

**Graziella Santana Feitosa Figueiredo**

**Caracterização bioquímica e estudo  
funcional *in vitro* da dipeptidil peptidase 8  
de *Trypanosoma cruzi***

**Brasília – DF  
2017**



Universidade de Brasília  
Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde  
Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro

# **Caracterização bioquímica e estudo funcional *in vitro* da dipeptidil peptidase 8 de *Trypanosoma cruzi***

**Graziella Santana Feitosa Figueiredo**

**Orientadora: Profa Dra Izabela M. Dourado Bastos  
UnB – Universidade de Brasília**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.**

**Brasília – DF  
2017**



Trabalho desenvolvido no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro – Instituto de Biologia da Universidade de Brasília com apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAP-DF.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

*Ayrton Senna*



Dedico aos meus queridos pais, Graciete Santana Feitosa e Washington Luiz Figueiredo dos Santos, aos meus avós, Maria José Feitosa e Abdoral José Santana (*In memoriam*). Às minhas tias, aos meus amados irmãos Lorena Paula Figueiredo e Diego Henrique Figueiredo, aos meus cunhados Raisia e Diego Bezerra e minhas sobrinhas Anna Laura Figueiredo Bezerra e a bebê ainda barriga na mamãe Raisia.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus, por me abençoar e me fazer forte todos os dias.

Aos meus pais que me proporcionaram uma vida com muito amor e incentivo para a realização desse e de muitos outros sonhos... Não sei como expressar a minha gratidão. A vocês toda felicidade do mundo. A minha mãe linda que além de tudo, tantas vezes fez questão de me acompanhar ao laboratório aos domingos à noite, aos feriados para me motivar, fazer companhia. Ela me ensinou a enfrentar qualquer problema, ter paciência pra não desistir no primeiro obstáculo...

À Universidade de Brasília – UnB, ao Instituto de Biologia - IB e a Faculdade de Ceilândia – FCE, dois *campi* onde tive oportunidade de aprender...

Ao Programa de Pós - Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde - PPGCTS pela oportunidade de realização do trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

À FAPDF pela concessão dos recursos financeiros para aquisição de reagentes e equipamentos

A minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Izabela Marques Dourado Bastos, obrigada pela oportunidade, todo seu empenho valeu a pena, hoje estou feliz por concluir esta etapa da minha vida e você foi fundamental, agradeço por tudo que me ensinou.

A minha co-orientadora Dr<sup>a</sup> Flávia da Silva Nader Motta, uma pessoa brilhante e esforçada. Obrigada por tantas contribuições, aprendizados, conselhos que você me proporcionou.

Ao Professor Dr. Jaime Martins Santana, pela oportunidade de conhecer e trabalhar em seu laboratório, pelas sugestões e ensinamentos que levaram às melhorias do meu trabalho. Obrigada!

Ao Dr. David Neves por seus ensinamentos, sugestões durante o meu doutorado, pela ajuda nos experimentos da dimerização e colaboração na ultracentrifugação.

A Professora Dr<sup>a</sup> Carla Nunes sempre com uma palavra amiga e acolhedora sempre se disponibilizando a contribuir conosco. Muito obrigada!

A Professora Glória pelas suas contribuições, por se disponibilizar a discutir comigo etapas importantes para ajudar no meu trabalho.

A Débora Torres, pela amizade e por me ensinar os primeiros passos na cultura e no laboratório.

A Natália Alves, pela ajuda, e dedicação em etapas importantes do trabalho.

Ao Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro por proporcionar um ambiente acolhedor, prestativo, obrigada pelos momentos de aprendizado, reflexão e diversão, sem vocês eu não teria chegado até aqui obrigada!

A Marta Rosa, Paula Santiago, Milene Andrade, Adriana, Débora, Aline Guimarães e Yanna obrigada pelo apoio, vocês são exemplos de mulheres fortes, inteligentes e bem humoradas. Adorei trabalhar perto de vocês, foi mais divertido e produtivo.

Camila Lasse, Clênia Azevedo, Luz Helena, Keyla Gonçalves e Natália Gil aqui os olhos se enchem lágrimas... A amizade de vocês foi fundamental nesse trabalho. Obrigada minhas amigas confidentes, conselheiras, psicólogas, pelos muitos momentos de descontração, reflexões pessoais e profissionais, ah... Vocês também são mulheres fortes, inteligentes e bem humoradas.

Amanda, Allan, Thuany de Moura e Carol Toledo obrigada pela amizade, conversas, debates e companheirismo principalmente nos expedientes noturnos.

Maria Beatriz, Kaio, Valmir, Álex, Luiza, Thales essa equipe vai longe... Nunca deixem de se maravilhar diante do conhecimento e sonhar com o melhor para o futuro de vocês. Obrigada por todos os momentos que me ajudaram.

Cissé Sow, Raquel Negreiros e Hugo pela amizade, por serem sempre atenciosos comigo, quando precisei discutir os experimentos antes de realizá-los, obrigada pela paciência em me explicar.

Tatiana, Rauciane, Jhonata, Iracyara Sampaio, Livia Nishino, Marina, Guilherme agradeço a vocês pelos momentos de descontração, conversas e auxílio nos experimentos.

Aos meus familiares, minha avó, meu pai, meus irmãos, às minhas tias, tios, primos, sobrinhas e cunhados. Aos meus amigos Iran Soares dos Santos, Tamille Farias e Dona Day, pessoas que acompanharam de perto esse longo desafio e facilitaram minha caminhada, seja com um gesto amigo, um conselho, um incentivo, um abraço. Muito obrigada!



## LISTA DE ABREVIATURAS

AMC	7-amino-4-metil-cumarina
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Etileno bis(oxi-etilenonitrilo) do ácido tetraacético
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	kilobase
pb	pares de base
PBS	Tampão fosfato
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
$V_{max}$	Velocidade Máxima
$K_{cat}$	Constante Catalítica
$K_i$	Constante de inibição
IC-50	Metade da concentração máxima inibitória
UTR	<i>Untranslated Regions</i>
LIT	<i>Liver Infusion Tryptone</i>
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
L6	Linhagem celular muscular murina
DTT	Ditiotreitol
NaCl	Cloreto de Sódio
N-Terminal	Amino-terminal da cadeia polipeptídica
CDS	<i>Coding DNA sequence</i>
CXCR-4	<i>Chemokine receptor type 4</i>
IL-4	Interleucina 4
GM1	monossialogangliosídeo



BENEFIT

*Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*



## SUMÁRIO

RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUÇÃO.....	15
DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	15
TRANSMISSÃO E CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS .....	16
EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	18
O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	20
Mecanismos moleculares de invasão do hospedeiro e resposta imune .....	22
Classificação e a cepa CI Brener.....	25
TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	25
Busca por novos alvos terapêuticos.....	27
A ESTRUTURA DA DIPEPTIDIL PEPTIDASE IV.....	29
Dipeptidil peptidases de microorganismos.....	33
O GENOMA DE <i>T. CRUZI</i> E SUA MANIPULAÇÃO PARA O ESTUDO DA FUNÇÃO GÊNICA .....	34
JUSTIFICATIVA.....	39
OBJETIVO .....	42
METODOLOGIA.....	44
OBTENÇÃO DA SEQÜÊNCIA TCCLB 510183.20.....	44
EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA DPP8T <sub>c</sub> RECOMBINANTE.....	44
PURIFICAÇÃO DA DPP8T <sub>c</sub> RECOMBINANTE.....	44
ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA DPP8T <sub>c</sub> .....	45
INFLUÊNCIA DO PH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA DPP8T <sub>c</sub> .....	45
PERFIL DE INIBIÇÃO DA DPP8T <sub>c</sub> .....	46
CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN ( $K_M$ ), VELOCIDADE MÁXIMA ( $V_{MAX}$ ), CONSTANTE CATALÍTICA ( $K_{CAT}$ ) E EFICIÊNCIA CATALÍTICA ( $K_{CAT}/K_M$ ).....	47



GEL FILTRAÇÃO .....	47
TESTES PARA AVALIAR A DIMERIZAÇÃO .....	47
ULTRACENTRIFUGAÇÃO .....	48
PRODUÇÃO DE ANTICORPOS.....	48
CONDIÇÕES DE CULTURA DA FORMA EPIMASTIGOTA.....	49
TRANSFEÇÃO DOS CASSETES PARA O NOCAUTE SIMPLES DO GENE DA DPP8Tc .....	49
CLONAGEM DE PARASITOS .....	49
EXTRATO DE PARASITOS .....	50
CURVA DE CRESCIMENTO.....	50
TESTE DE INFECÇÃO.....	51
WESTERN BLOT .....	51
IMUNOCITOLocalização POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .....	52
EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO .....	52
SOUTHERN BLOT .....	53
GRÁFICOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	54
RESULTADOS.....	56
ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS TcCLB 503637.30 e TcCLB 510183.20.....	56
EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA DIPEPTIDIL PEPTIDASE 8 DE <i>T. CRUZI</i> (DPP8Tc)57	
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA DPP8Tc.....	60
DIMERIZAÇÃO DA DPP8Tc .....	70
CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE POR MEIO DO NOCAUTE: .....	74
DISCUSSÃO .....	83
CONCLUSÃO .....	95
PERSPECTIVAS .....	97
REFERÊNCIAS .....	99

## RESUMO

A doença de Chagas é endêmica da América Latina, tem como agente etiológico o parasito *Trypanosoma cruzi*. O tratamento da doença durante a fase crônica gera diversos efeitos colaterais. Nesse sentido, as proteases de tripanossomatídeos têm sido investigadas na busca de novos alvos terapêuticos. A dipeptidil peptidase 8 de *Trypanosoma cruzi* (DPP8Tc) é uma enzima que faz parte das prolyl oligopeptidases, essa família possui membros com conhecida relevância médica, dentre elas está a enzima ortóloga DPPIV humana, cuja inibição é utilizada como uma das formas de tratamento da diabetes tipo II. A DPP8Tc, foi investigada neste trabalho por meio da caracterização bioquímica e por nocaute físico dos alelos do gene *dpp8tc* do parasito *T. cruzi* da cepa CL Brener. Os resultados obtidos indicam que a DPP8Tc é uma enzima dimérica, solúvel, ativa em tampão tris 50mM em pH situado entre 7,5 e 8,0 e melhora sua atividade com aditivos. A temperatura ótima para atividade enzimática situa-se em torno dos 28°C e substrato específico, Gly-Pro-AMC. Com o uso deste substrato, foram obtidos os parâmetros  $K_M$  de 10,78  $\mu\text{M}$ ,  $K_{cat}$  de  $1,67 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $V_{max}$   $4,6 \times 10^{-5} \mu\text{mol de AMC liberado/min}$  e  $K_{cat}/K_M: 1,55 \times 10 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Os inibidores clássicos de proteases exercem baixa inibição enzimática da DPP8Tc. Em contrapartida, os inibidores de DPPIV exercem maior taxa de inibição entre eles o IB-7, o mais potente, inibe em 96,59% da DPP8Tc, com constante de inibição ( $K_i$ ) de 8,2 nM. Outros inibidores da DPPIV apresentaram os seguintes ICs-50: KS (IV) com 95,47 nM, IB-4 com 484,9 nM e por último, KAll-23 com 2,7  $\mu\text{M}$ . A inibição enzimática ocorre principalmente por inibidores que possuem o grupo adamantil na sua composição química, semelhante à composição do inibidor vidagliptina da DPPIV humana. A atividade ótima ocorre em torno dos 28°C, temperatura requerida à sobrevivência da forma epimastigota, indicando potencial função no barbeiro. O nocaute simples do gene *dpp8tc*, diminuiu em 50% a atividade enzimática, em 20% a fluorescência e aumentou 2,9% a taxa de infecção do parasito DPP8Tc<sup>+</sup>. As diferenças existentes nas regiões UTRs 5' e 3' dos alelos do gene DPP8Tc, impediu o sucesso do nocaute duplo, sendo necessária a construção específica de um cassete direcionado para o nocaute do segundo alelo, visando conhecer por completo a função da DPP8Tc de *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

Chagas disease is endemic in Latin America, and has the parasite *Trypanosoma cruzi* as its etiological agent. Treatment of the disease during the chronic phase generates several side effects. In this sense, trypanosomatid proteases have been investigated in the search for new therapeutic targets. The dipeptidyl peptidase 8 of *Trypanosoma cruzi* (DPP8Tc) is an enzyme that is part of the prolyloligopeptidases, this family has members with known medical relevance, among them is the human orthologous enzyme DPPIV, whose inhibition is used as one of the forms of treatment of type diabetes II. DPP8Tc was investigated in this work through the biochemical characterization and physical knockout of the *dpp8tc* gene alleles of the *T. cruzi* parasite of the CL Brener strain. The results indicate that DPP8Tc is a soluble dimeric enzyme active in 50mM tris buffer at pH between 7.5 and 8.0 and improves its activity with additives. The optimal temperature for enzymatic activity is around 28°C and specific substrate, Gly-Pro-AMC. With the use of this substrate, KM parameters of 10.78 μM, Kcat of 1.67x10<sup>-3</sup> s<sup>-1</sup>, Vmax 4.6x10<sup>-5</sup> μmol of released AMC / min and Kcat / KM were obtained: 1.55x10<sup>4</sup>μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>. Classical protease inhibitors exert low enzymatic inhibition of DPP8Tc. In contrast, DPPIV inhibitors exert a greater inhibition rate among them, the more potent IB-7 inhibits in 96.59% of DPP8Tc, with inhibition constant (Ki) of 8.2 nM. Other DPPIV inhibitors showed the following ICs-50: KS (IV) with 95.47 nM, IB-4 with 484.9 nM and, finally, KAll-23 with 2.7 μM. Enzymatic inhibition occurs primarily by inhibitors that possess the adamantyl group in their chemical composition, similar to the composition of the human DPPIV vidagliptin inhibitor. The optimal activity occurs around 28°C, temperature required to the survival of the epimastigote form, indicating potential function in the barber. The simple knockout of the *dpp8tc* gene, decreased enzyme activity by 50%, fluorescence by 20% and the infection rate of the parasite DPP8Tc<sup>+</sup> increased by 2.9%. Differences in the 5' and 3' UTRs regions of the DPP8Tc gene alleles prevented the success of double knockout, necessitating the specific construction of a cassette directed to the knockout of the second allele, in order to fully understand the function of DPP8Tc from *Trypanosoma cruzi*.



# INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

### DESCOBERTA DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas foi primeiramente estudada pelo pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em 1907 em Minas Gerais, quando o pesquisador foi enviado por Oswaldo Cruz para prestar serviços em uma campanha contra a malária durante construção da estrada de ferro Central do Brasil. Por conta dos relatos da população, a respeito da presença de insetos que se abrigavam e se reproduziam nas frestas das paredes e telhados, Carlos Chagas investigou se haviam formas flageladas presentes na porção intestinal dos insetos hematófagos, tendo em vista que alguns animais silvestres apresentavam formas flageladas conhecidas como *Schizotrypanum cruzi* (CHAGAS, 1909).

Os insetos, conhecidos popularmente como barbeiros, estavam presentes em regiões urbanas próximas a áreas rurais e tinham hábitos noturnos. Obtiveram esse nome, pois sugavam sangue da face de habitantes de casas rústicas, como choupanas, pau a pique entre outras. As amostras coletadas dos insetos por Carlos Chagas foram analisadas na Fundação Oswaldo Cruz, onde foi conduzido testes de infecção *in vivo* em diversos tipos de mamíferos: macacos, cães, coelhos a fim de se estudar a transmissão da doença. Os macacos (*Calitrix penicilata*) foram os animais mais sensíveis aos parasitos, observados na circulação periférica dos animais, por sua vez os cães foram os menos afetados pela infecção. (CHAGAS 1909, KROPFF, 2009).

Os “barbeiros”, os agentes transmissores da infecção, são insetos hemípteros encontrados naturalmente nas Américas, se alimentam do sangue de animais silvestres. Os gêneros mais estudados dos barbeiros aos quais transmitem a doença de Chagas são: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, os quais pertencem a família Reduviidae, subfamília Triatominae. Existem ainda outros 15 gêneros conhecidos capazes de transmitir a infecção. Os triatomíneos infectados transmitem o *Trypanosoma cruzi*, um parasito flagelado da ordem kinetoplastida da família Tripanosomatidae, que pode infectar animais domésticos e silvestres e ser transmitido por cerca de 140 espécies de hemípteros (RASSI et al. 2012).

Os barbeiros se adaptaram com sucesso aos ambientes domiciliares humanos, reproduzindo-se neles e alimentando-se do sangue de seus moradores,

ocasionando transmissão do agente etiológico da doença de Chagas pela via tradicional de propagação da infecção. A urbanização dos ambientes de mata transformou o habitat natural dos insetos silvestres em áreas rurais (BELLO CORASSA et al. 2016), e a doença foi progressivamente se alastrando em populações rurais pela América Latina, chegando a afetar milhões de habitantes causando morbidade e então se tornando um fator preocupante de saúde pública e social.

## TRANSMISSÃO E CONTROLE DA DOENÇA DE CHAGAS

A tentativa de contenção da doença em 1940 ocorreu pelo borrifamento de inseticidas a base de organocloroquina em grandes áreas urbanas da Argentina, Brasil, Venezuela e Chile. A cidade brasileira pioneira no combate aos vetores foi São Paulo, sendo que os programas nacionais de combate ao vetor começaram a ser realizado somente após 1970 (CUCUNUBÁ et al. 2016).

Em 1983, os programas de controle da doença de Chagas foi implementado com sucesso em todas as áreas endêmicas. Os municípios conseguiram reduzir as taxas de infecções no ano 2000, restando apenas alguns estados em que havia focos do inseto, situados no Goiás, sul do Tocantins, Bahia e Piauí (VINHAES & DIAS 2000). A melhoria das moradias também representou importante papel no controle dos vetores. Em 1989, os métodos de triagem sangüínea permitiram melhor controle da infecção via transfusão sanguínea e, em 1991, uma iniciativa do Cone Sul foi criada para auxiliar no combate de triatomíneos (BELLO CORASSA et al. 2016). Ao final do século XX as populações dos vetores do *T. cruzi* foram substancialmente reduzidas interrompendo a transmissão da doença aos domicílios rurais (DIAS et al. 2002). Em 2006, houve a certificação brasileira da interrupção da transmissão da infecção pelo vetor *Triatoma infestans*, no entanto, a transmissão vetorial ainda persiste numa proporção de 6,4% (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2015).

A via vetorial tem representado menor proporção de infecção nos últimos anos (MINISTÉRIO DE SAÚDE 2015). Em contrapartida, a transmissão oral tem sido responsável pelo surgimento de novos casos anuais. A infecção ocorre pela ingestão de sucos e/ou alimentos contaminados com *T. cruzi*. Em Guarapari, no Espírito Santo, em foi reportado um caso fatal da doença na fase aguda, adquirido

por transmissão oral (DARIO et al. 2016). Em Salvador, foram encontrados triatomíneos em regiões de periferia entre 2007 e 2011 nos ambientes domiciliares, de mata e peridomésticos. Os insetos estavam infectados por *T. cruzi*, se alimentavam do sangue de pássaros, marsupiais e ruminantes representando risco potencial de infecção oral e vetorial dos moradores dessas áreas (RIBEIRO et al., 2015).

Entre 2000 e 2013, a maioria dos casos confirmados no Brasil de doença de Chagas ocorreu na Região Norte representando 91% dos casos, sendo que destes 74,7 % ocorreram no estado do Pará (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2015). Dos 233 casos relatados no estado do Pará, Maranhão e Amapá entre 1998 e 2005, 78% foram adquiridos pela via oral (PINTO DIAS, 2006). O tempo de incubação da doença na fase aguda adquirida via oral é de 7 a 22 dias enquanto que o tempo de incubação via vetorial é de 5 a 15 dias e via transfusional é de 30 a 40 dias (SANIT et al., 2016). Os sintomas da infecção oral são semelhantes ao da infecção aguda adquirida via inoculação vetorial. Não há sinal externo visível na infecção oral, pode ocorrer hemorragia decorrente da entrada do parasito na mucosa digestiva (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

A transmissão vertical pode ocorrer, pois o parasito atravessa a barreira placentária. A transmissão congênita do *T. cruzi* depende do sistema imune materno, fator ambiental, genético e placentário, que podem modular o sistema imune fetal, podendo, em alguns casos ocorrer o aborto e em casos não letais o recém nascido pode nascer com baixo peso, prematuro ou com hepatoesplenomegalia (CARLIER; TRUYENS, 2015). Nas regiões endêmicas, estima-se que 5% dos recém-nascidos de mães portadoras de Chagas da fase crônica, adquirem a doença (CARLIER et al., 2015). Os casos de doença de Chagas de origem congênita totalizam 0,4% dos casos em todo Brasil (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2015).

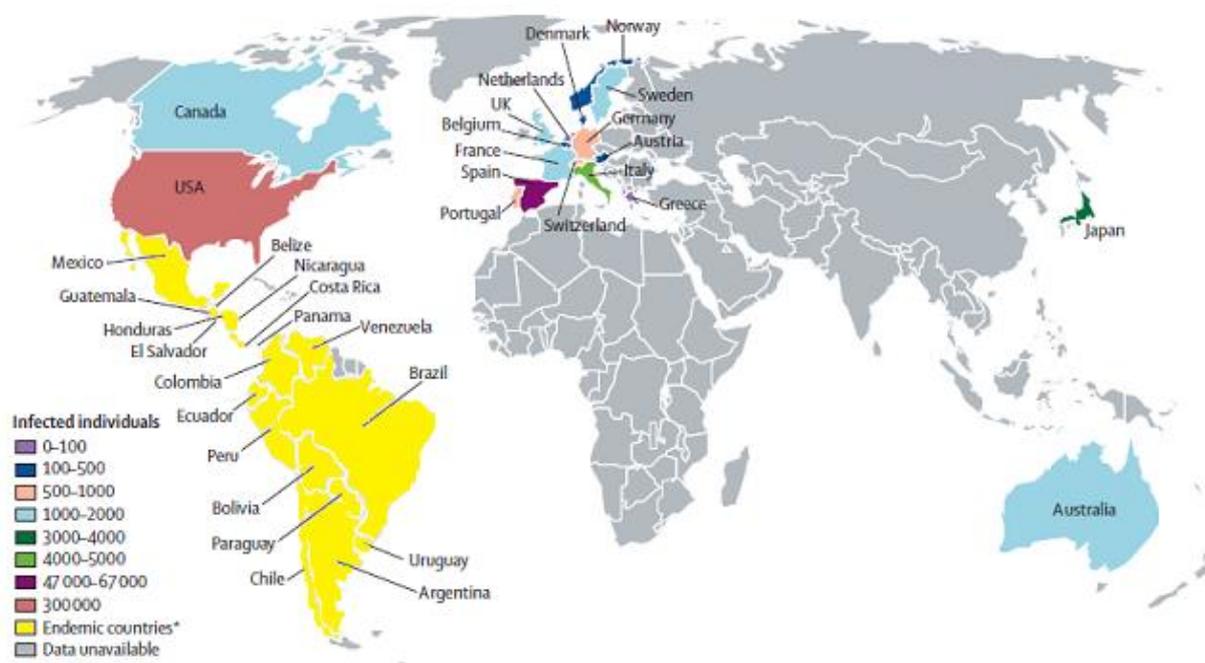
Em camundongos fêmeas imunossuprimidas que cruzaram com camundongos machos na fase aguda da infecção foi visto que há um risco potencial de transmissão do parasito por relação sexual, uma vez que formas infectivas podem ser encontradas na maioria dos tecidos, inclusive no reprodutivo (MARTIN et al., 2015). Outro estudo, realizado em camundongos machos e fêmeas na fase

crônica da doença revelaram parasitos presentes nos tecidos e no sangue dos parceiros sexuais dos animais estudados, confirmando experimentalmente que a infecção por *T. cruzi* pode ocorrer sexualmente (RIBEIRO et al., 2016). Por fim, a doença de Chagas ainda pode ser transmitida por meio de acidentes laboratoriais por meio de objetos perfuro-cortantes contaminados, ingestão acidental, contato do parasito com as mucosas (COURA; DE CASTRO, 2002).

## EPIDEMIOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é globalmente distribuída, a *World Health Organization* (2016) estima que entre 6-7 milhões de pessoas estejam infectadas com o *T. cruzi* o que traz grandes preocupações com a saúde pública mundial. A doença é endêmica na América Latina, dados paleológicos sugerem que a tripanossomíase surgiu na região Andina, e em outros pontos do globo antes da separação dos continentes, chegando à América do Sul cerca de 7-10 milhões de anos atrás (AUFDERHEIDE et al, 2004).

Existe a hipótese de que os primeiros seres humanos adquiriram formas ancestrais do *T. cruzi* por meio de morcegos infectados após o repasto dos barbeiros. Esses barbeiros se alimentaram do sangue de colonizadores do Deserto do Atacama, desde essa época aos dias atuais, os parasitos têm co-evoluído com seres humanos (STEVERDING, 2014; WHO, 2016). As regiões do mundo que mais possuem pessoas infectadas é a América Latina, e o Sul dos Estados Unidos (Figura 1). Devido à sua localização endêmica, a enfermidade também é conhecida como Tripanossomíase Americana, embora em alguns países europeus, norte americanos e asiáticos tenham sido recentemente registrado pela Organização Mundial de Saúde na lista dos países que possuem casos da Doença de Chagas (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).



**Figura 1. Distribuição geográfica da Doença de Chagas.** Adaptada da fonte: RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010.

Nos Estados Unidos da América, e em países europeus, as infecções recentes por *T. cruzi* decorrem de intensa imigração de habitantes dos locais endêmicos da doença para os países não endêmicos e de casos não reportados de infecções autóctones (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010; HSU et al., 2016).

A ocorrência da doença de Chagas na América Latina pode ser agrupada em 4 grandes grupos de países (COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014):

Grupo I - Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Equador, Honduras, Paraguai, Peru, Uruguai, Venezuela. Nestes países ocorrem ciclos domésticos e peridomésticos, a infecção é predominantemente humana, com cardiomiopatias e ausência ou raras formas digestivas. O vetor de transmissão nesses países é o *T. infestans*. Nestes países houve programas para eliminação do *T. infestans* e *Rhodnius prolixus* (COURA & BORGES-PEREIRA 2010; COURA; VIÑAS; JUNQUEIRA, 2014; CARLIER et al. 2015).

Grupo II – Colômbia, Costa Rica e México. Nestes países ocorrem ciclos domésticos e peridomésticos, há falta de programa para eliminação do vetor e as

manifestações clínicas são caracterizadas pela cardiomiopatia comum na fase crônica da Doença de Chagas.

Grupo III –El Salvador, Guatemala, Nicarágua e Panamá. Ciclo de vida doméstico e peridoméstico, há poucas informações clínicas sobre casos humanos e ações de controles na Nicarágua e Guatemala.

Grupo IV –Antilhas, Barramas, Belize, Cuba, Estados Unidos, Guiana, Guiana Francesa, Haiti, Jamaica e Suriname. Raros casos de humanos autóctones e poucas informações clínicas, infecções de imigrantes dos Estados Unidos, transmissão via transfusão de sangue, exceto os Estados Unidos onde é bem conhecido o perfil dos doadores de sangue.

Na Europa, a presença da doença de Chagas ocorre em nove países: Bélgica, França, Alemanha, Itália, Holanda, Portugal, Espanha, Suíça, e Reino Unido. Cerca de 4.290 pessoas foram diagnosticadas nesses países, na maioria dos casos são de Doença de Chagas congênita proveniente de nascimentos cujas mães eram imigrantes da América Latina. Embora tenham sido diagnosticados 4,290, estima-se que hajam entre 68.000 a 120.000 casos não documentados de imigrantes infectados (BASILE et al., 2011). No Japão existem cerca de 4.500 pessoas infectadas todos imigrantes advindos das regiões endêmicas principalmente do México (SORIANO-ARANDES et al., 2016).

A Austrália e Nova Zelândia tem recebido grande número de imigrantes advindos da América Latina, mas pelo fato de não haver um programa de prevenção da doença de Chagas congênita não se tem a estimativa exata de infectados, porém, nesses países supõe-se existam 2100 pessoas infectadas (SORIANO-ARANDES et al., 2016).

### O *TRYPANOSOMA CRUZI*

O ciclo de vida do *T. cruzi* se inicia quando o barbeiro, ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado, suga as formas tripomastigotas infectivas presentes na circulação. Muitas dessas formas, ao atingir estômago do inseto, morrem com o processo digestivo, mas ainda assim, alguns parasitos sobreviventes sofrem metacicloênese, a mudança da forma tripomastigota para forma epimastigotas. Essa última é a forma proliferativa e não infectiva que, ao atingir o

intestino médio posterior do barbeiro, diferencia-se em tripomastigota metacíclico, forma infectiva presente das fezes do inseto (SORIANO-ARANDES et al., 2016) (Fig. 2). A alimentação do barbeiro é hematófaga e, após seu repasto, o barbeiro possui um comportamento habitual de deposição de fezes próxima a região onde inseriu a probóscide para sugar o sangue do mamífero. O hospedeiro ao se coçar, promove a entrada das formas metacíclicas presentes nas fezes as quais se difundem pela corrente sanguínea do hospedeiro. Essas formas invadem os tecidos e se transformam em amastigota, forma proliferativa, que tomam o citoplasma das células hospedeiras e, após 90 à 120 horas, são novamente liberadas na corrente sanguínea na forma tripomastigota infectiva.

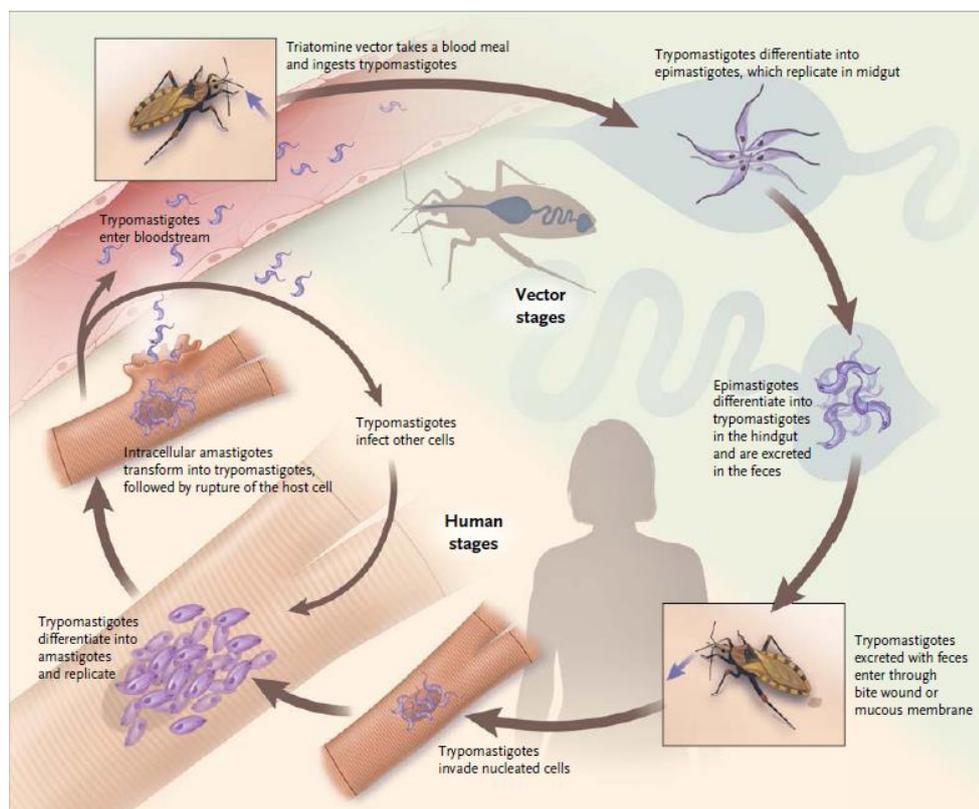


Figura 2. Ciclo de vida do parasito *Trypanosoma cruzi*. Fonte: BERN et al, 2011

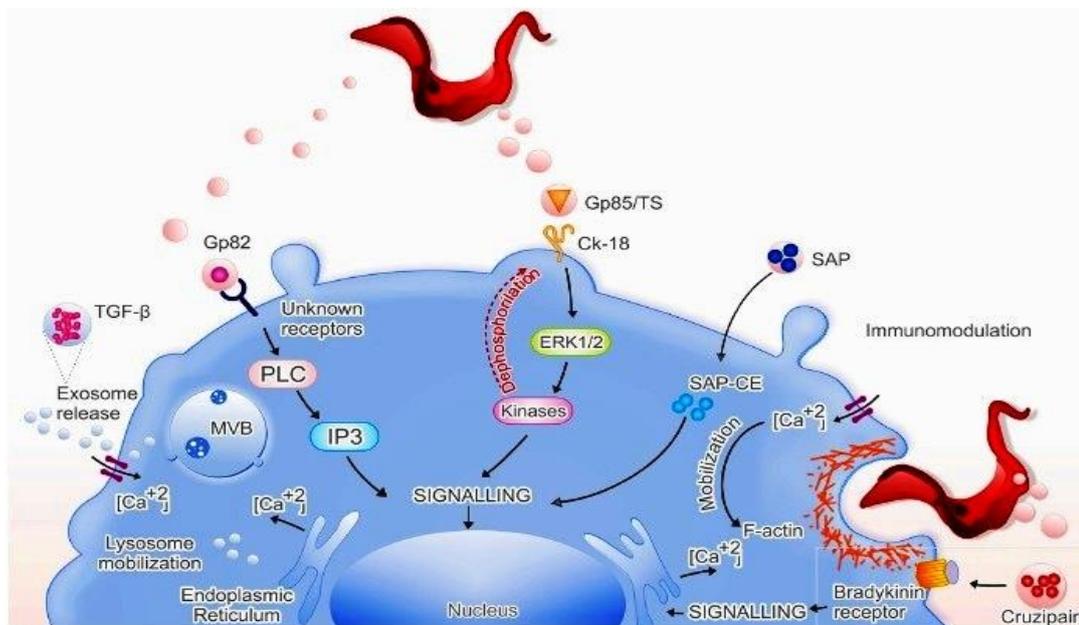
A doença de Chagas se desenvolve em duas fases: aguda e crônica. Ao ser infectado pela pálpebra, o indivíduo desenvolve um edema conhecido como sinal de Romaña. Ao ser infectado em outras regiões do corpo, o indivíduo pode desenvolver o chagoma de inoculação. A fase aguda ocorre durante as 8 primeiras semanas de

infecção, pode apresentar sintomas inespecíficos ou leves. É caracterizada pela alta taxa de parasitas presentes na circulação (BRENER, 1997). Os sintomas característicos são: mal-estar, febre, dor no corpo, dor de cabeça, aumento dos linfonodos, dificuldade em respirar entre outras que se confundem com outras enfermidades. (DSHS, 2016). Entre os sintomas clínicos, pode ocorrer disfunção ventricular com perda da ejeção em 50%, desenvolvimento de arritmia, megaesôfago, megacólon, hipertrofia e insuficiência cardíaca (ANTUNES et al., 2016; WHO, 2016). A forma indeterminada da doença de Chagas é caracterizada pela ausência de sintomas clínicos, radiológicos, e eletrocardiográficos, acometimentos digestivos e cardíacos. Porém os pacientes podem desenvolver anormalidades cardiovasculares. Após 10-30 anos, cerca de um terço dos pacientes podem desenvolver a forma cardíaca da doença (RIBEIRO; ROCHA, 1998).

### **Mecanismos moleculares de invasão do hospedeiro e resposta imune**

A saliva dos artrópodes possui moléculas bioativas que contrariam a resposta inflamatória e imune do hospedeiro. O Sialoma de *R. neglectus*, um dos vetores hematófagos transmissores do *T. cruzi*, revelou, por espectrometria de massa 636 CDS de proteínas, incluindo serino proteases, lipocalinas entre outras moléculas, demonstrando que há uma complexa relação entre os vetores e o hospedeiro vertebrado já no início da interação (SANTIAGO et al., 2016). Nos tripanossomatídeos, as proteases atuam em diversas funções, como: invasão da célula hospedeira, progressão do ciclo celular, catabolismo de proteínas, aderência celular e modulação da resposta imune do hospedeiro. No curso da infecção as microvesículas e as glicoproteínas presentes na superfície dos tripomastigotas metacíclicos, dentre elas as GP82, SAP, GP90, exercem papéis importantes. A GP82 atua no mecanismo de invasão celular promovendo a liberação de  $Ca^{2+}$ , a família SAP possui um domínio rico em três resíduos, serina, alanina e prolina, envolvido na invasão celular, e a GP90 regula negativamente a internalização do parasito (Fig.3). Nesse processo contribuem ainda as GP35/50, GP-30, mucinas e transialidases (BAYER-SANTOS et al., 2013).

Em formas tripomastigotas provenientes de cultura, o exoproteoma demonstrou que a maioria das proteases identificadas são glicoproteínas de superfície e transialidases envolvidas na interação parasito-hospedeiro. As várias proteínas de superfícies: Tc80, Tc85, POP, Oligopeptidase B, cruzipaina e Tc1 auxiliam na invasão da matrix extracelular e na invasão das células hospedeiras.



**Figura 3. Proteínas envolvidas no mecanismo de invasão ao hospedeiro.**  
Adaptada da fonte: Borges et al 2016.

A POPTc 80 é responsável pela hidrólise do colágeno, as Tc85, Tc-1 e GP83 realizam a aderência (BORGES et al., 2016) . A oligopeptidase B produz a molécula precursora da sinalização de  $Ca^{2+}$ . O uso de inibidores diminui a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular impedindo o recrutamento de lisossomos que participarão da formação da vesícula parasitófora. A Tc80 possui atividade para colágeno tipo I e tipo IV, a sua função está relacionada com a invasão da célula hospedeira (KLEMPA; GOLDBERG, 2002). A cruzipaina mantém a justaposição do parasito confinado dentro da célula provocando a resposta de cálcio estimulada pelo quinogenio e bradicinina, a mobilização do cálcio intracelular pela célula hospedeira ocasiona a invasão (BORGES et al., 2016).

Durante a invasão pelo tripomastigota metacíclico, a liberação de GP83 induz a regulação negativa da laminina  $\gamma$ -1 pela célula hospedeira, a galectina-3 é responsável pelo reforço da adesão da laminina pelo parasito (MOODY; OCHIENG; VILLALTA, 2002). O receptor CXCR-4 se liga a p21, que atua nas formas infectivas, realiza justaposição e ativa a cascata de sinalização que leva a mobilização do cálcio, a fosforilação de polipeptídeos do parasito, ativação da Rac 1 e formação de ondas de actina, com microdomínios enriquecidos por colesterol e GM1, culminando com a internalização do parasito (BORGES et al., 2016).

Os tripomastigotas da corrente sanguínea, podem se transformar em amastigotas extracelulares e executar a via alternativa de infecção. O rompimento de células infectadas ocasiona a liberação dos amastigotas intracelulares. Tanto os amastigotas extracelulares quanto os intracelulares contribuem para infecção através da formação de estruturas ricas em actinas (PROCÓPIO; BARROS; MORTARA, 1999). A proteína quinase D1 fosforila e modula a atividade da cortactina, um regulador da dinâmica de actina nas células hospedeiras. A infecção por amastigotas extracelulares é influenciada pela superexpressão ou depleção de cortactina e PDK1 em células não fagocíticas (BONFIM-MELO et al., 2015). A infecção por amastigotas envolve a presença do epítipo Ssp4 que confere aderência em célula hospedeira (VIEIRA DA SILVA et al., 2006).

O tripomastigota infectivo escapa da lise, pois possui moléculas regulatórias que atuam no sistema complemento do hospedeiro. Os parasitos internalizados escapam pela liberação de várias moléculas de superfície com propriedades antioxidantes. O progresso da infecção ainda envolve estratégias do parasito que são combatidas pela resposta imune humoral, e pela indução da ativação do macrófago pela IFN- $\gamma$ . Os padrões de reconhecimento (PRRs), dentre eles os receptor toll-like 2, 4, 7 e 9 (CAMPOS et al., 2001), o receptor do domínio oligomerização de ligação aos nucleotídeos (NOD) I, NATCH, e o receptor NLRP3, realizam a detecção do parasito por células dendríticas e macrófagos (GONÇALVES et al., 2013). A sinalização ineficiente dos PRRs auxilia na persistência do parasito, contudo, a regulação da resposta imune efetora ocorre pela senescência do linfócito TCD4 e TCD8 que infiltram o músculo estriado. A migração

do parasito para esse tecido promove a sobrevivência, pois a resposta citotóxica no tecido do miocárdio é ineficiente (ÁLVAREZ et al., 2014).

No hospedeiro, ocorre o recrutamento das células do sistema imune, indução da IL-4 para região da inflamação promovendo a resposta Th2, e diminuição da formação de vasos sanguíneos em indivíduos não resistentes ao *Trypanosoma cruzi* (TEIXEIRA et al., 2015). A resistência do hospedeiro à infecção por *T. cruzi* é correlacionada a liberação de citocinas pró-inflamatórias, IL-12, IFN- $\gamma$ , e a produção local de proteína quimiotática de macrófago (MCP-1), proteína inflamatória de macrófago, (MIP-1 $\alpha$ ), e (MIP-1 $\beta$ ), proteína induzível-10 (IFN- $\gamma$ ) e regulação da expressão normal de célula T, (RANTES), que ativam a síntese de óxido nítrico responsável pela eliminação dos parasitos (DOS SANTOS et al., 2014).

### **Classificação e a cepa CI Brener**

O *Trypanosoma cruzi* é classificado em discretas unidades de tipagem (DTUs) que partiram de duas grandes linhagens a *T. cruzi* I e *T. cruzi* II. A classificação foi baseada similaridades em isoenzimas e marcadores moleculares 24Sr DNA e mini-éxons. As duas linhagens, por sua vez foram classificadas 6 DTUS, distintos: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV e TcVI. A TcI foi derivada da linhagem *T. cruzi* I e a *T. cruzi* II deu origem aos demais DTUs baseados na proximidade genética verificada por múltiplos marcadores (TIBAYRENC, 2003).

### **TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS**

A quimioterapia da Doença de Chagas é realizada com medicações antitripanocidas. O benzonidazol, desenvolvido pela Roche em 1966, é indicado para tratamento de crianças, para períodos de reativação da doença decorrente da imunossupressão e durante estágios iniciais da fase crônica (WHO, 2016). O tratamento da doença é recomendado durante a fase aguda, pois nessa fase há mais resultados significativos de cura e melhoria da qualidade de vida. A avaliação do tratamento é feita por sorologia quantitativa, hemaglutinação, imunofluorescência, ensaio imuno-enzimático (ELISA), reação em cadeia da polimerase (PCR), exame parasitológico de sangue periférico e xenocultura (CANÇADO, 2002).

O nifurtimox, produzido pela Bayer em 1970, também é uma medicação usada na quimioterapia da doença de Chagas, no entanto, teve sua produção

cancelada em 1997 por falta de demanda (STEVERDING, 2014). Outro composto que foi bastante utilizado para combater as formas infectivas de *T. cruzi* em bolsas de sangue, foi o Cristal violeta em 1953, foi amplamente utilizado nos bancos de sangue de regiões endêmicas para eliminação de parasitos durante as transfusões (STEVERDING, 2014).

O tratamento da doença de Chagas com benzonidazol mesmo em adultos assintomáticos reduz a progressão da doença para fase crônica. Os resultados positivos do tratamento são dependentes da idade do paciente e da dose ministrada, os indivíduos mais jovens tendem a sofrer menos os inúmeros efeitos colaterais do medicamento. As pessoas que sofrem de insuficiência renal ou hepática não devem consumir o benzonidazol uma vez que o metabolismo do medicamento é principalmente realizado pelo fígado (PEREZ-MOLINA et al., 2009).

Em pacientes tratados com benzonidazol em regiões não endêmicas, pouco mais que 40% apresentaram ao menos uma reação adversa. A frequência de ocorrência de reações adversas mais severas é baixa, em torno de 8% dos pacientes, no entanto, o acometimento do paciente ocorre de forma muito debilitante podendo causar seqüelas (CARRILERO et al., 2011). Na fase crônica, a medicação tem pouco efeito positivo e muitos efeitos adversos, sendo os principais: distúrbios gastro-intestinais, anorexia, toxicidade cutânea, neuropatia periferal, anormalidades no fígado que podem levar ao paciente à descontinuidade do uso da medicação. Por esses motivos a eficácia do tratamento durante a fase crônica é duvidosa. Em estudo realizado com pacientes apresentando a forma aguda, que foram tratados com benzonidazol, 76% obtiveram a cura enquanto que os tratados na fase crônica apenas 8% foram curados. Os pacientes da fase crônica podem apresentar muitos tecidos infectados com a forma amastigota proliferativa o que dificulta a eliminação do *T. cruzi* pela medicação (CANÇADO, 2002). Além disso, o uso prolongado dos medicamentos pode levar a resistência de algumas cepas de *T. cruzi* (FILARDI; BRENER, 1987).

A combinação de medicamentos como benzonidazol e itraconazol está em fase experimental e pode melhorar a eficácia do tratamento auxiliando na eliminação do benzonidazol (CANÇADO, 2002). A associação das duas medicações permite a redução da quantidade de parasitemia por parte do benzonidazol, e em seguida, o

itraconazol atua melhorando a farmacocinética do benzonidazol e prevenindo a musculatura cardíaca (MARTINS et al., 2015). A medicação usada para tratamento da tuberculose, o SQ109, mostrou-se eficiente na atividade antitripanocida e com pouco efeito na hemólise da medula óssea vermelha (VEIGA-SANTOS et al., 2015).

O estudo BENEFIT, foi realizado por um comitê que reuniu cinco países para avaliar a interrupção da tripanossomíase durante a fase crônica da doença de Chagas com o uso do benzonidazol. Os resultados obtidos demonstraram que a quimioterapia com o medicamento não traz benefícios para a contenção da progressão da doença em pacientes que já desenvolveram a cardiomiopatia (RASSI, MARIN-NETO, RASSI, 2017).

Em decorrência da falha da quimioterapia da doença na fase crônica com os dois principais medicamentos, nifurtimox e benzonidazol, tem se buscado por novas alternativas terapêuticas. Dentre as moléculas estudadas na busca de novos alvos encontram-se as proteases. Essas enzimas executam a regulação de vários processos biológicos pela hidrólise de ligações peptídicas, causando inativação ou ativação de substratos fisiológicos essenciais para o metabolismo e sobrevivência em eucariotos, procariotos, vírus e archeas e sendo vital para sobrevivência e sucesso dos seres vivos (HEDSTROM, 2002; MONOD, 2008). As proteases são classificadas de acordo com a molécula presente no seu sítio ativo, dessa forma podem ser: serino, metalo, cisteíno, treonino, aspártico e glutâmico proteases.

### **Busca por novos alvos terapêuticos**

A cruzipaína é uma cisteíno protease validada como alvo terapêutico no tratamento da doença de Chagas. Na cepa CL Brener, os inibidores dessa cisteíno protease mostraram um perfil de inibição na escala de 0,1 $\mu$ M à 1  $\mu$ M e baixa toxicidade, demonstrando um potencial alvo farmacológico (BURTULOSO et., 2017). Outras proteases da classe das serino proteases, como a oligopeptidase B possui função importante na invasão celular. A POPTc 80 degrada colágenos I e IV e POPTb peptídeos ativos (BASTOS, 2013), por executarem funções importantes no mecanismo de invasão ao hospedeiro, as serino proteases representam grande potencial para descoberta de novos alvos.

O parasito *Trypanosoma cruzi* contém uma serino protease homóloga a Dipeptidyl peptidase IV humana. Essa enzima possui um grande destaque na indústria farmacêutica, é uma serino-protease envolvida na regulação de hormônios pancreáticos glucagon-símile (GLP-1) e do peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP). A DPPIV hidrolisa estes hormônios em dipeptídeos na porção N-terminal diminuindo a biodisponibilidade pós-prandial e durante o jejum prolongado do organismo (MENTLEIN, 1999).

Em seres humanos, apenas 2% das proteínas presentes são proteases que são codificadas por cerca de 500 genes (HEDSTROM, 2002; MONOD, 2008). Deste total, em menor número estão as proteases que clivam o aminoácido prolina e muitas dessas enzimas são consideradas de importância médica com potencial função farmacológica. Os camundongos nocauteados para o gene DPPIV se tornaram resistentes a obesidade e a hiper-insulinemia realizando mais gasto energético e mantendo-se mais magros quando alimentados com dieta rica em calorias, enquanto os camundongos selvagens demonstraram maior ganho de peso. Os níveis plasmáticos de insulina foram cerca de quatro vezes maior do que os indivíduos nocauteados, demonstrando que a depleção da DPPIV melhora a sensibilidade à insulina, decorrente aumento dos níveis de GLP-1 e da ausência da função da DPPIV (CONARELLO et al., 2003).

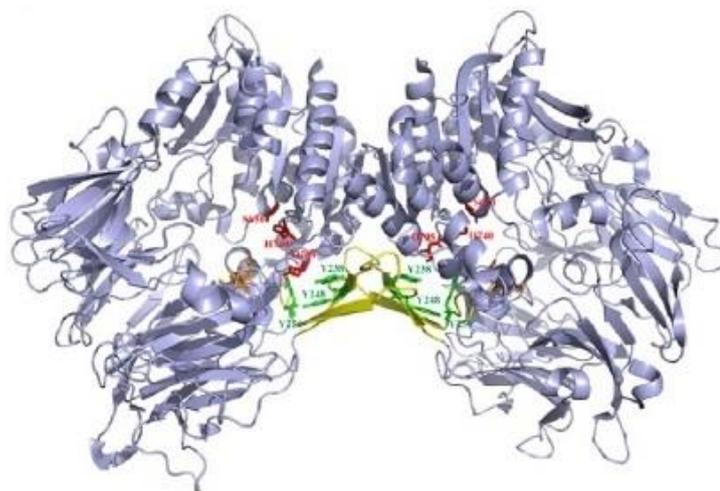
Ao apresentar relevante função na homeostase da glicose, a DPPIV foi intensamente estudada e se tornou alvo do tratamento da diabetes tipo II por meio do uso de inibidores específicos. A inibição com sitagliptina reduziu o ganho de peso de camundongos que consumiam dieta rica em calorias, promovendo a significativa redução da massa gorda, melhoria da homeostase da glicose e redução da taxa de hemoglobina glicada (LAMONT; DRUCKER, 2008), abrindo campo para o desenvolvimento de inúmeros inibidores. A DPPIV, além de estar envolvida na glicorregulação hormonal, é conhecida por atuar no metabolismo de colágenos, ativação das células T, patologias do sistema imunológico, clivagem da substância P, na regulação cardiovascular pela degradação do neuropeptídeo Y (NPY) e clivagem do fator estimulante de colônias de macrófagos, entre outros substratos (MENTLEIN, 1999; BJELKE et al., 2006).

As recentes descobertas sobre as funções da DPPIV mostraram que a protease atua inclusive como adipocina, peptídeos e proteínas que são liberados normalmente pelo tecido adiposo. No entanto, tornam-se desreguladas com o espessamento do tecido adiposo representando um link entre a obesidade e a resistência a insulina. As DPPs são potenciais alvos para descoberta de novas moléculas inibitórias bem como, a produção de novos fármacos para terapia de doenças crônicas (LAMERS et al., 2011).

Com relação à classificação da enzima, as DPPs pertencem a família S9B - Família Prolil Oligopeptidase, clivam ligações X-Pro, ou seja, com preferência por prolina ou alanina na penúltima posição, sempre a partir da região N-terminal dos peptídeos (WAGNER et al., 2016). A família POP é composta pela dipeptidil peptidase IV, proteína de ativação de fibroblasto (FAP), a DPP8, a DPP9, a DPP2 e a prolilcarboxipeptidase (WAUMANS et al., 2015). A família S9B reúne proteínas homodiméricas, sendo as DPPIV, FAP, DPP8 e DPP9 proteases que possuem características diméricas com atividade enzimática. O estudo da estrutura e função da DPPIV pode auxiliar no entendimento das funções biológicas bem como ajudar a compreender a regulação das suas proteínas homólogas e ortólogas (WAUMANS et al., 2015).

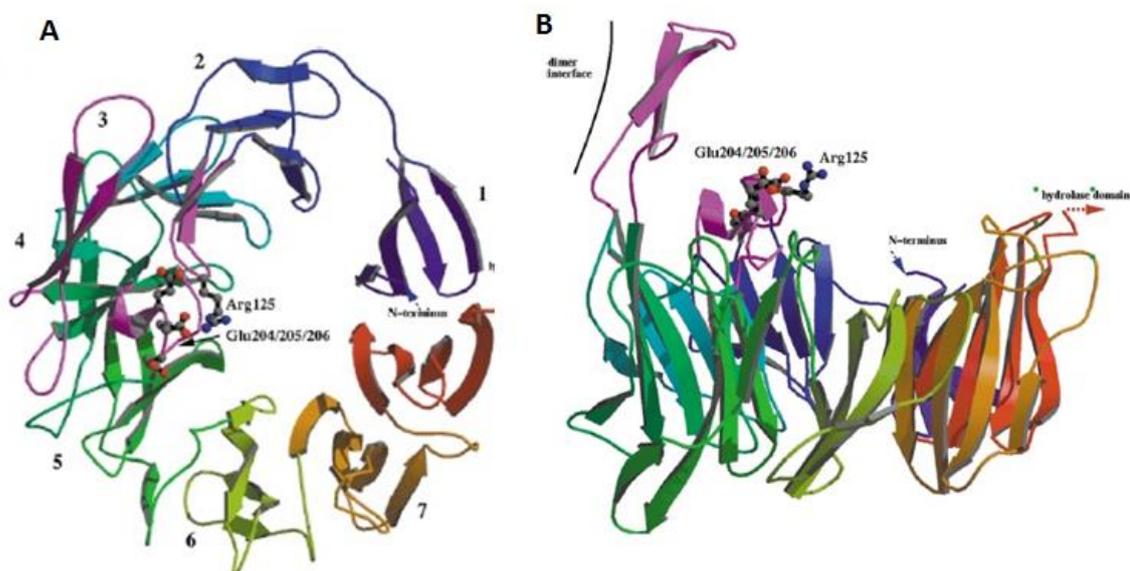
#### A ESTRUTURA DA DIPEPTIDIL PEPTIDASE IV

A DPPIV apresenta-se em duas versões, uma de proteína de membrana e outra citoplasmática. A DPPIV de membrana é glicosilada e contém uma pequena cauda citoplasmática de 1-6 aminoácidos e um domínio denominado domínio transmembrana (TMD), contendo 7-28 aminoácidos, não se liga ou cliva aminoácidos bloqueados na posição P2 da porção do N-terminal, atuando exclusivamente como dipeptidil peptidase (HONG; DOYLE, 1988). O domínio catalítico encontra-se na porção extracelular, possui 29-766 aminoácidos e contém a tríade catalítica Ser<sup>630</sup>, Asp<sup>780</sup>, e His<sup>740</sup> (Figura 4) identificada por mutagênese sítio-dirigida (DAVID et al., 1993). O ectodomínio da DPPIV é homodimérico e requer dimerização para atividade enzimática (ENGEL et al., 2003; CHIEN et al., 2004).



**Figura 4. Enzima Dipeptidil Peptidase IV.** É formada por um domínio  $\alpha/\beta$  – hidrolase e um domínio  $\beta$ -proppeller com o sítio ativo localizado entre eles. A face dimérica contém o loop C-terminal do domínio hidrolase e o loop  $\beta$ -proppeler. Adaptada da fonte: CHUNG et al., 2010.

O domínio extracelular da DPP-IV consiste em 12 hélices denominadas  $\alpha/\beta$  – hidrolase e um domínio  $\beta$ -proppeller com oito repetições folhas-  $\beta$  das quais quatro são antiparalelas. O sítio ativo está localizado entre o  $\alpha/\beta$  – hidrolase e o  $\beta$ -proppeller, bem próximo à interface dimérica (Figura 4). Essa organização contendo duas folhas  $\beta$  a mais no  $\beta$ -proppeler (Figura 5) contribui para funções importantes: formar parte da interface dimérica e formação de uma pequena hélice contendo dois resíduos Glu com função de reconhecimento e ligação ao N-terminal dos substratos (THOMA et al., 2003; CHIEN et al., 2006). As interações ocorrem por meio do domínio  $\alpha/\beta$  – hidrolase, hélice  $\alpha$ -E, folha  $\beta$ -8 e hélice  $\alpha$ -F, principalmente com resíduos hidrofóbicos. O loop C-terminal possui 50 aminoácidos que envolvem duas  $\alpha$ -hélices que englobam os aminoácidos 713-725 e 745-763 e uma folha- $\beta$  que vai do aminoácido 726 ao 744 (ENGEL et al., 2003; THOMA et al., 2003)



**Figura 5. Organização dos domínios da DPPIV.** O domínio  $\beta$ -proppeller contém oito repetições folhas-  $\beta$  das quais quatro são antiparalelas. A: Domínio  $\beta$ -proppeler; B: organização do  $\beta$ -proppeler contendo motivo Glu envolvido na formação da interface dimérica. Adaptada da fonte THOMA et al. 2003.

A face dimérica contém dois loops o C-terminal do domínio hidrolase e o loop  $\beta$ -proppeler que se estende da segunda até quarta folha do domínio  $\beta$ -proppeller. A histidina 740 do sítio catalítico é bem próxima à hélice  $\alpha$ -F e a folha  $\beta$ -7 que fazem parte da face dimérica por isso o rompimento do dímero afeta a atividade catalítica. As mutações no C-terminal rompem os dímeros ocasionando a perda da atividade enzimática (CHIEN et al., 2004; TANG et al., 2011). Na DPPIV, 6% da área total solúvel de cada subunidade é situada dentro da interface dimérica (THOMA et al., 2003).

Os resíduos hidrofílicos Y238, Y248 e Y256 do loop  $\beta$ -proppeller são conservados nas DPPs e essenciais para dimerização da DPPIV humana. Além desses, os resíduos hidrofóbicos F713, W734 e Y735 presentes no C-terminal foram avaliados por mutação sítio dirigida e demonstraram ser essenciais para dimerização, a mutação desses sítios ocasionou a separação do dímero em monômeros. A DPPIV possui resíduos com função de ancoramento de membrana

para a enzima adenosina deaminase (ADA) (THOMA et al., 2003; CHIEN et al., 2004).

No dímero, o aminoácido Y547 é altamente conservada sendo uma característica presente na família S9B (PITMAN; MENZ; ABBOTT, 2010). Modificações nesse resíduo afetam a catálise enzimática na DPP8 que é uma enzima homóloga à DPPIV, essa homologia sugere funções similares entre elas (PITMAN; MENZ; ABBOTT, 2010).

A DPP8 humana é uma dipeptidil peptidase homóloga à DPP9 com 58% identidade e 76% de similaridade entre aminoácidos, não apresenta atividade de endopeptidase nem de tripeptidil peptidase. A tríade catalítica é conservada na família S9B, contém os aminoácidos Ser, Asp, His. No entanto, DPP8 e DPP9 possuem um ativador alostérico não competitivo, a SUMO-1 (ABBOTT et al., 2000; BJELKE et al., 2006)

A DPP8 é formada pelos domínios  $\alpha/\beta$ - hidrolase e pelo  $\beta$ -propeller que confere a esta enzima 35% de identidade com a DPPIV, levando a preferência pelo mesmo substrato (PITMAN; MENZ; ABBOTT, 2010). A especificidade pelo mesmo substrato decorre da posição S1 ser ocupada pelos resíduos de aminoácidos Ala, Pro ou Ser na posição imediatamente adjacente à região da clivagem do sítio P1 (PITMAN; MENZ; ABBOTT, 2010).

A DPP8 humana é uma proteína não glicosilada citosólica e ativa nas formas monomérica e dimérica. As mutação nos resíduos H434 e D435 para o resíduo Phe dentro da interface do dímero da DPP8 humana alteram a catálise enzimática reduzindo o  $K_M$  e o pH ótimo para atividade enzimática (PITMAN; MENZ; ABBOTT, 2010). Durante a resposta imune, a DPP8 é regulada positivamente, porém as funções fisiológicas tanto da DPP8 quanto da DPP9 foram pouco estudadas. Além da preferência pelos mesmos substratos artificiais, as DPPs 8 e 9 clivam substratos naturais de DPPIV como quimiocinas e neuropeptídeo Y (BJELKE et al., 2006).

A maioria dos substratos das DPP8 e DPP9 de seres humanos possui atividade *in vitro* ótima para substratos contendo prolina na posição P1 precedido por uma alanina na posição P2. O pH ótimo para atividade enzimática varia de 7,5 à 8.0. As DPP8 e DPP9 hidrolisam os substratos cromogênicos Gly-Pro-pNA, Ala-Pro-

pNA, e Arg-Pro- pNA em pH 7,4 e trabalham em atividade abaixo da capacidade em pH 6,3, indicando que essa enzima não está presente no lisossomo ou endossomo.

A superexpressão da DPP8 reforça a indução da apoptose e interrompe a adesão e a migração celular (ABOTT, 2000). Os potentes inibidores da DPPIV utilizados no tratamento da diabetes tipo II são pouco seletivos para DPP8 e DPP9, a inibição específica dessas enzimas em seres humanos tem atividade antileucêmica (ABOTT, 2000).

### Dipeptidil peptidases de microorganismos

A DPPIV do fungo patogênico *Aspergillus fumigatus* executa a ligação e a liberação de dipeptídeos a partir do colágeno, auxiliando o fungo no primeiro passo de infecção na matriz extracelular do pulmão na espécie humana (BEAUVAIS et al., 1997). A DPPIV do fungo *A. oryzae* foi estudada por superexpressão e por deleção, a deleção não afeta as características fenotípicas do fungo, a perda da atividade de DPPIV aumentou o número de peptídeos de maior comprimento. Devido à sua capacidade de hidrolisar o glúten, DPPIV de *A. oryzae* apresenta potencial para aplicação industrial (DOUMAS et al., 1998).

A bactéria gram-negativa *Porphyromonas gingivalis* utiliza a matriz extracelular como fonte de carbono, sendo responsável por variadas formas de periodontite que podem ocasionar a perda dentária, e ainda é relacionada com a doença cardiovascular. A infecção de camundongos por mutantes que continham deleção do gene DPPIV levou a rápida recuperação da infecção e ganho de peso, ao serem comparados com indivíduos infectados com a linhagem selvagem, que desenvolviam abscessos e frequentemente morriam (OHARA-NEMOTO et al., 2014).

A DPP5 de *P. gingivalis* foi caracterizada bioquimicamente e apresenta substrato idêntico ao da DPPV de *A. fumigatus*, a DPP5 está envolvida no metabolismo por meio da produção de dipeptídeos nutritivos para o fungo (OHARA-NEMOTO et al., 2014). Na bactéria anaeróbica gram-negativa, *P. endodontalis*, as DPP5 e DPP7 levam a liberação de dipeptídeos a partir do N-terminal, atividade essencial para o crescimento da espécie, que utiliza aminoácidos como fonte de sobrevivência, como decorrência deste processo causam lesões periféricas que podem causar a perda da raiz dental (NISHIMATA et al., 2014).

Em *Streptococcus mutans*, o principal agente etiológico da cárie dental, possui uma abundância de peptidases, sendo que essas parecem facilitar o uso da saliva como reserva nutritiva (DE et al., 2016). A X-Pro (XPDAP) cliva oligopeptídeos com resíduo Pro na penúltima posição do N-Terminal, é homóloga a DPPIV de seres humanos, possui atividade colagenocítica e caseínolítica de substancial importância para como fator de virulência e necessidades nutricionais. Os inibidores de serino-proteases PMSF e os inibidores específicos de DPPIV inibiram fortemente a atividade enzimática da XPDAP de *S. mutans* (DE et al., 2016).

A função da DPP8 foi estudada primeiramente em *T.brucei*, por meio do RNA de interferência, além da DPP8, cerca de outros 20 genes codificadores de proteases da subfamília Prolil oligopeptidase da família S9 foram estudados e, em todos os casos, a ausência desses genes não provocou a morte dos parasitos *in vitro*. Além disso, a ausência da atividade de dipeptidil peptidase em *T.brucei* não alterou a infecção em camundongos (MOSS et al., 2015).

O nocaute do gene que codifica a dipeptidil aminopeptidase em *Plasmodium falciparum* provoca a formação de trofozoítos imaturos levando-os a morte, sugerindo um papel essencial para sobrevivência do parasito e possível alvo para o desenvolvimento de fármacos promissores para o tratamento da malária. A DPPI possui importante papel na degradação da hemoglobina e na egressão do parasito (DEU et al., 2010).

## O GENOMA DE *T. CRUZI* E SUA MANIPULAÇÃO PARA O ESTUDO DA FUNÇÃO GÊNICA

A cepa de referência de *T. cruzi* C.L Brener teve seu genoma sequenciado em 2005 e trata-se de uma cepa híbrida composta por não-Esmeraldo e Esmeraldo-like, a variedade possui 41 cromossomos e pertence ao DTU TcVI (WEATHERLY; BOEHLKE; TARLETON, 2009). A espécie possui dois conjuntos cromossômicos, apesar de diplóide, o cariótipo é bastante controverso, devido à baixa condensação dos cromossomos durante a divisão celular. Outro aspecto é que diferem em comprimento devido aos genes repetidos em tandem e sequencias repetitivas não codantes (CLAYTON, 2002).

A composição da região centromérica foi sugerida em 2007, pois não havia sido elucidada durante o sequenciamento, é rica em repetições GC obtidas por meio de fragmentação cromossômica associada ao telômero (OBADO et al., 2007). As sequências codificadoras de proteínas de tripanossomatídeos raramente são interrompidas por íntrons, os genes que apresentam grandes similaridades são organizados em clusters policistrônicos. A RNA polimerase I realiza o processamento de transcritos do pré-mRNA (transplicing) para produção dos mRNAs monocistrônicos e adição do miniéxon com 39 nucleotídeos contendo na extremidade 5' o CAP e na extremidade 3' a cauda Poli (A), o controle da expressão ocorre após a transcrição (LEBOWITZ et al., 1993; MATTHEWS; TEIXEIRA; DA ROCHA, 2003; ARAÚJO; TEIXEIRA, 2011;). A região 3' não traduzida (UTR) dos genes de tripanossomatídeos contém clusters de sequências específicas de RNA que se ligam a proteínas RBPs e regulam o controle pós transicional por meio da ligação aos elementos cis não codificadores de genes (DE GAUDENZI et al., 2013).

Em decorrência da grande quantidade de informações obtidas com o genoma, o estudo da função biológica dos genes de *T. cruzi* tornou-se cada vez mais necessária. O *T. cruzi* possui mais de 20.000 sequências codantes preditas para proteínas (CLAYTON, 2002), a genética reversa tem sido amplamente aplicada na como parte do estudo da função de genes. A técnica convencional é baseada na recombinação homóloga, no qual o gene de interesse é substituído por um cassete contendo uma marca de seleção flanqueada por UTRs de aproximadamente 500pb. A transfecção é realizada por meio da eletroporação em formas epimastigotas cultivadas sob condições axênicas. Apesar de ser uma estratégia viável, a técnica possui baixa eficiência e consome bastante tempo. A obtenção de clones partindo de um único parasito é crucial e dura cerca de 6-8 semanas para ser obtida e cada marcador de seleção se restringe à um único alelo, sendo necessária uma nova transfecção para obtenção do nocaute do segundo alelo, e conseqüentemente, novas etapas de seleção e clonagem são requeridas (XU et al., 2009).

A dificuldade na obtenção de clones nocauteados pela técnica convencional e a crescente evolução das ferramentas em genômica tem levado ao aprimoramento das estratégias do nocaute de genes. O uso de vetores epissomais tem reduzido o tempo de obtenção dos clones e tem facilitado a manipulação genética do *T. cruzi*. A

organização gênica desse organismo permite a transfecção de genes de resistência a antibióticos inseridos nos vetores que se camuflam pelo genoma do parasito na mesma orientação das regiões intergênicas e dispensam a presença de sequências promotoras (KELLY et al., 1992). O plasmídeo pTcINDEX é um vetor integrativo, em região ribossomal não transcrita, possui expressão indutível pelo o promotor T7 episomal regulado por tetraciclina. O vetor ainda contém dois marcadores: a luciferina e a proteína vermelha fluorescente (RFP) que facilitam o reconhecimento do parasito transfectado em cultura. A ferramenta é utilizada tanto para o nocaute como para expressão de genes (TAYLOR; KELLY, 2006).

A construção de blocos baseados na transferência de marcadores de seleção para vetores já construídos e a produção de plasmídeos de expressão fusionados a proteína verde fluorescente (GFP) permitiram o uso de vários antibióticos de seleção e a localização da proteína alvo no parasito. Além da diminuição do tempo gasto com a seleção, a vantagem está na visualização da fluorescência nas células transfectadas facilitando o trabalho com clones de *T. cruzi*. No entanto, essa ferramenta demanda vários passos em biologia molecular para obtenção dessas construções (BOUVIER et al., 2013).

O plasmídeo PTcGW possui diferentes opções de N-terminal baseados na tecnologia *gateway*, é recomendado em estudos de superexpressão, interação proteína-proteína e localização de proteínas. O vetor é flanqueado por sítios de restrição que permitem a troca dos elementos do vetor em um único passo de clonagem com a vantagem de escolher a posição do *tag* para purificação no C- ou N-terminal da proteína (KUGERATSKI et al., 2015).

Na família dos tripanossomatídeos, o RNA de interferência (RNAi) tem sido utilizado para estudar a função e regulação de genes em protozoários. Em *T. brucei* foi descoberto primeiramente e se tornou uma potente ferramenta para o estudo da função gênica nessa espécie. No entanto, não é disponível para *T. cruzi* já que esta espécie não possui a maquinaria apropriada, em específico a proteína argonauta necessária para o silenciamento de genes por RNAi (ULLU; TSCHUDI; CHAKRABORTY, 2004).

O sistema CRISPR-CAS-9 é uma ferramenta que revolucionou o estudo de genes em genomas de várias espécies. A técnica confronta a metodologia de RNAi,

por ser rápida e eficiente, permitindo o nocaute de vários genes e famílias de genes relacionadas. Em apenas dois dias da transfecção, os níveis de proteína diminuem demasiadamente tornando o estudo de genes em *T. cruzi* menos laborioso. Devido a essas características, a técnica é bastante promissora, baseia-se em um RNA guia que dirige a proteína Cas-9 para região do genoma de interesse introduzindo uma dupla ruptura no RNA ou DNA (DSB). As inserções ou deleções ocorrem via reparo da ruptura pela rota não homóloga e união das extremidades geradas (BURTON et al., 2007). Em kinetoplastídeos, a DSB ocorre por micro homologia e união das extremidades e não por extremidades não-homólogas (GLOVER ET AL. 2011). O fator limitante da técnica é obter o número suficiente de parasitos para confirmação do fenótipo e do nocaute (PENG et al. 2015).



# JUSTIFICATIVA

## JUSTIFICATIVA

O estudo da biologia do parasito, por meio do conhecimento da função de suas proteases, a forma como interagem com a célula hospedeira, como atuam na infecção e morte dessas células têm sido extensivamente investigada por grupos de pesquisa, no Brasil e no mundo. A descoberta desses mecanismos em sua totalidade contribuirá para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a doença de Chagas, uma doença classificada como negligenciada, além de contribuir significativamente para pesquisa básica.

No que se tem proposto, as investigações a respeito das proteases de *Trypanosoma cruzi* tem trazidos resultados relevantes, como por exemplo, as cisteíno proteases cruzipaina e catepsina B, e as serino proteases prolil oligopeptidase 80 (POPTC80) e oligopeptidase B (BASTOS et al., 2005; CERNY et al., 2016; MOTTA et al., 2012; SERVEAU et al., 1999). Essas duas últimas juntamente com as dipeptidil peptidases IV, 8 e 9 compõem a família da S9 de prolil oligopeptidases. As DPPs da família S9 são amplamente estudadas, principalmente em mamíferos, devido a sua grande importância na resposta imune e no metabolismo de hormônios da cretina atuando na homeostase da glicose em humanos. Essa descoberta representa um grande avanço para a medicina uma vez que inibidores da DPPIV são altamente empregados para controle glicêmico em pacientes portadores da diabetes tipo II.

Em relação às dipeptidil peptidases de microorganismos, a DPPIV do fungo *Aspergillus fumigatus* hidrolisa componentes da matriz extracelular (MEC) no pulmão (BEAUVAIS et al., 1997) e a hidrólise da MEC pela DPPIV de *Porphyromonas gingivalis* fornece carbono para o metabolismo do fungo causando várias formas da periodontite, a perda dentária, e ainda pode estar relacionada com a doença cardiovascular (KUMAGAI et al., 2000). Um processo similar é observado para as DPP5 e DPP7 I de *Porphyromonas endodontalis*, resultando em lesões periféricas que podem levar a perda da raiz dental (NISHIMATA et al., 2014).

O estudo da DPP8Tc é bastante promissor visto que as funções relatadas por seus genes ortólogos em outros organismos oferecem vantagens ao patógeno na interação com o hospedeiro. O nocaute gênico utilizado nesse trabalho, é uma técnica crucial para a avaliação funcional e vem sendo cada vez mais aplicada em



cepas de *T. cruzi*. Ela se mostra mais apropriada, uma vez que os inibidores comercialmente disponíveis da DPPIV não são capazes de inibir especificamente a DPP8Tc, podendo agir indiretamente na inibição de outras proteases. E por último, as técnicas de RNA interferente não são aplicáveis ao *T. cruzi* devido a biologia do parasito não permitir a viabilização da técnica.



# OBJETIVO

## OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi estudar as características bioquímicas da serino protease dipeptidil peptidase 8 de *Trypanosoma cruzi*, bem como avaliar o seu papel no parasito por meio de nocaute gênico. Para alcançar esse objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

- 1- Produção da DPP8Tc recombinante em *E. coli* e purificação da enzima ativa por cromatografia de afinidade;
- 2- Realização de ensaios enzimáticos com diferentes substratos e determinação dos parâmetros cinéticos;
- 3- Caracterização enzimática por determinação do pH e do efeito de aditivos;
- 4- Inibição da enzima com inibidores clássicos de proteases e específicos de DPPs;
- 5- Determinação de oligomerização da enzima;
- 6- Citolocalização da DPP8Tc nas formas epimastigotas;
- 7- Deleção do gene DPP8Tc por meio de nocaute físico;
- 8- Análise dos mutantes *in vitro*, quanto à sua viabilidade, taxa de crescimento e infectividade *in vitro* dos parasitos mutantes para o gene proposto;
- 9- Análise dos parasitos selvagens incubados com inibidor IB-7 específico da DPPIV;



# METODOLOGIA

## METODOLOGIA

### OBTENÇÃO DA SEQÜÊNCIA TCCLB 510183.20

A seqüência da dipeptidil peptidase 8 (DPP8Tc) de *Trypanosoma cruzi* TcCLB 510183.20 foi obtida no banco de dados GeneDB ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)) e NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### EXPRESSÃO HETERÓLOGA DA DPP8Tc RECOMBINANTE

O gene DPP8Tc foi clonado pela empresa GenScript® (<http://www.genscript.com/>) no vetor de expressão pET-19b. Para produção da proteína recombinante, o plasmídeo contendo o inserto DPP8Tc foi transformado em *Escherichia coli* BL21-AI competente (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

A indução, com 1 mM de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e 0,2% de arabinose, ocorreu quando a OD<sub>600</sub> alcançou de 0,5. O meio de cultura foi deixado a 18°C por 18h na rotação de 150 rpm. Após a indução, a cultura de bactéria foi centrifugada a 2.000 g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e *pellet* foi ressuscitado em tampão de lise (BugBuster® *Protein Extraction Reagent* - Novagen®), mantido sob agitação durante 20 min a 4°C. O produto de lise celular obtido foi centrifugado por 15 min a 12000 g e as frações solúveis e insolúveis separadas e analisadas em 10% SDS-PAGE.

Para a lise por sonicação, o *pellet* contendo a cultura induzida era ressuscitado em 50 mM Tris pH 7,5 e processado 25% amplitude, 40 seg, 23 ciclos 2 on 10 off. O material obtido após a sonicação foi centrifugado por 15 min a 12000 g. O sobrenadante foi reservado para purificação.

### PURIFICAÇÃO DA DPP8Tc RECOMBINANTE

A resina contendo matriz de agarose-níquel (Sigma®) foi preparada conforme as instruções do fabricante para a purificação da proteína contendo His-Tag. O extrato solúvel foi depositado na coluna e, após lavagem extensiva da resina com tampão (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl e imidazol variando de 5 a 40 mM), a enzima foi eluída com o tampão citado a cima com 80mM imidazol. O resultado da purificação foi analisado por SDS-PAGE. 10%. As frações nas quais foram obtidas a proteína purificada foram dialisadas em tampão 50 mM Tris pH 8,0. Após o processo

de diálise, a quantificação foi realizada por método de espectrofotometria quantitativa. A enzima foi estocada em igual volume de glicerol e mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### ENSAIOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA DPP8Tc

A atividade enzimática da DPP8Tc foi medida por meio da liberação do 7-amido-4-metilcoumarin (AMC) após hidrólise do substrato Gly-Pro-AMC conforme os testes de atividade enzimática descritos por GRELLIER (2001). A atividade enzimática foi realizada em 50 mM Tris pH 7,5 na presença de 20  $\mu\text{M}$  do substrato e 16,55 ng da DPP8Tc, concentração ótima enzimática obtida por meio de diluição seriada. Todos os ensaios foram conduzidos em placas transparentes de 96 poços de fundo chato. As leituras da liberação de fluorescência foram realizadas no espectrômetro SpectraMax M5 microplate reader (Molecular Devices). A atividade enzimática da DPP8Tc também foi realizada com outros substratos fluorogênicos: G-P-AMC, P-AMC, N-CBZ-R-R-AMC, N-SUC-G-P-L, A-A-F-AMC, N-SUC-A-A-P-F-AMC, todos provenientes da Sigma-Aldrich®. Diferentes concentrações de DTT (0 a 40 mM), NaCl (0 a 300 mM), além de EDTA (0 a 10 mM) foram usadas como aditivos com intuito de verificar a influência dos mesmos na atividade enzimática da proteína. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes em placas de forma independente, e em dias diferentes.

#### INFLUÊNCIA DO PH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA DPP8Tc

O pH ótimo para atividade enzimática da DPP8tc foi avaliado em tampão de força iônica constante na presença de 20  $\mu\text{M}$  do substrato Gly-Pro-AMC. Os tampões selecionados foram: o MES-Tris-Acetato (AMT) na faixa de pH entre 5,0 e 11. Os tampões 50 mM MES pH 5,5 - 6,5, 50 mM Tris pH 7,0 - 9,0 e 50 mM CAPS pH 10,0 e 11,0 também foram utilizados. A leitura do AMC liberado foi realizada conforme descrita anteriormente e as velocidades das reações comparadas entre si para obtenção do pH ótimo de funcionamento da enzima.

O teste de temperatura ótima da enzima foi realizado nas temperaturas 24, 26, 28, 32, 37, 40, 42, 45, 50, 55 e  $60^{\circ}\text{C}$ . A quantidade de 16,55 ng de enzima foram incubados durante 10 min em cada uma das temperaturas citadas, após este intervalo, 20  $\mu\text{M}$  do substrato Gly-Pro-AMC foram adicionados à reação e a mesma

foi incubada em temperatura ambiente por 15 min. Os testes foram realizados em triplicata e as temperaturas foram reguladas em termociclador. Para interromper a reação, foram adicionados 100µL de etanol absoluto e, posteriormente, a emissão de fluorescência acumulado foi captada no modo *endpoint* no SpectraMax M5.

#### PERFIL DE INIBIÇÃO DA DPP8Tc

Os inibidores clássicos de proteases TPCK (100 µM), AEBSF (100 µM), E-64 (1 mM), TLCK (100 µM), EDTA (1 mM), Leupeptina (100 µM) e pepstatina (100µM) foram utilizados para investigar o perfil de inibição da DPP8Tc. Os mesmos foram incubados com 16,55 ng de enzima em 50 mM Tris pH 7,5 contendo 1,25 mM DTT, 150mM NaCl durante 20 min e, posteriormente, 20 µM do substrato Gly-Pro-AMC foram adicionados. A leitura da liberação do AMC foi realizada conforme descrita anteriormente. Os inibidores específicos de DPPs utilizados neste trabalho foram obtidos por colaboração com a Universidade da Antuérpia, um grupo de pesquisa da Bélgica, por meio do Dr. Koen Augustyns. Os inibidores específicos da DPP8Tc IB-7 (100 µM), IB-4 (100 µM), KAII-23 (100 µM) e KS IV (S) (100 µM) foram incubados com 16,55ng de enzima e tampão durante 20 min em 50 mM Tris pH 7,5 contendo 1,25 mM DTT e 150 mM NaCl conforme o protocolo anterior de inibição. O IC<sub>50</sub> dos inibidores IB-7, IB-4, KA II-23 e KSIV foi realizado com concentração inicial de 200 µM em tampão 50 mM Tris 1,25 mM DTT, 150mM NaCl pH 7,5 contendo 16,55ng de enzima. Para avaliar a especificidade do inibidor pelo sítio ativo os inibidores IB-4 e IB-7 foram testados em concentrações próximas a IC<sub>50</sub>, 484,90 e 29,36 nM respectivamente, na ausência e presença de Triton X-100 com liberação de AMC como mencionado acima. Para obtenção do K<sub>i</sub> foi realizado um ensaio enzimático variando a concentração de substrato e inibidor. Por meio do software GraphPad Prism 6 foi gerado um gráfico Lineweaver-Burk para determinação do tipo de inibição. O cálculo foi obtido por regressão não-linear e o software calculou o valor do K<sub>i</sub>. Todos os experimentos de inibição enzimática foram conduzidos conforme o protocolo de Grellier (2001)

CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN ( $K_M$ ), VELOCIDADE MÁXIMA ( $V_{MAX}$ ), CONSTANTE CATALÍTICA ( $K_{CAT}$ ) E EFICIÊNCIA CATALÍTICA ( $K_{CAT}/K_M$ )

Para caracterizar o  $K_M$  da DPP8Tc o substrato Gly-Pro-AMC foi testado em concentrações que variaram de 80mM a 2,5mM em tampão 50mM Tris pH 7,5 com 16,55 ng de enzima. A cinética da DPP8Tc durou 15 min e a taxa de fluorescência liberada foi quantificada no intervalo de 1 min. Os dados obtidos foram analisados e calculados pelo software Graph Pad Prism por regressão não linear e cinética enzimática Michaelis-Menten.

### GEL FILTRAÇÃO

A cromatografia de exclusão molecular foi realizada em equipamento AKTA Purifier UPC-10 com software Unicorn Manager. Para iniciar a Gel filtração, 2L de cultura foram centrifugadas à 2000 *g* durante 20 min o *pellet* foi ressuspenso em tampão 50mM Tris-HCl pH 8,0 e lisado por sonicação conforme parâmetros mencionados anteriormente. A fração solúvel do lisado foi depositada em com coluna de gel filtração Superdex® 200 10/300GL capacidade para 24mL a cromatografia foi realizada com tampão 50mM Tris-HCl pH 8,0 200mM de NaCl. O fluxo do equipamento foi primeiramente ajustado em 0,4 mL/min, após o encaixe da coluna, foi reajustado para 0,5mL/min, em seguida outros parâmetros regulados: fração isocrática de 0.3, fração de eluição 1.0, eluição isocrática com comprimento de fração de 1.2 e pressão máxima em 1.2. As frações obtidas pela purificação foram coletadas e analisadas em gel SDS-PAGE 10%.

### TESTES PARA AVALIAR A DIMERIZAÇÃO

A proteína purificada foi analisada em SDS-PAGE 8% em 02 condições: 01 - condição desnaturante clássica e 02 - condição não-desnaturante, ou seja, a enzima não foi submetida a fervura prévia à aplicação no gel poliacrilamida e o tampão de amostra não continha DTT e/ou  $\beta$ -mercaptoetanol e não continha SDS. Na tentativa de verificar o coeficiente de dissociação da DPP8Tc, 375 ng da enzima foram incubados, por 15 min, com formaldeído variando de 2 a 0,03% em 25 mM HEPES pH 7,5. Este tampão foi escolhido, pois o tampão 50mM Tris interfere no teste de

cross-link com formaldeído. A reação foi interrompida acrescentando 50 mM tris pH 8,0 e as amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 8%.

## ULTRACENTRIFUGAÇÃO

Os experimentos de velocidade de sedimentação foram realizados utilizando uma ultracentrífuga analítica Beckman XL-I e um rotor TI AN-60 (Beckman Coulter). Os experimentos foram realizados a 20°C com 5,2  $\mu$ M de DPP8Tc em tampão 25 mM Tris-HCl 200 mM NaCl pH 8,0. Um volume de 400  $\mu$ L foi carregado em células de percurso de 1,2 cm e centrifugado a 130 000 g (42 000 rpm). As varreduras foram registradas a cada 3 min, durante a noite, a 280 nm. Para para estimar o volume específico parcial da cadeia polipeptídica = 0,733 mL/g, a densidade do solvente,  $\rho$  = 1,00720 g / mL, e a viscosidade do solvente,  $\eta$  = 1,027 mPa.s, a 20 ° C, foi utilizado o software Sednterp (disponível em: <http://www.jphilo.mailway.com/>). Os perfis de sedimentação foram analisados por análise de distribuição de tamanho de Sedfit (disponível em: <http://www.analyticalultracentrifugation.com>). Em Sedfit, as soluções de elementos finitos da equação de Lamm para um grande número de espécies discretas e independentes, para as quais é assumida uma relação entre coeficientes de massa, sedimentação e difusão,  $s$  e  $D$ , são combinadas com uma regularização de entropia máxima para representar uma distribuição contínua de tamanho. Para isso, 100 conjuntos de dados usando a relação de fricção ajustada para coeficientes de sedimentação compreendidos entre 0 e 26S em um nível de confiança de 0,68.

## PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Para obtenção de anticorpos contra DPP8Tc, foram utilizados 4 camundongos isogênicos machos *Mus musculus* da linhagem BALB/c. O soro pré-imune foi retirado por punção ocular de acordo com o projeto nº 27764/2016. Os camundongos foram imunizados, na região inguinal, por 4 vezes com intervalos de 15 dias. Cada imunização continha 5  $\mu$ g da proteína recombinante homogeneizados em adjuvante completo (na 1ª imunização) e incompleto (na 2ª e 3ª imunização) de Freund na proporção de 1:1 com PBS estéril 1x (137mM de NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,4). Na quarta e última imunização, 5  $\mu$ g de proteína recombinante foram diluídos apenas em PBS estéril e injetados nos animais. Após 7

dias da última imunização, o sangue dos animais foi coletado, o soro separado, diluído em glicerol (v/v) e estocado a -20°C.

### CONDIÇÕES DE CULTURA DA FORMA EPIMASTIGOTA

As formas epimastigotas da cepa CL-Brener de *T. cruzi* foram cultivadas a 28°C em meio Liver Infusion Tryptone (LIT) suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino inativado e 100 µg/mL de gentamicina.

### TRANSFEÇÃO DOS CASSETES PARA O NOCAUTE SIMPLES DO GENE DA DPP8Tc

Para transfecção do cassete contendo o gene de resistência ao antibiótico neomicina, preparado por FIGUEIRÊDO, (2013),  $1 \times 10^8$  epimastigotas da cepa CL-Brener de *T. cruzi* foram lavados e ressuspensos em 1mL de citomix gelado (120mM de KCl, 0,15mM de  $\text{CaCl}_2$ , 10mM de  $\text{K}_2\text{PO}_4$ , 25mM de HEPES, 2mM de EDTA, 5mM de  $\text{MgCl}_2$  pH 7,4). Após as lavagens,  $5 \times 10^7$  parasitos foram colocados em cubetas de 0,4 cm de espessura e a esta foram adicionados 50 µg do cassete contendo o gene de resistência ao antibiótico neomicina (ressuspensado em 50 µL de citomix). Para o controle, foram adicionados 50 µL de citomix. O eletroporador foi ajustado para 500 µF, 1,5 kV e resistência ao infinito e foram aplicados dois pulsos conforme (FIGUEIRÊDO, 2013). Na cubeta, após a eletroporação, 1 mL de LIT 50% condicionado e suplementado com 20% de soro fetal bovino e 100µg/mL de gentamicina foi adicionado para ressuspender os parasitos. Após a eletroporação, os parasitos foram transferidos para garrafas de 60mL contendo meio LIT nas mesmas condições anteriormente mencionadas. Ao atingir 48h de transfecção, foram adicionados nessas culturas 150 µg/mL do antibiótico geneticina (G418), nas duas condições: cultura transfectada com o cassete contendo o gene de resistência ao antibiótico neomicina e cultura transfectada apenas na presença de citomix.

### CLONAGEM DE PARASITOS

Os parasitos obtidos por transfecção cresceram em meio contendo antibiótico G418 por cerca de 2 meses. A primeira repicagem da cultura foi realizada após duas semanas da transfecção. 1/10 da cultura inicial foi colocada em LIT 50%

condicionado e suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100µg/mL de gentamicina e 150 µg/mL de geneticina.

Para obter uma cultura advinda de um único parasito, procedeu-se a clonagem em placa de 96 poços contendo LIT 50% condicionado e suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100µg/mL de gentamicina e 150 µg/mL de geneticina. No procedimento de clonagem, 40 parasitos foram ressuspensos em 2 mL do meio foram distribuídos em duas placas de 96 poços. As placas foram mantidas a 28°C e monitoradas até visualização de parasitos nos poços. Após isso, os parasitos foram transferidos para garrafas pequenas contendo 1mL de meio LIT 50% condicionado e suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100µg/mL de gentamicina e 150 µg/mL de geneticina.

#### EXTRATO DE PARASITOS

Após a contagem em câmara de Neubauer,  $1 \times 10^7$  parasitos foram centrifugados a 1000 g por 10 min e o sobrenadante desprezado. O *pellet* contendo os parasitos foi ressuspensado em PBS e lavado 3 vezes. Após a lavagem, os parasitos foram ressuspensos em tampão 50 mM Tris pH 7,5 e lisados em três ciclos de congelamento a - 80°C e descongelamento a temperatura ambiente. Após os ciclos, as amostras foram centrifugadas 16.000 g por 20 min os extratos solúveis e insolúveis foram separados, fervidos por 5 min em tampão de amostra Laemmli (10% glicerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 0,002% de azul de bromofenol e 125 mM Tris pH 6.8) (Laemmli, 1970) e armazenados a - 20°C.

Para o teste de atividade enzimática, 3µL do extrato solúvel proveniente de  $1 \times 10^7$  parasitos foram utilizados. Os testes de atividade enzimática foram conduzidos nas condições anteriormente descritas.

#### CURVA DE CRESCIMENTO

$5 \times 10^5$  formas epimastigotas do parasito selvagem e nocauteado foram colocadas em placas de 24 poços em 1 mL de meio LIT 50% condicionado e suplementado com 20% de soro fetal bovino e 100µg/mL de gentamicina e 150 µg/mL de geneticina. O antibiótico geneticina foi adicionado à cultura que recebeu o cassete com o gene de resistência. O crescimento foi avaliado por 10 dias e a

contagem foi realizada em câmara de Neubauer. Os experimentos foram feitos em triplicata.

### TESTE DE INFECÇÃO

As formas tripomastigotas das culturas selvagem e nocauteada com o cassete 5' neo 3' foram obtidos a partir da infecção com metacíclicos provenientes da cultura epimastigota envelhecida por 10 dias, cerca de 1mL de cultura foi utilizada para infecção. A infecção foi realizada em garrafas médias ou pequenas de células L6 com baixa confluência, o meio de manutenção das células L6 utilizado, foi o meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Este meio foi suplementado com soro fetal bovino inativado 5% (v/v) e com gentamicina (100µg/mL) durante o experimento as células infectadas e não infectadas foram mantidas em estufa a 37°C com CO<sub>2</sub> (5%). As infecções duraram 3h no caso de parasitos incubados com inibidor IB-7, ou 24h para avaliar a taxa de infecção de selvagens e mutantes. Após esse período o meio contendo os epimastigotas foi descartado e as garrafas com L6 lavadas por 3x em PBS 1x estéril ou meio DMEM (GRELLIER, 2001). Após estes intervalos, o meio de cultura foi dispensado e as placas foram fixadas e coradas com corante panótico e analisadas por microscopia óptica. A taxa de infecção foi realizada pela contagem do número de células infectadas e número de amastigotas intracelulares. Foram contadas por variedade 500 células obtidas por fotografias de campos obtidos aleatoriamente.

### WESTERN BLOT

Os extratos proteicos bacterianos de cultura foram induzidos e lisados conforme descrito em expressão heteróloga da DPP8Tc recombinante, e foram separados por SDS-PAGE. Para a análise por *western blot*, as amostras contidas no gel de poliacrilamida 10% foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond C+ protein (GE) em tampão de transferência 1x (30g Tris, 144g Glicina 200 mL de metanol em 1L de H<sub>2</sub>O) durante 1 h. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau (Sigma) e lavada com água destilada. Posteriormente, a membrana foi bloqueada com TBS (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl pH 7,5) leite 5% durante 30 min. A mesma foi incubada com o anticorpo anti-

DPP8Tc (1:200) em TBS leite 1% durante 2 h sob agitação constante e temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi lavada por três vezes durante 5 min com TBS Tween 0,1% e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:30.000) conjugado com anti-peroxidase por 45 min. A membrana foi lavada novamente por 3 vezes durante 10 min com TBS Tween 0,1% e, em seguida, procedeu-se a revelação com kit EC1 e EC2, (GE HealthCare). A imagem foi obtida no equipamento IMAGE QUANT software IMAGE 400.

#### IMUNOCITOLocalização por Microscopia de Fluorescência

$1 \times 10^7$  parasitos selvagens e mutantes foram lavados 3 vezes em PBS e ressuspensos em 200  $\mu$ L da solução de PBS/formaldeído 3,7% para fixação. Cerca de 20  $\mu$ L do material fixado que foi depositado em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina. Após 20 min, o sobrenadante foi retirado com pipeta. Os parasitos sedimentados foram permeabilizados com 0,1% Triton X-100 em PBS durante 10 min e, logo em seguida, a amostra foi bloqueada com 0,1% de Triton X-100 e 0,1% de BSA em PBS durante 30 min. Para marcação, o anticorpo anti-DPP8Tc (1:200) produzido anteriormente, foi depositado na lâmina e incubado durante 1 h em câmara úmida e em temperatura ambiente. Após isso, a lâmina foi lavada 3 vezes com PBS. Em seguida, o segundo anticorpo Alexa flúor 488 (1:200) foi adicionado e a lâmina foi incubada no escuro durante 1 h. Após este tempo, a lâmina foi lavada 3 vezes com PBS e foi incubada com 5 $\mu$ g/mL DAPI durante 10 min. Por último, a lâmina foi montada com uma gota do meio de montagem fluorescente (DAKO).

#### EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A extração de DNA genômico foi realizada com base em modificações do protocolo descrito por Medina-Acosta e Cross (1993). Os parasitos selvagens e nocauteados na quantidade de  $1 \times 10^8$ , foram lavados com PBS por 3 vezes, em seguida foram lisados em 10V de tampão 10mM Tris-HCl pH8,0, 100mM EDTA, SDS 5% e 100 $\mu$ g/mL proteinase K durante 14-16h a 50°C. Em seguida, igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado e a amostra centrifugada a 14.000 g durante 10 min. A fase aquosa foi cuidadosamente coletada

e transferida para um tubo novo. Após 3 repetições, a fase aquosa foi recuperada e o DNA precipitado com a adição de 2,5 volumes de etanol 100% gelado e 1/10 do volume de acetato de amônio 3M por 20 min à -20°C. Os tubos foram centrifugados a 14.000 *g* por 30 min e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* foram lavados com 1 mL de etanol 70% e centrifugados a 14.000 *g* por 5 min e o sobrenadante descartado. O *pellet* secou à temperatura ambiente e o DNA foi ressuspensionado em água MilliQ.

## SOUTHERN BLOT

O DNA genômico dos parasitos selvagens ou nocauteados foi extraído e incubado com enzima de restrição *Bam* HI (Jena Bioscience) à 37 °C por 18 h, e em seguida, procedeu-se a eletroforese do DNA fragmentado em gel de agarose 0,8% em baixa voltagem (30 V) por 18 h. Posteriormente, O DNA foi transferido para membrana de Nylon por capilaridade em tampão 20XSSC (3M de cloreto de sódio, 3M de citrato pH 7,0) por 18 h. Após a transferência, a membrana foi submetida à três pulsos de luz ultravioleta intercalados por 1 minuto. A pré-hibridação da membrana foi realizada em 20mL de solução contendo 5x SSC e 2mL de 100x Denhardt's (10g de Ficoll 400, 10g de polivinilpirrolidona, 10g de soro albumina bovina em 500mL) 0,5% SDS e 0,2 mg/mL de DNA esperma de salmão desnaturado, em forno de hibridação a 65° durante 4 h. Posteriormente, foi adicionado à solução 25 ng/mL de sonda de interesse e procedeu-se a incubação por no mínimo 18 h a 65°C. Em seguida, a membrana foi rinsada 5 min com tampão de lavagem 0,1M de ácido maleico, 0,15M NaCl, 0,3% (v/v) Tween 20 pH 7,5, bloqueada por 30 min e incubada 30 min com solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina AP (1:10.000) diluído em 1:10 da solução de bloqueio (reagente de bloqueio 10x concentrado da Roche diluído 10% em tampão de ácido maleico (p/v)) ajustada em tampão de ácido maleico 0,1M 0.15M de NaCl pH 7,5. A membrana foi lavada com tampão de lavagem durante 15 min por duas vezes e equilibrada com tampão de detecção contendo a diluição 1:10 do CSPD (reagente de detecção) por 5 min. A membrana foi incubada por 5-15 min no escuro em estufa a 37°C e revelada no equipamento ImageQuant. A revelação das hibridizações, foram feitas segundo protocolo do Dig Luminescent Detection Kit (Roche) e a detecção foi

registrada por meio do equipamento BIO-RAD universal hood II – S.N. 76S/04280, 100/115/230 v ~50/60 Hz - 200 VA. As sondas marcadas foram amplificadas por PCR baseadas nas especificações contidas no protocolo PCR Dig Probe Synthesis Kit (Roche).

## GRÁFICOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os gráficos e as análises estatísticas foram produzidas pelo software GraphPad Prism 6. Os testes estatísticos usados nesse trabalho foram escolhidos após obtenção da análise descritiva. Os dados foram avaliados quanto sua distribuição, obtida por histograma de barras em formato da curva de Gauss, para verificar a distribuição normal dos dados. Os dados com distribuição normal e contendo número amostral maior que dois pontos foram analisados com ANOVA, seguido do teste *post hoc* de Tukey. Os testes que apresentaram o número amostral  $n=2$  foram avaliados com teste T.



# RESULTADOS

## RESULTADOS

### ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS TcCLB 503637.30 e TcCLB 510183.20

O gene *dpp8tc* possui duas sequências de alelos no genoma da cepa CL-Brener, a sequência TcCLB 503637.30 e TcCLB 510183.20, disponíveis no banco de dados TriTryp (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>), estão localizadas nos cromossomos TcCH37-S e TcCH37-P, respectivamente. Por se tratar de uma cepa híbrida, foi realizado um alinhamento entre ambas as sequências a fim de identificar algum polimorfismo. Foi observado que as duas sequências de aminoácidos possuem a identidade de 97,3% e similaridade de 98,2% diferindo em cinco resíduos de aminoácidos iniciais e consecutivos no N-terminal do alelo TcCLB 503637.30 e 17 resíduos ao longo do alinhamento (Fig 6).

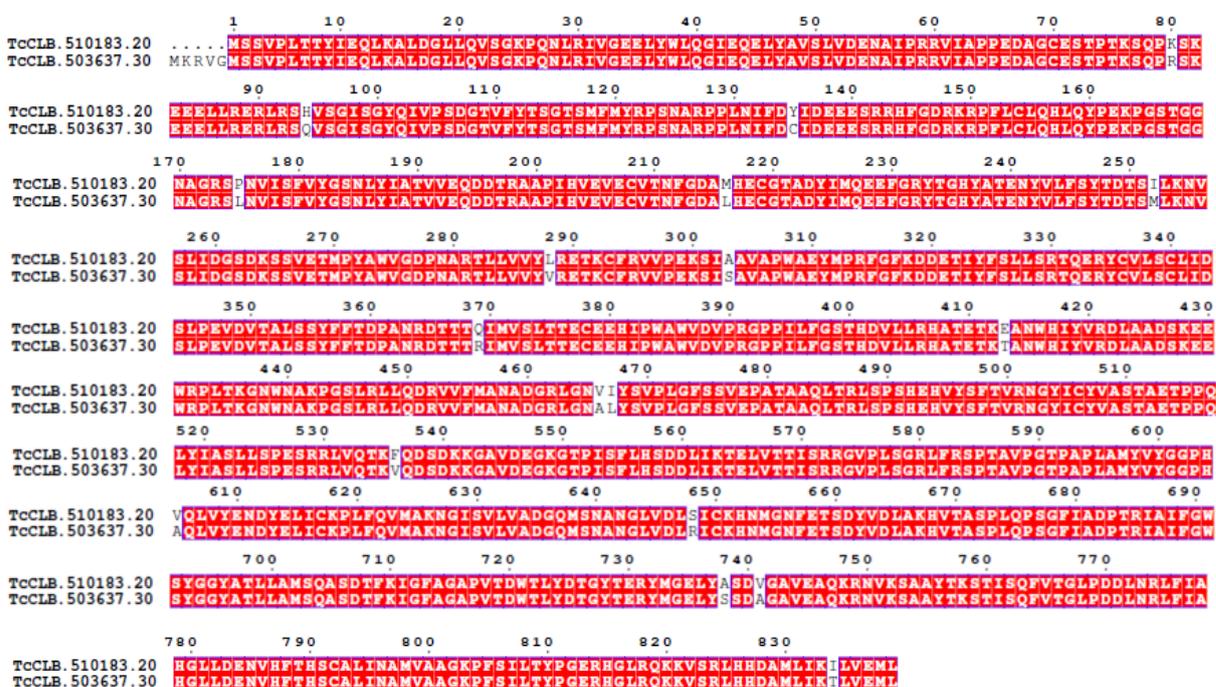
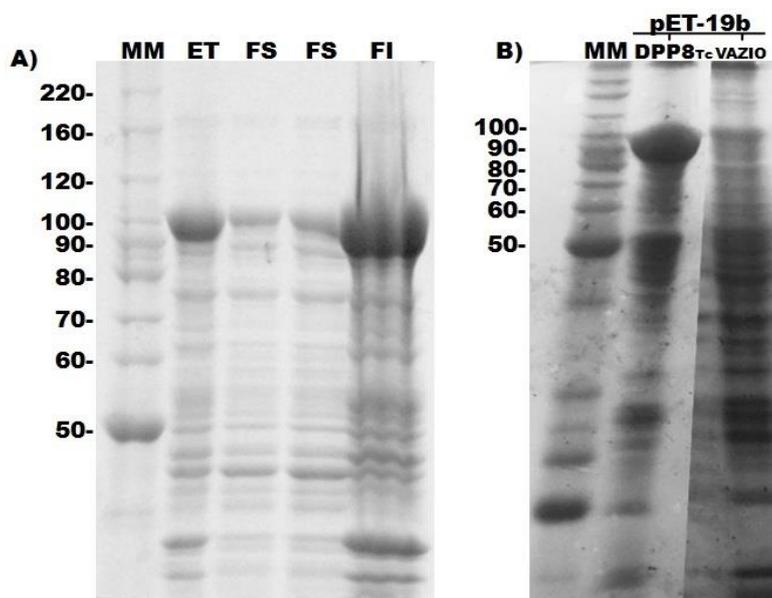


Figura 6. Polimorfismos entre as sequências dos dois alelos da DPP8Tc.

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA DIPEPTIDIL PEPTIDASE 8 DE *T. CRUZI* (DPP8Tc)

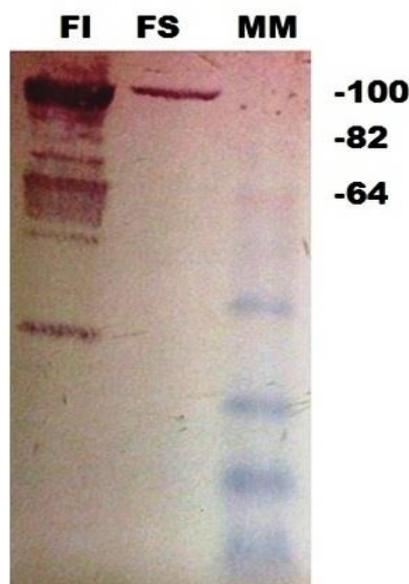
O peso molecular teórico predito para DPP8Tc, calculado no ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) é 93,3 kDa. A enzima contém 839 aminoácidos e seu PI teórico é 5.56. Ao adicionar as histidinas provenientes do plasmídeo pET-19b, a proteína recombinante totaliza um peso molecular esperado de 96,3 kDa, semelhante ao valor obtido na expressão da DPP8Tc com aproximadamente 100 kDa (Fig 7A). Para expressão da proteína recombinante, o plasmídeo pET-19b, contendo a fase aberta de leitura para DPP8Tc, foi utilizado para transformar células *E. coli* competentes da linhagem BL21-AI. Ao analisar todas condições testadas, a melhor para obtenção da forma solúvel da enzima foi por meio de indução com 1mM de IPTG e 0,2% de arabinose a 18°C por 14h. Nestas condições, grande parte da DPP8Tc foi expressa em corpo de inclusão, ou seja, na fração insolúvel porém a quantidade de enzima presente na fração solúvel foi suficiente para realizar os testes apresentados nesta tese. Na cultura induzida contendo o pET-19b vazio como controle, a banda de 100 kDa não foi visualizada em SDS-PAGE (Fig 7 B).



**Figura 7. Análise da expressão da proteína DPP8Tc recombinante em cultura de células de *E. coli* da linhagem BL21-AI. A) indução realizada com 1mM de IPTG, 0,2% de arabinose, induzida por 18h e visualizada em Gel SDS-PAGE 10%.**

MM: marcador de peso molecular; ET: extrato bacteriano lisado com reagente Bug Buster; FI: fração insolúvel; FS: fração solúvel. B) MM: marcador de peso molecular; pET DPP8Tc: DPP8Tc clonada em plasmídeo pET19b; pET19b vazio: plasmídeo pET19b sem inserto

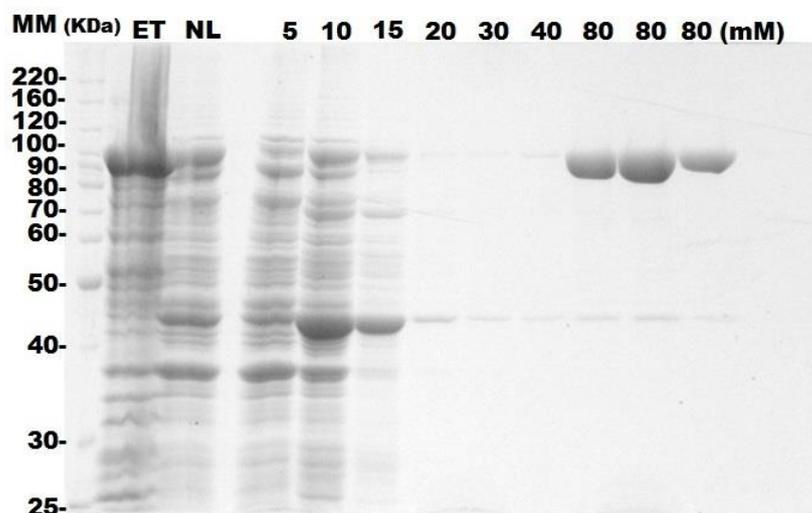
Para confirmar se a banda observada na indução da linhagem BL21-AI contendo o gene DPP8Tc inserido em pET-19b, representava a expressão da proteína recombinante, um teste de Western blot foi conduzido utilizando-se o extrato celular total, a fração solúvel e insolúvel de *E. coli*. No experimento, foi utilizado como 1º anticorpo, o anti-His tag (Novagen®), uma vez que a enzima apresenta na porção amino-terminal uma cauda de histidinas, como já mencionado anteriormente. No Western blot, foi possível verificar a presença da proteína recombinante nas três amostras obtidas da indução: extrato total, fração solúvel e insolúvel (Fig 8).



**Figura 8. Confirmação por Western blot da expressão da DPP8Tc recombinante em extrato de *E. coli* utilizando o anticorpo anti-His tag.** FI: fração insolúvel, FS: fração solúvel, MM: marcador de peso molecular.

A purificação da proteína recombinante foi realizada a partir da preparação do extrato total de proteínas utilizando cultura induzida com 1mM de IPTG e 0,2% de arabinose a 18°C por 14h, definida como condição padrão de expressão da proteína

na forma solúvel. O sobrenadante (fração solúvel) foi adicionado à resina agarose-níquel e, após, lavagem extensiva da resina, a enzima foi eluída com tampão contendo diferentes concentrações de imidazol (5 – 80 mM). Para verificar a pureza e o rendimento, as frações eluídas foram submetidas à análise por SDS-PAGE 8% sob condições desnaturantes e redutoras seguida por coloração em azul de coomassie. Na figura 9 observou-se que proteínas com diferenciados pesos moleculares e que não possuíam cauda de histidina, não se mantiveram ligadas a resina de afinidade foram eluídas em concentrações reduzidas de imidazol que se iniciaram a partir de 5mM. A DPP8Tc se despreendeu totalmente da resina de níquel somente com tampão contendo 80 mM de imidazol.



**Figura 9. Purificação da DPP8Tc recombinante por cromatografia de afinidade.**

O extrato protéico obtido a partir de uma cultura induzida com 1mM de IPTG e 0,2% de arabinose 18°C por 18h. MM: marcador de peso molecular, ET: extrato total, NL: não ligado 5: lavagem com 5 mM 10: lavagem com 10 mM, 15: lavagem com 15mM, 20: lavagem com 20 mM, 30: lavagem com 30mM, 40: lavagem com 40mM 80: lavagem com 80 mM de imidazol.

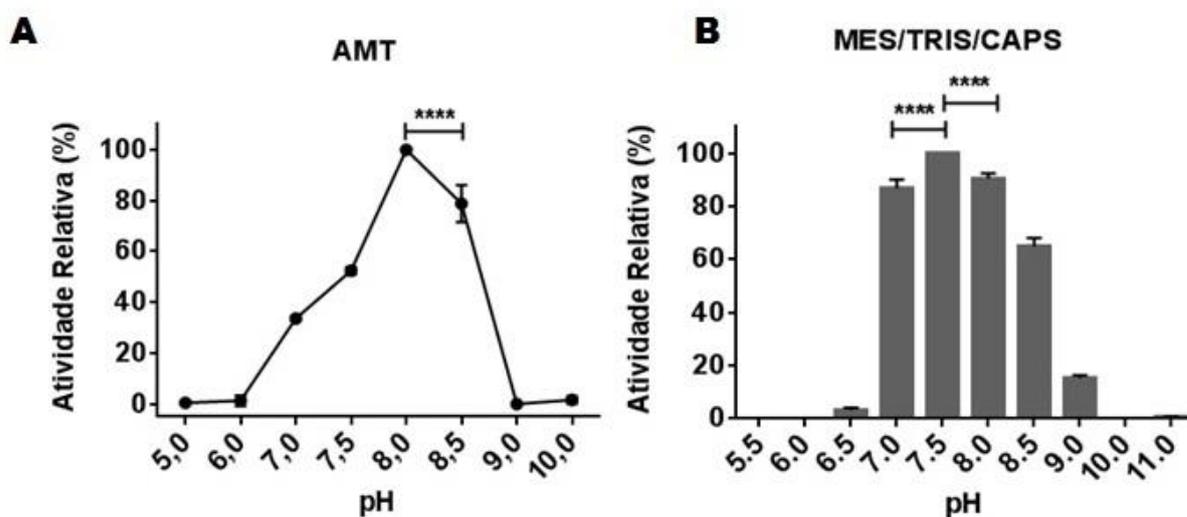
## ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA DPP8Tc

Após padronização da purificação da DPP8Tc, a mesma foi utilizada em diversos testes para caracterização da sua atividade enzimática, inicialmente foi conduzido o teste de afinidade por substrato. Conforme amplamente descrito na literatura, o principal substrato da enzima DPP8 humana é o Gly-Pro-AMC (ABBOTT et al., 2000), visto que a DPP8Tc hidrolisa resíduos de prolina presentes na segunda posição a partir do N-terminal não bloqueado de substratos peptídicos, a especificidade da DPP8Tc em vários substratos foi avaliada (Tabela 1). A única atividade foi observada para o substrato Gly-Pro-AMC em concordância com a literatura e com os pré-requisitos descritos acima. Assim pode-se concluir que o substrato específico da DPP8Tc, como para outras DPPs 8 é o Gly-Pro-AMC.

Tabela 1. Especificidade do substrato pela DPP8Tc

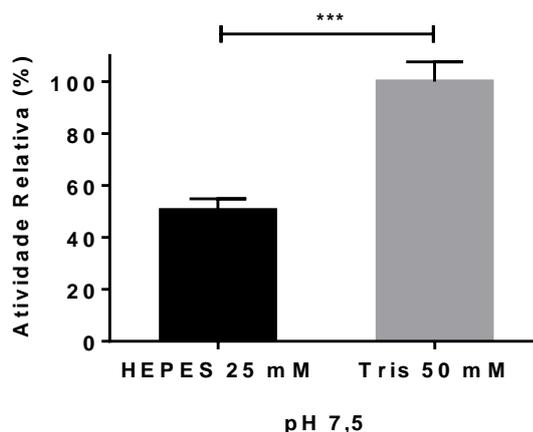
Substrato	% de atividade
G-P-AMC	100
P-AMC	0
N-CBZ-R-R-AMC	0
N-Suc-G-P-L-G-P-AMC	0
A-A-F-AMC	0
N-Suc-A-A-P-F-AMC	0

O efeito do pH na atividade enzimática da DPP8Tc foi testado em diferentes tampões para estabelecer em qual deles ocorre a melhor atividade da enzima. Ao observar a figura 10 A e B, é possível detectar diferenças na atividade enzimática decorrente do tipo de tampão utilizado. Para o tampão AMT, a atividade ótima foi detectada em torno do pH 8,0. Por outro lado, para a curva obtida com 50 mM MES (pH 5,5 – 6,5), 50 mM Tris (pH 7,0 – 9,0) e 50 mM CAPS (pH 10,0 e 11,0), a melhor atividade ocorre em pH 7,5 (Fig 10B). Contudo, em pH 7,0 e 8,0 a atividade enzimática ainda se mantém superior a 80%. O melhor resultado foi obtido no segundo experimento, no teste realizado em tampão 50 mM Tris pH 7,5.



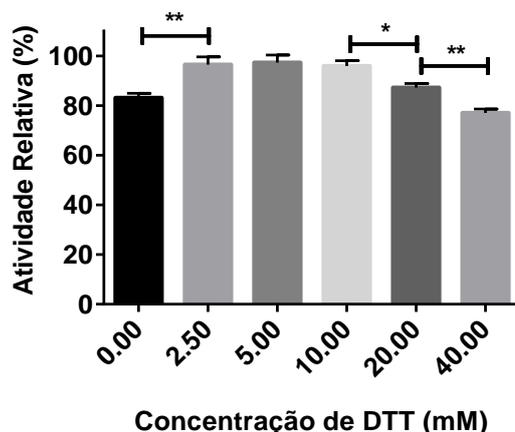
**Figura 10. Dependência do pH para atividade enzimática da DPP8Tc.** A) A atividade da DPP8Tc foi verificada em um único tampão AMT ajustado em pHs que abrangeram de 5,0 a 10 (diferenças significativas \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , ANOVA, teste Tukey, com  $n=8$ ). B) A atividade da DPP8Tc foi igualmente avaliada em três diferentes tampões ajustados na faixa de pH correspondente à faixa de tamponamento dos tampões MES (pH 5,5; 6 e 6,5), TRIS (pH 7; 7,5; 8; 8,5 e 9), e CAPS (pH 10 e 11), (diferenças significativas \*\*\*  $p < 0,001$  ANOVA, teste Tukey, com  $n=10$ ). Os testes com cada tampão foram conduzidos separadamente em placas com substrato Gly-Pro-AMC;

Sabendo-se que as enzimas possuem variações em sua atividade dependendo do tipo de tampão em que está condicionada e seu pH, foi realizado um teste para determinar qual o seu melhor tampão na faixa de pH neutro (BISSWANGER, 2014). Para isso analisou-se os tampões 50 mM Tris e 25 mM HEPES, ambos em pH 7,5, observando um aumento da atividade enzimática de 100% em tampão 50 mM Tris (Fig 11).



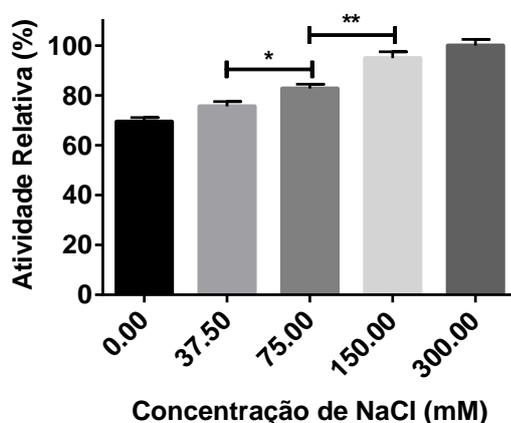
**Figura 11. Atividade enzimática da DPP8Tc conduzida em dois tampões diferentes.** Os tampões utilizados foram 25mM Hepes e 50mM Tris ambos em pH 7,5 com substrato Gly-Pro-AMC. (diferenças significativas \*\*\*  $p < 0,001$ ; teste T;  $n=2$ ).

Após a obtenção deste resultado, este tampão foi escolhido para testar a eficiência enzimática na presença de aditivos. O primeiro a ser testado foi o aditivo ditioneitol (DTT). Neste experimento, diferentes concentrações de DTT foram testadas por meio de diluição seriada (Fig 12). O resultado obtido com a presença de DTT demonstrou que a atividade enzimática aumentou cerca de 45% em relação ao controle. Pode-se observar que à medida que a concentração de DTT aumenta, a atividade enzimática se mantém constante, a diminuição da atividade enzimática ocorre apenas a partir de 20mM de DTT (Fig 12).



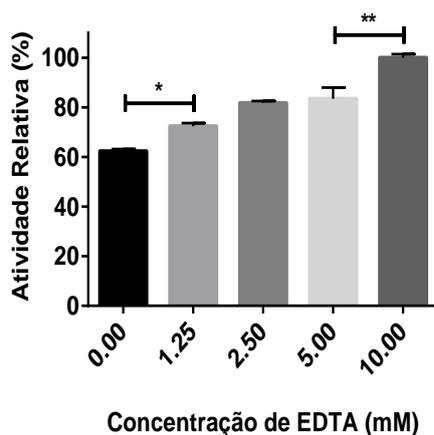
**Figura 12. Atividade enzimática da DPP8Tc na presença do aditivo ditioneitol (DTT).** A cinética enzimática foi realizada em 50mM Tris pH 7,5 contendo aditivo DTT em diferentes concentrações e utilizando o substrato Gly-Pro-AMC. (diferenças significativas  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,05^*$  com ANOVA, teste Tukey,  $n=6$ ).

O segundo aditivo avaliado foi o NaCl (Fig 13). Os sais interferem na cinética e na termodinâmica proteica, podem inibir a atividade ou promover a mudança de conformação promovendo a exposição do sítio ativo da enzima melhorando a afinidade pelo substrato (PARK; RAINES, 2001). A adição de NaCl ao tampão 50mM Tris pH 7,5 aumentou a atividade enzimática da DPP8Tc em 16,9% quando comparado ao controle. Os resultados obtidos neste experimento demonstraram que a melhor concentração de NaCl para aumento da atividade enzimática é de 150 mM, semelhante as concentrações de NaCl encontradas no citosol da célula (HURNÁK; ZACHAR, 1994).



**Figura 13. Atividade enzimática da DPP8Tc na presença do aditivo NaCl.** A cinética enzimática foi realizada em 50mM Tris pH 7,5 contendo aditivo NaCl em diferentes concentrações com substrato Gly-Pro-AMC (diferenças significativas \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  com ANOVA teste Tukey;  $n=5$ ).

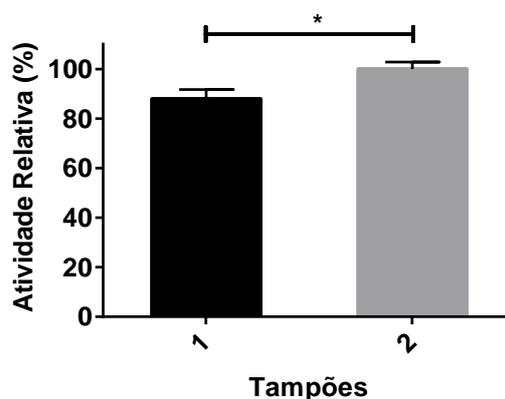
O terceiro aditivo analisado foi o EDTA, um agente quelante que pode se complexar a íons metálicos, como magnésio e cálcio. A presença de 2,5 mM EDTA aumentou em 23,7% a atividade catalítica da DPP8Tc em relação ao controle e, em 25,8% na presença de 5mM do quelante (Fig 14).



**Figura 14. Atividade enzimática da DPP8Tc na presença do aditivo EDTA.** A cinética enzimática foi realizada em tampão 50mM Tris pH 7,5 contendo aditivo

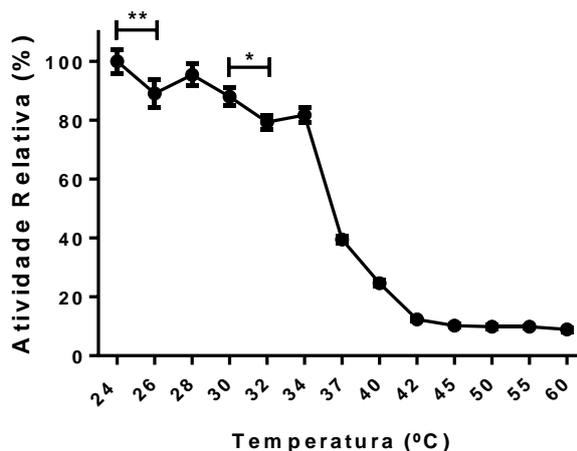
EDTA em diferentes concentrações. O ensaio foi realizado com substrato Gly-Pro-AMC (diferenças significativas  $**p<0,01$  e  $*p<0,05$  com ANOVA, teste Tukey;  $n=5$ ).

Os aditivos 1,25mM DTT, 150mM NaCl e 5mM EDTA foram incluídos ao 50mM Tris pH 7,5. Foi observado que a adição melhorou a atividade enzimática em relação ao controle em 12,1% controle (Fig 15). Esse tampão então foi estabelecido como o tampão para atividade enzimática da DPP8Tc, sendo os demais experimentos realizados com o mesmo.



**Figura 15. Atividade enzimática da DPP8Tc em tampão com aditivos.** Tampão 1: 50mM Tris pH 7,5 sem aditivos e tampão 2: 50mM Tris pH 7,5 com aditivos: DTT, 1,25 mM, EDTA 5mM e NaCl 150mM. O ensaio foi realizado com substrato Gly-Pro-AMC. (diferenças significativas  $*p<0,05$  com Teste T;  $n=2$ ).

Conhecendo o tampão ótimo de atividade da DPP8Tc e seu substrato específico, foi necessário conhecer outras características sobre a enzima, foram então conduzidos, ensaios de atividade enzimática em diferentes temperaturas, velocidade máxima e inibição com inibidores clássicos de proteases e específicos de DPPIV. A sensibilidade térmica da DPP8Tc foi estudada a partir da incubação da enzima em diferentes temperaturas (Fig 16). Os resultados obtidos apontam para maior atividade da enzima em temperaturas inferiores a 28°C. Entre 30 e 35 °C, a atividade enzimática correspondeu a 80%. A mesma apresentou uma redução de 50% a 37°C e, após 42 °C, a enzima praticamente não demonstrou mais atividade.



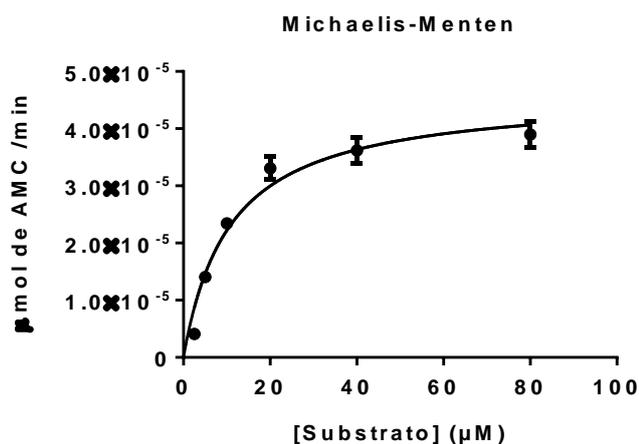
**Figura 16. Atividade da DPP8Tc submetida a diferentes temperaturas.** (diferenças significativas \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$  com ANOVA, teste Tukey,  $n=13$ ).

As características bioquímicas intrínsecas da DPP8Tc foram mensuradas com substrato Gly-Pro-AMC e encontram-se descritas na tabela 2.

**Tabela 2.** Valores de velocidade máxima, inicial e constante catalítica da DPP8Tc.

DPP8	Valores	Unidades
Kcat	$1,67 \times 10^{-3}$	$s^{-1}$
$K_M$	10,78	$\mu M$
Vmax(S)	$4,612 \times 10^{-5}$	$\mu mol \text{ de AMC/min}$
Kcat/ $K_M$	$1,55 \times 10^{-4}$	$\mu M^{-1} s^{-1}$

A saturação da DPP8Tc obtida pela cinética Michaelis-Menten em relação a concentração do substrato e a velocidade da reação podem ser visualizadas na figura 17



**Figura 17. Atividade da DPP8Tc em diferentes concentrações de substrato.** O ensaio de cinética para obtenção da curva de Michaelis-Menten foi realizado em substrato Gly-Pro-AMC.

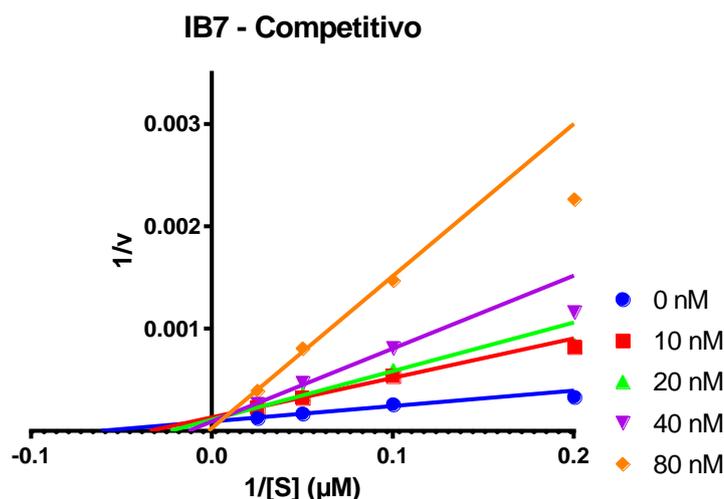
Nos ensaios enzimáticos foi possível verificar baixa inibição enzimática por quatro inibidores: AESBF: fluoreto de 4-(2- aminoetil) benzenossulfonila hidratado, inibidor de serino protease; E-64 [N-(L-3-*trans*-carboxixiran-2-carbonil)-L-leucil]-amino(4-guanidino)butane], inibidor de cisteíno protease; TLCK: tosil-lisina clorometil cetona, inibidor de serino e cisteíno proteases; e Leupeptina inibidor de treonino, serino, cisteíno proteases. Destes inibidores, o TLCK inibiu ~31% da atividade enzimática, seguido por Leupeptina (~21%), AESBF (~18%) e, por último, o E-64 que inibiu ~17% da atividade enzimática da DPP8Tc. A pepstatina inibidor de aspártico protease não inibiu a atividade da DPP8Tc. Além dos inibidores clássicos, outros 16 inibidores específicos da DPPIV humana foram também testados na concentração final de 100µM. Apenas quatro destes testados (Tabela 03) foram capazes de inibir a atividade enzimática da DPP8Tc, sendo que o inibidor IB-7 apresentou maior porcentagem de inibição, 96,59%.

**Tabela 3.** Ensaio de inibição com inibidores de proteases e dipeptidil peptidase IV.

<b>Categoria</b>	<b>Inibidor</b>	<b>Concentração</b>	<b>% de Inibição</b>
Inibidores de protease	AEBSF	100 µM	17.73 <sup>a</sup>
	EDTA	1 mM	N.I
	TPCK	100 µM	N.I
	E-64	1 mM	16.34 <sup>a</sup>
	TLCK	100 µM	30.75
	Leupeptina	100 µM	20.56 <sup>a</sup>
	Pepstatina	100 µM	N.I
Inibidores DPPIV	IB-7	1 µM	96.59
	IB-4	1 µM	38.78 <sup>b</sup>
	KA II 23	1 µM	37.04 <sup>b</sup>
	KS IV (S)	1 µM	31.00 <sup>b</sup>
	Sitagliptina	1 µM	N.I

N.I- não inibida. As letras iguais indicam diferenças não significativas obtidas por ANOVA, teste Tukey, n=12.

Através do resultado da diluição seriada dos inibidores IB-7 e IB-4, foi possível produzir dois *plots* Lineweaver-Burk um para cada inibidor e identificar qual o tipo de inibição promovida por eles. Os resultados obtidos indicam o IB-7 e IB-4, demonstram um perfil de inibidor competitivo, conforme pode ser observado nas Figuras 18 e 19.



**Figura 18.** Inibição da DPP8Tc pelo Inibidor competitivo IB-7.

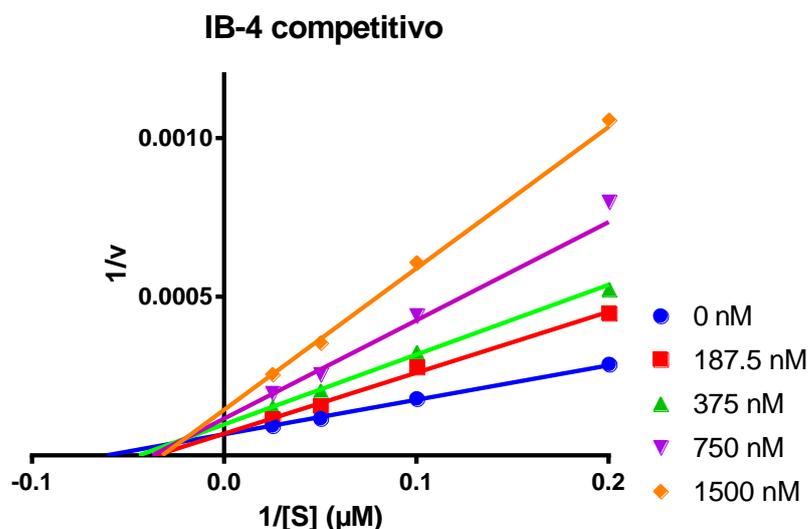


Figura 19. Inibição da DPP8Tc pelo inibidor competitivo IB-4.

A IC<sub>50</sub> desses inibidores foi obtida por diferentes concentrações que variaram de 4 µM até 125 nM. O menor IC<sub>50</sub>, portanto, a melhor eficiência foi obtida pelo inibidor IB-7 com 29,36 nM, seguido por KS (IV) com 95,47 nM, IB-4 com 484,9 nM e por último, KAI-23 de 2,7µM (Tabela 4). Continuando o estudo dos inibidores de DPP8Tc, o K<sub>i</sub> de IB-7 e IB-4 foram obtidos, conforme visualizado na tabela 4.

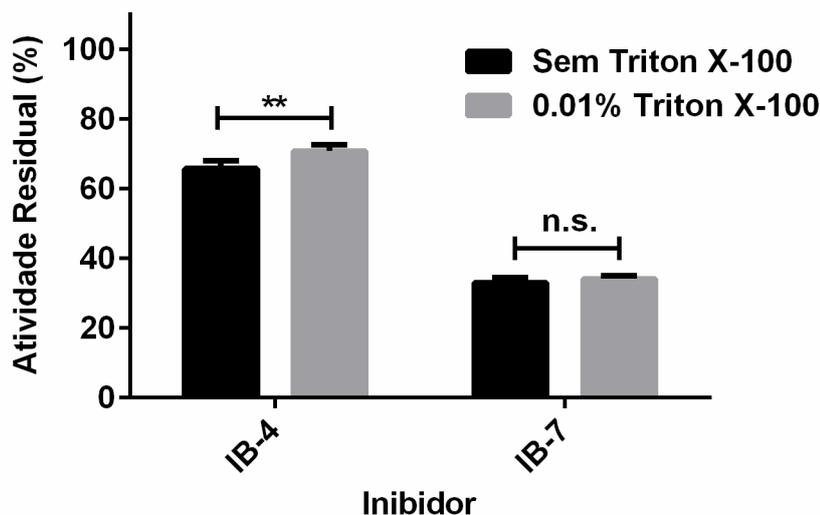
Tabela 4. IC<sub>50</sub> e K<sub>i</sub> dos inibidores da DPPIV

Inibidor	IC <sub>50</sub>	K <sub>i</sub>
Ib-7	29.36 nM	8.2 nM
Ib-4	484.90 nM	391.1 nM
KSIV (S)	95.470 µM	NR
KAI23	2.724 µM	NR

N.R- não realizada

Ao se avaliar a ação de inibidores e se determinar parâmetros inibitórios como IC<sub>50</sub> e K<sub>i</sub>, a utilização de detergentes em baixas concentrações é importante para reduzir ligações inespecíficas e avaliar a especificidade de ligação do composto ao

sítio ativo da enzima. Por isso foi realizado um ensaio de inibição na presença ou ausência de detergente Triton X-100. Percebe-se que, para o inibidor IB-4, a presença do detergente diminuiu ligeiramente sua inibição sobre a enzima. Porém, para o inibidor IB-7, cujo foi obtido a melhor inibição enzimática entre os compostos testados, não houve diferença indicando uma especificidade ao sítio ativo enzimático (Fig 20).



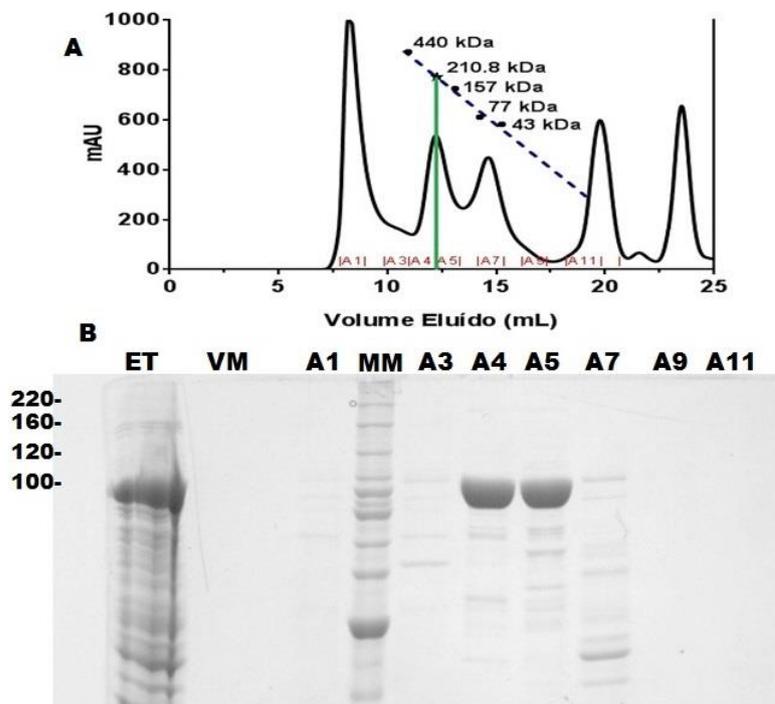
**Figura 20. Avaliação da especificidade do inibidor em relação ao sítio ativo.**

Para os grupos testados na ausência de detergente (preto) o controle foi medido sem inibidor e sem detergente; e para os grupos testados com ação de detergente (cinza), o controle foi realizado sem inibidor e com Triton X-100. Inibidores testados com concentração próxima ao seu IC<sub>50</sub>(diferenças significativas \*\* p<0,01 com ANOVA, teste Tukey; n=4).

#### DIMERIZAÇÃO DA DPP8Tc

Tendo em vista que a DPP8 humana é uma proteína dimérica e esta dimerização é importante para a atividade enzimática da proteína, foram realizados alguns testes para avaliar se a DPP8Tc também possui estrutura quaternária. A gel filtração por exclusão molecular evidenciou a presença de diversos picos, um deles, obtido na fração A7 (157 kDa) e outro pico obtido das frações A4 e A5 (210 kDa) se situam próximo da forma dimérica da enzima. Ao verificar o conteúdo dessas frações em gel SDS-PAGE 10% foi possível detectar que nas frações A4 e A5 havia maior

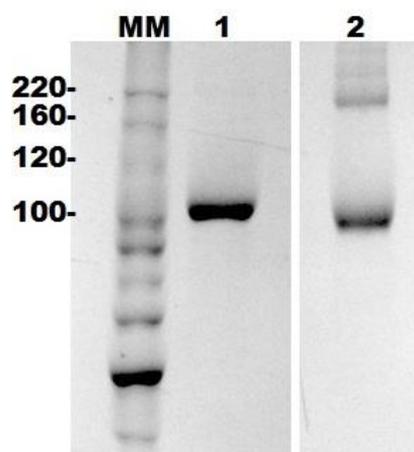
quantidade da DPP8Tc, enquanto menor quantidade de DPP8Tc foi vista na fração A7 (Fig 21 A e B). Nas demais frações analisadas não foram observadas bandas que condiziam com o peso molecular da DPP8Tc.



**Figura 21. DPP8Tc purificada por meio da gel filtração.** ET: extrato total, VM: volume morto, MM: marcador de peso molecular, A1-A11: frações obtidas por gel filtração. A: Cromatografia de gel filtração evidenciando diversos picos, dois deles com pesos moleculares de 210 e 157 kDa, próximos ao tamanho esperado para forma dimérica da DPP8Tc. B: Frações obtidas da gel filtração visualizadas em SDS-PAGE.

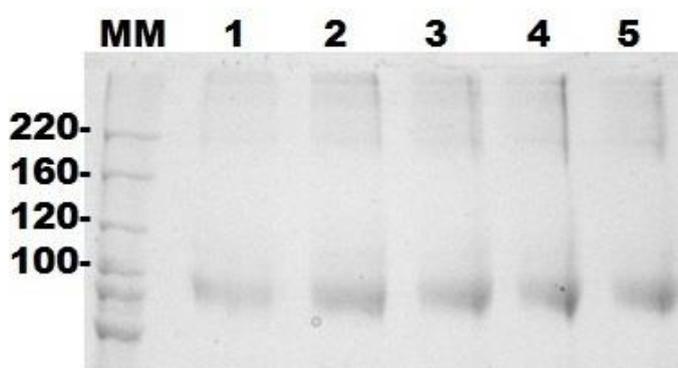
Como intuito de verificar qual tipo de ligação química é responsável pela formação do dímero, a proteína purificada foi analisada em SDS-PAGE 8% nas seguintes condições: 1) condição desnaturante: fervida contendo tampão Laemli, 2) condição não desnaturante: tampão de amostra sem DTT, sem  $\beta$ -mercaptoetanol e sem fervura (Fig 22). Na condição 2 foi possível observar a presença de duas bandas, uma mais intensa próxima a 100 kDa, altura esperada para o monômero e outra próxima a 220 kDa, valor condizente com a estrutura quaternária dimérica. Na condição 1 não foi possível observar a banda na altura de 220 kDa, o que indica que

a condição desnaturante provocou o possível rompimento de ligações não-covalentes devido ao aquecimento ou rompimento de ligações dissulfeto pela exposição ao  $\beta$ -mercaptoetanol, resultando na visualização da forma monomérica da DPP8Tc.



**Figura 22. Frações monomérica e dimérica da DPP8Tc.** MM: marcador de peso molecular. 1) condição desnaturante com fervura, DTT e  $\beta$ -mercaptoetanol e 2) condição não desnaturante, sem fervura, sem DTT e sem  $\beta$ -mercaptoetanol.

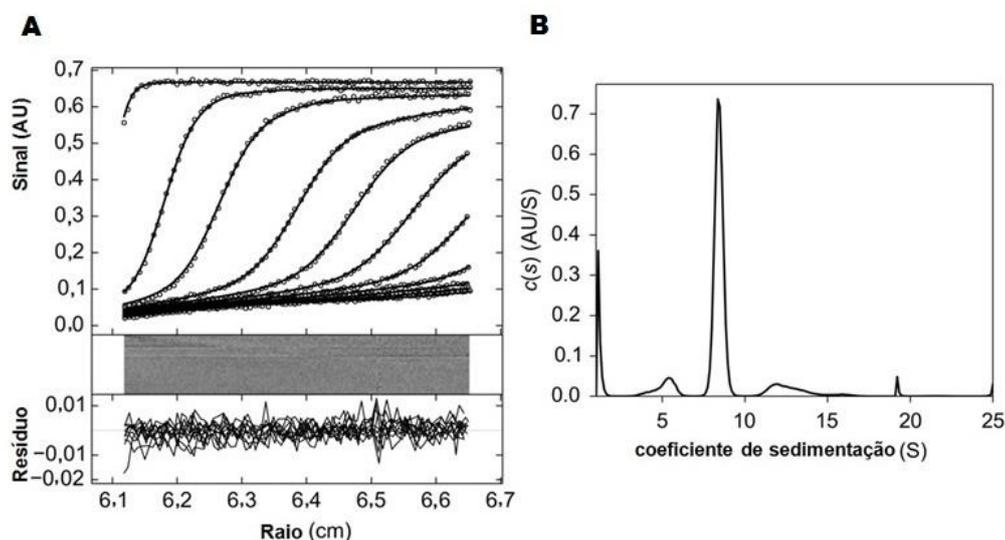
O comportamento da dimerização da enzima em diferentes concentrações de NaCl foi analisado por SDS-PAGE 8%. Este resultado mostra que o NaCl foi capaz de desfazer as ligações não covalentes do dímero em todas as concentrações testadas (Fig 23).



**Figura 23. Rompimento da forma dimérica da DPP8Tc por saturação com NaCl.** 1: marcador de peso molecular 2: 1M 3: 0,5M 4: 0,25M 5: 0,125M, 6: 0,06M de NaCl.

Os resultados da velocidade de sedimentação corroboram os dados obtidos com a cromatografia de exclusão por tamanho. O perfil da velocidade de

sedimentação experimental da DPP8Tc obtido a 5,2  $\mu$ M mostra uma espécie principal, que compreende aproximadamente 68% do sinal, que sedimenta a 8,45 S (S20,  $w = 8,9$  S). A combinação dos valores de  $s$  com  $RS = 4,9$  nm estimada a partir da cromatografia de exclusão de tamanho dá uma estimativa para o tamanho do dímero da DPP8Tc de  $M = 185$  kDa próximo da massa molecular esperada para um dímero (192 kDa). Considerando-se um dímero, o valor de  $RS$  correspondente a uma proteína globular possui uma razão de fricção de 1,30, sugerindo que o dímero DPP8Tc tem forma aglobular. As espécies que sedimentam em 5,1 S têm um peso molecular previsto de 87 kDa, próximo de 96 kDa, calculado a partir da seqüência primária, porém estas espécies respondem por menos de 10% do sinal. Foram observadas espécies de alto coeficiente de sedimentação e provavelmente se deve a agregação devido ao envelhecimento da amostra. Finalmente, observou-se um pico abaixo de 2S, normalmente representa produtos de degradação da proteína ou pequenos contaminantes. Estes dados indicam claramente que a DPP8Tc é um dímero (Fig 24 A e B).



**Figura 24. Dimerização da DPP8Tc avaliada por ultracentrifugação.** A: velocidade de sedimentação experimental; B: coeficiente de sedimentação da DPP8Tc.

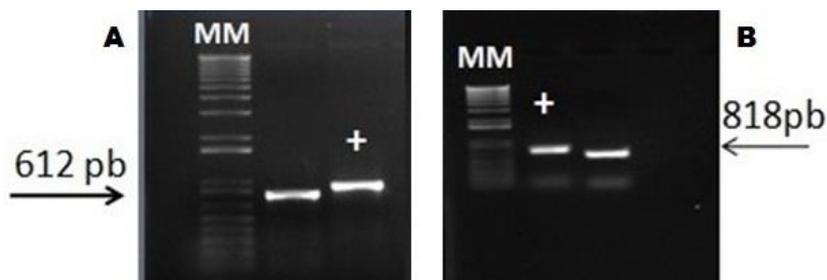
Os resultados obtidos por cromatografia de gel filtração permitem concluir que a presença de dois picos semelhantes ao monômero e ao dímero coincidem com o tamanho esperado para DPP8Tc (Fig 21 A e B). A presença da banda única de 100

kDa em SDS-PAGE demonstra que o dímero é desfeito pela na condição desnaturante em tampão seguido por fervura (Fig 22). O dímero ainda pode ser desfeito por concentrações gradativas de NaCl, nas condições salinas a banda de 220 kDa não é bem definida no gel de SDS-PAGE 8%, esse resultado indica que as ligações não-covalentes entre a fração monomérica e dimérica foram rompidas pelas concentrações de NaCl (Fig 22). Os resultados de ultracentrifugação obtidos corroboraram os resultados obtidos anteriormente (Fig 24).

#### CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO GENE POR MEIO DO NOCAUTE:

O estudo funcional da dipeptidil peptidase 8 de *T. cruzi* por meio de nocaute teve início em 2011, o cassete contendo as regiões flanqueadoras do gene DPP8Tc intercaladas pelo gene de resistência ao antibiótico neomicina (cassete *neo*) foi construído e sequenciado. Portanto, a construção do cassete se deu anterior ao presente trabalho.

O primeiro passo para entender a importância da proteína no parasito, foi a amplificação do cassete, por meio de PCR, usando protocolo estabelecido por FIGUEIRÊDO (2013). O cassete foi então transfectado em *T. cruzi* cepa CL Brener conforme descrito na metodologia. Após 48h da transfecção, os parasitos foram selecionados com o antibiótico G418. Ao final de 45 dias, os parasitos mutantes foram clonados e, após a clonagem, para confirmar o nocaute simples, por meio da técnica de southern blot, foram construídas 3 sondas: uma para a região 5' UTR do gene *dpp8tc*(DPP8Tc 5'UTR) (Fig 25 A), outra para o gene neomicina fosfotransferase (*neo*) (Fig 24B) e a última para o gene *dpp8tc* (dado não mostrado).

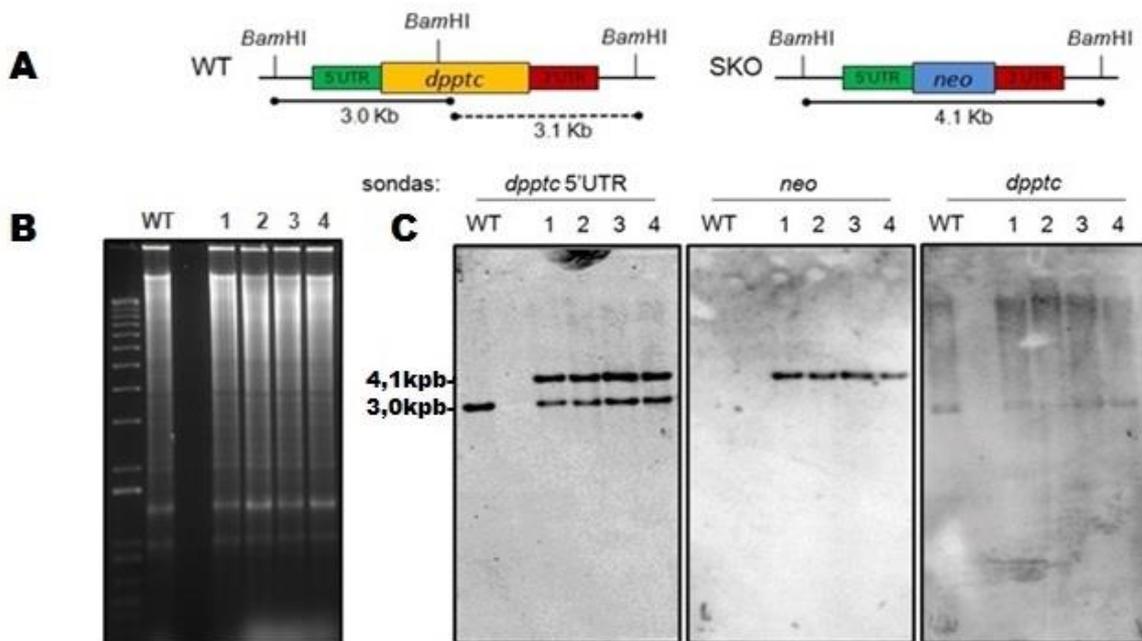


**Figura 25. A: Produção das sondas 5'UTR e *neo* marcadas com dUTP; A:** amplificação do controle e da sonda marcada 5' por dUTP (+) por pcr. **B:** amplificação da sonda *neo* marcada por dUTP (+) e do controle por pcr. MM: marcador de peso molecular.

Antes da construção das sondas foi realizada a análise de restrição, *in silico*, do locus do gene *dpp8tc* no cromossomo 37 da cepa CL-Brener. O comprimento da região de interesse apresenta 9 KB, possui dois sítios de restrição para as enzima *Bam* HI com tamanhos conhecidos dentro e fora do gene *dpp8tc*. A distância entre um sítio de restrição para *Bam* HI e outro, totaliza 3044pb para um alelo selvagem e no caso do alelo nocauteado o comprimento do locus deveria possuir 7,3 kB. Um único sítio restante de *Bam* HI localiza-se fora do gene após a 3'UTR totalizando um fragmento de 4066 pb de tamanho correspondente a distância do próximo sítio de *Bam* HI (Fig.26 A). Além disso, o gene *neo* não contém sítios de restrição *Bam* HI. Dessa forma, para comprovar o simples nocaute são esperadas duas marcações, na membrana do southern blot, utilizando a sonda 5'UTR, uma com 3044pb referente ao alelo selvagem, e outra com 4066pb referente ao alelo nocauteado. No genoma selvagem apenas uma marcação com a sonda 5'UTR no tamanho 3044pb é esperada referente aos dois alelos intactos. Na hibridação com a sonda *neo* é esperada apenas uma marcação referente ao cassete *neo* no tamanho de 4.066 pb no genoma simples nocaute. A terceira sonda é composta pelo gene *dpp8tc* seu tamanho é 2520pb, o objetivo desta sonda é evidenciar duas marcações no genoma selvagem decorrentes da existência de dois sítios de *Bam* HI no locus, essas marcações serão mais evidentes pela existência dos dois alelos intactos. No genoma simples nocaute, as duas marcações serão mais suaves em decorrência da ausência de um dos alelos que foi nocauteado. Após todo o planejamento da

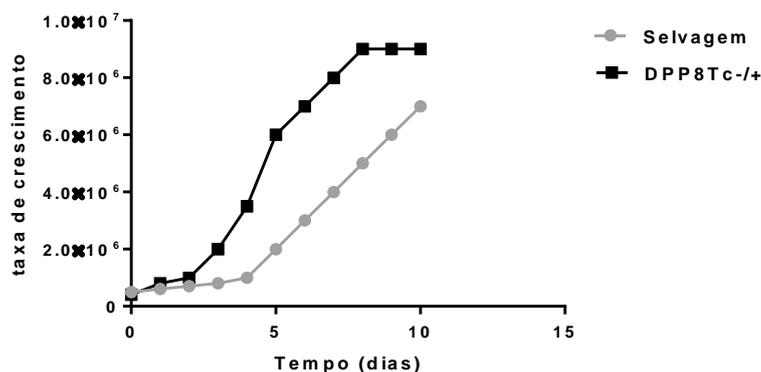
técnica, o DNA genômico dos parasitos selvagem e nocauteados foram digeridos pela enzima de restrição *Bam* HI, a figura 20B mostra o resultado desta digestão.

O DNA digerido foi transferido para uma membrana de nylon a qual foi hibridada primeiramente com a sonda 5'UTR, a análise das marcações do Southern blot confirmou a integração do cassete no parasito nocaute nos tamanhos esperados para o parasito selvagem e para o parasito nocaute simples *neo* (Fig 26 C). A membrana foi de-hibridada e re-hibridada com a segunda sonda, desta vez composta pelo o gene *neo* para verificar se o cassete *neo* estava corretamente inserido no maior fragmento de 4.066pb, esta segunda hibridação confirmou a correta integração do gene em um dos lócus do gene *dpp8tc* na orientação correta (Fig 26 C). A última hibridação da membrana foi realizada, com a sonda *dpp8tc*, contendo 2520pb, que permitiu identificar a presença dos alelos *dpp8tc* nas variedades selvagem e nocauteada.



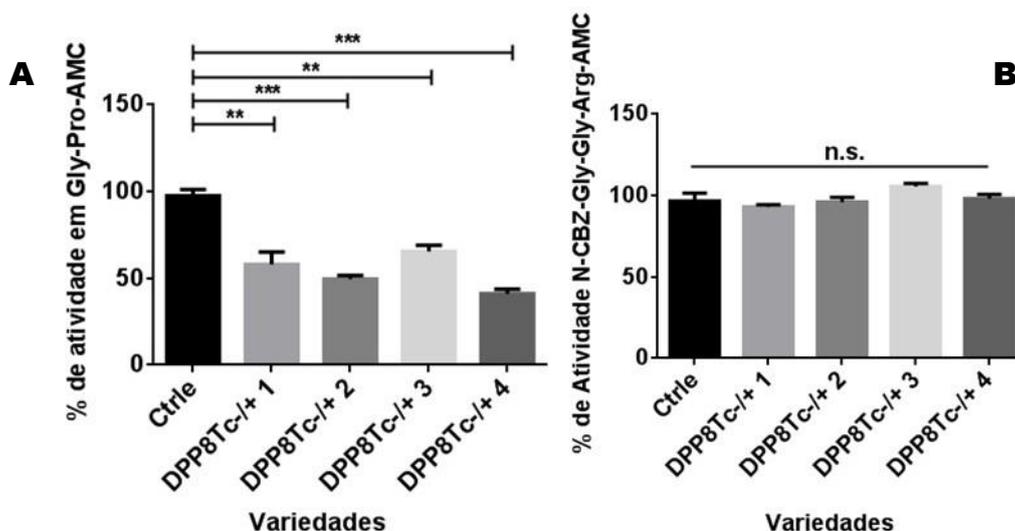
**Figura 26. Deleção do alelo *dpp8tc* em parasitos nocauteados com cassete *neo*.** A: região de interesse do mapa de restrição de *Bam* HI do lócus de *dpp8tc* no cromossomo 37; B: Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico selvagem e nocaute (*DPP8TC*<sup>-/+</sup>) digeridos por *Bam* HI; C: marcação por diferentes sondas das variedades *DPP8Tc*<sup>-/+</sup> e selvagem.

Após confirmação do nocaute simples, a taxa de crescimento destes parasitos foi avaliada e, conforme mostrado na figura 27, os mutantes transfectados com cassete *neo* apresentaram diferenças no crescimento a partir do quarto dia, sendo que esta se mostrou mais acentuada a partir do sexto dia quando comparados com o parasito selvagem.



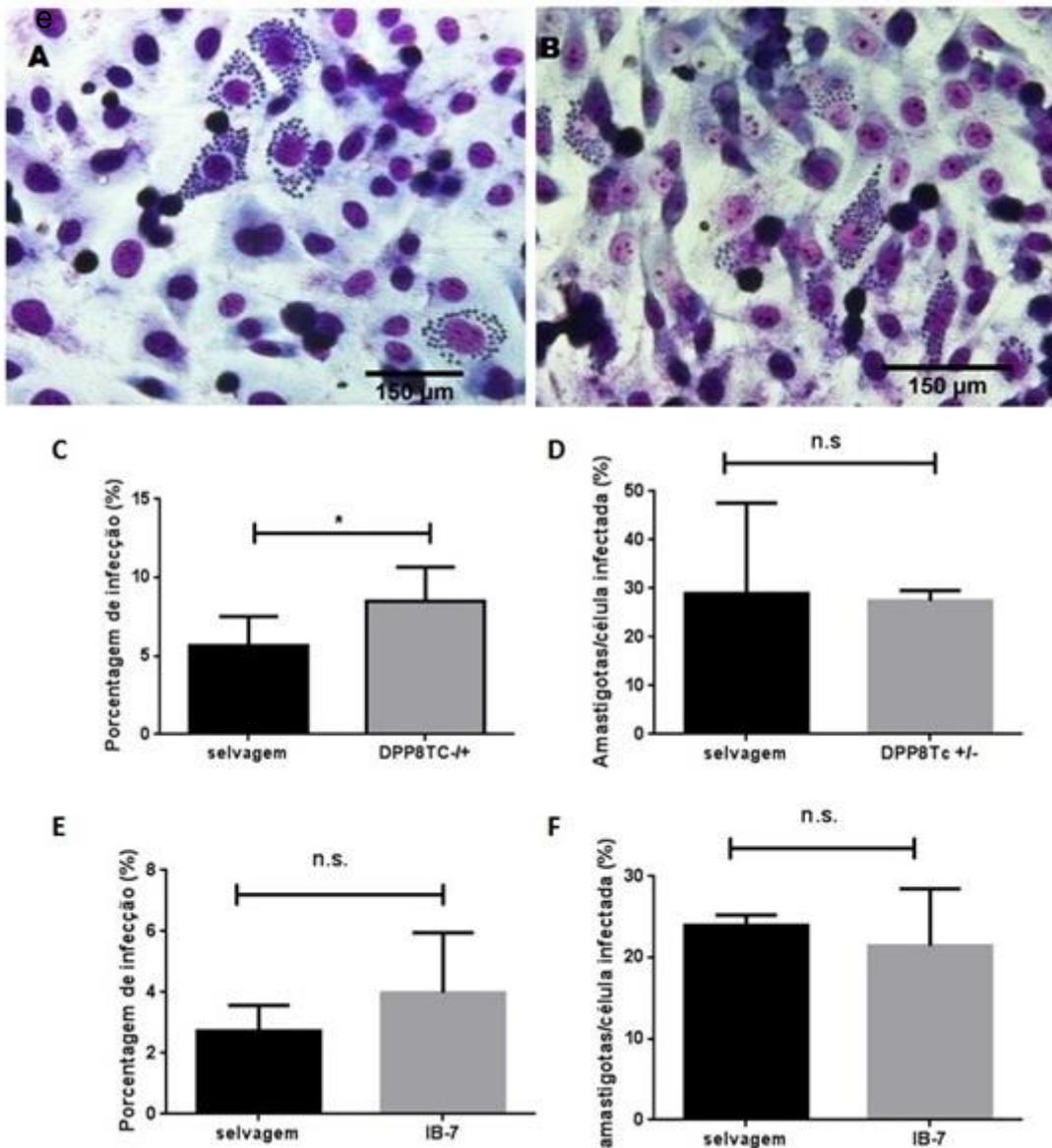
**Figura 27. Avaliação da taxa de crescimento dos parasitos DPP8Tc<sup>-/+</sup> e selvagens.**

Para avaliar o nível da atividade do nocaute simples do gene *dpp8tc* em relação ao substrato Gly-Pro-AMC, foi utilizado como controle interno quantitativo, o substrato específico da protease Oligopeptidase B, o qual a enzima DPP8Tc não tem afinidade. Os parasitos mutantes DPP8Tc<sup>-/+</sup> demonstraram redução significativa da atividade em relação aos parasitos selvagens para o substrato Gly-Pro-AMC (Fig 28 A). O controle interno não foi alterado pelo nocaute da *dpp8tc* conforme previsto (Fig 28 B).



**Figura 28. Atividade de DPP8Tc no extrato de parasitos selvagens e DPP8Tc<sup>+/-</sup> na forma epimastigota.** (A) Substrato de DPP8 Gly-Pro-AMC e (B) Controle usando o substrato de oligopeptidase B, N-CBZ-Gly-Gly-Arg. (diferenças significativas \*\*\*p<0,001 \*\*p<0,01e \*p<0,05 com ANOVA, com teste Tukey; n=5; n.s.= não significativo).

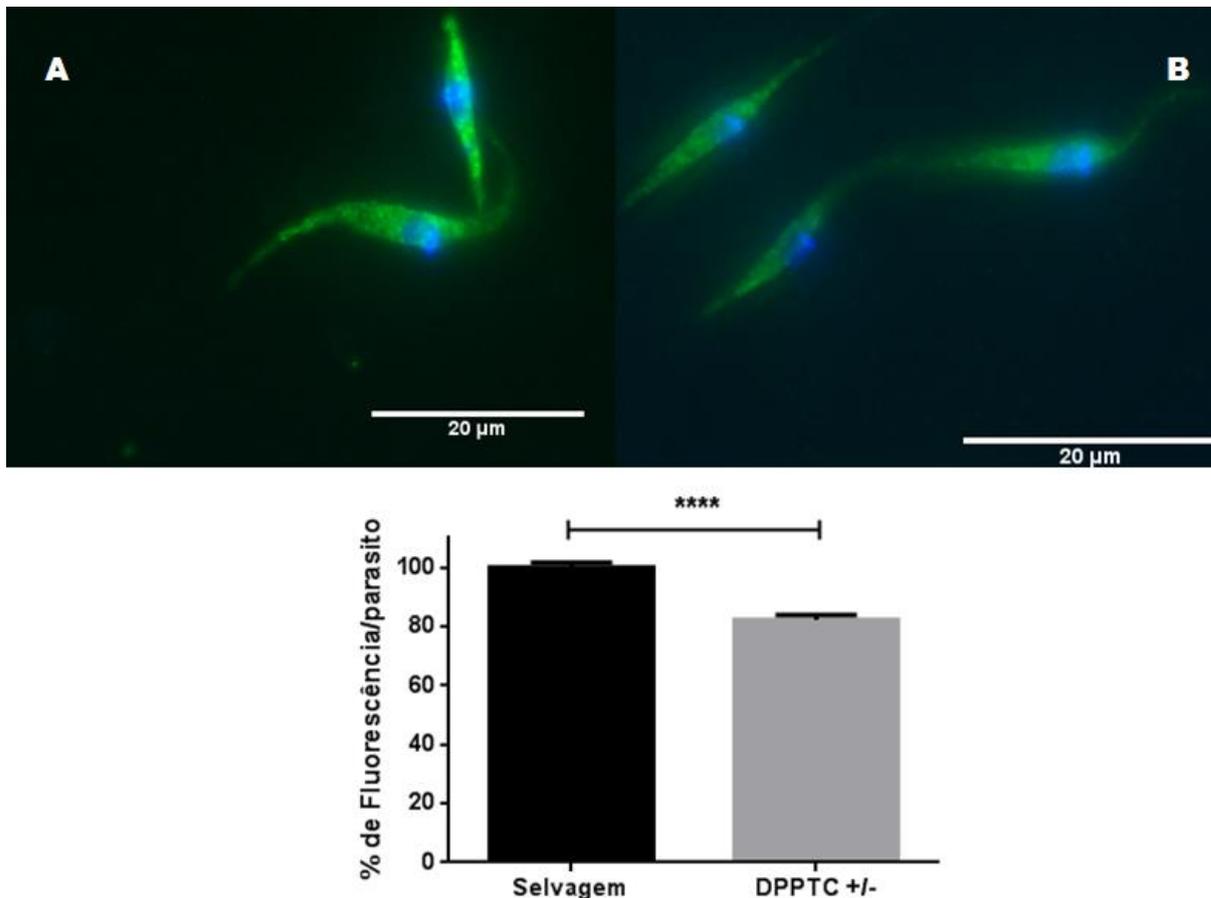
A taxa de infecção dos parasitos mutantes foi avaliada por meio da infecção de células murinas da linhagem L6. As formas metacíclicas dos parasitos mutante e selvagem foram obtidas por meio do envelhecimento da cultura de formas epimastigotas, como descrito na metodologia. Os parasitos nocauteados infectaram 2,9% mais que os parasitos selvagens (29C). A figura 28 mostra a taxa de infecção após 24h, a contagem foi feita a partir do número células infectadas da linhagem L6 e de acordo com o número de amastigotas por célula infectada, que não mostrou diferenças significativas (fig 29 A e B). O inibidor IB-7 também foi incubado com os parasitos selvagens para verificar a taxa de entrada do parasito na célula hospedeira e não houveram diferenças significativas entre o número de células infectadas e amastigotas por células nos parasitos incubados com o inibidor (fig.29).



**Figura 29. Avaliação da taxa de infecção dos parasitos mutantes DPP8Tc<sup>+/-</sup> e selvagens após 24h de infecção.** A: formas amastigotas intracelulares dos parasitos mutantes DPP8Tc<sup>+/-</sup> em células L6; B: formas amastigotas intracelulares dos parasitos selvagens (diferença significativa \*p<0,05 com Teste T, n=2; n.s.=não significativo).

Para verificar a localização da dipeptidil peptidase de *T. cruzi*, procedeu-se uma imunofluorescência das formas epimastigotas do parasito utilizando o anticorpo anti-rDPP8Tc e segundo anticorpo para camundongo conjugado com alexa-fluor-FITC. As lâminas de foram visualizadas em microscópio de fluorescência e

fotografadas em objetiva de 60x (Fig 30 A e B). A marcação verde decorrente do segundo anticorpo demonstrou que a enzima é distribuída por todo citoplasma do parasito. A intensidade da emissão de fluorescência entre os parasitos DPP8Tc<sup>+/-</sup> e selvagens foi avaliada, os mutantes simples apresentaram 80% de fluorescência em relação à obtida nos parasitas selvagens (Fig 30 C).



**Figura 30. Imunocitocalização da DPP8 em formas epimastigotas DPP8Tc<sup>+/-</sup> e selvagem.** A: DPP8Tc localizada em parasitos selvagens; B: DPP8Tc localizada no mutante DPP8Tc<sup>+/-</sup>; C: medida da intensidade de fluorescência dos parasitos. (diferenças significativas \*\*\*\* com p<0,001, teste T, n=2).

O nocaute simples permitiu concluir que a ausência de um dos alelos não é suficiente para inviabilizar a taxa de crescimento e infecção, pelo contrário essas taxas são intensificadas. No entanto, foi possível observar que o nocaute ocasiona a diminuição da atividade enzimática pela metade para o substrato Gly-Pro-AMC.



Outra característica encontrada, foi a diminuição da taxa de fluorescência obtida nos parasitos DPP8Tc<sup>+/-</sup>.



# DISCUSSÃO

## DISCUSSÃO

As Dipeptidil peptidases 8 são proteases membros da família S9B das dipeptidilpeptidases. São enzimas homologas a DPPIV, que possuem preferência pelos mesmos substratos sintéticos e naturais, clivam dipeptídeos a partir do N-terminal, contendo o aminoácido Pro na posição P1 de clivagem (BJELKE et al., 2006). A maioria das DPPs estudadas e caracterizadas bioquimicamente foi produzida em sistemas eucarióticos, provavelmente devido à capacidade desses organismos em expressarem e manterem modificações pós-traducionais, bem como as pontes dissulfeto das cisteínas, diferentemente dos sistemas bacterianos. Na literatura, foram encontrados inúmeros estudos de DPPs que utilizaram sistemas de expressão eucarióticos, as DPPIV, DPP8 e DPP9 humanas já foram expressas em baculovírus, células hek-293 e em células sf9 de insetos (ZIMMERMANN-KORDMANN et al., 2002; BJELKE et al., 2006; HUAN et al., 2015).

A DPP8Tc recombinante estudada neste trabalho foi produzida a partir da clonagem da sequência TcCLB 510183.20 em vetor compatível com *E. coli*, representando uma das únicas DPPs solúveis e expressas em grande quantidade por esse sistema. A DPP8Tc apresenta identidade de 55,9% e 70% de similaridade com a ortóloga DPP8 de *T. brucei*, insolúvel e inativa (dados não mostrados) que foi estudada anteriormente por nosso grupo no mesmo sistema de expressão. Para entender as diferenças vistas com relação a solubilidade e atividade das duas enzimas, a composição química dos resíduos de aminoácidos foi analisada pelo alinhamento das duas cadeias polipeptídicas dos dois alelos que codificam cada enzima (Fig 31).

A partir desse passo, foi possível notar que para a sequência de *T. brucei*, 12 aminoácidos hidrofóbicos consecutivos estão presentes na posição 365-383 (VAAVAAGTTLA) e ausentes na DPP8Tc (Fig.31). Além disso, as duas sequências foram analisadas estatisticamente com relação à composição química e carga elétrica dos seus aminoácidos. A DPP8Tb mostrou um desequilíbrio na composição de aminoácidos, sendo 13,2 % básicos e 11,6% ácidos, enquanto a distribuição desses elementos na DPP8Tc foi bastante equilibrada em 11,7% ácidos e 11,8%

básicos (Tabela 5). Além disso, DPP8Tb possui 6% de aminoácidos apolares a mais, que a DPP8Tc, dentre eles 10 cisteínas a mais, sendo 22 ao total. Isso pode aumentar a probabilidade de formação de pontes dissulfetos necessárias para correta conformação da proteína. No entanto, em sistemas bacterianos de expressão heteróloga, o ambiente redutor interfere na formação dessas pontes dissulfeto provocando a formação de corpo de inclusão e insolubilidade em enzimas recombinantes (SALINAS et al., 2011). Outra divergência entre as duas enzimas é a carga elétrica, DPP8Tc possui -10 enquanto DPP8Tb -1, o que pode auxiliar a enzima DPP8Tc suportar melhor meio intracelular bacteriano. Juntas, todas essas características podem favorecer a expressão da DPP8Tc em *E. coli* de forma solúvel.

Tabela 5. Composição química dos aminoácidos da DPP8Tc e DPP8Tb

Propriedades*	DPP8Tc		DPP8Tb	
	Qtd	%	Qtd	%
Minúsculo (A+C+G+S+T)	256	30,5	283	33,3
Pequeno (A+C+D+G+N+P+S+T+V)	444	52,9	469	55,2
Alifático (A+I+L+V)	244	29,1	259	30,5
Aromático (F+H+W+Y)	104	12,4	106	12,5
Apolar (A+C+F+G+I+L+M+P+V+W+Y)	462	50,1	476	56,0
Polar (D+E+H+K+N+Q+R+S+T)	377	44,9	374	44,0
Carregado (D+E+H+K+R)	197	23,5	211	24,8
Básico (H+K+R)	99	11,8	112	13,2
Ácido (D+E)	98	11,7	99	11,6

Qtd- Número de aminoácidos

\*Classificação de acordo com o site: [https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss\\_pepstats/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/)

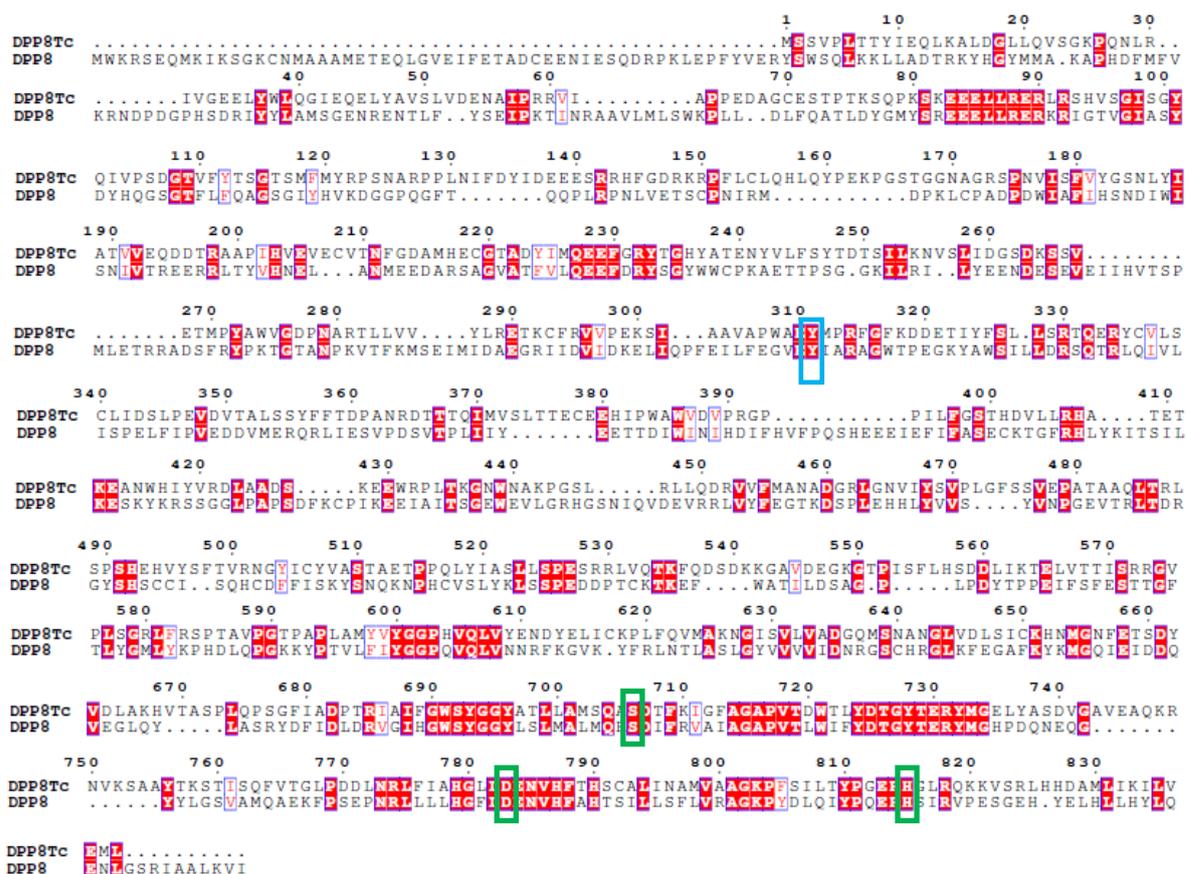
Apesar das inferências, para se ter certeza exata de quais aminoácidos exercem as funções de solubilidade e atividade, a mutagênese sítio dirigida seria mais informativa. Esse experimento realizado por Pitman (2010) para identificar os aminoácidos importantes para DPP8 humana mostrou que os resíduos hidrofílicos nas posições S1 e S2 presentes no bolsão catalítico são essenciais para a atividade da enzima, entre eles os resíduos H434, D435 e Y315. Ao analisar o alinhamento de DPP8Tc e DPP8Tb (Fig 31), é possível observar que destes anteriores, o resíduo Y315 é conservado tanto em *T. cruzi* quanto para *T. brucei* na posição Y311.



**Figura 31. Alinhamento das sequências referentes aos aminoácidos da DPP8Tc e DPP8Tb.** Os resíduos em vermelho mostram as regiões conservadas, o contorno azul reúne resíduos de mesma natureza química. O retângulo de linha verde: resíduos presentes apenas em DPP8Tb. O retângulo de linha roxa: resíduo 311Y, conservados em DPP8Tc e DPP8Tb. O retângulo de linha rosa: resíduo D422 presente apenas em DPP8Tc.

O resíduo D435 importante para catálise enzimática da DPP8 humana está conservado na posição D422 apenas para DPP8Tc, sendo plausível considerar que este esteja também envolvido na atividade da enzima. As representantes das serino proteases da família DPPIV apresentam um consenso, todos possuem uma tríade catalítica organizada em domínios  $\alpha/\beta$ - hidrolases contendo uma sequência nucleofílica de resíduos de aminoácidos Gly-Trp-Ser-Tyr-Gly (ABBOTT et al., 2000). Essa organização da tríade S739, H849 e D817 foi identificada no alinhamento das sequências de DPP8Tc com DPP8Tb e provavelmente ocupam as posições S707, H815 e D783 da DPP8Tc (Fig 31). A análise do alinhamento da DPP8Tc com a

DPP8 humana mostrou que dos resíduos vistos por mutagênese da DPP8 humana, apenas Y315 está conservado, ocupa a posição Y 311 do alinhamento (Fig 32). Essas análises ajudam a supor quais aminoácidos são cogitados a estarem envolvidos na atividade enzimática, porém apenas experimentos mais acurados como dicróismo circular e a mutagênese sítio dirigida responderão certamente quais são estes aminoácidos.



**Figura 32. Alinhamento das seqüências referentes aos aminoácidos da DPP8Tc e DPP8 humana.** Os resíduos em vermelho mostram as regiões conservadas, o contorno azul reúne resíduos de mesma natureza química. As linhas verdes identificam a tríade catalítica da DPP8Tc: S707, H815 e D823 da DPP8Tc. O retângulo de linha azul indica o resíduo de aminoácido conservado na DPP8Tc, associado a atividade enzimática na DPP8 humana.

A DPP8Tc é uma serino-protease de *Trypanosoma cruzi*, que foi pela primeira vez caracterizada, sua atividade enzimática é semelhante as demais DPPs relatadas na literatura. A natureza química dos aminoácidos é crucial para atividade nas

posições P1 e posição P2 do substrato. Dessa forma a DPP8 requer um resíduo de aminoácido polar na posição P1, já na posição P2, o aminoácido deve possuir cadeia lateral apolar e resíduos carregados (BJELKE et al., 2006).

Em nossos resultados foi visto que a DPP8Tc possui afinidade pelo substrato Gly-Pro-AMC com  $K_M$  de 10,78  $\mu\text{M}$ ,  $K_{cat}$  de  $1,67 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $V_{max}$   $4,6 \times 10^{-5} \mu\text{mol}$  de AMC liberado/min e  $K_{cat}/K_M: 1,55 \times 10 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (tabela 2). A mesma preferência por substrato foi observada também na DPPIV do fungo patogênico *Aspergillus fumigatus*, que hidrolisa preferencialmente ligações Xaa-Pro (BEAUVAIS et al., 1997). Outros substratos contendo o N-terminal bloqueado foram testados, e em nenhum deles a enzima obteve atividade, indicando que a enzima de fato é uma dipeptidyl dipeptidase que hidrolisa ligações a partir do N-terminal, conforme o esperado (tabela 1).

Os testes executados para caracterização bioquímica da DPP8Tc mostraram que a enzima aumenta significativamente a sua atividade em tampão 50 mM Tris pH 7,5 (Fig 11). Este tampão é semelhante ao utilizado na caracterização bioquímica da DPPIV de *Aspergillus fumigatus* (BEAUVAIS et al., 1997). No entanto, foi visto que a DPP8Tc melhora ainda mais a sua atividade na presença de 1,25mM de DTT, 150mM de NaCl em pH 7,5 (Fig 12).

O DTT atua nos tiois dos resíduos de cisteínas formando moléculas dissulfeto em sítios importantes para enzima ocasionando a melhoria da atividade e a afinidade pelo substrato na presença do aditivo (GILGE; FISHER; CHAI, 2008). Em enzimas nas quais os resíduos de cisteínas não são importantes para atividade, o DTT pode não alterar a atividade enzimática conforme observado por MOTTA et al., (2012) na Oligopeptidase B (OPBTC).

A DPP8Tc melhora a atividade com a adição 150mM e 300mM de NaCl em 50mM Tris pH 7,5 (Fig 13). A adição de sais, pode alterar a força iônica do tampão, nem todas as enzimas se tornam mais ativas como a DPP8Tc, algumas são sensíveis as concentrações de sal como visto por Motta (2012) no estudo de dimerização da OPBTC. As concentrações acima de 0,5M de sal são menos toleradas pelas enzimas (SCOPES, 2002). A concentração de NaCl obtida para DPP8Tc se assemelha além da concentração fisiológica, mas igualmente à concentração vista na caracterização bioquímica da DPP5 de *Porphyromonas*

*gingivalis*, protease localizada na face externa da membrana periplasmática (OHARA-NEMOTO et al., 2014), e DPPIV humana, uma proteína transmembranar (BJELKE et al., 2006).

Por fim o aditivo EDTA foi testado para verificar mudanças na atividade enzimática da DPP8Tc, este reagente é um quelante de íons divalentes, essenciais para atividades de metaloproteases, esse aditivo atua como inibidor dessas enzimas. Na DPP8Tc, uma serino protease, a adição deste quelante estabilizou a estrutura da molécula tornando-a mais ativa (Fig 14). Na DPPIV humana o EDTA não altera a atividade enzimática (MENTLEIN, 1999). O pH ótimo em tampão 50mMTris obtido para atividade da DPP8Tc situa-se em torno de 7,5 (Fig 10B) mesmo pH obtido na caracterização bioquímica da Prolil oligopeptidase (POP) de *Leishmania chagasi* (SILVA, 2014) e próximo ao pH obtido na caracterização bioquímica da DPPIV do fungo *Aspergillus fumigatus* com pH ótimo 7,4. Nos pHs 6,0 e 5,0 a DPP8Tc se mostrou pouco ativa. Ao se obter as concentrações ótimas de cada aditivo, os mesmos foram incluídos em conjunto no tampão 50mM Tris pH 7,5 (Fig 15).

Dentre as características vistas na DPP8Tc, um aspecto interessante foi a temperatura ótima com atividade de 100% em torno dos 24-28°C (Fig 16), 80% de atividade em torno dos 30° e redução de 50% da atividade enzimática à 37°C semelhante a temperatura ótima vista para enzima recombinante benzoato digoxigenase do organismo *Rhodococcus ruber* (TAVAKOLI et al., 2016) e semelhante a temperatura requerida para sobrevivência das formas epimastigotas em insetos hematófagos.

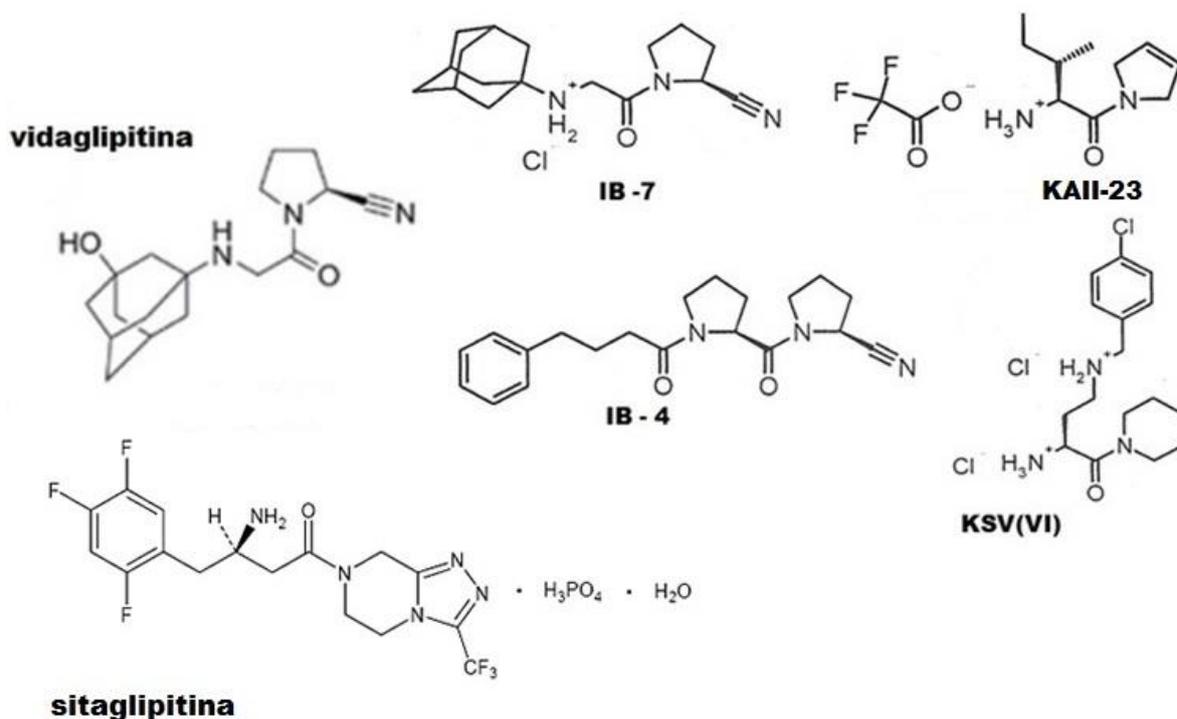
Um aspecto correlacionado com a atividade de algumas proteases é a dimerização, esse processo pode esconder dentro da molécula os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos provocando a exposição do sítio ativo da enzima. Os membros da família S9B normalmente possuem uma configuração dimérica (revisado por BJELKE et al. 2006). Considerando que essas estruturas sejam bem conservadas, e baseando-se nos estudos de dimerização e ultracentrifugação realizados neste trabalho, foi visto que a DPP8Tc é um dímero (24 A,B e 23 A,B). Na gel filtração o pico encontrado de 210 kDa coincide com o valor obtido com o dímero encontrado por Lee (2006) no estudo de dimerização da DPP8 humana. A

dimerização da DPP8Tc instiga a busca pelo entendimento de sua função, pois nos organismos patogênicos como *T. cruzi* e *Porphyromonas gingivalis* são descritas proteases diméricas, com importantes papéis na biologia desses organismos. A protease dimérica de *T. cruzi*, oligopeptidase B (MOTTA et al., 2012), exerce um papel importante para o parasito, atua gerando moléculas de  $Ca^{2+}$  necessárias para o recrutamento e fusão de lisossomos. A DPP5 do fungo patogênico *Porphyromonas gingivalis* atua no metabolismo de aminoácidos. Com relação aos resíduos que estão envolvidos na dimerização, na DPP8 humana foi visto que os resíduos hidrofílicos D772, Y315, presentes nas posições S1 e S2 do bolsão catalítico são fundamentais nesse processo (PITMAN; MENZ; ABBOTT, 2010), no alinhamento realizado entre a DPP8Tc e a DPP8 humana (fig 32) verifica-se que estes resíduos são conservados nas posições D770 e Y316, representando mais uma evidência da dimerização da DPP8Tc.

No estudo da inibição enzimática da DPP8Tc realizado com inibidores clássicos, foi visto que esses inibidores exerceram baixa inibição enzimática (Tabela 3). Entre os 16 inibidores de DPP testados, apenas Ib-7 com  $IC_{50}$  de 29,36 nM, Ib-4 com 484.90 nM, KSIV[S] com 95.470  $\mu$ M e KAlI23 com 2.724  $\mu$ M inibiram a atividade da enzima (Fig 33) (Tabela 4).

O inibidor IB-7, com maior porcentagem de inibição contém em sua composição química o grupo adamantil, este grupo está presente na molécula do inibidor vidagliptina (1-([(3-hydroxy-1-adamantyl) amino] acetyl)-2-cyano-[S]-pyrrolidine), um potente fármaco utilizado na terapia da Diabetes tipo II para inibir a DPPIV humana, com de  $IC_{50}$  de 4,5 nMol/L (revisado por KALRA 2011). A vidagliptina é um inibidor reversível competitivo que supera a inibição da DPPIV por sitagliptina com  $IC_{50}$  de 26 nMol/L, próximo ao valor obtido em nossos resultados com a inibição da DPP8Tc pelo IB-7 de 29,36nMol/L. Embora sitagliptina tenha um  $IC_{50}$  para DPPIV próximo à do IB-7 para DPP8Tc as moléculas desses inibidores são diferentes. Além disso, sitagliptina não inibiu a atividade enzimática da DPP8Tc (dados não mostrado), sugerindo que de fato o grupo adamantil presente no composto IB-7 esteja envolvido na inibição da DPP8Tc. As DPPs IV clivam na posição P1 substrato amida, o grupamento nitrilo presente nesses inibidores fornecem estabilidade química e inibição por competição com o substrato. Os

inibidores IB-7, IB-4, KAI-23 e KSV(VI) possuem em comum o grupamento cianopirrolidina (VILLHAUER et al., 2003), esse grupamento em inibidores DPP-IV fornece potente inibição, este fato pode explicar a obtenção dos maiores IC<sub>50</sub> com essas moléculas.



**Figura 33. Fórmulas químicas dos inibidores de DPP.**

Adaptada de MOSS et al 2015,p1-15

Além da caracterização bioquímica e da dimerização, a função da DPP8Tc foi avaliada por meio do nocaute físico. O estudo foi iniciado em 2011(Figueirêdo, 2013) e resultou na produção dos cassetes 5'UTRneo3'UTR e 5'UTRhyg3'UTR. No atual estudo, esses cassetes foram transfectados em formas epimastigotas selvagens. Após a transfecção e seleção sobreviveram os mutantes DPP8Tc<sup>+/-</sup>hyg e DPP8Tc<sup>+/-</sup>neo. A confirmação foi obtida pela revelação do southernblot com 3 diferentes sondas que mostraram que ocorreu a recombinação homóloga e a correta integração do cassete contendo o gene neomicina fosfotransferase nos 4 clones obtidos (Fig 26).

A transfecção do cassete contendo higromicina fosfotransferase falhou e não foi vista a integração por southernblot (dados não mostrados). A avaliação da taxa de crescimento mostrou que o parasito nocauteado cresce em uma maior proporção que os parasitos selvagens (Fig 27) e a análise da infecção mostraram que os parasitos nocauteados infectam numa maior porcentagem que os selvagens (Fig 28). Anteriormente, já foi visto por Figueirêdo (2013), diferenças significativas na taxa de crescimento do parasito nocauteado para o parasito selvagem. Embora tenham sido encontrada divergências na avaliação da atividade dos extratos protéicos dos mutantes simples para DPP8Tc em substrato específico Gly-Pro-AMC, o presente trabalho demonstrou que houve diminuição em cerca de 50% da atividade para o substrato Gly-Pro-AMC, o que coincidiu com a diminuição da fluorescência obtida em parasitos nocauteados em comparação com os selvagens 40% (Fig 30).

No estudo da função de outros genes, como da OPBTC embora o nocaute apresentasse a modificação da morfologia de epimastigotas, não foram visualizadas diferenças na motilidade, metaciclogênese ou tripomastigotas em cultura, indicando a possível existência de uma rota de invasão da célula hospedeira levando a uma ambigüidade da função desta protease no mecanismo de infecção da célula (KLEMBÁ; GOLDBERG, 2002). Não foi possível avaliar a infecção *in vivo* dos mutantes neste trabalho, apesar de ter sido previamente realizado, porém sem sucesso devido à dificuldade de identificar a parasitemia nos camundongos (FIGUEIREDO, 2013). Portanto essa é uma lacuna importante a ser explorada futuramente, uma vez que estudar a infecção *in vivo* poderá auxiliar na determinação da função gênica da DPP8Tc. Em outro estudo da função por nocaute simples em *T. cruzi*, o gene *dhfr-ts* foi avaliado (BRANDAN et al., 2011) e os parasitos nocauteados apresentaram taxa de crescimento atenuada *in vitro*, acompanhada da redução da infecção *in vivo*. Desse modo torna-se necessário estabelecer um protocolo otimizado que possa avaliar taxas de infecção obtidas *in vivo* e confirmar se as mesmas corroboram as taxas de infecção obtidas *in vitro*.

Considerando a temperatura ótima de 28 °C obtida nos ensaios de atividade da proteína, e que a mesma representa a temperatura necessária para sobrevivência das formas epimastigotas no barbeiro, foram conduzidos

experimentos para avaliar a taxa de metaciclo gênese dos mutantes. Este experimento também falhou, mas deve ser retomado pois este é um processo crucial para a viabilidade do ciclo de vida do parasito. Ainda com o intuito de entender o papel da DPP8Tc para o parasito, foram realizados alguns western blots para comparar a expressão da enzima nas diferentes formas do parasito (epimastigota, tripomastigotas, tripomastigotas metacíclicos e amastigotas), no entanto sem um resultado satisfatório. Após testar diferentes condições, foi observado que o fato de ferver o extrato antes de submetê-lo a SDS-PAGE (protocolo padrão) reduzia drasticamente a presença da enzima no gel e assim reduzindo a detecção pelo anticorpo, o que foi revertido quando se aquecia o extrato a 70 °C por 5 min. Já coletamos as diferentes formas dos parasitos para repetir o western blot com esta nova condição. Por fim, o conjunto, esses três esses experimentos devem fornecer informações relevantes na busca da função da DPP8Tc.

O nocaute do segundo alelo da DPP8Tc foi realizado, porém os parasitos não sobreviveram a seleção com os antibióticos. As regiões 5' e 3' UTRs dos alelos dois foram alinhadas e verificou-se que existem 93% de identidade e similaridade para região 3' UTR, já para região 5' UTR existem 86,6% de identidade e similaridade para essas sequências, é possível que as diferenças entre nucleotídeos da região 5' que representa mais de 10% de diferenças tenha inviabilizado o nocaute do segundo alelo. Dessa forma, a medida que a segunda transfecção era realizada, o alelo já nocauteado sofria recombinação homóloga com o cassete contendo segunda marca de seleção (higromicina fosfotransferase). Dessa forma, o alelo intacto ainda permanecia no genoma. Ao ser adicionado o antibiótico, a falta do cassete anterior contendo a marca de seleção (neomicina fosfotransferase) provocava a morte dos parasitos durante as etapas de seleção do duplo nocaute. Em *Trypanosoma brucei* os sucessos em experimentos de transfecção por recombinação homóloga são obtidos com regiões 5' e 3' contendo 100% de identidade, nas transfecções com cassetes contendo 11% de diferenças essa taxa decai cerca de 200 vezes (BARNES; MCCULLOCH, 2007). Assim, aplicando-se esse conceito ao resultado obtido com a transfecção do segundo cassete, evidencia-se a necessidade da construção de um cassete que faça recombinação dentro do gene *dpp8Tc* que possui uma alta similaridade entre as duas sequências disponíveis no banco de

dados, representando uma estratégia que pode resolver o problema de obtenção do nocaute do segundo alelo, dessa forma a recombinação aconteceria dentro do gene evitando a baixa taxa de identidade da região 5'UTR.

Na tentativa de verificar se ocorre inibição com o inibidor IB-7, o mesmo foi incubado por 3 horas com tripomastigotas infectivos provenientes de cultura, o IB-7 não foi capaz de impedir a infecção (dados não mostrados). Contudo, a cultura simples nocaute não foi incubada com este inibidor, visando aproximar-se ao resultado esperado com duplo nocaute. Este dado somado as outras técnicas a serem empregadas podem oferecer resultados satisfatórios ao estudo da função da DPP8Tc.

Em *Trypanosoma brucei*, na qual a técnica de RNA interferente é uma ferramenta aplicável, o silenciamento do gene e a inibição da DPP8 não alteraram a sobrevivência ou a infecção demonstrando que a protease não é essencial para o parasito (MOSS et al., 2015). Contudo, não chegamos ao experimento final de deleção dos dois alelos para verificar se o mesmo conceito é aplicável da DPP8Tc. Dessa forma, para entender a função do gene *dpp8tc*, é necessária a obtenção do nocaute do segundo alelo, visto que a inibição com o melhor inibidor de DPP8Tc não inibe a entrada do parasito na célula hospedeira, um novo desenho do cassete contendo as regiões N e C terminais da DPP8Tc para a recombinação com o alelo intacto da DPP8Tc se torna necessário. Outra alternativa que, já está sendo incorporada em nosso laboratório é a metodologia de nocaute gênico pela técnica CRISPR-CAS-9, uma ferramenta que incrementou e acelerou o estudo de genes por ser rápida e eficiente, permitindo o nocaute de vários genes e famílias de genes relacionadas (PENG et al., 2015) poderá auxiliar no entendimento da função da DPP8Tc em *Trypanosoma cruzi*.



# CONCLUSÃO

## CONCLUSÃO

O simples nocaute representou um desafio que levantou ainda mais questionamentos sobre a função biológica do gene *dpp8tc*, a dipeptidil peptidase 8 tem ou não função biológica no parasito, se sim é envolvida é na metaciclogênese? São lacunas que precisam ser investigadas. Mas ainda assim, além das contribuições obtidas pelo estudo funcional e bioquímico, foi possível tirar conclusões importantes:

- A DPP8Tc é dimérica, ativa com afinidade pelo substrato Gly-Pro-AMC;
- A DPP8Tc pode ser expressa de forma ativa e solúvel em sistema bacteriano;
- O tampão ótimo obtido para atividade enzimática é o 50mM Tris pH 7,5 contendo os aditivos 1,25 mM de DTT, 150mM de NaCl e 5mM de DTT;
- O pH ótimo da DPP8Tc em tampão 50mM Tris é 7,5;
- A DPP8Tc é citossólica;
- A temperatura ótima para atividade enzimática da DPP8Tc é 28°C com significativa diminuição após 37°C, característica peculiar a DPP8Tc não visualizada em outras recombinantes;
- Os inibidores da DPPIV contendo em sua composição química o grupo adamantil exerceram maior inibição da DPP8Tc;
- O nocaute simples diminui a atividade enzimática da DPP8Tc em 50% e a expressão da enzima verificada por imunofluorescência;
- O nocaute simples +/-, a taxa de infecção e taxa de crescimento não foram suficientes para investigar a função da DPP8Tc no parasito *T. cruzi*;

# PERSPECTIVAS

## PERSPECTIVAS

O simples nocaute apesar de diminuir a atividade da Dipeptidil peptidase 8, e fornecer a evidência da diminuição da taxa de expressão da enzima, não foi suficiente para entender a função desta protease no parasito. O trabalho representou um grande avanço no estudo da função e entendimento da ferramenta de manipulação de genes, mas, ainda há muitos objetivos a serem alcançados para o completo entendimento da função desse gene em *T. cruzi*, são eles:

- Avaliar a metaciclologênese dos parasitos DPP8Tc -/+.
- Tratar os parasitos simples nocaute com inibidor IB-7 de DPP8Tc e vidaglipitina.
- Realizar o western Blot das formas tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas.
- Construir um cassete específico para o segundo alelo da DPP8Tc visando o nocaute duplo.
- Infectar camundongos com o simples nocaute para verificar a infecção *in vivo*.
- Realizar mutações sítio dirigidas para avaliar quais os resíduos de aminoácidos estão envolvidos na dimerização e atividade da DPP8Tc.



# REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, C. A. et al. Cloning, expression and chromosomal localization of a novel human dipeptidyl peptidase (DPP) IV homolog, DPP8. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 20, p. 6140–6150, 2000.

ÁLVAREZ, J. M. et al. Chagas disease: Still many unsolved issues. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

ANTUNES, A. F. et al. Chronic Heart Disease after Treatment of Oral Acute Chagas Disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 184–186, 2016.

ARAÚJO, P. R.; TEIXEIRA, S. M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *trypanosoma cruzi* - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 3, p. 257–266, 2011.

AUFDERHEIDE, A. et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. **PNAS**, v.101, n.7, p. 2034-2029, 2004.

BASTOS, I. M. D. et al. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. **Biochem. J**, v. 388, p. 29–38, 2005.

BASTOS, I.M.D. et al. Parasite prolyl oligopeptidases and the challenge of designing chemotherapeutics for Chagas disease, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v .20-p.3103-3115.

BAYER-SANTOS, E. et al. Expression and cellular trafficking of GP82 and GP90 glycoproteins during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 127, 2013.

BEAUVAIS, A. et al. Dipeptidyl-peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 8, p. 3042–3047, 1997.

BARNES, R. L.; MCCULLOCH, R. *Trypanosoma brucei* homologous recombination is dependent on substrate length and homology, though displays a differential dependence on mismatch repair as substrate length decreases. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 10, p. 3478-3493, 2007

BELLO CORASSA, R. et al. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: a critical review. **Perspectives in public health**, v. 20, n. 10, p. 1–7, 2016.

BERN, C ; KJOS, S.; YABSLEY; M. MONTGOMERY, S. *Trypanosoma cruzi* and chagas' disease in the united states. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24,n.4, p.655-681, 2011

- BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in science**, v. 1, n. 1-6, p. 41-55, 2014.
- BJELKE, J. R. et al. Dipeptidyl peptidases 8 and 9: specificity and molecular characterization compared with dipeptidyl peptidase IV. **The Biochemical journal**, v. 396, n. 2, p. 391–399, 2006.
- BONFIM-MELO, A. et al. Trypanosoma cruzi extracellular amastigotes trigger the protein kinase D1-cortactin-actin pathway during cell invasion. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 1797–1810, 2015.
- BORGES, B. C. et al. Mechanisms of Infectivity and Evasion Derived from Microvesicles Cargo Produced by Trypanosoma cruzi. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. November, p. 1–7, 2016.
- BOUVIER, L. A. et al. Plasmid Vectors and Molecular Building Blocks for the Development of Genetic Manipulation Tools for Trypanosoma cruzi. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–11, 2013.
- BRANDAN, C. P. et al. Knockout of the dhfr-ts gene in trypanosoma cruzi generates attenuated parasites able to confer protection against a virulent challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 12, 2011.
- BRENER, Z. *Typanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. **Scielo Books**, p. 24–31, 1997.
- BURTOLOSO, A. C. B. et al. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease inhibitors. **Plos One**, v.11, n.2, p. 1-16, 2017.
- CAMPOS, M. A. et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J Immunol**, v. 167, n. 1, p. 416–423, 2001.
- CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29–37, 2002.
- CARLIER, Y. et al. Congenital Chagas disease: An update. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 363–368, 2015.
- CARLIER, Y.; TRUYENS, C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between Trypanosoma cruzi parasites, pregnant women, placenta and fetuses. **Acta Tropica**, v. 151, n. 1, p. 103–115, 2015.
- CARRILERO, B. et al. Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. **Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia**, v. 24, n. 3, p. 123–6, 2011.
- CERNY, N. et al. Coadministration of cruzipain and GM-CSF DNAs, a new

immunotherapeutic vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 12, n. 2, p. 438–450, 2016.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909.

CHIEN, C. H. et al. One site mutation disrupts dimer formation in human DPP-IV proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52338–52345, 2004.

CHIEN, C. H. et al. Identification of hydrophobic residues critical for DPP-IV dimerization. **Biochemistry**, v. 45, n. 23, p. 7006–7012, 2006.

CHUNG, K. M. et al. The dimeric transmembrane domain of prolyl dipeptidase DPP-IV contributes to its quaternary structure and enzymatic activities. **Protein Science**, v. 19, n. 9, p. 1627–1638, 2010.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. v. 21, n. 8, p. 1881–1888, 2002.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, 2010.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A.; JUNQUEIRA, A. C. V. Ecoepidemiology, Short history and control of chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 856–862, 2014.

CUCUNUBÁ, Z. M. et al. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 42, 2016.

DARIO, M. A. et al. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 477, p. 1–14, 2016.

DAVID, F. et al. Identification of serine 624, aspartic acid 702, and histidine 734 as the catalytic triad residues of mouse dipeptidyl-peptidase IV (CD26). A member of a novel family of nonclassical serine hydrolases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 23, p. 17247–17252, 1993.

DE GAUDENZI, J. G. et al. Genome-wide analysis of 3'-untranslated regions supports the existence of post-transcriptional regulons controlling gene expression in trypanosomes. **PeerJ**, v. 1, p. e118, 2013.

DEU, E. et al. Functional studies of plasmodium falciparum dipeptidyl aminopeptidase i using small molecule inhibitors and active site probes. **Chemistry**

**and Biology**, v. 17, n. 8, p. 808–819, 2010.

DIAS, J.; SILVEIRA, A.; SCHOFIELD, C. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 97, n. 5, p. 603–612, 2002.

DOS SANTOS, M. A. et al. A successful strategy for the recovering of active P21, an insoluble recombinant protein of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific reports**, v. 4, p. 4259, 2014.

DOUMAS, A. et al. Characterization of the prolyl dipeptidyl peptidase gene (dppIV) from the Koji mold *Aspergillus oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4809–4815, 1998.

DSHS. Texas Chagas Disease Update. **DSHS State**, p. 1–2, 2016.

ENGEL, M. et al. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 9, p. 5063–5068, 2003.

FIGUEIRÊDO, D. **Análise funcional preliminar da dipeptidil peptidase 8 e da otubaina de *Trypanosoma cruzi* por meio de nocaute gênico**. 13f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) Faculdade de Medicina, UnB, Brasília, 2013.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.

GILGE, J. L.; FISHER, M.; CHAI, Y. C. The effect of oxidant and the non-oxidant alteration cellular thiol concentration on the formation of protein mixed-disulfides in HEK 293 cells. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, 2008.

GLOVER, L.; JUN, J.; HORN, D. Microhomology-mediated deletion and gene conversion in African trypanosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 4, p. 1372–1380, 2011.

GONÇALVES, V. M. et al. NLRP3 Controls *Trypanosoma cruzi* Infection through a Caspase-1-Dependent IL-1R-Independent NO Production. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2013.

GRELLIER, P. et al. *Trypanosoma cruzi* Prolyl Oligopeptidase Tc80 Is Involved in Nonphagocytic Mammalian Cell Invasion by Trypomastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47078–47086, 2001.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–4523, 2002.

HONG, W.; DOYLE, D. Membrane orientation of rat gp110 as studied by in vitro translation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 32, p. 16892–16898, 1988.

HSU, R. C. et al. Chagas Cardiomyopathy in New Orleans and the Southeastern United States. **The Ochsner journal**, v. 16, n. 3, p. 304–308, 2016.

HUAN, Y. et al. Establishment of a dipeptidyl peptidases (DPP) 8/9 expressing cell model for evaluating the selectivity of DPP4 inhibitors. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 8–12, 2015.

KALRA, S. Emerging role of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the management of type 2 diabetes. **Vascular Health & Risk Management**, v. 4, n. 4, p. 753–768, 2011.

KLEMBE, M.; GOLDBERG, D. E. Biological Roles of Proteases in Parasitic Protozoa. **Annual review of biochemistry**, v. 71, p. 275–305, 2002.

KROPFF, S. P. S. M. R. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. **História, Ciências, Saúde**, v. 46, n. 2, p. 530–533, 2009.

KUGERATSKI, F. G. et al. pTcGW plasmid vectors 1.1 version: A versatile tool for *Trypanosoma cruzi* gene characterisation. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 687–690, 2015.

KUMAGAI, Y. et al. Enzymatic properties of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and its participation in virulence. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 716–724, 2000.

LAMERS, D. et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. **Diabetes**, v. 60, n. 7, p. 1917–1925, 2011.

LAMONT, B. J.; DRUCKER, D. J. Differential antidiabetic efficacy of incretin agonists versus DPP-4 inhibition in high fat-fed mice. **Diabetes**, v. 57, n. 1, p. 190–198, 2008.

LEBOWITZ, J. H. et al. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes and Development**, v. 7, n. 6, p. 996–1007, 1993.

LEE, H. J. et al. Investigation of the dimer interface and substrate specificity of prolyl dipeptidase DPP8. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 50, p. 38653–38662, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head 346 of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

MARTIN, D. L. et al. Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. **Acta Tropica**, v. 149, p. 15–18, 2015.

MARTINS, A. et al. Benznidazole/Itraconazole combination treatment enhances anti-*Trypanosoma cruzi* activity in experimental Chagas disease. **Plos One**, v. 10, n. 6, 1-12.

MATTHEWS, K. R.; TSCHADI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in

trypanosomes. **Genes and Development**, v. 8, n. 4, p. 491–501, 1994.

MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. A. Rapid isolation of DNA from tripanosomatid protozoa using a simple 'miniprep' procedure. **Mol. Biochem Parasitol**, v. 59, n. 2, p. 327–329, 1993

MENTLEIN, R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in inactivation of regulatory peptides **Regulatory peptides**, 1999.

MINISTÉRIO DE SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em saúde**, v. 46, n. 21, p. 1–9, 2015.

MONOD, M. Secreted proteases from dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5–6, p. 285–294, 2008.

MOODY, T. N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix and host cells mediated by human galectin-3. **FASEB Journal**, v. 16, n. 5, p. A898–A898, 2002.

MOSS, C. X. et al. An essential signal peptide peptidase identified in an RNAi screen of serine peptidases of *Trypanosoma brucei*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–15, 2015.

MOTTA, F. N. et al. The *Trypanosoma cruzi* virulence factor oligopeptidase B (OPBTc) assembles into an active and stable dimer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

NISHIMATA, H. et al. Identification of dipeptidyl-peptidase (DPP)5 and DPP7 in porphyromonas endodontalis, distinct from those in porphyromonas gingivalis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–15, 2014.

OBADO, S. O. et al. Repetitive DNA is associated with centromeric domains in *Trypanosoma brucei* but not *Trypanosoma cruzi*. **Genome biology**, v. 8, n. 3, p. R37, 2007.

OHARA-NEMOTO, Y. et al. Identification and characterization of prokaryotic dipeptidyl-peptidase 5 from porphyromonas gingivalis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 9, p. 5436–5448, 2014.

PENG, D. et al. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. **mBio**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2015.

PEREZ-MOLINA, J. A et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1139–1147, 2009.

PINTO DIAS, J. C. The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). **Ann Intern Med**, v. 144, n. 10, p. 772–774, 2006.

PITMAN, M. R.; MENZ, R. I.; ABBOTT, C. A. Hydrophilic residues surrounding the S1 and S2 pockets contribute to dimerisation and catalysis in human dipeptidyl peptidase 8 (DP8). **Biological Chemistry**, v. 391, n. 8, p. 959–972, 2010.

PROCÓPIO, D. O.; BARROS, H. C.; MORTARA, R. A. Actin-rich structures formed during the invasion of cultured cells by infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **European journal of cell biology**, v. 78, n. 12, p. 911–924, 1999.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

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

RASSI, A.J; MARIN-NETO, J.A.;RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of a etiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, n.3, p. 224-235, p. 2017

REIS-CUNHA, J. L. et al. Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct *Trypanosoma cruzi* strains. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 499, 2015.

RIBEIRO, G. et al. Frequent House Invasion of *Trypanosoma cruzi*-Infected Triatomines in a Suburban Area of Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. 1–10, 2015.

RIBEIRO, M. et al. Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. **Exp Parasitol**, v.162, p.1 – 6, 2016

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.1626, 1989

SALINAS, G. et al. Tuned Escherichia coli as a host for the expression of disulfide-rich proteins. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 6, p. 686–699, 2011.

SANIT, R. et al. Gerenciamento do Risco Sanitário na Transmissão de Doença de Chagas Aguda por Alimentos. **Informe técnico**, n. 35, p. 7–14, 2016.

SCOPES, R. K. Enzyme Activity and Assays. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–6, 2002.

SERVEAU, C. et al. Discrimination of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, and mammalian cathepsins B and L, by a pH-inducible fluorogenic substrate of trypanosomal cysteine proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, n. 1–2, p. 275–280, 1999.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845–852, 2012.

SILVA, C. L. **Caracterização bioquímica da Prolil Oligopeptidase de Leishmania chagasi , um potencial alvo quimioterápico para as Leishmanioses.**79f.

Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde). Faculdade de Ceilândia, UnB, Brasília, 2014.

SORIANO-ARANDES, A. et al. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: Current policies and practices. **Tropical Medicine and International Health**, v. 21, n. 5, p. 590–596, 2016.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 317, 2014.

TANG, H. K. et al. Role of a propeller loop in the quaternary structure and enzymatic activity of prolyl dipeptidases DPP-IV and DPP9. **FEBS Letters**, v. 585, n. 21, p. 3409–3414, 2011.

TAVAKOLI, A. et al. Expression, purification and kinetic characterization of recombinant benzoate dioxygenase from. **Molecular Biology Research Communications**, v. 5, n. 3, p. 133–142, 2016.

TEIXEIRA, S. M. R.; DAROCHA, W. D. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 2, n. 1, p. 148–158, 2003.

TEIXEIRA, T. L. et al. *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. **Scientific reports**, v. 5, p. 16877, 2015.

THOMA, R. et al. Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. **Structure**, v. 11, n. 8, p. 947–959, 2003.

VEIGA-SANTOS, P. et al. SQ109, a new drug lead for chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 1950–1961, 2015.

VIEIRA DA SILVA, C. et al. Involvement of Ssp-4-related carbohydrate epitopes in mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 8, p. 2120–2129, 2006.

VILLHAUER, E. B. et al. 1-[[[(3-Hydroxy-1-adamantyl)amino]acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine: A Potent, Selective, and Orally Bioavailable Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor with Antihyperglycemic Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 13, p. 2774–2789, 2003.

VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 16, p. S7–S12, 2000.

WAGNER, L. et al. Unravelling the immunological roles of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) activity and/or structure homologue (DASH) proteins. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 184, n. 3, p. 265–283, 2016.

WAUMANS, Y. et al. The Dipeptidyl Peptidase Family, Prolyl Oligopeptidase, and Prolyl Carboxypeptidase in the Immune System and Inflammatory Disease, Including Atherosclerosis. **Frontiers in immunology**, v. 6, n. August, p. 387, 2015.

WEATHERLY, D. B.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC genomics**, v. 13, p. 1–13, 2009.

WHO. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>.

XU, D. et al. Evaluation of high efficiency gene knockout strategies for *Trypanosoma cruzi*. **BMC microbiology**, v. 9, p. 90, 2009.

ZIMMERMANN-KORDMANN, M. et al. Expression , purification , and characterization of human dipeptidyl peptidase IV / CD26 in Sf9 insect cells. **Protein Expression and Purification**, v. 25, p. 527–532, 2002.