UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

HELINE HELLEN TEIXEIRA MOREIRA

ESTUDOS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS DE UMA PROTEÍNA DE 21 kDa DO *Trypanosoma cruzi*

São Paulo

2012

HELINE HELLEN TEIXEIRA MOREIRA

Estudos físico-químicos e bioquímicos de uma proteína de 21 kDa do *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Física aplicada-Opção Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Horjales Reboredo

Versão Corrigida

(Versão original disponível na unidade que aloja o programa)

São Carlos

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Teixeira Moreira, Heline Hellen Teixeira Moreira Estudos físico-químicos e bioquímicos de uma proteína de 21 kDa do Trypanosoma cruzi / Heline Hellen Teixeira Moreira Teixeira Moreira; orientador Eduardo Horjales Reboredo - versão corrigida -- São Carlos, 2012. 106 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2012.

1. Doença de Chagas. 2. Modelagem Molecular. I. Horjales Reboredo, Eduardo, orient. II. Título.

Dedico aos meus Pais.

AGRADECIMENTOS

- Ao prof. Dr. Eduardo Horjales Reboredo, pela dedicação, confiança, compreensão e por me ensinar muitas coisas importantes no aspecto pessoal e profissional. Agradeço de coração!
- A professora Dra. Ana Paula Lima, Flavia e Tatiana da UFRJ.
- Ao professor Dr. Claudio Vieira da Silva da UFU.
- Aos meus pais, irmãos e sobrinhos por me apoiarem incondicionalmente.
- Aos técnicos da cristalografia: Suzana, Kelvin, Maria, Simone, Renata, Humberto e os técnicos da biofísica: Bel e Andressa por me darem um enorme suporte neste trabalho.
- Aos professores da cristalografia: Otávio, Richard e Javier por contribuírem a minha formação profissional.
- Aos meus amigos e colegas de São Carlos, UFSCAR, USP, cristalografia e biofísica: Tati, Leo, Leo lima, Gustavo (Gu), Mariana laureano, Mariana, Bela, Rafa, Thiago, Marcos Michel, Lívia(s), Daiana, Ivan, Maycou, Amanda(s), Tavin, Mamé, Marisa, Fer costa, Vitor (Wally), Bachega, Lari, Marisa, juliana, Fran, Malu, Renata, Vivi, Ana, Karina, Leandro, Ricardo, Ana Elise, Militar, Sumaria, Mike, Sadao, Rigolin, Michelle e Carol por terem me apoiado e me ajudado nessa longa jornada!
- Aos meus amigos de Fortaleza: Breno, Mariana, Juliana e Nydy pela paciência, apoio e amizade.
- Aos meus amigos de São Carlos: Cyntia, Tati, David e Pablo pela paciência, conselhos, excelente companhia e amizade.
- A CAPES, FAPESP e CNPq por financiar este trabalho

RESUMO

MOREIRA, H. H. T. Estudos físico-químicos e bioquímicos de uma proteína de 21 kDa do *Trypanosoma cruzi*. 2011. 106p. Dissertação (mestrado). Instituto de Física de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

A proteína P21 do Trypanosoma cruzi participa no processo de infecção da célula hospedeira, desse modo é de grande importância: elucidar as vias de sinalização induzidas pela proteína, bem como caracterizar a nível molecular e estrutural a P21. O que vai auxiliar no entendimento da função biológica da P21 e sua participação no processo de infecção. A P21 recombinante é expressa Escherichia coli em sua maioria na fração insolúvel. Visando aumento de proteína na fração solúvel, foi realizada a clonagem do gene da P21 em vetor pSMT3, bem como testes de expressão subseqüentes em diferentes cepas de expressão de E. coli, em vetor pET-28 e pSMT3 e variadas condições de expressão e lise celular. Desse modo obtiveram-se as condições que permitissem uma maior concentração da P21 na fração solúvel. A expressão foi realizada no vetor pET-28, cepa BL21, a 37ºC com meio 2xYT a 0.5 mM de IPTG, utilizando a técnica de sonicação como lise. A P21 foi purificada em cromatografia de afinidade e posteriormente em coluna de exclusão molecular. Foram realizados estudos de modelagem por homologia levaram a elaborar a hipótese de que a P21 tem a função de inibidor de serinoprotease do tipo kunitz. Posteriormente essa hipótese foi confirmada com ensaios de avaliação da atividade inibitória da P21 frente à tripsina, quimiotripsina e elastase neutrofílica, o qual a P21 mostrou capaz de inibir a elastase neutrofílica. Estudos com espalhamento dinâmico da luz (DLS) revelaram que as amostras testadas de P21 contém diferentes concentrações de agregados de alto peso molecular em todos os pHs avaliados. Outras medidas foram realizadas para avaliar o estado de agregação da P21 de acordo com a temperatura e verificou-se que entre 32-52 °C, a proteína apresenta menor raio hidrodinâmico, indicando menor agregação nesse intervalo. Estudos de dicroísmo circular revelaram que a P21 apresenta por volta de 20% de α -hélice, 32% de folha-β, 22% de volta e 23 % estrutura randômica. De acordo com a curva de desnaturação referente ao espectro de CD obtido, a P21 se mostra desnaturada a partir de 64°C.

Palavras chave: *Trypanosoma cruzi*. P21. Inibidor de serinoprotease. Modelagem molecular por homologia. Espalhamento dinâmico de luz. Dicroísmo circular.

ABSTRACT

MOREIRA, H. H. T. Physico-chemical and biochemical studies of a 21 kDa protein of *Trypanosoma cruzi*. 2011. 109p. Dissertação (mestrado). Instituto de Física de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The Trypanosoma cruzi protein P21 participates in the host cell infection process, but its specific function is poorly described. Thus it is important to elucidate the signaling pathways induced by the protein and characterize the P21 at the structural and molecular levels, as a contribution towards the understanding of the P21 biological function and its role in the infection process. The Escherichia coli recombinant P21 is expressed mostly in the insoluble fraction. Aiming to increase protein in the soluble fraction, we performed the cloning of the P21 gene in pSMT3 vector and subsequent expression tests in different expression strains of E. coli in pET-28 and pSMT3 vectors and varied expression conditions and cell lysis. Thus we obtained conditions that allow a greater concentration of the P21 in the soluble fraction. The expression vector was performed using vector pET-28, in BI21 strain at 37°C in 2xYT culture medium with 0.5 mM IPTG, using the sonication technique in cell lysis. The recombinant P21 was purified by Ni affinity chromatography and subsequently a molecular exclusion column. We performed homology modeling studies which led to assume that P21 can be a serinprotease inhibitor of Kunitz type. Furthermore, this hypothesis was confirmed in the experiments testing the P21 inhibitory activity against the trypsin, chymotrypsin and elastase. We found the P21 exclusively inhibit neutrophil elastase. Studies using dynamic light scattering (DLS) revealed that the samples containing P21 contained large molecular weigth aggregates in different concentrations at all evaluated pHs. Others measurements were performed to assess the P21 aggregation state according to the temperature and we found that between 32-52 °C the protein had a smaller hydrodynamic radius, indicating less aggregation in this range. Circular dichroism (CD) studies revealed that P21 has about 20% α-helix, 32% β-sheet, 22% turn and 23% of random structure. According to the denaturation curve for the CD spectrum obtained, the P21 was denatured from 64°C.

Key words: *Trypanosoma cruz.* P21. Serineprotease inhibitor. Homology modeling, Dynamic light scattering. Circular dichroism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SÍMBOLOS DOS AMINOÁCIDOS

Código de 3 letras	Código de uma letra	Nome do aminoácido
Ala	Α	Alanina
Arg	R	Arginina
Asn	Ν	Asparagina
Asp	D	Aspartato
Cys	С	Cisteína
GIn	Q	Glutamina
Glu	E	Glutamato
Gly	G	Glicina
His	н	Histidina
lso	I	Isoleucina
Leu	L	Leucina
Lys	K	Lisina
Met	М	Metionina
Phe	F	Fenilalanina
Pro	Р	Prolina
Thr	т	Treonina
Тгр	W	Triptofano
Tyr	Y	Tirosina
Val	V	Valina

ABREVIATURAS

- 3D Tridimensional
- Å Angstrons
- AMP_c Adenosina mono fosfato cíclico

CBZ-Phe-Arg-MCA–Benziloxicarbonil-fenilalanil-arginil-7-amino-4metilcoumarina

- CD Dicroísmo Circular, Circular dichroism
- DLS Espalhamento dinâmico de luz, Dynamic light scattering
- DMSO- dimetilsulfóxido
- DNA Ácido desoxirribonucléico
- DO densidade ótica
- **DTT -** Ditiotreitol
- EDTA Àcido etileno diamino tetra-acético
- **GPI –** Glicofosfatidilinositol
- GTP Guanosina trifosfato
- HAI Inibidor do fator de crescimento de hepatócitos
- HGF Fator de crescimento de hepatócitos
- HGFA Ativador do fator de crescimento de hepatócitos
- IP₃ Inositol 1,4,5 trifosfato
- **IPTG** Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
- OMS Organização Mundial da Saúde
- NCBI National Center for biotechnology information

PCR - Reação da cadeia da polimerase

- PDB Protein Data Bank
- p I Ponto isoelétrico
- PI-3 Fosfatidilinositol
- PMSF Fenilmetanosulfonilfluor
- ps pico segundos
- R_h- Raio hidrodinâmico

SDS-Page – Eletroforese Sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide Gel electrophoresisl

SELCON, CONTINLL e CDSSTR – Programas de análise de espectros de CD que estimam o conteúdo de estrutura secundária de uma proteína

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA - N-Succinil-alanil-alanil-prolil-fenilalanil-7-amido-4-metil-coumarina

Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA - N-Succinil-alanil-alanil-prolil-valina-7-amido-4metil coumarina

SUMO – Ubiquitin related modifier

UV- Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO18
1.1 Doenças negligenciadas18
1.2 Doença de Chagas19
1.3 <i>T. cruzi</i> e seu ciclo de vida21
1.4 Apresentações clínicas da doença de Chagas24
1.5 Interação do <i>T. cruzi</i> com a célula hospedeira25
1.5.1. Adesão-reconhecimento25
1.5.2. Internalização28
1.6 Proteases
1.7 Inibidores de proteases
2. OBJETIVOS
3. MATÉRIAIS E MÉTODOS
3.1 Modelagem molecular
3.1.1 Introdução
3.1.2 Método
3.2 Clonagem no vetor pGEM-t40
3.2.1 Extração de DNA genômico40
3.2.2 Construções de oligonucleotídeos e amplificação gênica
3.2.3 A Obtenção do DNA partindo do da P21 já clonada em pET-28 a(+) por PCR42
3.2.4. Análise do produto de amplificação no gel de agarose
3.2.5 Purificação do produto de PCR
3.2.6 Clonagem no vetor pGEM-t
3.2.7 Reação de ligação44
3.2.8 Transformação da DH5α com os plasmídeos recombinates pGEM-T.45
3.2.9 Reação de digestão 45
3.2.10 Sequenciamento 46
3.3. Subclonagem dos genes para o plasmídeo pSMT346

3.4 Preparo de células competentes de E. coli: DH5α, BL21, Artic Express e	
Rosetta4	7
3.5 Análises de bioinformática4	8
3.6 Expressão4	8
3.7 Purificação5	2
3.7.1 Purificação em coluna de afinidade5	2
3.7.2 Purificação por coluna de exclusão molecular5	3
3.8 Quantificação da P215	3
3.9 Determinação do ponto isoelétrico5	3
3.10 Dicroísmo Circular5	5
3.11 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)5	6
3.12 Avaliação da atividade inibitória da P21 frente à tripsina, quimiotripsina e elastase neutrofílica5	e 8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO6	0
4.1 Modelagem molecular6	0
4.1.1 Seleção da proteína molde6	0
4.1.2 Alinhamento e modelagem6	3
4.2 Clonagem7	0
4.2.1. Amplificação da P217	0
4.2.2 Clonagem e Subclonagem da P217	1
4.3 Expressão	3
4.4 Purificação8	0
4.5 Determinação do ponto isoelétrico8	2
4.6 Espectroscopia de Dicroísmo Circular8	3
4.7 Espalhamento dinâmico da luz (DLS)8	6
4.8 Avaliação da atividade inibitória da P21 frente à tripsina, quimiotripsina e elastase neutrofílica	7
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS9	0
Referências9	2

1.1 Doenças negligenciadas

O termo doenças negligenciadas tem sido utilizado para designar o conjunto de doenças prevalentes em países em desenvolvimento, sendo culpada pela geração de um grande impacto econômico e social. Existem 10 moléstias consideradas como doenças negligenciadas, os quais podem citar: tripanossomíase africana, dengue, leishmaniose, malária, esquistossomose, tuberculose, doença de Chagas, hanseníase, filariose linfática e oncocercose.¹

As doenças negligenciadas apresentam um alto índice de mortalidade que é explicado pela ausência de ferramentas úteis de diagnóstico e tratamento, molestando um bilhão de pessoas, provocando 14 milhões de mortes por ano, com 90% destas mortes ocorrendo em países situados sob a linha do equador ^{2; 3}. Por afetar as populações mais empobrecidas essas enfermidades não despertam o interesse da indústria farmacêutica, que não vê um mercado lucrativo que justifique a pesquisa de novos medicamentos mais eficazes. Apesar de estas doenças estarem representando 12% da carga de doenças mundiais, apenas 1,3% dos medicamentos disponibilizados entre 1975 e 2004 foram usados para o tratamento de doenças negligenciadas, o que nos alerta para o quadro crítico em que estas doenças se encontram ⁴.

Entre as diversas endemias incluídas como doença negligenciada, a doença de Chagas, ocupa um lugar de destaque entre os males, causando 14 mil mortes por ano, como abordado na tabela 1.

Leishmaniose	51000
Tripanossomíase africana	48000
Esquistossomose	15000
Doença de Chagas	14000
Helmintíases ²	12000
Hanseníase	6000
Filariose, oncocercose e verme da Guiné	0
Total de Mortes	146000

Tabela 1 - Mortes anuais provocadas pelas doenças negligenciadas¹

¹ World Health Report 2004 ¹⁻⁵

²Ascaridíase, Ancilostomíase, e Tricuríase

*Algumas estimativas indicam que a tripanossomíase americana causa 100.000 mortes, Leishmaniose 100.000, Ancilostomíase 65.000, e esquistossomose 150.000- 280.000 mortes. Entretanto, mais de 500.000 mortes por ano.

1.2 Doença de Chagas

Em 1909, o cientista brasileiro Carlos Chagas na tentativa de controlar um surto de malária em Minas Gerais observou a presença de protozoários flagelados no intestino do inseto hematófago conhecido popularmente como barbeiro. Concomitantemente a esse fato, Carlos Chagas ao examinar o sangue de uma menina febril que habitava a região encontrou o mesmo protozoário, um protozoário hemoflagelado, que foi nomeado *Trypanosoma cruzi. T. cruzi* causa a tripanossomíase americana, uma doença atualmente conhecida como doença de Chagas ⁶⁻⁷.

A propagação desta enzootia ocorreu, principalmente, devido à ação antrópica, que resultou no esgotamento das fontes alimentares naturais do vetor da doença ⁸. Dessa forma, o percurso da enzootia da doença de Chagas forçou que os vetores se deslocassem de seus ecótopos silvestres, evoluindo para um processo de domiciliação em ecótopos artificiais, dando origem a um processo de expansão da doença de Chagas nas populações humanas que habitam desde o México aos extremos dos países Sul-Americanos ⁹, gerando um dos problemas médicos e sociais mais graves no Brasil e em diversos países da América Latina. Sendo a doença mais relacionada ao subdesenvolvimento, possuindo o 4º maior impacto social entre todas as doenças parasitárias e infecciosas ⁹⁻¹⁰.

Apesar dos índices de incidência do aparecimento da enfermidade terem diminuído 70% em meados do ano 2000, estima-se que existam 16-18 milhões de chagásicos e 100 milhões vivendo sob condições de risco⁶⁻¹¹. Esse quadro fornece uma idéia de como se apresenta a transmissão vetorial ¹²⁻¹³. Tendo em vista que a eliminação do reservatório silvestre é impossível ¹³⁻¹⁴, é grande a necessidade de implantação de medidas profiláticas mais eficazes e adequadas, o qual Carlos Chagas, em sua descoberta a mais de 100 anos, alertou para importância da profilaxia e ressaltou a necessidade da implantação de políticas públicas para doença¹⁵.

O processo de descentralização do sistema de saúde no Brasil torna difícil a execução de políticas para o controle do vetor e acentuadamente, a melhora do tratamento das pessoas acometidas pela doença. Atualmente, o tratamento da doença de chagas é mais sintomático que etiológico, pois não existem fármacos eficazes e seguros que consigam combater os parasitos em todos os estágios da doença. Desse modo, torna-se urgente a necessidade da busca de novos fármacos. Para tanto, é importante direcionar estudos para a compreensão da interação do *T. cruzi* a nível celular e molecular com o hospedeiro mamífero e inseto vetor com a finalidade de elucidar determinados mecanismos que são essenciais para a evolução do ciclo de vida do *T. cruzi*. A posse do conhecimento desses mecanismos nos confere a capacidade de projetar racionalmente novos fármacos com base na topologia molecular-estrutural dos alvos moleculares que se mostrem primordiais à sobrevivência e propagação do parasito ¹⁶.

T. cruzi é pertencente à família Trypasomatidea da ordem Kinetoplastida apresentando um núcleo oval, um flagelo e um quinetoplasto. O parasita possui ciclo biológico nos hospedeiros vertebrados e invertebrados com variadas formas evolutivas. No hospedeiro vertebrado (algumas espécies de mamíferos e o homem) inclui duas formas que estão relacionadas com a posição emergente do flagelo, quinetoplasto e núcleo: Tripomastigotas são formas infectantes presentes no sangue do hospedeiro possuem forma longa e fusiforme com 20 µm de comprimento e quinetoplasto subterminal e podem também se apresentar como formas delgadas e largas; amastigotas são formas que apresentam forma arredondada com 2-3 µm de diâmetro não possuindo flagelo emergente, estão presentes no interior das células de mamíferos, onde se dividem por fissão binária ¹⁷⁻¹⁸. No hospedeiro invertebrado são encontradas formas arredondadas com o flagelo circundando sua extensão, denominadas esferomastigotas, que estão presentes no intestino e no estômago dos triatomíneos; epimastigotas são formas não infectantes e estão presentes em todo o intestino dos insetos triatomíneos, possuem forma longa e fusiforme com quinetoplasto anterior ao núcleo e com 20 µm de comprimento. A tripomastigota metacíclica se mostra semelhante às tripomastigotas sanguíneas do hospedeiro invertebrado e estão presentes no reto do inseto¹⁸. As formas evolutivas do parasita podem ser visualizadas na fig. 1.



Figura 1 - O ciclo de vida do *T. Cruzi* . Formas do parasita no hospedeiro invertebrado e vertebrado. (I) forma infectiva, (N) forma não infectiva, (+) forma proliferativa, (-) forma não proliferativa

O ciclo no hospedeiro invertebrado (fig. 2) começa quando os insetos triatomíneos hematófagos, conhecidos vulgarmente como barbeiros alimentam-se do sangue contendo as formas tripomastigotas de um hospedeiro vertebrado infectado. Passando poucas horas do repasto, as tripomastigotas se diferenciam em amastigotas que se tornam mais robustas, dando origem às esferomastigotas, as quais posteriormente se modificam em epimastigotas que apresentam forma mais delgada com o flagelo aparente. As epimastigotas migram para o reto se diferenciando em formas tripomastigotas metacíclicas infectantes. O ciclo no hospedeiro vertebrado se inicia quando as formas tripomastigotas metacíclicas liberadas nas fezes do inseto, após o repasto sanguíneo em um indivíduo sadio, penetram a lesão da pele provocada pela picada e infectam células nucleadas formando o vacúolo parasitóforo. Nesse processo ocorre o recrutamento dos lisossomos, os quais se fundem com o vacúolo parasitóforo. A acidificação do vacúolo induz a ativação de uma proteína do parasita chamada Tc-Tox, que facilita a saída das formas tripomastigotas do vacúolo²⁰. A saída das tripomastigotas faz com que ocorra a diferenciação em formas amastigotas que passam por 9 ciclos de divisão binária dando origem ao pseudocisto²¹. As amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas delgadas, que uma vez formadas, lisam a célula, devido ao intenso movimento flagelar. Tripomastigotas delgadas juntamente com amastigotas intracelulares que não conseguiram se diferenciar em tripomastigotas são liberadas no interstício atingindo a corrente circulatória podendo infectar novas células em outros tecidos, cumprindo assim um novo ciclo celular. Muitas vezes as formas tripomastigotas delgadas não conseguem infectar novas células, fazendo com que as mesmas se diferenciem em tripomastigotas largas e depois amastigotas (amastigotas extracelulares), o que explica a presença de pleomorfismo do parasita no sangue periférico do hospedeiro. As amastigotas são hábeis em infectar célulares por um mecanismo diferente das tripomastigotas são hábeis em infectar células, principalmente células fagocíticas, o que incrementa a propagação da doença com a presença de uma rota alternativa a rota da infecção pelas tripomastigotas²².



Figura 2 - O ciclo de vida do *T. Cruzi*. São mostradas várias formas presentes nos hospedeiros invertebrados (insetos triatomíneos) e nos vertebrados (mamíferos). Retirado e Adaptado e do site da OMS.(http://www.oms.gov, acesso em jul. de 2011)

É neste ato, acima descrito, que o barbeiro transmite a doença de Chagas ao homem e a pequenos mamíferos, caracterizando assim o modo mais importante de transmissão da doença, a transmissão vetorial ⁸. Outro modo de transmissão é por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, via transplacentária, alimentos contaminados e acidentes de laboratório¹⁷⁻²¹.

1.4 Apresentações clínicas da doença de Chagas

O processo de rompimento da célula pelos parasitas e infecção de novas células, induz a liberação de vários peptídeos, produtos lisossômicos e citoquinas, que estimulam uma reação inflamatória nos tecidos. Esse processo de amplificação da divisão parasitária passa por um período de incubação de cerca de 72h^{8; 19}, após esse período, inicia-se a evolução da doença no hospedeiro, que constitui basicamente de duas fases sintomáticas (aguda e crônica) e uma fase assintomática (indeterminada). Fase aguda é dada pela fase inicial da doença; durando, na maioria dos casos, de 4 a 8 semanas após a contaminação com as fezes do barbeiro. Uma a cada mil pessoas morre nesta fase, em geral, crianças e indivíduos imunosuprimidos, devido à meningocefalite e miocardite²³. Essa fase é caracterizada por manifestações locais, como sinal de Romaña (edema palpebral unilateral), ocorrida quando barbeiro pica nas proximidades da mucosa ocular²¹⁻²⁴. A sintomatologia da fase crônica ocorre, geralmente, 20 anos depois da fase aguda⁶. A fase crônica é ocasionada por dois mecanismos de patogenicidade, como a autoimunidade e o processo de inflamação crônica que afeta órgãos internos, como principalmente, o coração, esôfago, cólon e sistema nervoso periférico²⁵. Calcula-se que a 20 a 30% dos indivíduos infectados evoluam para uma cardiopatia severa, megacólon ou megaesôfago, sendo a cardiopatia a causa que leva a maior taxa de letalidade ⁸⁻²¹. Após a fase aguda os indivíduos infectados passam por um período de 10 a 30 anos sem desenvolver a fase crônica ²⁶⁻²⁷. Essa fase é denominada de fase indeterminada, é caracterizada pela destruição da parasitemia, devido ao

aumento da resposta imunológica; ocorre por anos ou até décadas com sinais clínicos e sintomas ausentes com positividade nos exames sorológicos e parasitológicos¹⁷.

1.5 Interação do T. cruzi com a célula hospedeira

Uma vez que o *T. cruzi* encontra-se no tecido que foi inoculado, o mesmo invade as células (fibroblastos, células epiteliais, macrófagos, etc.) ali presentes. Este processo necessita de interações moleculares entre o parasito e a célula hospedeira, que pode ser dividido em duas etapas: adesão-reconhecimento e internalização²⁸.

1.5.1. Adesão-reconhecimento

O processo de adesão envolve o reconhecimento entre uma série de moléculas presentes na superfície tanto na célula hospedeira quando do parasito, existindo a possibilidade de algumas moléculas virem a ser secretadas pelo parasito. A maneira como se dá o mecanismo de reconhecimento é dependente dos tipos de célula hospedeira, cepas e formas (tripomastigotas delgadas ou largas, amastigotas e tripomastigotas metacíclicas) dos parasitos, exibindo diferentes moléculas em suas superfícies celulares, que irão realizar o reconhecimento entre o parasita e a célula hospedeira. Este processo demanda energia por parte do parasita e não requer o rearranjo dos microfilamentos da célula hospedeira. Tratamento com inibidores da polimerização dos filamentos de actina, como a citocalasina D, infere que a invasão

de tripomastigotas ocorra de forma independente dos microfilamentos²⁹. O contrário acontece em amastigotas extracelulares que são dependentes desses microfilamentos para realizar a invasão³⁰⁻³¹.

1.5.1.1 Moléculas dos parasitas

Uma série de moléculas do parasito, principalmente das formas tripomastigotas e tripomastigotas metacíclicas, estão envolvidas no processo de adesão e reconhecimento celular, como determinadas glicoproteínas, tais como a gp90, gp35/50, gp82, Tc85 e mucinas. Outras proteínas, como as penetrinas, transsialidases, proteases como a cruzipaína. Oligopeptidases B e Tc80 também estão envolvidas no processo de adesão e reconhecimento ³².

De acordo com o trabalho de Nogueira, 1983, que usou macrófagos como célula hospedeira para se avaliar a atividade da gp90 do *T. cruzi*, mostrou que a gp90 apresenta atividade antifagocítica devido à atividade de glucosidase que remove os resíduos de carboidratos necessários para internalização do parasita ³³. A habilidade da gp90 de regular negativamente a invasão celular tem sido associada à baixa concentração de Ca²⁺ intracelular, que faz com que a mobilização intracelular de Ca²⁺ em ambas as células seja requerida para internalização do *T. cruzi*. As mucinas são as glicoproteínas mais abundantes na superfície do parasito e apresentam resíduos de carboidratos que interagem com a célula hospedeira ³⁴.

A Tc85 é uma glicoproteína de 85 KDa ligante de fibronectina e laminina, é expressa na superfície do parasito e faz parte da família das gp85/trans-sialidases junto com a gp82, TSA-1 e trans-sialidases ³⁵. Estudos realizados usando anticorpos monoclonais específicos para Tc85 inibiu a invasão celular em torno de 50% e 96% ³⁶⁻³⁷.

A gp82 e gp35/50 presentes na superfície das tripomastigotas metacíclicas, mostraram-se imunogênicas em um experimento que envolveu ratos imunizados

com formas tripomastigotas inativadas por aquecimento. Os ratos imunizados produziram anticorpos específicos para estas proteínas e moléculas do sistema complemento, que lisaram os parasitos^{25; 38}. A gp85, gp35/50 e gp82 são capazes de induzir a mobilização intracelular de Ca²⁺ em células HeLa³⁴. Outra característica da gp82 é a capacidade de modular e induzir a despolimerização de filamentos de F-actina em HeLa, apesar de se ligar menos eficientemente nesta célula quando comparada com a gp90 e gp35/50³⁹.

Trans-sialidases são moléculas que também estão presentes na superfície de tripomastigotas, é uma sialidase que diferentemente da dos mamíferos apresenta atividade neuroaminidásica e transialidásica, liberando ácido siálico para a superfície de células. As trans-sialidases removem resíduos de ácido siálico na posição $\alpha(1,3)$ de glicoproteínas, oligossacarídeos e glicolipídeos presentes na célula hospedeira e no soro e os transfere para moléculas conhecidas, como mucinas presentes na superfície do parasita. Alguns trabalhos têm relatado que o ácido siálico modula o processo de adesão. Trans-sialidases são ancoradas em uma molécula de glicofosfatidilinositol (GPI) na membrana do parasita. Apresentam duas regiões, a região N-terminal que é catalítica e a região C-terminal onde se repete 12 aminoácidos *in tandem.* No trabalho de Pereira *et al*^{40; 41} usou-se tripomastigotas expressando trans-sialidases(TS+) e tripomastigotas não expressando trans-sialidases(TS-) e foi percebido que as TS+ tinham capacidade superior de invadir células hospedeiras comparado com as TS-³⁸.

A gp83 está presente em todas as cepas de *T. cruzi* e é também empregada no processo de invasão celular ⁴². A penetrina é uma proteína de 60 KDa que apresenta afinidade por componentes da matriz extracelular, como heparansulfato, heparina e colágeno e participa da adesão e penetração nos fibroblastos ⁴³.

Já tem sido reportado que algumas proteases, como a cruzipaína e oligopeptidase C participam do processo de infecção. A cruzipaína é uma cisteínoprotease secretada pelo parasita capaz de clivar o cininogênio de baixo peso molecular, liberando cininas que se ligam ao receptor de bradicinina que ativa o IP₃ (inositol-1,4,5-trifosfato), que por sua vez induz a liberação de Ca²⁺ no citoplasma da célula hospedeira. A oligopeptidase C é uma serino peptidase citosólica de 80 KDa que induz o influxo de Ca²⁺ durante a invasão do *T. cruzi*⁴⁴⁻⁴⁵. Membro da família de

serinoproteases a Tc80 é uma polipeptidase que hidrolisa o colágeno humano tipo I e IV e fibronectina, facilitando a passagem do parasita através da matriz extracelular ⁴⁶.

Nas formas amastigotas não estão bem definidas as moléculas presentes na adesão e na internalização destas formas ⁴⁷. Vários trabalhos têm relatado que as amastigotas expressam determinadas moléculas na membrana que podem estar envolvidas na sua captação por fagócitos. Um trabalho de Andrews et al.48-50 mostra que ambas as amastigotas intracelulares e extracelulares expressam uma glicoproteína de superfície designada Ssp-4 que esta ligada a membrana via uma âncora com GPI (glicofosfatidil inositol). A Ssp-4 participa do processo de infecção regulando o óxido nítrico em macrófagos ⁵¹. Recentemente um trabalho de Silva et al.⁴⁷ no objetivo de triar moléculas do parasita que possam estar relacionadas a invasão celular; utilizando a técnica de microarranjo de DNA, onde partiu do RNA polissomal de amastigotas extracelulares das cepas G e CL Brener; identificou e selecionou uma sequência que codifica uma proteína de 21KDa, a P21, que parece ser secretada por amastigotas extracelulares. De acordo com o trabalho, o prétratamento da cultura de células hospedeiras com a P21 recombinante (HIS₆-P21), inibiu a invasão celular pelas amastigotas extracelulares, por outro lado guando a proteína foi adicionada ao mesmo tempo em que as amastigotas extracelulares, induziu um aumento da invasão celular, sugerindo que a P21 está envolvida no processo de invasão celular⁴⁷.

1.5.2. Internalização

As formas tripomastigotas são hábeis a infectar uma amplitude de células e entram nas células hospedeiras por três mecanismos: Fagocitose, endocitose e invaginação da membrana (macropinocitose). Na fagocitose as células emitem pseudópodes com a participação dos filamentos de actina. Em células fagócíticas profissionais, como macrófagos, há a ativação de tirosina quinase seguida do recrutamento PI-3 (fosfatidil inositol) quinase e filamentos de actina. A endocitose ocorre com a participação dos filamentos de actina, porém sem a emissão de pseudópodos^{32;52}. A invaginação da membrana ocorre sem a participação dos filamentos de actina, neste processo o parasita penetra ativamente através da membrana com gasto de energia. O mecanismo de internalização também vai diferenciar do tipo de célula hospedeira, pois se a mesma for a célula fagocítica profissional será requerido à participação dos filamentos de actina para entrada do parasita³².

A invasão celular se faz forma diferente no que se refere aos tipos de células hospedeiras. Na invasão celular ocorre: interações entre os elementos de superfície da célula hospedeira e do parasita, episódios enzimáticos, sinalização mediada por cálcio, tráfego de substâncias pela membrana plasmática da célula hospedeira, recrutamento do citoesqueleto para captação do parasita e a sua entrada na célula com a subsequente evasão do vacúolo parasitóforo³².

No processo de reconhecimento entre moléculas, tanto na célula hospedeira quanto no parasita, ocorre o aumento dos níveis citoplasmáticos de Ca²⁺, que é primordial para a entrada do parasito, pois o cálcio estimula a despolimerização dos filamentos de actina na região da invasão na célula hospedeira, facilitando a entrada do parasito. Logo após que o parasita invade a célula, os lisossomos são recrutados para o vacúolo endocítico, formando o vacúolo parasitóforo. O parasita libera transsialidase/ neuraminidase que remove resíduos de ácido siálico presente na membrana do vacúolo parasitóforo, que a deixa mais suscetível a ação da Tc-Tox⁵³. Ocorre a diminuição do pH, que faz com essas enzimas destruam o vacúolo parasitá foro pela formação de poros na membrana, fazendo com que o parasita escape do vacúolo para o citoplasma para se multiplicar, dando continuidade ao ciclo⁵⁴.

A capacidade de invasão celular não esta restrita apenas as tripomastigotas, as amastigotas também ganham destaque neste processo. No trabalho de Fernandes *et al.* Utilizou-se drogas durante alguns experimentos com amastigotas realizados em cultura de células HeLa. Tratamento com droga que afetava a liberação de Ca²⁺ via IP₃, não afetou a infectividade das amastigotas, enquanto isso o tratamento das culturas com ionomicina mais NH₄Cl ou nigericina, que afeta na

liberação de Ca²⁺ oriundo dos acidocalcisomas, tiveram as amastigotas com infectividade diminuída. Tratamento dos parasitas com ativador da adenilato ciclase aumentou a infectividade dos mesmos. Isso sugere que as amastigotas participam da sinalização que aumenta as concentrações de adenosina mono fosfato cíclico (AMPc) e a mobilização de Ca²⁺ do aldocalcisoma ⁵⁵. Em células MDCK, a infecção com amastigotas da cepa G demonstrou que a Rac-1 mediou à invasão celular. A Rac-1 é uma GTPase que faz parte da subfamília Rac da família Rho ⁵⁶. As amastigotas em cultura de células envolvem um rearranjo do citoesqueleto em um mecanismo de sinalização diferente quando comparado ao das tripomastigotas metacíclicas ⁵⁷. As células HeLa testadas na presença de tripomastigotas emitem pseudópodos ⁵⁸, já a entrada de amastigotas envolve uma expansão da membrana que se assemelha com a estrutura chamada de *cup-like* ⁵⁹.

1.6 Proteases

Proteases ou peptidases participam de uma serie de processos biológicos vitais para os seres vivos. São enzimas proteolíticas que clivam as ligações péptidicas de outra proteína, resultando em pequenos peptídeos ou aminoácidos ⁶⁰.

Essas enzimas são fundamentais em determinados microorganismos, bem como na sua propagação em processos infecciosos ⁶¹.

As proteases são classificadas em grupos e se diferenciam pelo seu mecanismo de catálise, similaridade na sequência de aminoácidos e avaliação dos aminoácidos posicionados no sitio catalítico. Os grupos de proteases consistem em: serinoproteases, cisteínoproteases, asparticoproteases e metaloproteases ⁶².

As metaloproteases apresentam necessidade por um íon metálico, como Zn²⁺, Ca²⁺ ou Mn ²⁺, para exercer sua atividade ⁶³.

As asparticoproteases apresentam um resíduo Asp no sítio catalítico, apresentam pH ótimo na faixa ácida ⁶⁴.

As cisteinoproteases possuem um resíduo Cys no seu sítio catalítico, apresentam melhor atividade na faixa de pH entre 4-6,5.⁶⁵.

As serinoproteases são o grupo de peptidases mais largamente estudado. Apresentam um resíduo nucleofílico de Ser no seu sítio ativo, que é formado por uma tríade catalítica Ser, His e Asp. Essa tríade também pode ser composta por Ser, His, Glu; Ser, Lys, His e His, Ser, His. Essas proteínas apresentam tamanho que variam de 19-110 kDa com atividade ótima em pH alcalino de 7-10⁶⁶.

1.7 Inibidores de proteases

Inibidores de proteases são amplamente distribuídos na natureza e apresentam um importante mecanismo de controle da atividade proteolítica de muitas proteases, ajudando à regular uma série de eventos fisiológicos, como a cascata de coagulação, processamento hormonal, apresentação de antígeno e remodelamento celular. Os inibidores de proteases também participam de eventos patológicos, como câncer, desordens degenerativas, inflamações e em infecções. Nessas situações os inibidores de proteases apresentam mudanças na sua expressão e no seu modo de ação ⁶⁷.

Inibidores enzimáticos têm sido largamente estudados por servirem como base para a pesquisa de novas drogas para varias doenças, como distúrbios de coagulação, alergias, processos inflamatórios, pancreatite e determinados tipos de cânceres ⁶⁸.

Outra aplicabilidade das pesquisas com inibidores de protease é avaliar sua atividade frente às enzimas proteolíticas de insetos predadores de lavouras, no intuito de serem utilizadas em plantas transgênicas ⁶⁹.

Os inibidores de proteases são classificados de acordo com a protease que estas moléculas inibem como os inibidores de serino, cisteíno, aspártico ou metaloproteases ⁷⁰.

1.7.1 Inibidores de serinoprotease

Estão presentes entre microorganismos, plantas e animais. Estes podem ser divididos em 18 famílias, com base na homologia na sequência primária, estrutura terciária, posição do sítio reativo, pontes di-sulfeto e mecanismo de inibição. Todas as proteínas desse grupo são inibidores competitivos e inibem as proteases de maneira semelhante. As famílias mais caracterizadas são a: *Kunitz, Bowman-Birk*, Batata I, Batata II e abóbora ⁷¹.

- Inibidor tipo kunitz

Os inibidores de protease tipo *kunitz* representam uma das famílias mais importantes de inibidores de protease. São representados por um grupo de proteínas de massa entre 21-22 kDa, em geral constituem duas cadeias polipeptídicas com 4 resíduos de cisteínas que formam duas pontes de di-sulfeto⁶⁸. Inibem com alta afinidade a tripsina e a quimiotripsina e proteases envolvidas na cascata de coagulação⁷².

Alguns trabalhos têm demonstrado que inibidores do tipo *kunitz* são úteis para o tratamento de determinadas patologias, como diabetes melitus⁷³, anemia, artrites⁷⁴ e derrame cerebral ^{70; 75}.

Este grupo de inibidores é representado por moléculas que apresentam entre 29-200 resíduos de aminoácidos, possuindo uma alça hidrofóbica essencial para execução da função ⁷⁴⁻⁷⁶.

Tendo em vista que as formas amastigotas apresentam habilidade de invadir células, torna-se evidente que a identificação de moléculas que participam desse processo é fundamental para a melhor compreensão dos processos biológicos relacionados ao *T. cruzi*. Sendo assim, este trabalho tem como alvo a realização de estudos estruturais e funcionais da proteína de 21 kDa do *T. cruzi*. Para tanto, conduzimos estudos visando à otimização da expressão da proteína solúvel e sua purificação. Também realizamos estudos com base em modelagem molecular de forma a elucidar e compreender a função da P21.

Nesse contexto desenvolvemos atividades visando atingir as seguintes metas:

-Otimizar o processo de expressão em *Escherichia coli* e purificação, procurando obter uma maior concentração de P21 na fração solúvel.

-Clonar em vetor contendo o gene de expressão da proteína SUMO, que fusionada com a P21, possivelmente, conferirá maior solubilidade.

-Elaborar um modelo computacional para a P21 com base na homologia de proteínas com estrutura resolvida.

-Com base na modelagem, realizar ensaios subsequentes, visando elucidar a função da P21: Verificando a hipótese de que a P21 pode ser um inibidor de serinoproteases com ensaios de fluorescência.

-Realizar ensaios com a P21 utilizando a técnica de dicroísmo circular e espalhamento dinâmico da luz (*Dinamic Light Scattering* (DLS)).

3.1 Modelagem molecular

3.1.1 Introdução

As proteínas são compostas por pequenas moléculas, conhecidas como aminoácidos. Existem 20 tipos diferentes de aminoácidos nas proteínas, eles estão ligados de maneira linear, constituindo assim a sequência primária específica de cada proteína. A sequência primária de uma proteína determina (através das interações interatômicas) a sua estrutura tridimensional que juntamente com as propriedades físico-químicas dos aminoácidos que a constituem, executam sua função na célula. As sequências primárias das proteínas podem ser facilmente determinadas usando métodos de química analítica, como a degradação de Edman ou o sequenciamento de genes que codificam a sua sequência. Contudo a sua estrutura tridimensional é difícil de determinar experimentalmente, devido ao grande trabalho empregado na aplicação de técnicas de RMN (ressonância magnética nuclear) e cristalografia de raios X, o que faz com que apenas uma pequena fração das proteínas existentes tenha estrutura resolvida. Soma-se a isso a ausência de um algoritmo que permita com plena precisão deduzir o arranjo tridimensional baseado na sequência primária que a proteína assumirá. Com base nisso a modelagem molecular comparativa tem sido uma ferramenta útil para se obter modelos confiáveis. Sequências de aminoácidos homólogas apresentam maior porcentagem de identidade na sequência de aminoácidos associados à função e a estrutura da proteína, ou seja, uma vez que existe alta homologia entre sequência de duas proteínas, o enovelamento geral é sempre conservado 77. Em geral, a principal diferença estrutural entre proteínas homólogas dar-se em regiões externas, contendo, sobretudo *loops*, que ligam os componentes da estrutura secundária⁷⁸⁻⁷⁹. Uma vez construído o modelo é de grande importância avaliar: a ausência de aminoácidos carregados no núcleo hidrofóbico da proteína, avaliando se todos os grupos polares no núcleo hidrofóbico da proteína estão realizando de ligação de hidrogênio entre si ⁸⁰.

Para que o modelo seja construído o mais próximo do real é necessário que a sequência tenha maior grau de identidade possível com a estrutura molde, e que a mesma esteja alinhada corretamente. Quando o grau de identidade entre a proteína alvo e a proteína molde é superior a 25%, tem-se a grande possibilidade de que estas proteínas tenham estruturas tridimensionais semelhantes ⁷⁹. As aproximações feitas na modelagem molecular comparativa de proteínas são realizadas com base nas distâncias e restrições dos ângulos diedros, adicionando ao modelo restrições implícitas da topologia. Para diminuir as violações às restrições, aplica-se um cálculo de minimização de energia, de forma a satisfazer as limitações espaciais ⁸¹⁻⁸².

3.1.2 Método

No objetivo de deduzir a função da P21, construiu um modelo baseando-se na modelagem molecular comparativa, como mostrado no esquema na fig. 3.



Figura 3 - Esquema da modelagem de proteínas por homologia.

A modelagem da P21 foi feita em 3 passos:

1. Procura e seleção da proteína molde nos bancos de dados FastA, o qual submeteu a sequência de aminoácidos da P21, utilizando como parâmetro de seleção da proteína molde, proteínas com as estruturas resolvidas e depositadas PDB (*Protein Data Bank*)..

2. Confecção das coordenadas do modelo. São geradas coordenadas cartesianas que são dependentes do alinhamento.

3. Validação do modelo gerado.
A modelagem começa na identificação de pelo menos uma proteína de estrutura tridimensional resolvida, para tanto é feita a procura da proteína em um banco de dados de estruturas proteicas, que servirão de molde para a determinação da estrutura da proteína problema. É importante buscar sempre, modelos com a porcentagem mais elevada de resíduos em comum e menos números de *gaps* no alinhamento.

O programa FastA, disponibiliza alguns indicadores estatísticos incluídos nos resultados gerados para seleção das sequências molde, como os valores do Score e *E-value*.

O *Score* é dado pelo um valor numérico que abrange a soma dos valores atribuídos ao pareamento entre aminoácidos idênticos (maior valor), semelhantes (valor intermediário) e diferentes (valor negativo). Desse modo, quanto maior o valor do *Score* mais semelhantes são as sequências⁸³.

O Score é calculado a partir da seguinte equação:

$$S' = \frac{\lambda S - lnK}{ln2} \tag{1}$$

Onde:

λ e K são parâmetros estatísticos que visam normalizar o valor dos escores derivados de diversas matrizes e espaços de busca.

O *E-value* é um valor obtido a partir do *Score*. A partir do *E-value* pode-se ter a noção da chance de se encontrar um *Score* maior ou igual ao do alinhamento relativo ao banco de dados pesquisado. Ou seja, o *E-value* nos permite ter uma ideia de o quão significativo são os alinhamentos obtidos. O qual, em geral é importante considerar que a melhor sequência a ser escolhida para formulação do modelo apresenta o maior o valor de *Score* e o menor valor de *E-value*⁸³.

O valor o do E-value é dado pela equação:

$$E = mn2^{-S'} \tag{2}$$

Onde:

E é o valor de esperança (*E-value*)

mn é o tamanho da sequência alinhada

S' é o *Score* normalizado

O alinhamento é um dos principais passos da modelagem. Com a posse da proteína molde selecionada, inicia-se o alinhamento da proteína alvo com a proteína modelo. Nesta etapa o objetivo é alinhar resíduos estruturalmente equivalentes, especialmente, componentes estruturais, como elementos da estrutura secundária e resíduos catalíticos, visando extrair restrições espaciais para a confecção do modelo. Pode-se utilizar variadas faixas de identidade. Para sequências com identidade superior a 40%, o alinhamento é mais fidedigno, já para os alinhamentos das sequências com identidade inferior a 30% apresentam grandes extensões nos *gaps* e falhas no alinhamento. È importante ressaltar que a seleção da proteína modelo e realização de um alinhamento preciso e correto apresenta grande impacto na construção de um modelo fidedigno, sobretudo em modelos com identidade sequencial abaixo de 40%.

O alinhamento utilizado na modelagem da P21 foi aproveitado da ferramenta de alinhamento que o FastA disponibiliza. Ao alinhamento usado para a modelagem, foram realizados alguns ajustes manuais nos *gaps* gerados, procurando inserir *gaps* em regiões de baixa homologia, buscando desconsiderar sequências que apresentavam *gaps* no centro estruturas secundárias e em regiões hidrofóbicas. Dessa forma procurou descartar as candidatas à proteína molde que apresentaram deleções ou inserções de *gaps* na sequência que é relativa à execução da função da proteína; observando a estrutura em 3D do arquivo PDB das proteínas candidatas a molde.

38

Após o alinhamento, o modelo da proteína alvo é confeccionado com base na modelagem molecular comparativa, o qual consistiu na realização de substituições manuais (feitas no programa *Coot* do pacote CCP4) dos aminoácidos da proteína molde pelos aminoácidos da proteína alvo, respeitando a combinação proposta pelo alinhamento. Após o a substituição dos aminoácidos, foi feito um ajuste das distâncias geométricas procurando o rotâmero mais provável, de forma tal que não colida com o resto da estrutura proteíca e a seguir se otimizou a conformação da cadeia principal, realizando pequenas modificações das restrições de ângulos diedros.

3.1.2.3 Validação do modelo

Na validação do modelo verifica-se a qualidade do empacotamento global da proteína com os seus erros estruturais e seus padrões estereoquímicos, o qual o modelo da proteína alvo deve atender uma estrutura terciária satisfatória.

Após a confecção do modelo, foi realizada uma minimização de energia e uma equilibração, solvatando-se a molécula gerada da modelagem em caixa d'água, utilizando programa de dinâmica molecular. Este processo permite a verificação da estabilidade da estrutura gerada, onde se detecta contatos eletrostáticos desfavoráveis e contatos hidrofóbicos próximos. O valor de R.M.S.D. (desvio quadrático médio) foi utilizado de forma a avaliar a qualidade do modelo antes e depois da dinâmica ser executada no modelo. A dinâmica molecular também possibilita o relaxamento do modelo na presença de um solvente (água), permitindo, se caso a estrutura é estável, a observação de eventos de formação ou deformação de estrutura secundária.

A dinâmica do modelo da P21 foi realizada no programa NAMD, solvatando a molécula em caixa d'água, realizando a minimização de energia a 500 passos e equilibração em 1000 pico segundos (ps).

3.2 Clonagem no vetor pGEM-t

O vetor pET-28a contendo as construções gênicas da P21 foi gentilmente cedido pelo professor Dr. Claudio Silva e o Dr. Renato Mortara do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de medicina da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP.

3.2.1 Extração de DNA genômico

A extração de DNA plasmidial do vetor pET-28 já contendo as construções gênicas da P21 foi realizada no *kit wizard plus SV miniprep DNA purification systems* (Promega).

Idealização dos oligonucleotídeos iniciadores foi feita com base na sequência de DNA correspondente a P21 já clonada pET-28 a(+) com o auxílio do programa *Gene Runner* versão 3.01. Foram idealizados os oligonucleotídeos iniciadores, tendo como referência a sequência encontrada no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) no código XM_812182, de acordo com fig 4.

A)

B)

Primer sense: 5'CATGGATCCGAGGAGGTGGTGAATC 3'

Primer antisense: 5'CATCTCGAGTTACTGGCGTCTGTGGAATC 3

Figura 4 - Sequência codificadora da P21 e dos primers sense e antisense. A) Sequência codificadora da P21 contém 465 nucleotídeos, 411 nucleotídeos que codificam a proteína hipotética. Os nucleotídeos sublinhados são os códons de início e parada da tradução. Os nucleotídeos iniciais em verde são referentes o peptídeo sinal. B) Os nucleotídeos em azul e amarelo são referentes aos iniciadores sense e antisense, respectivamente. Os nucleotídeos em negrito representam os sítios de clivagem para as enzima BamHI e XhoI,

3.2.3 A Obtenção do DNA partindo do da P21 já clonada em pET-28 a(+) por PCR

A reação de PCR (Reação da cadeia polimerase) assemelha-se ao processo de replicação nas células. O DNA que contém o segmento alvo; na presença de nucleotídeos (A, T, C e G), enzima DNA polimerase, dois iniciadores (oligonucleotídeos complementares ao DNA de interesse) e um termociclador que realiza sucessivas mudanças de temperatura, será amplificado em três etapas da reação⁸⁴:

 <u>Desnaturação</u>: separação da dupla fita de DNA molde causada pelo aumento da temperatura para 95 ºC.

2. <u>Anelamento</u>: Pareamento das fitas de DNA já separadas se faz quando reduz a temperatura para 55 °C. Os oligonucleotídeos iniciadores anelam-se um em cada fita molde, nas respectivas sequências complementares vizinhas à região alvo da amplificação.

3. <u>Extensão</u>: Aumenta a temperatura para 72 °C de forma que a enzima Taq DNA polimerase se localize junto aos iniciadores, dando assim início a duplicação da fita molde, adicionando os nucleotídeos que contenham as bases nitrogenadas complementares à fita molde.

Após a finalização dos passos, o ciclo (desnaturação a extensão) é repetido varias vezes até obter DNA amplificado suficiente. A reação desta etapa foi realizada de acordo com a tabela 2. Foi utilizado um programa de amplificação com 25 ciclos, cada ciclo é composto por uma etapa de desnaturação durante 30" a 95 °C, uma de anelamento durante 30 seg a 55 °C e uma de extensão durante 2 min a 72 °C, utilizando a enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Finalizando todos os ciclos, a reação é parada com o resfriamento a 4°C.

N° de ciclos	1x		25x		1x	
Temperatura °C	95	95	55	72	72	4
Tempo	3'	30"	30"	2'	10'	∞

Tabela 2 - Programa de PCR utilizado na amplificação do gene P21.

3.2.4. Análise do produto de amplificação no gel de agarose.

O produto da reação foi analisado em gel de agarose a 1% contendo 0.5 µg mL⁻¹ de brometo de etídeo, contendo 1x de tampão TAE (80mM tris, 40mM de ácido acético; 2.5 mM de EDTA, pH 8.3). O gel com as amostras foi submetido a uma tensão de 90 V por 40 min. Em seguida visualizou-se o gel sob luz UV.

As bandas contendo os produtos de PCR foram isoladas do gel com um corte usando bisturi para ser purificada.

3.2.5 Purificação do produto de PCR

A purificação do gel de agarose foi realizada usando o kit de purificação da Promega (*wizard SV gel and PCR Clean-up System*) de acordo com o protocolo dado pelo fabricante. O produto da purificação foi analisado em gel de agarose 1% e quantificado por espectrofotometria no aparelho *nanodrop* (Thermo Scientific) no comprimento de onda (λ) de 280 nm.

O kit de clonagem pGEM-t (Promega) é um sistema avançado de seleção positiva para a clonagem de elevada eficiência de produtos de PCR, contém um plasmídeo linear com deoxitimidina (T) nas extremidades 3', permitindo uma fácil inserção pela T4 DNA ligase dos produtos de PCR adenilados. Uma vez ocorrendo à inserção do gene alvo, ocorre a formação do plasmídeo recombinante, que por sua vez pode se inserido em uma *E. coli* de interesse poderá propagar o plasmídeo.

3.2.7 Reação de ligação

A reação de ligação consiste em uma mistura com o volume final de 10µL que contém 2 µL do produto de PCR a 100 ng µL⁻¹, 1µL da enzima T4 DNA ligase (Promega), 5 µL do tampão (2x) de ligação especifico para enzima T4 DNA ligase, e 1 µL da solução contendo o vetor pGEM-T a 50 ng µL⁻¹. O resto do volume foi completado com água Milli-Q®. Incubou-se a reação por 24h a 4°C.

Os produtos da ligação foram tratados com as células competentes de *E. coli* DH5 α (Promega) por choque térmico com CaCl₂ na presença de 100 µg/mL de kanamicina.

O volume de 10 μL da reação de ligação foi utilizado no procedimento de transformação em 50 μl células da linhagem DH5α já competente. A mistura foi homogeneizada e mantida em gelo por 30 min. Passados os 30 min, incubou-se a mistura em banho seco a 42°C durante 2 min exatos. Logo após, incubou-se novamente em gelo por 2 min e em seguida adicionou 500μL de meio LB. A mistura obtida foi mantida sob agitação de 100rpm durante 90min a 37°C.

Após o crescimento a suspensão contendo as bactérias foi plaqueada em meio LB sólido (15g de extrato de levedura, 10 g de triptona, 10 g de NaCl e 15 g de agar em um litro de meio com pH 7,5) suplementado com ampicilina a 100mg mL⁻¹, 40 μ l de X-Gal 50 mg mL⁻¹ e 15 μ L de IPTG a 1M. As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 12h.

As colônias brancas que possam ser positivas foram selecionadas, objetivando a extração de DNA plasmidial para confirmação da inserção do gene pela análise por sequenciamento e por digestão com as enzimas de restrição.

As colônias selecionadas foram repicadas em tubos contendo meio LB líquido contendo ampicilina 100 mg mL⁻¹. Os tubos foram incubados por 12 h sob agitação de 100 rpm. Em seguida as células foram submetidas ao processo de extração de DNA de acordo com o item 3.1. O DNA obtido da extração foi submetido à reação de digestão enzimática com as enzimas de restrição.

3.2.9 Reação de digestão

1 µl do DNA plasmidial a 100 ng μ L⁻¹ foi digerido a 37 °C durante 4 h com 2µl da enzima Xho 5U, 2 µl da enzima de BamHl 5U (ambas da Promega) e 1 µL do

tampão tango(10x) a reação foi completa com volume 10 µl com água Milli-Q. Alíquotas foram retiradas e analisadas em gel de agarose 1% sob luz UV.

Os clones positivos tiveram seus DNAs avaliados por um sequenciamento automático.

3.2.10 Sequenciamento

O seqüenciamento foi realizado pelo método do didesoxinucleotídeo marcado, usando o seqüenciador automático ABI prism 377-96 Collection Applied Biosystem de acordo com o protocolo do fabricante. De forma a avaliar a fidelidade da sequência obtida e a presença de uma fase de leitura correta, a sequência foi analisada em bancos de dados do NCBI pela ferramenta contida no BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

3.3. Subclonagem dos genes para o plasmídeo pSMT3

O sistema pET é um sistema largamente utilizado em plasmídeos, pois apresenta uma sequência nucleotídica na região C- ou N-terminal do sítio de múltipla clonagem que irá codificar 6 histidinas (*his-tag*). Desse modo os genes de interesse são subclonados em junção com a *his-tag*, facilitando o processo de purificação de proteínas recombinantes em colunas com metais, como níquel e cobalto imobilizados. O vetor pSMT3 apresenta as mesmas características do vetor pET-28, exceto na sua sequência posterior a sequência de nucleotídeos que codifica a calda de histidina na porção N-terminal, pois nesta região esta presente uma

sequência que codifica uma pequena proteína, SUMO (*ubiquitin-related modifier*), que fusionada na porção N-terminal da proteína de interesse, confere maior solubilidade. Além disso, a estrutura terciária da SUMO é reconhecida de forma específica, sendo dessa forma clivada pela enzima SUMO protease, produzindo a proteína na sua forma nativa. A proteína SUMO é procedente da *Saccaromyces cerevisae* compondo parte da família da "ubiquitina-like", responsável por regular uma série de processos celulares.

O inserto da do gene que codifica a P21 presente no vetor PGEM-t foi clivado com as enzimas Bam HI e Xho I e ligado no vetor pSMT3 linearizados com as mesmas enzimas.

As etapas realizadas para linearização por digestão enzimática com enzimas de restrição, isolamento e recuperação do inserto e do vetor, preparação da mistura para reação de ligação e transformação estão contidas nos itens 3.2.9, 3.2.5, 3.2.7 e 3.2.8, respectivamente.

O clone recombinante foi confirmado pela reação de digestão descrita de acordo com item 3.2.9

3.4 Preparo de células competentes de E. coli: DH5 α , BL21, Artic Express e Rosetta

Inoculou-se uma colônia isolada em 3 mL de meio LB líquido, a qual foi mantida a 37 °C por 16 h (pré-inóculo). Inicialmente 400 µL do pré-inóculo foi colocado em 40 mL de meio LB e deixado sob agitação de 100 rpm a 37 °C até atingir densidade óptica (DO) igual a 0.6 no comprimento de onda de 600 nm. As bactérias foram centrifugadas a 3.500 rpm por 6 min, ressuspensas em 40 mL de MgCl₂ 0,1 M; centrifugadas, re-suspensas em 20 mL de CaCl₂ 0,1 M e centrifugadas e re-suspendidas em 4 mL de CaCl₂. As bactérias permaneceram por 40 min em banho de gelo, foram aliquotadas e posteriormente armazenadas no freezer a -80°C.

Com o uso do servidor do ProtParam disponível no endereço eletrônico <u>http://ca.expasy.org.tools/protparam.html</u> foi possível determinar o coeficiente de extinção teórico(ε) para absorbância a 280 nm e o ponto isoelétrico (pl) teórico.

3.6 Expressão

De forma a otimizar o processo de expressão P21, visando o aumento da concentração da P21 na fração solúvel do lisado bacteriano. Foram realizadas 5 expressões variando determinadas condições usadas durante a expressão, como o: tipo de vetor de expressão (pET 28 e pSMT3), tipo de cepa de *E. coli* (Bl21 DH3, Rosetta e *Artic Express*), temperatura de expressão (37, 20 e 16°C), concentração de IPTG (0.1, 0.5 e 1mM), meios de cultura (2xYT e LB), métodos de lise (sonicação french press, freezing thaw).

A expressão da P21 foi feita no vetor pET-28 e no vetor pSMT3 que contém o gene que codifica a proteína SUMO, ambos os vetores têm a construção gênica que codifica a P21. As duas construções foram transformadas em células de *E.coli*, das linhagens: Bl21 DH3, Rosetta e *Artic Express*.

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura Luria Bertani (meio LB: contendo, 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl, pH 7,5) e meio 2xYT (1,6% triptona, 2% extrato de levedura e 0.5% de NaCl) ambos contendo os seguintes antibióticos de acordo com cada linhagem de *E. coli* e vetores utilizados, mostrados na tabela abaixo.

Vetor: pET-28 e PSMT3	Rosetta	BL21	Artic express®
Kanamicina	Cloranfenicol	-	Gentamicina
3,5µg/ml	5µg/ml		10µg/ml

Tabela 3: Antibióticos utilizados durante a expressão

A expressão da proteína foi feita na presença de pré-cultura (pré-inóculos) de células, na proporção de 1:100 de pré-inóculos nos meios. As culturas foram crescidas por volta de 4 horas a 37 ° sob agitação constante (200 rpm), até atingir a 600 nm uma D.O de 0.6-0.8. Após atingir a D.O na faixa mencionada, a expressão da proteína foi induzida com IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) em concentrações variadas (0,1; 0,5; 1 mM), nesta fase fez-se o uso de temperaturas diferentes com 16 °C e16h de expressão, 20 °C com 12h de expressão e 37 °C a 4h de expressão para as construções para Bl21, para Rosetta usou a temperatura de 37°C com 4h de expressão. Para as construções em *Artic Express* utilizou-se 11°C e 24h para expressão e a temperatura que antecede a indução da expressão foi a 30°C. Os parâmetros utilizados nas expressões estão descritos na tabela 4. As varáveis analisadas durante as 5 expressões realizadas estão na tabela 5.

Cepas de <i>E. coli</i> com as construções em pET-28 e pSMT3	Temperatura	Concentração de IPTG	Meios de cultura
BI21 DE3	37, 20 ⁰C	0,1; 0,5; 1 mM	LB e 2xYT
Rosetta	37	0,1; 0,5; 1 mM	LB
Artic express	11ºC	0,1; 0,5; 1 mM	LB

Tabela 4 - Parâmetros avaliados durante a expressão da P21.Avaliou a expressão da P21 nas
construções em pET 28 e pSMT3 nas cepas: Bl21, Rosetta e Arctic Express.

Tabela 5 - Variáveis usadas nas expressões contidas nos quadrados em laranja. As 5 expressões realizadas e usa variáveis como: tipo de vetor de expressão (pET-28 e pSMT3), tipo de cepa de *E. coli* (Bl21 DH3, Rosetta e Artic Express), temperatura de expressão (37, 20 e 16ºC), concentração de IPTG (0.1, 0.5 e 1mM), meios de cultura (2xYT e LB), métodos de lise (sonicação *french press, freezing thaw*)

Expressões	Tipo de	Tipo de cepa	Temperatura	Meios	Métodos de lise	Concentração
	vetor		de			de IPTG
			expressão			usada
1°	pSMT3/	BI 21	37ºC	LB	Sonicação	$0.1.05.1 \mathrm{mM}$
expressão	pET-28					0,1,0,3,11111
2º	pET-28	Rosetta/Arctic/	37ºC	LB	Sonicação	0.1:0.5:1 mM
expressão		BI21				0,1,0,5,11111
3°	pET-28	BI21	37, 20 e 16ºC	LB	Sonicação	0.1:0.5:1 mM
expressão						0,1,0,5,11111
4º	pET-28	BL21	37ºC	2xYT	Sonicação	0.5 mM
expressão				e LB		
5°	pET-28	BI 21	37ºC	LB	Sonicação/french	0.5 mM
expressão				_	press/ freezing	
					thaw	

Passado o período da expressão, o meio foi centrifugado a 8.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e cada 1g de *pellet* de bactérias precipitado foi ressuspendido com 3 ml do tampão 1 (300mM de NaCl, 25mM Hepes e 5% de glicerol pH 8) com 10mM de imidazol.

No processo de lise celular foi adicionado ao *pellet* já ressuspendido, inibidor de serino protease PMSF (Fenilmetanosulfonilflúor) 1 mM, Ditiotreitol (DTT) 5 mM e 1mg/ml de lisozima (concentração final), logo após incubou-se por 30 minutos em gelo. Em seguida foram testados para a construção pET-28 BL21 os 3 métodos de lise celular, como *French press*, ultassom *e freezing/thaw*, no intuito de avaliar o método mais eficiente de lise:

Métodos de lise utilizados:

- French press

Os *pellets* ressupendidos no tampão de lise foram lisados em *French Press* (16.000 psi) até a solução não estar mais viscosa. Posteriormente, as células passaram a ser ressuspendidas no mesmo tampão e foram reforçadamente lisadas na *French Press.*

-<u>Ultrassom</u>

A suspensão foi aplicada ultrassom com uma freqüência de 60 khz por 30 s, por 8 vezes a intervalos de 1 min, em gelo.

-Freezing/thaw

A suspensão de bactérias foi congelada em nitrogênio líquido e descongelada em banho-maria por 5 vezes. Ao lisado obtido foi adicionado a enzima benzonase 5 U/ml, no intuito de diminuir a viscosidade da solução com a quebra de DNA, deixou-se homogeneizando durante 30 min.

Os materiais previamente lisados foram centrifugados a 4 ºC, 14.000 rpm por

30 minutos.

Foram retiradas alíquotas dos sobrenadantes e dos *pellets* obtidos, para a posterior análise em gel de poliacrilamida 15% em SDS (Dodecil sulfato de Sódio).

3.7 Purificação

3.7.1 Purificação em coluna de afinidade

A P21 da construção em pET-28 foi purificada em coluna de níquel com afinidade para caudas de histidina.

Antes de aplicar a amostra equilibrou-se a coluna com 5 volumes de coluna com o tampão de lise contendo 10mM de imidazol. Em seguida colocou a amostra na coluna. No passo seguinte lavou a coluna com concentrações crescentes de imidazol; 10 mM (20 volumes de coluna), 50 mM (10 volumes de coluna), e logo após eluiu a coluna com 300 mM (3 volumes de coluna). Após essa etapa da purificação as frações da lavagem e da eluição formam analisadas em gel de poliacrilamida 15% em SDS, avaliando o nível de pureza das amostras.

A solução com 300 mM de imidazol contendo as proteínas eluidas foi concentrada em centrífuga a 2700 rpm a 500µL usando o concentrador Millipore® de 5 KDa.

A amostra obtida da purificação anterior foi submetida à cromatografia de filtração molecular, utilizando como fase estacionária coluna SUPERDEX 750/300GL (Sistema-FPLC, PHARMACIA®), que separa proteínas de 3.000 a 70.000 Da. A cromatografia foi realizada em equipamento Akta Purifier, marca General Electric (GE). O fluxo de eluição foi de 0,5 mL/min, frações de 1,0 mL foram coletadas. A fase móvel utilizada para o *pool* de proteínas foi tampão 1. Os picos observados na purificação foram analisados em gel de poliacrilamida 15% em SDS.

3.8 Quantificação da P21

A concentração da P21 foi determinada por espectrofotometria no λ= 280 nm no aparelho *nanodrop* (Thermo Scientific).

3.9 Determinação do ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico ou pl é o pH no qual uma proteína ou aminoácido apresenta carga elétrica líquida nula, onde existe um balanceamento entre as cargas positivas e negativas dos íons dos aminoácidos de uma proteína. O pl é uma característica de grande importância na purificação de proteínas, pois é neste pH, que é peculiar a cada proteína, que a solubilidade de uma proteína é mínima ⁸⁵.

A focalização isoelétrica consiste em uma técnica eletroforética que separa proteínas de acordo com seu pl. A eletroforese é realizada em condições desnaturantes e baseia-se no deslocamento das proteínas carregadas em um gradiente de pH quando uma corrente elétrica é aplicada ao sistema ⁸⁵.

A corrida eletroforética foi realizada com a P21, vinda da coluna de exclusão molecular, usando o sistema Phastsystem (Pharmacia LKB Biotechnology), utilizando-se o gel do kit *Phast gel* IEF 3-9(Amersham Pharmacia) com gradiente de pH 3-9. O gel foi corado com *Coomassie blue* G contendo 0.1% de solução com metanol 25% e acido acético a 5%. Os padrões de pl usados na corrida estão descritos na tabela 6.

Padrões de pl	рІ
Tripsinogênio	9.30
Banda básica de	8.65
lectina	
Banda média de	8.15
lectina	
Banda ácida de	8.15
lectina	
Mioglobina básica	7.35
Mioglobina ácida	6.85
Anidarse carbônica	6.55
humana	
Anidrase carbônica	5.85
bovina	
B Lactoglobulina A	5.20
Inibidor de tripsina	4.55
de soja	

Tabela 6 - Padrões de PI do kit do Phast gel IEF 3-9.

O dicroísmo circular é um fenômeno resultante da interação da luz polarizada com moléculas quirais. Essas moléculas assimétricas são opticamente ativas, possuindo um centro quiral, que quando interagem com a luz circularmente polarizada, induzem alteração da polarização da luz incidente. O dicroísmo detecta essa alteração, no qual é medida a absorbância diferencial da luz circularmente polarizada para direita e a esquerda depois que luz incidente passa pela amostra ⁸⁶.

O espectro de CD apresenta uma região UV próxima em 250-300nm, que pode detectar a contribuição de pontes di-sulfeto e aminoácidos aromáticos; na região UV distante entre 190-250 nm, detecta-se a transição das ligações peptídicas, alterações conformacionais e composição das estruturas secundárias (voltas β , hélice α e folhas β)⁸⁷.

A estrutura de α -hélice presentes em proteínas é vista no espectro de CD como uma banda negativa de 222 nm, ocasionada por uma forte interação das ligações de hidrogênio. As folhas- β apresentam-se com espectro de CD característico em uma banda negativa próxima a 216nm, uma banda positiva entre 195-200nm e uma banda negativa próxima a 175nm ⁸⁸.

Os experimentos foram realizados no espectropolarímetro Jasco modelo J-815 CD *Espectrometer*. As medidas foram realizadas em uma cubeta de quartzo de 0.1cm de caminho ótico, com a proteína na concentração de 0.2 mg/ml no tampão NaHPO₄ 50mM acrescido de 100mM de NaCl, pH 8 usando a célula de 1mm de varredura entre 190-260nm a 25 °C. A medida de desenovelamento térmico foi realizada utilizando a temperatura de 25 ° C inicial com o incremento de 1° na temperatura até o alcance de 90 ° C. Os espetros foram analisados utilizando o pacote de programas de deconvolução CDPRO (Selcon3, Contill, CDSSTR), que usam as diferenças entre os espectros CD das diferentes estruturas secundarias para assinar porcentagens de cada estrutura contidas na proteína observada. Quando uma luz incide sobre a matéria, estimula um processo de polarização dos elétrons das moléculas na mesma direção do campo elétrico da onda incidente. A polarização oscila na mesma freqüência da onda incidente induzindo assim o espalhamento de radiação em todas as direções ⁸⁹.

Quando uma luz monocromática incide em um líquido contendo partículas que se movimentam aleatoriamente (movimento Browniano), ocorre uma alteração na freqüência da radiação detectada em relação à freqüência da onda emitida. Esta alteração relaciona-se com o tamanho de partícula, tornando possível a medida de seu tamanho. O tamanho e a forma da partícula definem a freqüência, polarização e distribuição angular da luz dispersada, já a posição da partícula e do detector determina a intensidade do espalhamento. A alteração da posição de uma partícula é seguida pela alteração na medida da intensidade da luz espalhada. Estas alterações de intensidades permitem através de uma função de correlação, o conhecimento acerca do movimento das partículas, assim como seu coeficiente de difusão e suas dimensões. A função de correlação das intensidades medidas é uma medida indireta do coeficiente de difusão das partículas ⁹⁰.

No espalhamento de luz dinâmico (DLS) a intensidade do espalhamento é detectada como função de tempo. É de grande importância saber o tempo necessário para as flutuações na intensidade da luz espalhada ocorrerem, pois é nesse tempo que estar contido a informação das propriedades dinâmicas das partículas. O coeficiente de difusão translacional é a informação mais simples a ser obtida. O coeficiente de difusão translacional para uma partícula esférica relacionase ao raio hidrodinâmico (R_H). O R_H de uma partícula é calculado a partir do coeficiente de fusão (D) via a equação de Stokes-Einstein, no qual K_B é constante de Boltzmann, η é a viscosidade, T é a temperatura e $f=6\pi\eta R$ é o coeficiente friccional para uma esfera compacta no meio viscoso ⁸⁹.

$$D = \frac{kT}{f} = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H}$$

DLS é uma técnica empregada para medir o tamanho de partículas em solução aquosa. O DLS mede o movimento browniano e relaciona isso ao tamanho das partículas. Partículas grandes apresentam movimento browniano mais lento, já partículas pequenas interagem mais com as moléculas do solvente se mostrando com o movimento browniano mais rápido.

A intensidade do espalhamento de luz de uma molécula de proteína é proporcional ao quadrado do peso molecular tornando as técnicas de espalhamento de luz sensíveis a presença de agregados de proteína. O que faz o DLS uma ferramenta útil em cristalografia de proteínas, pois se pode avaliar a estabilidade de uma proteína, bem como sua tendência de formar agregados e oligômeros frente a variados parâmetros, como pH, temperatura, força iônica de soluções. Desse modo o uso do DLS faz-se importante na triagem de soluções contendo proteínas, no intuito de identificar se essas soluções são susceptíveis ou não a conduzir a formação de cristais⁸⁹.

As medidas de espalhamento de luz dinâmico foram realizadas no aparelho Zetasizer Nano series (Zetasizer µV) da Malrvern em cubetas de 2µL com as amostras previamente centrifugadas a 13000 RPM durante 5min. A concentração de proteína utilizada foi de 1 mg/ml. Foram utilizados tampões com diferentes pHs a concentração de 0.3 M de NaCI, como mostrado na tabela 7.

pHs	Tampão (25 mM) Concentração de 0.3 M de NaCl
5	MES
6	MES
7	MOPS
8	Tris-HCI
9	Tris-HCI
10	CHES

Tabela 7 - Tampões utilizados como solvente da P21 nas análises em DLS

3.12 Avaliação da atividade inibitória da P21 frente à tripsina, quimiotripsina e elastase neutrofílica

Os Experimentos foram realizados no laboratório da professora Ana Paula de Lima do departamento de biofísica da UFRJ do Centro de Ciências da Saúde. Ensaios fluorimétricos foram realizados no espectrofluorímetro (Hitachi F-4500) e os comprimentos de onda utilizados para excitação e emissão de fluorescência foram de 380nm e 440nm. Para detecção da atividade de serinoprotease foram utilizados substratos fluorescentes CBZ-Phe-Arg-MCA, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA e Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA, previamente preparados em solução estoque de 50% de DMSO.

As tripsina, quimiotripsina e a elastase de neutrófilo foram pré-incubadas em tampão (50 mM de Na₂ HPO₄, 200 mM NaCl, 2mM EDTA, pH 7,5), com variadas concentrações da P21 por 10 min, a temperatura ambiente e na ausência dos substratos fluorescentes. O controle foi incubado apenas com tampão 1 da P21.nas

mesmas condições. Após a incubação as atividades foram analisadas por ensaio fluorimétrico e a atividade residual foi detectada pela hidrólise do substrato sintético fluorogênico em espectrofluorímetro F4500 (Hitachi), a 380 nm de excitação e 440 nm de emissão

Utilizou-se 25 μ M de tripsina pancreática bovina em tampão (50 mM Na₂PO₄, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,5),4 μ g/ml de P21(concentração final) e 10 μ M do substrato fluorogênico CBZ-Phe-Arg-MCA. Para quimiotripsina bovina utilizou-se o tampão (50 mM Na₂PO₄, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,5), 4 μ g/ml da P21 concentração final), 10 μ M do substrato Suc-AAPF-MCA Para a elastase de neutrófilo humano utilizou-se o tampão (50 mM Na₂PO₄, 200 mM NaCl, 20 mM Na₂PO₄, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7,5), 1 μ g/ml, 3 μ g/ml, 4 μ g/ml de P21 (concentração final) e10 μ M do substrato Suc-AAPV-MCA.

60

4.1 Modelagem molecular

4.1.1 Seleção da proteína molde

Na busca de proteínas molde, utilizando o programa FastA, foi realizada pesquisa, selecionando alguns parâmetros na busca, como apontar busca de proteínas moldes oriundas bancos de dados específicos, como o PDB e selecionar o *"expectation upper value"* de 20, o qual refere-se ao valor de esperança(E)(*E-value*), O *E-value* é um estimador estatístico da probabilidade de que o alinhamento aconteça por acaso e de que o mesmo não seja derivado de proteínas que sejam ancestrais comuns.

A sequência submetida da P21 foi à seguinte:

EEVVNRGYNHKEPHKRHHHSFGHHRYVRREELRDATEVGCRGEITRYCQPPVNGFYEDWWKCLSDNMD RFSTPDCQTHVNGMIACRNFTVSSYGSGEQSPDGLVKHLLHSEKESIPSECRNSRFYKDTVVGFHRRQ

O resultado da busca de proteína molde é mostrado na tabela 8 e na fig. 5 abaixo, o qual especifica os alinhamentos da P21 com as proteínas moldes propostas.

Código PDB	Proteína	№ de aminoá cidos	Score	Identidade	Similaridade	E-value
1YC0_I	Inibidor de protease tipo kunitz	75	78	24.7	55.8	5.9
1JR2_B	Uroporfirinogênio III sintase	286	90	42.4	66.7	8.1
2JR2_A	Uroporfirinogênio III sintase	286	90	42.4	66.7	8.1
1T30_A	Proteína reguladora de estoque de carbono	95	83	33.3	61.5	9.0
1GGM_A	Glicil _TRNA sintetase	442	91	26.1	59.8	11.0
1B76_A	Glicil _TRNA sintetase	442	91	26.1	59.8	11.0
1GGM_B	Glicil _TRNA sintetase	442	91	26.1	59.8	11.0
1B76_B	Glicil _TRNA sintetase	442	91	26.1	59.8	11.0
1ATI_A	Glicil _TRNA sintetase	505	91	26.1	59.8	12.0
1ATI_B	Glicil _TRNA sintetase	505	91	26.1	59.8	12.0
3M9Q_B	Proteína letal a machos-3	101	80	43.2	62.2	17.0
3M9Q_A	Proteína letal a machos-3	101	80	43.2	62.2	17.0

Tabela 8 - Tabela gerada após o submissão da sequência da P21 no FastA.



Figura 5 - Visual FastA result gerado após a submissão da sequência da P21: As sequências alinhadas estão mostradas na ordem do crescente do valor de *E-value*(escala colorida)

De acordo com a tabela 8 e a fig. 5, o alinhamento da sequência da P21 a sequência da proteína 1YC0_I apresentou o melhor resultado (1º linha em laranja da tabela 8 e a 1ª sequência em vermelho), com 24,7 % de identidade num segmento de sequencia de 75 aminoácidos com o valor de *E-value* de 5.9. Esse valor estatisticamente deveria ser desconsiderado para construção do modelo se a única informação for a sequencia da proteína. Todavia a interpretação de um resultado não é tão simples, muitas vezes dependendo do que se busque; como definição de função, motivos conservados, etc, o valor de *E-value* para muitos alinhamentos não será o ideal, pois muitas vezes, proteínas de mesma função podem apresentar apenas alguns aminoácidos conservados do motivo ou domínio catalítico e isso pode refletir em um alto valor de *E-value*. Pode-se aplicar esse fato para o alinhamento da P21 com a sequência da 1YC0_I (fig 6), o qual os resíduos coloridos referentes à região de ligação do inibidor 1YC0 à protease ativadora do fator de crescimento de hepatócitos(HAI) de ambas as sequências se conservaram quase por completo.

Mesmo apresentando um alinhamento parcial com valores estatísticos insatisfatórios, seguiu-se em frente na construção do modelo. Durante análise do alinhamento, levou-se em conta outros parâmetros mais relevantes, como a avaliação do enovelamento da proteína molde sob os aminoácidos alinhados da P21, bem como a presença de aminoácidos correspondentes na região responsável pela função da proteína molde na sequencia da P21. Sendo assim o alinhamento da P21 frente à sequência 1YC0 se mostrou relevante, pois mesmo sendo parcial, os

aminoácidos alinhados são importantes para a função e o enovelamento da proteína modelo, fato que não foi confirmado nas outras proteínas alinhadas.

Desse modo, selecionou a proteína com código PDB 1YC0_I. A proteína selecionada tem função de inibidor de serino protease do tipo *kunitz*, que inibe a serino protease HGFA (ativador de fator de crescimento de hepatócito). O HGFA ativa o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), que é secretado pelos hepatócitos e promove uma série de funções, como regeneração das células do fígado, rim e pele. O HGF circula no sangue na forma de zimogênio inativo e para se tornar biologicamente ativo é necessário que o HGFA clive a cadeia de peptídeos do HGF. A atividade do HGFA é regulada por um inibidor de fator de crescimento de hepatócitos (HAI), que é um inibidor de serinoprotease com um domínio tipo *kunitz*

4.1.2 Alinhamento e modelagem

O Alinhamento gerado pelo FastA se encontra na fig 6. Alguns parâmetros foram tomados para validação do alinhamento, como a avaliar a conservação dos resíduos essenciais para manutenção e da estrutura molde e função da proteína (resíduos coloridos do alinhamento). Os inibidores de protease tipo *kunitz* apresentam uma alça em sua estrutura, que é denominada de conformação canônica ⁷⁰. Estes inibidores formam complexos estáveis com a protease ⁹². A alça de ligação é estabilizada por interações adicionais entre os resíduos que circundam o centro catalítico da protease e o núcleo do inibidor (fig. 7) ⁷⁰. A alça é constituída, basicamente, de 6 resíduos importantes para sua função, como a glicina 257(G²⁵⁷), a arginina 258 (R²⁵⁸), cisteína (C²⁵⁹), arginina 300 (R²⁶⁰), serina 262 (S²⁶²), fenilalanina 263 (F²⁶³). Desta forma, dos 5 resíduos que interagem com o HGFA, três deles que realizam interação estão conservados (tabela 9). As cisteínas em amarelo são fundamentais para o a manutenção da conformação da alça e (interagem formando ligação de di-sulfeto) se encontram conservadas, mostrando que a

proteína molde é viável para construção do modelo. Um ponto negativo considerado dentro do modelo é uma deleção encontrada em centro da folha β (aminoácidos sublinhados por duas linhas na fig 6).



Figura 6 - Alinhamento gerado utilizado como base para modelagem da P21. Sublinhadas estão as hélices α em tachado estão as folhas β. Em vermelho se encontram os aminoácidos apolares, em azul os aminoácidos polares não carregados, em verde os aminoácidos carregados negativamente e em magenta os aminoácidos carregados positivamente. Na estrutura molde os resíduos sublinhados são os resíduos referentes à composição da alça característica dos inibidores tipo *kunitz*, em fundo verde os resíduos conservados é importantes para interação da HAI com HGFA, em fundo magenta são os resíduos semiconservados e em fundo amarelo a cisteína que se conserva no molde e na P21 e que forma ligação de di-sulfeto com a alça. Dois pontos entre as duas sequências alinhadas mostram que os aminoácidos são diferentes, mas que apresentam similaridade em suas características físico-químicas.

Com base no alinhamento descrito gerou-se o modelo do fragmento Nterminal da P21 o qual foi sobreposto à estrutura molde para se avaliar as possíveis interações dos resíduos da alça do modelo da P21 com o HGFA. A comparação das interações intermoleculares entre os resíduos do modelo construído e os resíduos da estrutura molde com a estrutura do HGFA é observado na fig. 7 e na tabela 9.



Figura 7 - Estrutura do HAI (azul) complexado com HGFA (cinza). Em magenta encontram-se os resíduos que constituem a alça responsável pela função da proteína.

Tabela 9 - Resíduos componentes da alça do HAI e do modelo da P21 e suas respectivas interações químicas com HGFA. Linhas da coluna marcado em laranja são as interações que se conservam tanto no modelo da P21 como na estrutura do HAI. Linha em verde é uma possível nova interação realizada entre o Glu 262 do modelo da P21 e a Phe 431 do HGFA.

Resíduos P21	HGFA	Tipo de interação	Resíduos HAI	HGFA	Tipo de interação
lle 263	-	-	Phe 263	-	-
Glu 262	Phe 431	Carboxila do Glu forma lig. Hidrogênio com o grupamento amina da Phe	Ser 262	Phe 431	Grupamento amina e carbonila da Ser forma lig. Hidrogênio com o grupamento carbonila e amina da Phe
Gly 261	Ser 598	O grupamento amina da Gly forma lig. Hidrogênio com a hidroxila da Ser	Gly 261	Ser 598	O grupamento amina da Gly forma lig. Hidrogênio com a hidroxila da Ser
Arg 260	Asp 592 Gln 595	O grupo amina da cadeia lateral do Arg forma ponte de salina com a carboxila d a cadeia lateral do Asp O grupo carboxila da Arg forma lig. hidrogênio com grupamento amina do Gln	Arg 260	Asp 592 Gln 595	O grupo amina da cadeia lateral do Arg forma ponte de salina com a carboxila d a cadeia lateral do Asp O grupo carboxila da Arg forma lig. hidrogênio com grupamento amina do Gln
Cys 259	Gln 595	O grupo carboxila da Cys forma lig. hidrogênio com o grupo amida da cadeia lateral do Gln	Cys 259	Gln 595	O grupo carboxila da Cys forma lig. hidrogênio com o grupo amida da cadeia lateral do Gln
Gly 257	-	-	Arg 258	Gly 619 Ser 494	O grupo carboxila da Arg forma lig. hidrogênio com o grupo amina da Gly O grupo amina da cadeia lateral da Arg forma lig. hidrogênio com a hidroxila da cadeia lateral da Ser



Figura 8 - Complexo formado entre o HAI e HGFA (PDB- 1YC0) e o modelo da P21 com HGFA.
A) Em azul a estrutura do HAI e seus aminoácidos (em palito) da alça interagindo com os aminoácidos em magenta em linha e bola da estrutura em *cartoon* de cor cinza do HGFA.
B) Em verde escuro a estrutura do modelo da P21 e seus aminoácidos (em palito) da alça interagindo com os aminoácidos magenta em linha e bola da estrutura em *cartoon* de cor cinza do HGFA.
B) Em verde escuro a estrutura do modelo da P21 e seus aminoácidos (em palito) da alça interagindo com os aminoácidos magenta em linha e bola da estrutura em *cartoon* de cor cinza do HGFA. Em verde claro são mostrados os dois triptofanos (Trp 280 e Trp 281) não pertencentes à alça que possui os resíduos responsáveis pela função da proteína. O Trp 281, possivelmente, interagirá com estrutura do HGFA formando uma ligação de hidrogênio com Gln 595. A estrutura do HGFA tem a presença de um fosfato cristalográfico, que interage com His 451, já no modelo (item B) existe a possibilidade de o mesmo interagir com a His 451, o Trp 280.

Uma vez construídas as coordenadas do modelo o mesmo foi submetido à minimização de energia e equilibração de forma a otimizar uma conformação mais estável do modelo. Na fig 9 é observada algumas poucas mudanças na cadeia principal do modelo da P21, porém o enovelamento da proteína não se distanciou do modelo inicial. Para determinar a estabilidade do modelo foi realizado um processo de dinâmica molecular, onde fez uma equilibração. Na equilibração é injetada à molécula energia, de forma que cada átomo constituinte da molécula ganhe energia cinética. Para cada passo alcançado pela estrutura durante o ganho de energia cinética é calculado as medidas das coordenadas das distâncias dos átomos da estrutura. Ao final da equilibração obteve-se uma trajetória do modelo no decorrer do tempo e um gráfico de RMSD em função do tempo em ps do modelo (fig 10). É notado que o RMSD de 2.8 Å variou dentro da faixa do limite aceitável (até 3Å), o que mostra que o a modelo possui estabilidade, tornando-o válido.



Figura 9 - Modelo da P21 antes da minimização de energia (em verde), em vermelho modelo depois da minimização de energia e em azul modelo depois da equilibração





Figura 10 - Trajetória da P21 durante a equilibração realizada em 1000 pico segundos (ps) e seu gráfico correspondente de RMSD. A) Estruturas do modelo da P21 : estrutura de cor verde é referente à estrutura da P21 antes da equilibração, as estruturas variando do vermelho, branco e azul, nessa ordem, são relativas à crescente fração de tempo durante a equilibração. B- Gráfico de RMSD relativo à trajetória de equilibração em 1000 ps variando na faixa de 2.8 Å.

Com base na modelagem realizada, pode-se supor que a P21 apresenta função de inibidor de serinoprotease tipo *kunitz*. Assim sendo, realizou um teste posterior, de forma a avaliar a atividade inibitória da a P21 frente à tripsina, quimiotripsina e elastase neutrofílica, contida no item 4.8, de forma ajudar a confirmar ou descartar esta hipótese.

B)

4.2 Clonagem

Durante os testes com variadas condições de expressão verificou-se que P21 expressa em grandes proporções na forma de corpos de inclusão bacterianos (fração insolúvel). Desse modo, visando aumentar os níveis de expressão da P21 na fração solúvel, realizou-se a clonagem e subclonagem no vetor de clonagem PGEM-t e o vetor de expressão PSMT3, respectivamente. O vetor pSMT3 apresenta em sua construção uma proteína de fusão chamada SUMO, que quando submetida à expressão é fusionada com a proteína interesse confere um aumento a solubilidade da mesma.

4.2.1. Amplificação da P21

O plasmídeo pET-28a a contendo a construção para P21 foi submetido à reação de amplificação. O resultado afirmando a positividade da reação de amplificação para P21 é mostrado na fig. 11, em que a banda contendo 429 pb (pares de base) é relativa à P21. Ao produto da amplificação foi acrescido 18pb correspondentes aos sítios de clivagem para enzimas Bam HI e Xho.



Figura 11 - Amplificação da P21 oriunda do vetor pET-28. Gel de agarose 1% contendo a coluna 1 marcador de massa molecular, coluna 2 produto da amplificação de 429pb relativo a P21 e coluna 3 produto de amplificação após submetido a um processo de purificação do gel de agarose.

4.2.2 Clonagem e Subclonagem da P21

Os fragmentos de DNA referente à P21, previamente purificados, foram submetidos à reação de ligação com vetor de clonagem pGEM-t. Das colônias que se mostraram positivas a presença do inserto na reação de digestão (fig. 12), extraiu-se o DNA que por sua vez foi digerido com enzimas Bam HI e Xho para liberação do inserto correspondente a P21.





Figura 12 - Reação de digestão relativa à presença do inserto da P21 no vetor pGEM-t. Gel de agarose 1% contendo a coluna 1 marcador de massa molecular, coluna 2, 3 e 6 inserto de 429pb liberado após a reação de digestão(retângulo branco).

Uma vez liberados os insertos do vetor pGEM-t, os mesmos foram purificados do gel e posteriormente submetidos a reação de ligação com vetor pSMT3, previamente digerido com as enzimas Bam HI e Xho. O produto da reação de ligação foi transformado para cepas BI21 competentes.

O DNA plasmidial positivo para reação de digestão com enzimas de restrição é mostrado na Fig 13.

Desse modo confirma-se a clonagem do gene da P21 no vetor de expressão pSMT3.



Figura 13 - Gel de agarose referente à reação de digestão relativa à presença do inserto da P21 no vetor pSMT3. Seta branca apontada para o inserto de 429kb liberado na reação de digestão com as enzimas de restrição Bam HI e Xho.
O estudo estrutural e cristalográfico de proteínas tem sido largamente explorado. Para tanto, faz-se necessário investir esforços para a obtenção de proteína pura, conformacionalmente correta e em quantidades adequadas para realizar os estudos em questão. Desse modo, neste presente trabalho investigou as melhores condições para expressão e purificação. Durante a expressão desenvolveram-se os experimentos de forma a otimizar as condições para obter maiores concentrações da P21 expressa em *E. coli* na fração solúvel, pois é na fração solúvel que se encontra a proteína no seu enovelamento correto ⁹³. As variáveis avaliadas no processo de expressão foram: temperatura (16, 20 e 37°C), concentração de IPTG (0.1, 0.5 e 1 mM), meios de cultivo (LB e 2xYT), cepas de *E. coli*(Rosetta, *Arctic express* e BL21), vetor de expressão (pET-28 e pSMT3) e métodos de lise mais eficientes.

Primeiramente avaliou a expressão da P21 na fração solúvel utilizando 2 vetores de expressão, pET-28 e pSMT3. A expressão foi realizada utilizando meio LB, cepa Bl21, 37°C, com as concentrações de IPTG de 0.1, 0.5 e 1 mM. O *pellet* bacteriano foi lisado por sonicação. As frações solúveis e insolúveis da P21 podem ser comparadas no gel de poliacrilamida a 15% na figura 14. A FI (fração insolúvel) e FS (fração solúvel) da P21 é observada nas bandas de massa molecular (MM) 18 kDa (pET-28) no item A e de 29 kDa (pSMT3) no item B da área ocupada pelo retângulo vermelho. Pode-se observar que as intensidades das bandas de FI e FR de ambos os vetores apresentam-se proporcionalmente iguais, indicando que a expressão da P21 em pET-28. Fato este que não corrobora com a teoria, que aponta que o pSMT3 é um vetor de expressão promissor no que se refere ao aumento da concentração de proteína presente na fração solúvel.



Figura 14 - Gel de poliacrilamida relativo a expressão da P21 nos vetores de expressão pET-28 e pSMT3. AE- Perfil proteico do lisado bacteriano antes da expressão da P21. A) Expressão da P21 realizada em pET-28 nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1mM de IPTG e as respectivas fração insolúvel(FI) e fração solúvel(FS) do lisado bacteriano. B) Expressão da P21 realizada em pSMT3 nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1mM de IPTG as respectivas fração insolúvel(FI) e fração solúvel(FS) do lisado bacteriano.

Utilizando o vetor pET-28 foi avaliada a expressão da P21 nas seguintes cepas de *E. coli*: Rosetta, *Arctic Express* e Bl21. A expressão foi realizada em meio LB, 37°C, com as concentrações de IPTG de 0.1, 0.5 e 1 mM. As bandas relativas à FI e FS da P21 são observadas em gel de poliacrilamida a 15% mostrado na fig. 15. Observou-se que a intensidade das bandas de FI e FS contida na área do retângulo em vermelho, não modifica na presença das diferentes cepas.







Figura 15 - Gel de poliacrilamida relativo à expressão da P21 nas cepas de E. coli; Arctic Express, Rosetta, BI21. AE- Perfil proteico do lisado bacteriano antes da expressão da P21. A) Expressão da P21 realizada em Arctic Expess nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1 mM de IPTG e as respectivas frações insolúveis (FI) e fração solúvel (FS) do lisado bacteriano. B) Expressão da P21 realizada em Rosetta nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1 mM de IPTG e as respectivas frações insolúveis (FI) e fração solúvel (FS) do lisado bacteriano. C) Expressão da P21 realizada em Bl21 nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1 mM de IPTG e as respectivas frações insolúveis (FI) e fração solúvel (FS) do lisado bacteriano. C) Expressão da P21 realizada em Bl21 nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1 mM de IPTG e as respectivas frações insolúveis(FI) e fração solúvel (FS) do lisado bacteriano.

Baixas temperaturas são largamente empregadas na expressão de proteínas heterológas, pois a lentificação do metabolismo bacteriano ocasionado pela baixa temperatura, muitas vezes, direciona a expressão da proteína em fração solúvel, porém é nessas condições que as chaperonas (proteínas, cuja finalidade é facilitar enovelamento correto da proteína expressa) bacterianas perdem atividade, especialmente o complexo chaperonina GroEL/ES da E. coli, que a temperatura de 12 °C apresenta apenas 30% de sua atividade quando comparada com sua atividade ótima a 30°C. Dessa forma, o uso de baixas temperaturas durante a expressão acarreta num déficit do aproveitamento do potencial bacteriano na expressão da proteína de interesse na fração solúvel. Tentando corrigir esse problema criou-se a Arctic Express, uma cepa desenvolvida para expressar as chaperonas cpn 10 e 60 oriunda da bactéria Oleispira antártica (manual stratagene), cuja atividade ótima é a temperaturas de 4-12ºC. Diante do exposto, um fato interessante foi observado, a FS de P21 expressa em Arctic Express no item A apresenta-se com intensidade proporcionalmente igual ou menor que a P21 expressa em outras cepas, o que leva a supor que as chaperonas cpn 10 e 60 expressa na Arctic Express não apresenta ou apresenta desprezível atividade frente à P21.

Realizou testes subseqüentes de expressão com seguintes temperaturas: 16 20 e 37°C. Utilizando o vetor pET-28 na cepa Bl21, meio LB, com as concentrações de IPTG de 0.1, 0.5 e 1 mM. O *pellet* bacteriano foi lisado por sonicação. Não diferentemente dos outros parâmetros já avaliados, a variação de temperatura durante a expressão, observada nas FI e FS contidas no retângulo vermelho nos géis de poliacrilamida mostrado na fig. 16, não foi relevante para aumentar a concentração da P21 na fração solúvel.







Figura 16 - Gel de poliacrilamida respectivo à expressão da P21 nas temperaturas de 16, 20 e 37°C. A) Expressão da P21 a 37°C a concentrações de 0.1, 0.5 e 1 mM de IPTG e as respectivas fração insolúvel (FI) e fração solúvel (FS) do lisado bacteriano B) Expressão da P21 a 20°C a concentrações de 0.1, 0.5 e 1 mM de IPTG e as respectivas fração insolúvel(FI) e fração solúvel (FS) do lisado bacteriano C) Expressão da P21 a 16°C a concentrações de 0.1, 0.5 e 1 mM de IPTG e as respectivas fração insolúvel (FI) e fração solúvel (FS) do lisado bacteriano C) Expressão da P21 a 16°C a concentrações de 0.1, 0.5 e 1 mM de IPTG e as respectivas fração insolúvel (FI) e fração solúvel (FS) do lisado bacteriano. De acordo com as áreas em vermelho referente às bandas de FI e FS da P21 contidas na fig. 14 e 15, pode-se perceber a influência positiva da diminuição da concentração de IPTG no meio de cultura durante a expressão. È notado que as concentrações de 0.5 mM de IPTG, a intensidade da banda de FS aumenta em relação as concentração 1 mM. Isso mostra que a concentração do agente indutor da expressão é preponderante frente ao tipo de cepa e a temperatura de expressão nas concentrações de P21 na FS.

Avaliou-se, também, quais meios de cultura levariam as bactérias a apresentar maior taxa de expressão em relação ao tempo. Sendo assim, testou-se o meio LB e 2xYT durante a expressão da P21 em 4h a temperatura de 37°C, utilizando a cepa Bl21 com pET-28, 0.5 mM de IPTG e sonicação como método de lise. É notado que a P21 se mostra em maior concentração na fração total (FT) do lisado bacteriano oriundo do meio 2xYT visto na área em vermelho, quando comparada a FT do lisado bacteriano proveniente do meio LB observado na área em azul dos géis da fig.17.

1 2 MM (KDa) LB 2×YT 66 45 36 29 20 14

Figura 17 - Gel de poliacrilamida contendo as frações totais (FT) do lisado bacteriano relativo às expressões da P21 em meio LB e 2xYT. 1: Retângulo azul corresponde a FT proveniente do meio LB. 2: Retângulo vermelho corresponde a FT proveniente do meio 2xYT.

Outro parâmetro avaliado foram os três métodos de lise: sonicação, *french press* e *freezing and thawing*. A expressão foi realizada a 37°C com o meio 2xYT, 0.5 mM de IPTG, utilizando a cepa Bl21 e o vetor pET-28. As FI e FS da P21 relativa às técnicas de lise testadas são observadas na fig. 18. È possível perceber que a

intensidade da FS da P21 na sonicação é maior que nas outras técnicas, sugerindo que a P21 é melhor "extraída", quando o *pellet* bacteriano é submetido à lise com o sonicador.



Figura 18 - Gel de poliacrilamida referentes às técnicas de lise o qual o pellet bacteriano foi submetido. Coluna 1: técnica de *freezing and thawing* e suas respectivas FI e FS. Coluna 2: técnica de *french press* e suas respectivas FI e FS. Coluna 3: técnica de sonicação e suas respectivas FI e FS.

A sonicação se mostrou mais potente que a *french press* e *freezing and thawing* sendo mais vantajosa na extração de P21 para fração solúvel.

Diante dos resultados expostos, decidiu trabalhar na expressão da P21 no vetor pET-28, cepa BL21, a 37°C com meio 2xYT a 0.5mM de IPTG, utilizando a técnica de sonicação como lise.

Uma vez encontrada a temperatura, meio de cultura, concentração de IPTG, o vetor e cepa adequados para uma melhor expressão da P21, iniciou-se o processo de purificação proteica por afinidade em coluna de níquel, como mostrado na fig. 19.



Figura 19 - Gel de poliacrilamida relativo a purificação da P21 por afinidade em coluna de níquel. Coluna 1: Fração solúvel do lisado bacteriano. Coluna 2: Primeira lavagem realizada com tampão contendo 10 mM de imidazol. Coluna 3: Segunda lavagem realizada com tampão contendo 50mM de imidazol. Coluna 4: Terceira lavagem realizada com tampão contendo 100mM de imidazol. Coluna 5, 6 e 7: Eluição da P21 realizada com 300mM de imidazol.

No objetivo de retirar por completo os contaminantes presentes no eluído da coluna de afinidade, realizou a segunda etapa da purificação, que consiste na purificação em coluna SUPERDEX 75 de exclusão molecular. Foram coletadas frações de 1 ml em fluxo de 1mL/min. Na figura abaixo é mostrado o cromatograma contendo o pico da P21 (item A) e o gel de poliacrilamida (item B) relativo aos picos do contidos no gráfico.





Figura 20 - Perfil cromatográfico da purificação da P21 na coluna de gel filtração. A) picos referentes à leitura de 280nm do sistema Äkta purifier da P21 e das frações contaminantes oriundas da coluna de afinidade de níquel. Aos 13 ml (pico P21) observase a P21 no seu estado monomérico (18.3 kDa). B) Frações relativas aos picos do item A. Retângulo vermelho abrange as frações coletadas da P21 em 13, 14 e 15 ml.

81

O pl teórico da P21 foi analisado no *protparam* disponível no <u>http://ca.expasy.org/tools/protparam.html</u>, este software permite avaliar vários parâmetros físicos e químicos da sequência de aminoácidos da proteína. O valor teórico encontrado para P21 foi de 8.26. Com base nesta estimativa, foi realizado o ensaio de focalização isoelétrica (fig.21) para se descobrir pl experimental, que foi de 7.32, valor este que contrasta com o valor do pl teórico.



Figura 21 - Ensaio de focalização isoelétrica da P21. Coluna 1: Padrão contendo proteínas com seus respectivos valores de pl. Coluna 2: Amostra contendo P21.

O espectro dicroico da P21 em tampão fosfato a 25°C é mostrado na fig 22. A P21 é formada, prevalentemente, por estrutura de folhas-β, como mostrado na tabela 10.

Tabela 10 – Porcentagem das estruturas secundárias da P21. O espectro da P21,que foi coletado em tampão fosfato pH 8 a 25°C, após ser deconvoluído pelos programas SELCON3, Continll e CDSSTR.

Programa usado	% de estrutura secundária					
	α-hélice	Folha-β	Volta	Randômica		
SELCON3	18.1	38.9	20.1	20.2		
Continll	22.4	29.3	21.4	26.9		
CDSSTR	19.2	34	24.6	21.7		



Figura 22 - Espectro de dicroísmo circular da P21 na forma nativa em tampão fosfato pH 8.

A banda negativa de 222 nm é ocasionada por uma forte interação das ligações de hidrogênio no meio conformacional referente à estrutura de α -hélice. É representado na fig. 24 o espectro dicroico da P21, o qual se fixou o comprimento de onda em 222 nm em função temperatura de forma a avaliar a perda da estrutura de α -hélice, que começou a ocorrer a 60 °C.

Como mostrado nos gráficos abaixo o sinal dicroico diminuiu de acordo com o aumento da temperatura. Na fig. 23, observa-se os espectros de 190-250 nm, medidos em diferentes temperaturas que variaram de 10-86°C. È possível perceber mais precisamente que a perda do sinal acontece em torno de 64° C, indicando o processo de desnaturação da proteína inicia-se nesta faixa de temperatura.



Figura 23 - Espectro de dicroísmo circular da P21 obtido com o aumento de temperatura de 10-86 ºC.



Figura 24 - Curva de desnaturação térmica da P21 em 222nm. Os dados foram coletados em tampão fosfato pH 8 no comprimento de onda, que foi fixado em 222 nm.

4.7 Espalhamento dinâmico da luz (DLS)

A P21 mostra-se na presença de agregados de alto peso molecular em todos os pHs testados nos ensaios de espalhamento dinâmico da luz (tabela 11). Sendo assim, deve haver buscas mais apuradas de tampões e aditivos que permitam que a P21 se apresente de forma monodispersa, com índice de polidispersividade menor que 20%, pois desse modo possibilitará a condução de ensaios cristalográficos mais promissórios.

рН	Raio hidrodinâmico (nm)	Mm (kDa)	Massa (%)	Índice de polidispersividade (%)
5	47.08±43	26.5±7	100	84
6	50.74±39.8	27.7±5.3	100	61
7	61.67±59.2	14.4± 3.7	100	92
8	82.62±69.86	23±3	100	76
9	46.42± 35.45	29.5 ±4.9	100	58
10	40.31±38.76	27.2 ±10.6	100	92

Tabela 11 - Dados de DLS da P21 variando o pH de 5-10 a 25ºC.

As medidas realizadas para avaliar o estado de agregação da P21 de acordo com a temperatura podem ser observadas na figura 25. Nota-se a presença de agregados em todas as medidas, tornando-se mais evidente o seu estado de agregação a partir de 65°C. A região de menor diâmetro em nm, contida na faixa de 37 e 52°, é a que apresenta provavelmente maior estabilidade, pois as partículas ali contidas possuem menor diâmetro, indicando que o processo de formação de agregados nessa faixa de temperatura é menor.



Figura 25 - Gráfico referente às medidas obtidas do DLS da P21 em raio em nm em função da variação da temperatura de 15-70 °C.

4.8 Avaliação da atividade inibitória da P21 frente à tripsina, quimiotripsina e elastase neutrofílica

De forma avaliar se a P21 apresenta atividade de inibidor de serinoprotease, como sugerido pelo modelo foi realizada uma avaliação do seu potencial inibitório sobre a tripsina (fig. 26), quimiotripsina (fig. 27) e elastase de neutrófilo (fig. 28).



Figura 26 - Avaliação da atividade inibitória do P21 purificada frente a tripsina. Uma aliquota. P21 a concentração final de 4 μg/ml foi incubada por 10 min com o tampão (50mM Na₂ PO₄, 200mM, NaCl, 2mM EDTA, pH 7,5) e com 25μM de tripsina. Após a incubação, a atividade residual foi determinada com a adição de 10μM de CBZ-Phe-Arg-MCA. O controle corresponde à atividade de tripsina sem incubar com a P21.



Figura 27 - Avaliação da atividade inibitória do P21 purificada frente a quimiotripsina. A P21 a concentração final de 4 μg/ml foi incubada por 10 min com o tampão (50mM Na₂ PO₄, 200mM, NaCl, 2mM EDTA, pH 7,5) e com 25μM de quimiotripsina. Após a incubação, a atividade residual foi determinada com a adição de 10μM de Suc-AAPF-MCA. O controle corresponde à atividade da quimiotripsina sem incubar com a P21.



Figura 28 - Avaliação da atividade inibitória do P21 purificada frente a elastase. P21 a concentrações de 1 μg/ml, 3 μg/ml e 4 μg/ml, foi incubada por 10 min com o tampão (50mM Na₂ PO₄, 200mM, NaCl, 2mM EDTA, pH 7,5) e com 25μM de elastase de neutrófilos. Após a incubação, a atividade residual foi determinada com a adição de 10μM de Suc-AAPV-MCA. O controle corresponde à atividade da elastase sem incubar com a P21.

Como observado nos gráficos acima, a P21 não apresenta atividade inibitória frente à tripsina e a quimiotripsina, porém apresenta atividade inibitória dose dependente frente à elastase neutrofilica. Resultados semelhantes indicou Lima e Mottram com a ISP1 (inibidor de serinopeptidases 1 de *T. cruzi*), o qual relata que estudos não publicados sugerem que a ISP1 de *T. cruzi* inativa a elastase de neutrófilos. Estes estudos mostraram que, também, a ISP1 não inativa a tripsina e quimiotripsina ⁹⁴.

Desse modo pode-se considerar que a P21 é um inibidor de serinoprotease, o que corrobora a veracidade do modelo computacional da P21 realizado neste trabalho.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

 - A clonagem do gene da P21 no vetor de expressão pSMT3 ocorreu. A P21 fusionada com o SUMO foi expressa em sua maioria em corpos de inclusão. Desse modo buscaram-se novas condições de expressão que direcionassem a uma maior obtenção da P21 na fração solúvel.

 A expressão da P21 utilizada nos ensaios foi realizada no vetor pET-28, cepa BL21, a 37°C com meio 2xYT a 0.5 mM de IPTG, utilizando a técnica de sonicação como lise, permitindo uma maior obtenção da P21 na fração solúvel.

- A obtenção do pl experimental da P21 que foi de 7.32, valor este que contrasta com o valor do pl teórico 8.26.

 - A P21, de acordo com espectros de dicroísmo circular deconvoluídos, apresenta sua estrutura secundária formada, majoritariamente, por folhas-β, (aproximadamente 30% da estrutura secundária).

- Durante a análise dos espectros de dicroísmo circular de desenovelamento térmico da P21, observou que em torno de 64° C a P21 começa a perder de sua estrutura secundária.

-. Sendo assim deve investir mais esforços na pesquisa de tampões e aditivos que permitam que a P21 se apresente de forma monodispersa, sem a presença de agregados, possibilitando a execução de ensaios cristalográficos futuros mais satisfatórios.

 - A realização da modelagem molecular por homologia do fragmento da P21 permitiu identificar uma possível função de inibidor de serinoprotease do tipo *kunitz*, o qual conduziu a subsequentes ensaios de inibição de serinoproteases usando substratos fluorescentes. - Na análise dos alinhamentos gerados, procurou escolher para modelagem, as sequências que contivessem alinhamentos com a melhor pontuação apontada pelo programa FastA. Dado que foram obtidos somente valores estatísticos insatisfatórios, priorizou-se outros parâmetros para seleção de uma sequencia molde. Um parâmetro determinante foi a alta identidade de sequencia na região associada à função da proteína (ligação do inibidor HAI com o HGFA). Com base nisso elaborou um modelo do fragmento da P21 que permitiu hipotetizar a sua função. Dessa forma realizaram-se ensaios de inibição de proteases usando substratos fluorescentes, visando avaliar a capacidade e potencial inibitório da P21 na presença de serinoproteases ativas. Estes ensaios apontaram que a P21 é um inibidor de serinoprotease, em particular da elastase de neutrófilos que apresentou uma inibição dependente da dose de P21.

Neste trabalho foram realizados alguns estudos estruturais e funcionais com a P21, que conduziram à experimentos que resultaram na indentificação da P21 como um inibidor de serino protease. Estes estudos abrem um novo capítulo, direcionando novas pesquisas na busca da elucidação do intricado processo de vias de sinalização induzidas pela proteína durante o processo de infecção da célula hospedeira pelo *T. cruzi*. Sendo assim, é de grande relevância a realização de estudos estruturais com base na cristalografia e RMN. Almejamos explorar estruturalmente a molécula da P21 e buscar de que forma a P21, como inibidor de serinopreotease, encaixa no processo de infecção, correlacionando com dados experimentais já obtidos, como a indução *in vitro* da polimerização de actina cortical⁹⁵⁻⁹⁶.

1 MORAN, M. The new landscape of neglected disease drug development. 2005 disponível em: < http://www.policycures.org/downloads/The_new_landscape_of_neglected_disease_ drug_development.pdf>. Acesso em: nov. 2011

2 LIESE, B.; ROSENBERG, M.; SCHRATZ, A. Neglected Tropical Diseases 1 Programmes, partnerships, and governance for elimination and control of neglected tropical diseases. Lancet, v. 375, n. 9708, p. 67–76, Jan 2010. ISSN 0140–6736.

3 HOTEZ, P. J. et al. Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. Lancet, v.373, n. 9674, p. 1570-75, 2009.

4 CHIRAC, P.; TORREELE, E. Global framework on essential health R&D. Lancet, v. 367, n. 9522, p. 1560-1561, May 2006.

5 **The World Health Report.** 2004 Disponível em: http://.who.int/healthinfo Acesso em : jul. de 2011

6 MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 104, p. 17-30, 2009.

7 MARTÍNEZ-DÍAZ, R. A. et al. Biological characterization of Trypanosoma cruzi strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 96, n. 1, p. 53-9, Jan 2001.

8 TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 101, n. 5, p. 463-491, Aug 2006.

9 MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 94, p. 401-404, 1999.

10 DIAS, João Carlos Pinto. Doença de Chagas, ambiente, participação e estado. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2011. Disponivel em:
http://www.scielosp.org/pdf/csp/v17s0/3893.pdf>. Acesso em:
16 June 2011. DOI: 10.1590/S0102-311X2001000700026.

11 WHO/TDR – World Health Organization. report of the scientific working group on chagas disease. Buenos Aires: Geneva, 2006. p. 7.

12 MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 98, n. 5, p. 577–91, Jul 2003. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12973523</u> >. Acesso em jun. de 2011.

13 MOREL, C. M. Chagas disease, from discovery to control – and beyond: history, myths and lessons to take home. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 3–16, 1999.

14 SILVEIRA, A.; VINHAES, M. Elimination of vector-borne transmission of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** v. 94, p. 405-11, 1999. Supplement 1

15 CHAGAS, C., R, J. Molestia de Carlos Chagas. in CONFERÊNCIA NA ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA EM AGOSTO DE 1911, 2., 1981. **Resumos** ... Brasília: UNB, Ed. 1981.p 167-192.

16 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, Jan 2002. ISSN 0074–0276.

17 MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A:** molecular & integrative physiology, v. 146, n. 4, p. 601–620, 2007. ISSN 1095–6433. Disponível em: < <u>http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643306001735</u> > Acesso em jun. de 2011..

18 PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet** Infectious Diseases, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001. ISSN 1473–3099. Disponível em: < <u>http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309901000652</u> >. Acesso em jul. de 2011.

19 TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. International Journal for Parasitology, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, May 2001. ISSN 0020-7519.

20 ANDREWS, N. W. Lysosome recruitment during host cell invasion by Trypanosoma cruzi. **Trends in Cell Biology,** v. 5, n. 3, p. 133–137, 1995. ISSN 0962–8924. Disponível em: < <u>http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0962892400889655</u> > Acesso em jul. de 2011.

21 ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology,** v. 3, n. 10, p. 819-823, Oct 2005. ISSN 1740-1526.

22 BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma-cruzi* invasion of mammalian-cells. **Annual Review of Microbiology,** v. 49, p. 175-200, 1995. ISSN 0066-4227.

23 ORGANIZATION, W.-W. H. Report of the expert committee on the control of chagas disease. . Geneva: WHO, 2002. p.85. (Technical Report Series)

24 ANDRADE, S. G. et al. Experimental chemotherapy of Trypanosoma cruzi infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. **Bullettin World Health Organ,** v. 69, n. 2, p. 191–7, 1991. ISSN 0042–9686. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1907221</u> > Acesso em jul. de 2011.

25 SOUZA, W. C., T, M, U. BARRIAS, E, S. "Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction,". **International Journal of Cell Biology,** v. 2010, p. 18, 2010. DOI: <u>10.1155/2010/295394</u>

26 NEVES, D.; MELO, A. L. GENARO, O. LINARDI, P, M. Parasitologia humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

27 REY, L. **Bases da parasitologia humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

28 SILVERSTEIN, S. C.; STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Endocytosis. Annual Review of Biochemistry, v. 46, p. 669–722, 1977. ISSN 0066–4154.

29 SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of Trypanosoma cruzi to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. **Infection and Immunity.**, v. 59, p. 645–654, 1991.

30 BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells. **Annual Review of Microbiology.,** v. 49, p. 175-200, 1995. Disponível em: < <u>http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.001135</u> >. Acesso em jul. de 2011.

31 PROCOPIO, D. O. et al. Trypanosoma cruzi: effect of protein kinase inhibitors and cytoskeletal protein organization and expression on host cell invasion by amastigotes and metacyclic trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 1–13, 1998.

32 EPTING, C. L.; COATES, B. M.; ENGMAN, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by Trypanosoma cruzi. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 283–91, Nov 2010. ISSN 1090–2449. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599990</u> > Acesso em ago. de 2011.

33 NOGUEIRA, N. Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by Trypanosoma cruzi. **Ciba Foundation Symposium,** v. 99, p. 52–73, 1983. ISSN 0300–5208. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6196166 Acesso em ago. de 2011.

34 RUIZ, R. C. et al. Infectivity of Trypanosoma cruzi strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca2+ signalling activity. **Biochemistry Journal**, v. 330, n. 1, p. 505–11, Feb 1998. ISSN 0264–6021. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9461549</u> > Acesso em ago. de 2011.

35 CROSS, G. A.; TAKLE, G. B. The surface trans-sialidase family of Trypanosoma cruzi. **Annual Review of Microbiology,** v. 47, p. 385-411, 1993. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8257103</u> > Acesso em ago. de 2011.

36 MANSO ALVES, M. J. et al. Partial inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology,** v. 21, n. 1, p. 75–82, 1986. ISSN 0166–6851. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685186900812 Acesso em ago. de 2011.

37 ABUIN, G. et al. A surface antigen of Trypanosoma cruzi involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. **Molecular and Biochemical Parasitology,** v. 35, n. 3, p. 229–237, 1989. ISSN 0166–6851. Disponível em: < <u>http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685189902090</u> > Acesso em ago. de 2011.

38 TEIXEIRA, M. M.; YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi identified by monoclonal antibodies. **Molecular and Biochemical Parasitology,** v. 18, n. 3, p. 271–82, Mar 1986. ISSN 0166–6851. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3515178</u> > Acesso em ago. de 2011.

39 CORTEZ, M.; ATAYDE, V.; YOSHIDA, N. Host cell invasion mediated by Trypanosoma cruzi surface molecule gp82 is associated with F-actin disassembly and is inhibited by enteroinvasive Escherichia coli. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 6, p. 1502–1512, 2006. ISSN 1286–4579. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457906000761 Acesso em ago. de 2011.

40 PEREIRA, M. E. et al. Invasive phenotype of Trypanosoma cruzi restricted to a population expressing trans-sialidase. **Infection and Immunity,** v. 64, n. 9, p. 3884–92, Sep 1996. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8751943</u> >. Acesso em ago. de 2011

41 SCHENKMAN, S.; DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of Trypanosoma cruzi trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains. **Experimental Parasitology,** v. 72, n. 1, p. 76–86, 1991. ISSN 0014–4894. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001448949190123E Acesso em ago. de 2011.

42 VILLALTA, F. et al. Molecular analysis of early host cell infection by Trypanosoma cruzi. Frontiers in Bioscience, v. 13, p. 3714–34, 2008. ISSN 1093–4715. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18508467</u> > Acesso em ago. de 2011.

43 ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, M. E. A novel T. cruzi heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. **Cell**, v. 67, n. 2, p. 411–21, Oct 1991. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1655283</u> > Acesso em ago. de 2011.

44 BURLEIGH, B. A. et al. A cytosolic serine endopeptidase from Trypanosoma cruzi is required for the generation of Ca2+ signaling in mammalian cells. Journal Cell Biology, v. 136, n. 3, p. 609–20, Feb 1997. ISSN 0021–9525. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9024691 Acesso em ago. de 2011>

45 BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and Trypanosoma cruzi invasion. **Cell Microbiology,** v. 4, n. 11, p. 701–11, Nov 2002. ISSN 1462–5814. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12427093</u> > Acesso em set. de 2011.

46 SANTANA, J. M. et al. A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **Biochemistry Journal**, v. 325, n. 1, p. 129-37, Jul 1997. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224638</u> > Acesso em ago. de 2011.

47 DA SILVA, C. V. et al. Characterization of a 21 kDa protein from Trypanosoma cruzi associated with mammalian cell invasion. **Microbes and Infection,** v. 11, n. 5, p. 563–570, Apr 2009. ISSN 1286–4579.

48 ANDREWS, N. W. et al. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of Trypanosoma cruzi. **Experimental Parasitology,** v. 64, n. 3, p. 474-84, Dec 1987. ISSN 0014-4894. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3315736</u> >. Acesso em set. de 2011.

49 ANDREWS, N. W. et al Developmentally regulated, phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of Trypanosoma cruzi. **Journal of Experimental Medicine,** v. 167, n. 2, p. 300–14, Feb 1988. ISSN 0022–1007. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3279152</u> > Acesso em set. de 2011..

50 VERBISCK, N. V.; DA-SILVA, S.; MORTARA, R. A. Trypanosoma cruzi: amastigote polymorphism defined by monoclonal antibodies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 12, p. 1583–91, Dec 1998. ISSN 0100–879X. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9951555</u> >. Acesso em set. de 2011.

51 RAMOS-LIGONIO, A. et al. Recombinant SSP4 protein from Trypanosoma cruzi amastigotes regulates nitric oxide production by macrophages. **Parasite Immunology**, v. 26, n. 10, p. 409–18, Oct 2004. ISSN 0141–9838. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15752118</u> >. Acesso em set. de 2011.

52 VIEIRA, M. et al. Cellular signaling during the macrophage invasion byTrypanosoma cruzi. Histochemitry Cell Biology, v. 118, n. 6, p. 491–500, Dec 2002.ISSN0948–6143.Disponívelem:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12483314>. Acesso em set. de 2011.

53 ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by Trypanosoma cruzi of a hemolysin active at low pH. **Molecular and Biochemical Parasitology,** v. 33, n. 3, p. 249–256, 1989. ISSN 0166–6851. Disponível em: < <u>http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685189900868</u> >. Acesso em set. de 2011.

54 HALL, B. F. et al. Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by Trypanosoma cruzi: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **Journal of Experimental Medicine,** v. 176, n. 2, p. 313–25, Aug 1992. ISSN 0022–1007. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1500849</u> >. Acesso em set. de 2011.

55 FERNANDES, A. B. et al. Cell invasion by Trypanosoma cruzi amastigotes of distinct infectivities: studies on signaling pathways. **Parasitology Research**, v. 100, n. 1, p. 59–68, Dec 2006. ISSN 0932–0113. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16791632 Acesso em set. de 2011.

56 FERNANDES, A. B.; MORTARA, R. A. Invasion of MDCK epithelial cells with altered expression of Rho GTPases by Trypanosoma cruzi amastigotes and metacyclic trypomastigotes of strains from the two major phylogenetic lineages. **Microbes and Infection,** v. 6, n. 5, p. 460–467, 2004. ISSN 1286–4579. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457904000644 >. Acesso em set. de 2011.

57 MORTARA, R. A. et al. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by Trypanosoma cruzi infective forms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências,** v. 77, n. 1, p. 77–94, Mar 2005. ISSN 0001–3765. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15692679</u> >. Acesso em set. de 2011.

58 SCHENKMAN, S.; MORTARA, R. Hela cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by Trypanosoma cruzi trypomastigotes. Journal of Cell Science, v. 101, p. 895–905, 1992.

59 MORTARA, R. A. et al. Host cell actin remodeling in response to Trypanosoma cruzi: trypomastigote versus amastigote entry. **Subcellular Biochemistry,** v. 47, p. 101–9, 2008. ISSN 0306–0225. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18512345</u> > Acesso em set. de 2011..

60 RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. Biochemistry Journal, v. 290 (Pt 1), p. 205–18, Feb 1993. ISSN 0264–6021. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8439290</u> >. Acesso em set. de 2011.

61 CHOU, K. C.; CAI, Y. D. Prediction of protease types in a hybridization space.Biochemistry Biophysics Research Communication, v. 339, n. 3, p. 1015–20, Jan2006.ISSN0006–291X.Disponívelhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325146>. Acesso em set. de 2011.

62 HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501–24, Dec 2002. ISSN 0009–2665. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475199 > Acesso em set. de 2011..

63 NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. **Trends Biochemistry Science,** v. 14, n. 7, p. 268–71, Jul 1989. ISSN 0968–0004. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2672446</u> > Acesso em set. de 2011..

64 COOPER, J. B. Aspartic proteinases in disease: a structural perspective. **Current Drug Targets,** v. 3, n. 2, p. 155–73, Apr 2002. ISSN 1389–4501. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11958298</u> > Acesso em set. de 2011..

65 BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **Biological Chemistry,** v. 382, n. 5, p. 727–33, May 2001. ISSN 1431–6730. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11517925</u> >. Acesso em set. de 2011. 66 ANTÃO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiology Biochemistry,** v. 43, n. 7, p. 637–50, Jul 2005. ISSN 0981–9428. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16006138</u> >. Acesso em set. de 2011.

67 RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochemistry Journal,** v. 378, n. 3, p. 705–16, Mar 2004. ISSN 1470–8728. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14705960</u> >. Acesso em set. de 2011.

68 OLIVA, M. L. et al. Leucaena leucocephala serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1477, n. 1–2, p. 64–74, Mar 2000. ISSN 0006–3002. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10708849</u> >. Acesso em set. de 2011.

69 KOIWA, H. et al. Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. **Plant Journal.** v. 14, n. 3, p. 371–9, May 1998. ISSN 0960–7412. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9628031</u> >. Acesso em set. de 2011.

70 BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interactionwith proteinases. European Journal of Biochemistry, v. 204, n. 2, p. 433–51, Mar1992.ISSN0014–2956.Disponívelhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1541261>. Acesso em set. de 2011.

71 LASKOWSKI, M.; QASIM, M. A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1477, n. 1–2, p. 324–37, Mar 2000. ISSN 0006–3002. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10708867</u> >. Acesso em set. de 2011.

72 JOHNSON, K. et al. Activity of secreted Kunitz domain 1 variants of tissue factor pathway inhibitor. **Thrombosis Haemostasis,** v. 80, n. 4, p. 585–7, Oct 1998. ISSN 0340–6245. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9798974</u> >. Acesso em set. de 2011.

73 LAURENTI, O. et al. Effect of aprotinin on insulin sensitivity in non-insulindependent diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 13, n. 7, p. 642–5, Jul 1996. ISSN 0742–3071. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8840098</u> >. Acesso em set. de 2011.

74 ZUBKOVA, S. M. et al. [The function of the kallikrein-kinin system and the activity of proteinase inhibitors during physical loading and infrared laser irradiation]. **Voprosy Kurortologii, Fiziotearapii, i Lechebnoi Fizicheskoi Kultury**, n. 6, p. 9–11, 1995 Nov-Dec 1995. ISSN 0042-8787. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8713297 Acesso em set. de 2011.

75 GREENWOOD, J. Mechanisms of blood-brain barrier breakdown. Neuroradiology, v. 33, n. 2, p. 95-100, 1991. ISSN 0028-3940. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2046916 >. Acesso em set. de 2011.

76 CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-39, Nov 2002. ISSN 0041-0101. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12419503</u> >. Acesso em set. de 2011.

77 BRANDEN, C.-I.; TOOZE, J. Introduction to protein structure. 2 nd. New York: Garland Publishing, 1999. 410

78 LESK, A., M. Introduction to protein Architecture Oxford: Oxford University Press 2001.

79 SANTOS, O., A, F. ALENCASTRO, R, B. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n 2, p. 253-259, 2003..

80 MUNSON, M. et al. What makes a protein a protein? Hydrophobic core designs that specify stability and structural properties. **Protein Science,** v. 5, n. 8, p. 1584–93, Aug 1996. ISSN 0961–8368. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8844848</u> > Acesso em set. de 2011..

81 SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. Journal Molecular Biology, v. 234, n. 3, p. 779-815, Dec 1993. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8254673</u> > Acesso em out. de 2011..

82 JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications Biosciences**, v. 8, n. 3, p. 275–82, Jun 1992. ISSN 0266–7061. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1633570</u> > Acesso em out. de 2011.

83 PEARSON, W. R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. **Methods Enzymology**, v. 183, p. 63–98, 1990. ISSN 0076–6879. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2156132</u> >. Acesso em out. de 2011

84 EISENSTEIN, B. I. The polymerase chain reaction. A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. **The New England Journal of Medicine,** v. 322, n. 3, p. 178-83, Jan 1990. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2403656</u> > Acesso em out. de 2011.

85 LEHNINGER, A., L. NELSON, D, L. COX, M, M. **Princípios de bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 2000. p. 81-107.

86 CAMPBEL, I., D. DWEK, R, A. **Biological Spectroscopy**. California: Benjamin Cummings, 1984. p. 404

87 FASMAN, G., D. Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. New York: Plenum, 1996.

88 SREERAMA, N.; VENYAMINOV, S. Y.; WOODY, R. W. Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. **Protein Science,** v. 8, n. 2, p. 370–80, Feb 1999. ISSN 0961–8368. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10048330</u> > Acesso em out. de 2011.

89 SARTOR, M. Dinamic light scattering., San Diego: University of California. p. 21.

90 BERNE, B., J. AND PECORA, R. Dynamic light scattering with applications to chemistry, biology and physics. New York: Dover publications, 1976. 384p.

91 SHIA, S. et al. Conformational lability in serine protease active sites: structures of hepatocyte growth factor activator (HGFA) Alone and with the Inhibitory Domain from HGFA Inhibitor-1B. Journal of Molecular Biology, v. 346, n. 5, p. 1335-1349, 2005. ISSN 0022-2836. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283604016183 Acesso em nov. de 2011.

92 RITONJA, A. et al. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. FEBS Letters, v. 267, n. 1, p. 13–15, 1990. ISSN 0014–5793. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001457939080275N Acesso em nov. de 2011.

93 SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular Cell Biochemistry,** v. 307, n. 1–2, p. 249–64, Jan 2008. ISSN 0300–8177. Disponível em: < <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17874175</u> > Acesso em nov. de 2011.

94 LIMA, A. P. C.; MOTTRAM, J. C. Trypanosomatid-encoded inhibitors of peptidases: unique structural features and possible roles as virulence factors. **Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 132–138, 2010.

95 CLEMENTE, T. M. et al. A recombinant protein based on Trypanosoma cruzi P21 upregulates unspecific phagocytosis. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN SOCIETY OF PROTOZOOLOGY, 37; ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH IN CHAGAS' DISEASE, 38., 2011. **Anais** ... Foz de Iguaçu, 2011.

96 MORTARA, R. et al. Host Cell Actin Remodeling in Response to Trypanosoma cruzi:Trypomastigote Versus Amastigote Entry. In:BARBARA BURLEIGH & DOMINIQUE SOLTATI-FARVE (Ed.). **Molecular Mechanisms of Parasite Invasion**. Austin, TX: Landes Bioscience, 2008. p.101-109.