

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS

Carolina Marin Rocha Coelho

CARACTERIZAÇÃO DA OLIGOPEPTIDASE B (OPB) DE
Trypanosoma rangeli

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard

Florianópolis

2013.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Marin-Coelho, Carolina

Caracterização da Oligopeptidase B (OpB) de *Trypanosoma rangeli* / Carolina Marin-Coelho ; orientador, Edmundo Carlos Grisard - Florianópolis, SC, 2013.

90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Oligopeptidase B. 3. *Trypanosoma rangeli*. 4. ciclo intracelular. 5. mobilização de Ca²⁺ intracelular. I. Grisard, Edmundo Carlos. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

“Caracterização da Oligopeptidase B (OpB) de *Trypanosoma rangeli*”

por

**Carolina Marin Rocha
Coelho**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 13/PPGBTC/2013) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências- UFSC, composta pelos Professores/Doutores:

Orientador:



Prof(a) Dr(a) Edmundo Carlos Grisard (MIP/CCB/UFSC)
Comissão examinadora



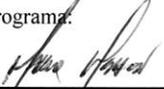
Prof(a) Dr(a) Thais Cristine Marques Sincero (ACL/CCS/UFSC)



Prof(a) Dr(a) Samuel Goldenberg (FioCruz - Paraná)



Prof(a) Dr(a) Oscar Bruna Romero (MIP/CCB/UFSC)
Coordenação do Programa:



Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Florianópolis, 09 de julho de 2013.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar meus agradecimentos demonstrando minha gratidão, através destas palavras, a quem me deu a benção de poder escolher. Um Pai celestial amoroso que tem guiado minhas escolhas e ações. Que me concedeu a vida e a oportunidade de progredir em meio a pessoas maravilhosas.

Agradeço a meus pais Clovis Marin e Elizabet Matos Marin. Agradeço a vocês, pai e mãe, por todo o esforço e sacrifício que sempre fizeram para que suas filhas tivessem a melhor educação e oportunidades. Obrigada pelo amor que posso sentir que têm por mim a cada palavra e gesto e, principalmente, obrigada pelo exemplo que são para mim. Obrigada pai por, através do teu exemplo, ter me ensinado uma das qualidades mais admiráveis em uma pessoa, a honestidade. E, mãe, pelo teu exemplo também pude aprender nosso maior propósito nesta terra, servir com amor. Muito obrigada.

À pessoa que mais precisou ter paciência e ser compreensiva nestes últimos anos. Que nos momentos alegres em que os experimentos deram certo não entendeu nada quando tentei explicar os resultados tão esperados. E, que quando nada estava dando certo, foi paciente e me ofereceu seu amor e apoio. Obrigada, Rodrigo Rocha Coelho, eu o amo muito.

Agradeço também a mais nova integrante da nossa família, Anne. Como alguns têm dito: Meu melhor experimento! O que mais deu certo e que mais alegria trouxe a nossas vidas. Obrigada filha, todos os enjoos, sono, mal estar, dor nas costas valeram a pena e foram esquecidos quando vi aquele rostinho lindo nos meus braços. Obrigada pelos sorrisos e risadas que agora estão dando mais vida ao nosso lar.

Gostaria de expressar meus agradecimentos também às minhas irmãs, Carmem, Ciça e Mari que contribuíram tanto para o que sou hoje. Um pouco mais longe outras um pouco mais perto, mas sempre pude sentir seu amor, carinho e apoio. Vocês são um exemplo para mim de fé, força e perseverança. Amo muito vocês, meus sobrinhos lindos, Amon, Elisa e Henrique e os cunhadinhos também, claro.

Também não poderia deixar de agradecer ao meu cunhado Raphael Rocha Coelho e sua esposa Simony pelo apoio e principalmente pelos conselhos, tanto profissionais quanto pessoais. E por se interessarem em saber o que eu estava fazendo em meu mestrado e tentarem entender o que são as Oligopeptidases. Obrigada titia

Claudinha, por ter cuidado com tanto amor e dedicação da Anne para que eu pudesse voltar ao laboratório e terminar os experimentos que não pude fazer antes do nascimento da nossa princesa.

Obrigada Professor Edmundo, você com certeza foi mais que um orientador nestes anos em que estive no laboratório. Obrigada por ter me dado a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Protozoologia lá em 2006, quando ainda estava terminando a segunda fase da graduação. E, por além de me ensinar, discutir resultados e mandar eu ler mais, reconhecer os bons resultados do nosso trabalho. Obrigada por me ajudar nos momentos difíceis pelos quais passei durante estes anos e, por também podermos compartilhar alegrias. Gostaria de agradecer também ao Professor Mário por toda a ajuda e paciência ao me ensinar. Meus agradecimentos se estendem também aos demais professores do MIP e do programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências.

Gostaria de agradecer a uma pessoa que fez toda a diferença em meu progresso no laboratório, que me ensinou desde o mais básico até o mais sofisticado. Que além de me ensinar com tanta dedicação, respondeu às minhas perguntas com tanta paciência, mesmo quando eu perguntava pela quarta vez a mesma coisa. Obrigada por compartilhar o teu conhecimento comigo e por cuidar de mim quando eu não estava bem. Pati, muito obrigada mesmo por tudo que fez por mim.

Às pessoas que dedicaram seu tempo, atenção e conhecimentos para me ajudar, principalmente no período do mestrado em que estava grávida. Meus sinceros agradecimentos a: Patrícia, Milene, Ingrid, Ibeth, Aline, Débora, Jair, Mariel, Greicy, Ana, Elisa, Ninna, Mayko, Gustavo, Thaynara, Carime, Laís, Glauber e Wagner.

Alguns desses caros amigos merecem um reconhecimento especial: Débora e Pati, obrigada por manterem com tanto zelo e cederem prontamente os parasitos usados neste trabalho. Aos farmacêuticos que tanto me ajudaram com as contas de concentração e número de células, Aline, Débora, Mayko e é claro, também temos biólogos muito bons nisso, obrigada Pati, Elisa, Gustavo. Obrigada Pati, por ter feito as imunizações dos camindongos para mim. Obrigada Glauber, por ter feito toda a parte de espectrometria de massas e ter me ajudado na busca pelos sítio de autoclivagem da proteína. Jair e Ibeth, obrigada por tantas vezes e de tão boa vontade terem sentado comigo para discutirmos nossos resultados, planejarmos e realizarmos novos experimentos.

Muitas pessoas me ajudaram a fazer géis de poliacrilamida enquanto estava grávida e não podia fazê-los, meus agradecimentos a Elisa, Pati, Thaynara, Greicy e um agradecimento especial à Carime, sem dúvida sem a quantidade de géis que você fez este trabalho não teria sido realizado. Obrigada, Débora e Nicole, pela ajuda com a purificação da proteína. Aline, Milene e Maiko, obrigada por terem me ajudado a fazer a análise estatística dos meus dados. Obrigada Aline, por me ajudar nos experimentos de atividade da proteína. Jair e Ibeth, obrigada por me ajudarem com a fábrica de tripos de *T. cruzi* e os ensaios de interação parasito/ célula. Milene, obrigada por me ajudar com as análises de densitometria. Wagner, obrigada pela ajuda com as formatações do Word. Elisa e Aline, obrigada por terem dedicado seu tempo, que sei que é corrido, para corrigirem minha dissertação.

Aos companheiros de RU, Aline, Elisa, Mayko, Gustavo, Paula, Puka, Nicole, Nicoli, Renata, Fernanda e principalmente Greicy, que andava devegarinho ao meu lado no final da gravidez. Obrigada a todos pela agradável companhia durante os almoços, com certeza era um período de descontração que fazia diferença no restante do dia.

Obrigada às amigas Aline, Ibeth e Ingrid que, além de compartilharem momentos tão bons no laboratório também compartilharam comigo de uma alegria indescritível, a de ser mãe.

Minha gratidão se estende a todos que passaram pelo laboratório desde 2006, alguns ainda presentes outros que seguiram outros caminhos, mas que de alguma maneira ao fazerem parte da minha vida, no dia a dia do laboratório, modificaram-na. Obrigada ao pessoal dos laboratórios vizinhos, LVA, LIA, LIDI pela cordialidade e prestatividade.

Gostaria de agradecer aos professores que gentilmente aceitaram o convite para fazerem parte da banca avaliadora deste trabalho. Obrigada Prof^ª. Thais Cristine Marques Sincero, Prof. Oscar Bruna Romero, Prof. Samuel Goldenberg e a Prof^ª. Patrícia Hermes Stoco por disponibilizarem seu tempo e conhecimentos a fim de melhorar minha dissertação.

Obrigada ao CNPq e à FINEP pelo incentivo financeiro.

Meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação.

RESUMO

O *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* é um protozoário hemoflagelado de ciclo heteroxênico. Apesar de não ser patogênico para o hospedeiro mamífero, incluindo seres humanos, infecções por este parasito podem dificultar o diagnóstico da doença de Chagas. Vários aspectos relativos ao curso da infecção do *T. rangeli* no hospedeiro mamífero são controversos, incluindo o mecanismo de invasão e multiplicação celular neste hospedeiro. A enzima Oligopeptidase B (OpB) está fortemente relacionada com o processo de invasão celular e patogenicidade de vários tripanosomatídeos, sendo um alvo promissor para o desenvolvimento de quimioterápicos. A OpB de *T. rangeli* é codificada por uma ORF de 2.139 pb que é traduzida para um polipeptídeo de 713 aminoácidos com 80.2 kDa de massa molecular. A sequência aminoacídica da OpB de *T. rangeli*, que corresponde a família das prolil endopeptidases, apresenta similaridade de 89,9% com *T. cruzi*, 86% com *T. brucei* e 85,5% com *T. evansi*, estando o domínio catalítico característico da família bastante conservado entre estes organismos. A OpB é expressa nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*, sendo sua atividade mensurada através da emissão de fluorescência resultante da mobilização de Ca^{+2} da célula hospedeira em ensaios *in vitro*. Os extratos proteicos das formas tripomastigotas de *T. rangeli* apresentaram uma emissão de fluorescência estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação aos controles. O tratamento dos extratos proteicos com o soro anti-OpB reduziu a emissão da fluorescência de todos os extratos, no entanto, apenas para os extratos das formas tripomastigotas de *T. cruzi* essa redução foi significativa. A OpBr teve uma emissão de fluorescência próxima do basal revelando ausência de atividade da proteína recombinante. A avaliação da expressão da OpB durante a interação parasito/célula hospedeira mostrou um aumento significativo ($p < 0,01$) da expressão da OpB em *T. rangeli* após trinta minutos de interação em relação aos parasitos que não entraram em contato com as células. Estes resultados demonstram o envolvimento da OpB no processo de interação do *T. rangeli* com a célula do hospedeiro mamífero, constituindo um importante alvo de estudo para o esclarecimento do processo de interação parasito/célula.

Palavras-chave: Oligopeptidase B, *Trypanosoma rangeli*, ciclo intracelular, mobilização de Ca^{+2} intracelular.

ABSTRACT

Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli is a flagellate protozoan with heteroxenic life cycle. Although is not pathogenic to the mammalian host, including human beings, this parasite's infections may complicate the diagnosis of Chagas disease. Various aspects relating to the course of infection of *T. rangeli* in the mammalian host are controversial, including the mechanism of invasion and cell multiplication within this host. The Oligopeptidase B (OpB) protein is strongly related to cell invasion and pathogenicity caused by trypanosomatids, being a promising target for the development of chemotherapy. The *T. rangeli* OpB is encoded by an ORF of 2,139 bp which is translated into a polypeptide of 713 amino acids with a molecular weight of 80.2 kDa. The amino acid sequence for the *T. rangeli* OpB, which corresponds to the family of prolyl endopeptidases, shows 89.9% similarity with *T. cruzi*, 86% with *T. brucei* and 85.5%, with *T. evansi*, while the catalytic domain characteristic of the family rather preserved among these organisms. The OpB is expressed in epimastigotes and trypomastigotes of *T. rangeli*, its activity has being measured by fluorescence emission resulting from the mobilization of Ca^{+2} in the host cell *in vitro* assays. The protein extracts of trypomastigotes of *T. rangeli* showed a statistically significant fluorescence ($p < 0.01$) compared to controls. The treatment of the protein extracts with anti-OpB serum reduced fluorescence of all extracts, however, only for the trypomastigotes of *T. cruzi* extracts this reduction was significant. The OpBr had a fluorescence near the revealing the absence of activity of the recombinant protein. The expression of OpB during the parasite/host cell interaction showed a significant increase ($p < 0.01$) in the expression of *T. rangeli* OpB after thirty minutes of interaction when compared to parasites that did not have contact with the cells. These results demonstrate the involvement of OpB in the process of interaction of *T. rangeli* with the host cell, constituting an important target of study to clarify the process of parasite/ cell interaction.

Key words: Oligopeptidase B, *Trypanosoma rangeli*, intracellular cycle, intracellular Ca^{+2} mobilization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Imagens de *Trypanosoma rangeli* em dois diferentes estágios biológicos..... 21
- Figura 2: Mapa das Américas Central e do Sul mostrando a sobreposição geográfica da distribuição da doença de Chagas humana (sombreado) e os registros de ocorrência comprovada do *Trypanosoma rangeli*. 23
- Figura 3: Representação esquemática do ciclo do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro triatomíneos..... 26
- Figura 4: Representação da estrutura terciária das proteínas da família prolil oligopeptidase..... 30
- Figura 5: Representação esquemática da sinalização mediada pela Oligopeptidase B de *T. cruzi* na célula do hospedeiro. ... 33
- Figura 6: Alinhamento múltiplo parcial das sequências aminoacídicas da OpB de tripanosomatídeos..... 53
- Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando a banda de aproximadamente 2.139 pb do gene da OpB de *T. rangeli*. 55
- Figura 8: Expressão heteróloga da OpB na fração insolúvel do extrato bacteriano. 56
- Figura 9: Análise da expressão heteróloga da OpB (~80 kDa) em diferentes temperaturas e tempos de indução..... 57

| | |
|---|----|
| Figura 10: Expressão heteróloga da OpB por diferentes linhagens celulares após 16 horas de indução com 0,5 mM de IPTG. | 58 |
| Figura 11: Gel SDS-PAGE a 10% revelando a ausência da OpBr na fração solúvel do extrato proteico de bactérias <i>ArcticExpress</i> | 59 |
| Figura 12: Expressão heteróloga da OpB utilizando protocolo de solubilização. | 60 |
| Figura 13: Análise da purificação da proteína recombinante através de <i>Western blot</i> Reconhecimento de uma banda entre 37 kDa e 50 kDa pelo anticorpo primário nas eluições. | 61 |
| Figura 14: Mapa dos sítios de clivagem da proteína OpB de <i>T. rangeli</i> pela enzima Prolina-endopeptidase. | 62 |
| Figura 15: Favorecimento da purificação da proteína recombinante de 80 kDa após tratamento da amostra. | 62 |
| Figura 16: Sequência aminoacídica da Oligopeptidase B de <i>T. rangeli</i> obtida por espectrometria de massas (MS). | 63 |
| Figura 17: Reconhecimento da banda de 80 kDa pelo soro murino anti-OpB na OpBr, bem como nos extratos solúveis dos parasitos | 64 |
| Figura 18: Mobilização de Ca ⁺² da célula hospedeira (Vero) pelos extratos solúveis de formas epimastigotas e tripomastigotas de <i>T. rangeli</i> e <i>T. cruzi</i> e ausência de atividade pela OpBr. | 66 |

Figura 19: Aumento na expressão da OpB de *T. rangeli* durante diferentes tempos de interação parasito/ célula hospedeira. ... 67

Figura 20: Aumento na expressão da OpB *T. cruzi* durante diferentes tempos de interação parasito/ célula hospedeira. ... 68

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------------------|--|
| ACN | Acetonitrila |
| AEBSF | Benzenosulfonil-fluorido |
| AF | Ácido Fórmico |
| AM | Acetoximetil |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BLAST | (do ingles <i>Basic Local Aligment Search Tool</i>) |
| [Ca ⁺²] _i | Concentração de cálcio intracelular |
| CDART | (do inglês <i>Conserved Domain Architecture</i>) |
| D/Asp | Aminoácido Aspartato |
| D.O. | Densidade óptica |
| DMEM | (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) |
| dNTP | Desoxiribonucleotídeo trifosfato |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido Etilenodiaminotetracético |
| E-64 | L-trans-epoxisuccinil-leucilamido (4-guanidino) butano |
| GO | (do inglês <i>Gene Ontology</i>) |
| H/His | Aminoácido Histidina |
| IAA | Iodoacetamida |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IP3 | Inositol 3,4,5 trifosfato |
| IPTG | (do inglês <i>Isopropylthio-β-galactoside</i>) |
| KDa | Quilodaltos |
| kDNA | DNA do cinetoplasto |
| LB | Luria Bertani |

| | |
|----------|--|
| LIT | (do inglês <i>Liver Infusion Triptose</i>) |
| M | Molar |
| MS | Espectometria de massas |
| NP40 | Nonidet P40 |
| OpB | Oligopeptidase B |
| OpBr | Oligopeptidase B recombinante |
| ORF | (do inglês <i>Open Reading Frame</i>) |
| pb | Pares de base |
| PBS | (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>) |
| PCR | (do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>) |
| pmol | Picomolar |
| pI | Ponto isoelétrico |
| PLC | Fosfolipase C |
| proPO | Profenoxidase |
| PO | Fenoxidase |
| PVDF | (do inglês Polyvinylidene difluoride) |
| qPCR | PCR quantitativa |
| RIFI | Reação de Imunofluorescência Indireta |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| S/Ser | Aminoácido Serina |
| SBF | Soro Bovino Fetal |
| SDS | (do inglês <i>Sodium Dodecil Sulphate</i>) |
| SDS-PAGE | (do inglês <i>Sodium Dodecil Sulphate – Polyacrilamide Gel electrophoresis</i>) |
| TA | Temperatura ambiente |
| U | Unidade |
| WHO | (do inglês <i>World Heath Organization</i>) |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1 <i>Trypanosoma rangeli</i> | 21 |
| 1.1.1 Aspectos gerais..... | 21 |
| 1.1.2 Ciclo biológico..... | 25 |
| 1.2 Oligopeptidase B..... | 29 |
| 1.2.1 Aspectos gerais..... | 29 |
| 1.2.2 Oligopeptidase B em Tripanosomatídeos..... | 31 |
| 2 OBJETIVO GERAL | 37 |
| 2.1 Objetivos específicos..... | 37 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 39 |
| 3.1 Células | 39 |
| 3.2 Parasitos | 39 |
| 3.2.1 Cultivo das formas epimastigotas | 39 |
| 3.2.2 Obtenção das formas tripomastigotas..... | 39 |
| 3.3 Obtenção do gene da OpB e ligação ao vetor de expressão | 40 |
| 3.3.1 Extração de DNA genômico..... | 40 |
| 3.3.2 Amplificação gênica..... | 40 |
| 3.3.3 Clonagem | 41 |
| 3.3.4 Extração de DNA plasmídial e inserção em vetor de expressão | 42 |
| 3.3.5 Análise das sequências..... | 42 |
| 3.4 Expressão heteróloga da OpB de <i>Trypanosoma rangeli</i> em <i>E.</i> <i>coli</i>..... | 44 |
| 3.5 Purificação da proteína recombinante | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 3.6 Imunização dos camundongos e obtenção do soro policlonal | 46 |
| 3.7 Avaliação do reconhecimento da OpB pelo soro murino anti-OpB através de <i>Western blot</i> | 46 |
| 3.7.1 Extração proteica..... | 46 |
| 3.7.2 <i>Western blot</i> | 47 |
| 3.8 Espetrometria de massas | 47 |
| 3.9 Avaliação da atividade da Oligopeptidase B | 49 |
| 3.10 Ensaio de interação parasito/ célula hospedeira <i>in vitro</i> | 50 |
| 4 RESULTADOS | 53 |
| 4.1 Análise da sequência da OpB de <i>T. rangeli</i> e amplificação do gene | 53 |
| 4.2 Expressão heteróloga e purificação da OpB recombinante (OpBr) | 55 |
| 4.3 Avaliação da atividade da Oligopeptidase B | 64 |
| 4.4 Avaliação da Expressão da OpB durante interação parasito/célula por <i>Western blot</i> | 66 |
| 5 DISCUSSÃO | 69 |
| 6 CONCLUSÕES | 77 |
| 7 PERSPECTIVAS | 79 |
| 8 REFERÊNCIAS | 81 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma rangeli*

1.1.1 Aspectos gerais

O *Trypanosoma rangeli* é um parasito hemoflagelado de ciclo heteroxênico pertencente ao Filo Euglenozoa, Ordem Kinetoplastida, Sub-ordem Trypanosomatina, Família Trypanosomatidae. Este parasito foi originalmente descrito na Venezuela por Enrique Tejera em 1920, que observou formas flageladas do parasito no conteúdo intestinal de *Rhodnius prolixus* naturalmente infectados (D’ALESSANDRO, 1976).

Como organismo da Ordem Kinetoplastida, o *T. rangeli* é caracterizado pela presença de uma grande quantidade de DNA extra nuclear localizado em uma estrutura denominada cinetoplasto. O cinetoplasto corresponde à região de acúmulo de DNA mitocondrial (kDNA) da mitocôndria única destes organismos. Durante os últimos 20 anos, sequências de kDNA têm sido utilizadas para o diagnóstico e caracterização de diversos tripanosomatídeos (VARGAS et al., 2000). Além disso, um dos critérios para se diferenciar as formas biológicas presentes em alguns membros da Família Trypanosomatidae é a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (HOARE; WALLACE, 1966; MASLOW; SIMPSON, 1995).

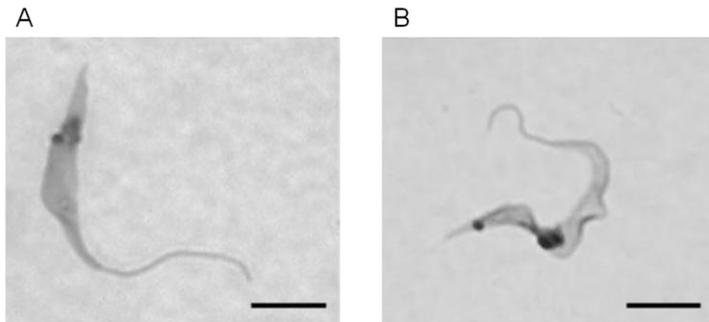


Figura 1: *Trypanosoma rangeli*. A, formas epimastigotas, proliferativas, encontradas no triatomíneo e, B, formas tripomastigotas, infectantes, encontradas no triatomíneo e no mamífero. As barras representam 5 μm (PRESTES, 2013).

O *T. rangeli* apresenta três formas morfológicas predominantes (Figura 1), (1) as epimastigotas, presentes principalmente no intestino, hemolinfa, onde ocorre a multiplicação destas formas biológicas, e fezes dos triatomíneos, caracteristicamente finos que podem atingir de 15 a 56 µm de comprimento; (2) as tripomastigotas metacíclicas, encontradas na glândula salivar do triatomíneo, sendo esta a forma infectante do parasito (CUBA CUBA, 1998) e (3) as tripomastigotas sanguíneas, presentes no hospedeiro mamífero, com 26 a 34 µm de comprimento, incluindo o flagelo. As formas tripomastigotas possuem um cinetoplasto subterminal pequeno e redondo, e seu núcleo encontra-se localizado aproximadamente no meio do corpo, sendo a membrana ondulante bastante desenvolvida. Formas similares a amastigotas, esferomastigotas e tripomastigotas podem ser encontradas desenvolvendo-se no intestino dos insetos infectados (VALLEJO et al., 1988).

Desde 1942, quando De Leon detectou o *T. rangeli* em sangue de seres humanos, infecções por este parasito foram descritas em várias espécies de triatomíneos e mamíferos, nas Américas Central e do Sul. Os reservatórios e vetores do *T. rangeli* são compartilhados com o *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas ou Tripanosomíase Americana. Este parasito constitui um importante problema de saúde em suas regiões de ocorrência, onde cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas com *T. cruzi* e aproximadamente 25 milhões vivem em áreas de risco de infecção (WHO, 2012).

Além disso, estes dois parasitos apresentam sobreposição geográfica, sendo encontrados desde a Guatemala até o Brasil (Figura 2). A coexistência destes dois parasitos tem implicações epidemiológicas que residem na ocorrência de infecções únicas ou mistas, tanto nos hospedeiros invertebrados como nos hospedeiros mamíferos (GRISARD et al., 1999; GRISARD; STEINDEL, 2005).

Embora não seja considerado patogênico para o homem, o *T. rangeli* possui uma alta reatividade sorológica cruzada com o *T. cruzi*. Estudos comprovam o compartilhamento de antígenos entre estes dois parasitos (ANTHONY et al., 1979; MORAES et al., 2008), sendo que suas formas epimastigotas compartilham cerca de 60% da sua constituição antigênica solúvel (AFCHAIN et al., 1979). Desta maneira, uma infecção com *T. rangeli* pode gerar uma resposta humoral com elevados títulos de anticorpos, podendo levar a diagnósticos falso-positivos da doença de Chagas, principalmente em sua fase crônica (GRISARD et al., 1999; MORAES et al., 2008) e, conseqüentemente, a tratamentos e inferências epidemiológicas inapropriados. Todos estes fatores acusam a importância médica e epidemiológica de se aprofundar

os estudos sobre o *T. rangeli*, correlacionando-os aos estudos do *T. cruzi* e da doença de Chagas.



Figura 2: Mapa das Américas Central e do Sul, mostrando a sobreposição geográfica da distribuição da doença de Chagas humana (sombreado) e os registros de ocorrência comprovada do *Trypanosoma rangeli* em humanos, triatomíneos ou animais silvestres (•). (Fonte: GRISARD; STEINDEL, 2005).

Neste contexto, vários pesquisadores têm direcionado seus estudos para o desenvolvimento de um modelo de vacina para a doença de Chagas utilizando tanto formas vivas quanto fixadas de *T. rangeli*. Basso e colaboradores (1991) mostraram que camundongos imunizados com formas epimastigotas fixadas de *T. rangeli* tiveram uma redução nos níveis de parasitemia e mortalidade quando comparados com a população infectada que não foi previamente vacinada.

Outras duas cepas de *T. rangeli*, a cepa brasileira SC-58 e a cepa colombiana Choachí, também mostraram-se eficientes na redução

da parasitemia, no aumento da sobrevivência e na ausência de ninhos de amastigotas nos tecidos na fase aguda, bem como na ausência de lesões histopatológicas na fase crônica de camundongos imunizados e posteriormente submetidos a infecção com uma cepa virulenta de *T. cruzi* (BASSO et al., 2008). Resultados semelhantes foram observados em desafios realizados com cães, os quais desempenham um importante papel no ciclo doméstico do *T. cruzi* (BASSO et al., 2007).

Além disso, ao avaliar o padrão de imunoglobulinas específicas no peritônio e soro de camundongos imunizados com *T. rangeli*, antes e depois de serem desafiados com *T. cruzi*, observou-se que a vacinação com *T. rangeli* desencadeia uma alta produção de isotipos específicos de IgG e modula os níveis de IL-6 no peritônio nos períodos iniciais da infecção (MARINI et al., 2011). No entanto, ainda não se tem conhecimento a respeito de possíveis alterações no curso da infecção do *T. cruzi* pela administração de *T. rangeli*. Desta maneira, a identificação dos antígenos que possivelmente causam proteção pode ser útil, a fim de utilizar moléculas purificadas e/ou sintetizadas de *T. rangeli* nos modelos de proteção. Além da necessidade de se esclarecer melhor os mecanismos primários envolvidos na proteção a infecções causadas pelo *T. cruzi*.

São emergentes estudos envolvendo proteínas e enzimas relacionadas ao ciclo biológico do parasito, principalmente no hospedeiro mamífero, tanto de *T. cruzi* (DUSCHAK; COUTO, 2007; BASTOS et al., 2013) quanto de *T. rangeli* (PRESTES et al., 2012; WAGNER et al., 2013). O estudo correlacionado destas moléculas pode contribuir para um melhor esclarecimento do curso de infecção destes dois parasitos, além de revelar novos alvos para o desenvolvimento de fármacos e quimioterápicos direcionados ao tratamento de doenças causadas por tripanosomatídeos (BASTOS et al., 2013).

1.1.2 Ciclo biológico

A co-evolução de parasitos e insetos promoveu o desenvolvimento de estratégias sofisticadas baseadas em mecanismos fisiológicos e bioquímicos tanto do vetor quanto do parasito. Tais estratégias podem facilitar ou não o desenvolvimento do parasito no hospedeiro. O impasse concernente à interação do *T. rangeli* e, também do *T. cruzi*, com o hospedeiro invertebrado resulta da complexidade da interação e forma de transmissão destes parasitos (GARCIA; AZAMBUJA, 1991; KOLLIEN; SCHAUB, 2000; AZAMBUJA et al., 2005).

O ciclo biológico do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado é relativamente bem conhecido (Figura 3), sendo o inseto triatomíneo infectado pelo parasito (forma tripomastigota sanguínea) após sua ingestão durante a hematofagia. No trato intestinal do triatomíneo, os parasitos diferenciam-se em epimastigotas que, alguns dias após a infecção, aderem-se ao epitélio do intestino médio e o atravessam, alcançando a hemocele. Na hemolinfa, as formas epimastigotas multiplicam-se livremente e, então, migram para a glândula salivar do inseto, invadindo-a e diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos, num processo denominado metaciclogênese. Essas formas do parasito são infectantes e, através da via inoculativa, são transmitidas ao hospedeiro mamífero. É possível ainda, segundo estudos em laboratório, infectar camundongos com as fezes do triatomíneo, nas quais podem ser encontradas formas tripomastigotas do parasito, demonstrando, assim, a possibilidade de diferenciação destes na ampola retal do hospedeiro primário (GRISARD; STEINDEL, 2005).

O *T. rangeli* possui uma grande variedade de hospedeiros triatomíneos, no entanto normalmente infecta espécies de triatomíneo pertencentes ao gênero *Rhodnius*. Apesar de haver uma grande relação entre cada espécie do inseto com as cepas do parasito que ocorrem na mesma região geográfica, a suscetibilidade e o nível de infecção varia conforme a espécie do triatomíneo e a cepa do parasito (GUHL; VALLEJO, 2003; BARRETO-SANTANA et al., 2011).

Aspectos relacionados ao processo de invasão e metaciclogênese do parasito na glândula salivar do triatomíneo, bem como as alterações fisiológicas e comportamentais que a presença deste parasito pode causar no hospedeiro invertebrado ainda não foram totalmente esclarecidas. No entanto, alguns estudos mostram que este

parasito é patogênico para o hospedeiro invertebrado (D'ALESSANDRO; SARAIVA, 1992; FERREIRA et al., 2010).

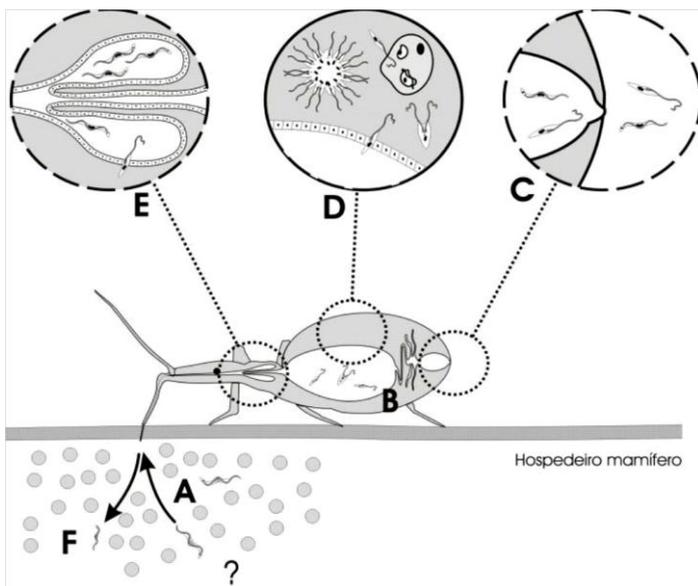


Figura 3: Representação esquemática do ciclo do *Trypanosoma rangeli* no hospedeiro invertebrado. A – Ingestão das formas tripomastigotas durante o repasto sanguíneo do triatomíneo; B – Formas epimastigotas no trato intestinal do triatomíneo; C – Parasitos alcançam a ampola retal; alguns se diferenciam em tripomastigotas e podem ser excretados junto a fezes e urina; D – Adesão de epimastigotas ao epitélio intestinal e migração para a hemocele, onde se multiplicam; E – Invasão das glândulas salivares e diferenciação para formas infectivas (tripomastigotas metacíclicos), as quais são inoculadas com a saliva (F) durante o repasto sanguíneo (Fonte: GRISARD; STEINDEL, 2005).

Os triatomíneos apresentam componentes de ação anti-hemostática na saliva. Esta ação permite uma alimentação mais rápida, à medida que facilita a localização dos vasos sanguíneos e permite uma sucção mais eficaz do sangue (GARCIA et al., 1994). Uma vez infectado com o *T. rangeli*, o triatomíneo necessita de um tempo na busca por vasos sanguíneos e, além disso, a infecção das glândulas salivares afeta diretamente o comportamento de alimentação de *R. prolixus*, aumentando o número de picadas em coelhos e reduzindo a

sua habilidade de sugar o sangue (AÑEZ; EAST, 1984; GARCIA et al., 2012).

Esta alteração comportamental aumenta a eficiência de transmissão do parasito para o hospedeiro mamífero, estando relacionada à patologia que o *T. rangeli* causa na glândula salivar dos insetos infectados, os quais têm a produção de saliva drasticamente reduzida e composição alterada (PAIM et al., 2012). As lesões nas glândulas salivares (HECKER et al., 1990) causam deficiência na biossíntese de componetes salivares, prejudicando a expressão completa da maquinaria anti-hemostática nos triatomíneos infectados (GARCIA et al., 1994, 2012). De maneira geral, infecções pelo *T. rangeli* na hemolinfa de *R. prolixus* levam a um atraso na muda destes, alteram o comportamento dos insetos e aumentam sua mortalidade (D'ALESSANDRO; SARAVIA, 1992; SCHAUB, 1992; 1994).

A transmissão do *T. rangeli* para o hospedeiro mamífero ocorre preferencialmente pela via inoculativa, através da picada de triatomíneos infectados durante a hematofagia (GRISARD; STEINDEL, 2005). O *T. rangeli* apresenta uma extensa variedade de reservatórios mamíferos das Ordens Xenarthra, Marsupialia, Carnivora, Rodentia e Primates (D'ALESSANDRO, 1976), para os quais não é considerado patogênico.

Infecções por *T. rangeli* em humanos foram diagnosticadas em diversos países da América Latina, incluindo o Brasil (COURA et al., 1996). Embora vários estudos busquem elucidar o curso de infecção no hospedeiro mamífero, a interação do parasito com a célula e a multiplicação nesse hospedeiro são questões que continuam controversas. Urdaneta-Morales e Tejero (1985) sugerem que a idade do hospedeiro e o tempo em que os parasitos estão em cultura sejam fatores que influenciam os níveis de parasitemia observados, os quais descreveram parasitemias sete vezes maiores do que o inóculo aplicado inicialmente em ratos, sugerindo uma provável multiplicação do parasito nestes hospedeiros.

No entanto, este parasito geralmente determina parasitemias sanguíneas baixas e de curta duração (D'ALESSANDRO et al., 1999, EGER-MANGRICH et al., 2001). Apesar das dúvidas com relação à multiplicação intracelular do *T. rangeli*, Grisard e colaboradores (1999) demonstraram a presença de formas intracelulares do parasito em ensaios de infecção celular *in vitro* utilizando células VERO, L-929, J-774-13 (promonócitos murinos) e macrófagos peritoneais, o que evidencia uma real interação do parasito com a célula, com possibilidade de invasão celular.

Interações de culturas de parasitos das cepas SC-58 (clone B1), Macías e Choachí com macrófagos murinos revelaram taxas de infecção entre $10,5 \pm 2,6\%$ e $14,4 \pm 1,4\%$ após 1 hora de interação. No entanto, independentemente da cepa de *T. rangeli*, a percentagem de células infectadas decresceu significativamente após 3 horas de interação, sendo que após 48 horas grandes vacúolos eram observados sem a presença de parasitas intracelulares (EGER-MANGRICH et al., 2001). Apesar de os dados a respeito da interação celular e da multiplicação do *T. rangeli* no seu hospedeiro mamífero ainda serem escassos e controversos, a interação deste parasito com a célula ocorre e é, possivelmente, mediada por várias moléculas.

Estas moléculas podem atuar como âncoras de adesão à superfície, permitindo a entrada do parasito na célula, a evasão do sistema imune ou participar de eventos de sinalização bidirecional entre o parasito e a célula hospedeira. Algumas destas moléculas que possuem um amplo papel na patogenicidade das doenças, as proteases, além de estarem envolvidas no processo de invasão e migração dos parasitos através das barreiras teciduais, participam da degradação de hemoglobina e outras proteínas sanguíneas, bem como na ativação de processos inflamatórios (CAZZULO, 2002; DUSCHAK; COUTO, 2007).

As várias funções associadas a estas enzimas proteolíticas tornam-as atrativas como potenciais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos e agentes quimioterápicos para o tratamento de doenças (BASTOS et al., 2013). Neste contexto, a Oligopeptidase B tem mostrado ser de grande importância na interação de protozoários com as células do hospedeiro, podendo ser considerada um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos.

1.2 Oligopeptidase B

1.2.1 Aspectos gerais

A Oligopeptidase B (OpB) é uma proteína citosólica, pertencente à família prolil oligopeptidase das serina proteases (Clã SC, família S9) (BARRETT; RAWLINGS, 1995, RAWLINGS et al., 2006). Esta proteína, inicialmente denominada protease II, foi clonada e caracterizada pela primeira vez em *Escherichia coli* (PACAUD; RICHARD, 1975), sendo descrita posteriormente em outros procariotos e organismos eucariotos unicelulares, incluindo tripanosomatídeos (MORTY et al., 2001), e em plantas superiores (TSULI et al., 2004). Análises *in silico* sugerem que a OpB não está presente no genoma de mamíferos.

A família S9A possui dois membros bem definidos, prolil oligopeptidase (POP) e Oligopeptidase B (OpB), além de um terceiro membro emergente, a proteína prolil endopeptidase-like A (PREPL A) (REA et al., 2006; SZELTNER et al., 2005). Enquanto as POP catalisam a hidrólise de ligações peptídicas na região carboxi-terminal de resíduos de prolina em peptídeos, as OpB clivam peptídeos exclusivamente na região carboxil de resíduos básicos, com preferência para resíduos de arginina sobre lisina e uma preferência ainda maior para clivagens depois de pares de resíduos básicos (REA et al., 2006; COETZER et al., 2008).

Os membros desta família apresentam estruturalmente dois domínios característicos: uma β -hélice na região *N*-terminal, que exclui proteínas da ação da enzima evitando sua proteólise (PÓLGAR, 1997) e um domínio catalítico na região *C*-terminal, formado pela sequência de aminoácidos D-x(3)-A-x(3)-[LIVMFYW]-x(14)-G-x-S-x-G-G-[LIVMFYW], onde o resíduo de serina (S) é o sítio catalítico e x representa resíduos não conservados. Esta serina, faz parte da tríade catalítica (Ser, His, Asp) e está geralmente localizada a uma distância de 150 resíduos da extremidade *C*-terminal da enzima. Todas as enzimas da família das prolil oligopeptidases contêm cerca de 700 a 800 aminoácidos.

As enzimas da família prolil oligopeptidase apresentam especificidade para diferentes substratos (SZELTNER et al., 2002), no entanto, nem todas reconhecem e clivam próximo a resíduos de prolina, como era de se esperar devido ao nome da família. As oligopeptidases catalizam a hidrólise de oligopeptídeos exclusivamente na porção

carboxil de resíduos de lisina e arginina, havendo uma preferência por clivagens após pares de resíduos básicos, o que representa um marco no processamento de enzimas em organismos eucariotos (PÓLGAR, 1997).

Uma das principais características estruturais desta enzima é a maneira como os peptídeos a serem clivados são selecionados e como, ao mesmo tempo, peptídeos maiores e proteínas são protegidos da proteólise no citosol. O sítio ativo está inserido em uma grande cavidade na interface da α/β -hidrolase e dos domínios β -hélice, coberto pelo túnel central da β -hélice. Essencialmente, o domínio β -hélice fica no topo do domínio α/β -hidrolase, impedindo o acesso de grandes peptídeos e proteínas ao sítio ativo da enzima. A cavidade é grande o suficiente para acomodar os peptídeos mais de 30 resíduos, no entanto, estes são susceptíveis de possuir elementos estruturais secundários estáveis que impedem a passagem para a cavidade da enzima (FÜLÖP et al., 2011).

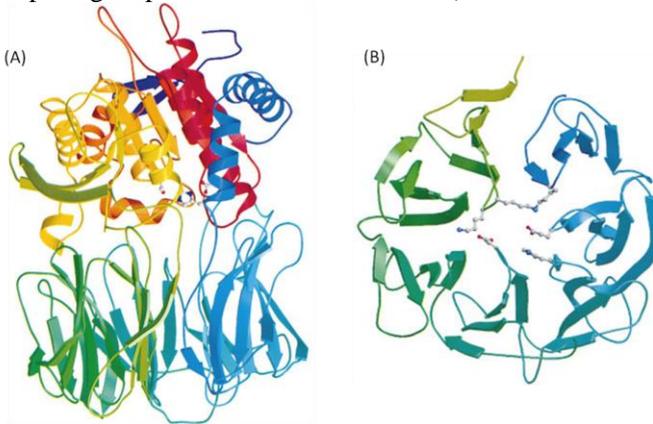


Figura 4: Representação da estrutura terciária das proteínas da família protil oligopeptidase. (A) Estrutura completa da proteína, a coloração do diagrama de fitas varia no espectro visível do azul para o vermelho a partir da região N-terminal seguindo para a região C-terminal. O sítio catalítico está representado em modelo bola-e-vara. (B) Visão perpendicular do domínio β -hélice. As folhas β das sete lâminas estão unidas em sucessão ($\beta 1 / 1$ a $\beta 7 / 4$) em torno do eixo central. O sulco de ligação não é fechado e há somente interações hidrofóbicas entre a primeira (azul) e a última (verde) lâmina. Os resíduos (Lys82, Glu134, His180, Asp242, Lys389 e Lys390) estreitando a entrada do túnel da hélice estão representados em modelo bola-e-vara (Fonte: adaptado de FÜLÖP et al., 1998).

O domínio catalítico C-terminal é covalentemente ligado a uma hélice incomum de sete lâminas. Este domínio consiste de uma cadeia de quatro folhas β antiparalelas repetidas sete vezes (Figura 4). Ao

contrário de outras β -hélices que provêm meios de fechar o sulco de ligação, este não é fechado entre a primeira e a última lâmina das proli oligopeptidases. Esta característica permite uma abertura parcial da hélice e provê o acesso ao sítio ativo através do túnel central formado. Interações hidrofóbicas são as principais responsáveis por promover a estabilidade da estrutura. Os substratos são, então, selecionados por exclusão de tamanho da hélice e especificidade do sítio ativo (FÜLÖP et al., 1998, 2011). Isto proporciona uma explicação para a atividade da oligopeptidase, em que pequenos peptídeos de até 30 resíduos podem acessar o sítio ativo enquanto proteínas e peptídeos maiores são excluídos (REA et al., 2006).

Devido a sua importante participação no processamento de peptídeos fisiologicamente relevantes e na invasão de células hospedeiras, esta peptidase tem atraído a atenção de pesquisadores como alvo de fármacos para distúrbios neurológicos e, também, tripanosomíases como a doença de Chagas, Leishmaniose e Tripanosomíase Africana (MENTLEIN, 1988, TROEBERG et al., 1996; BURLEIGH; ANDREWS, 1998; MORTY et al. 2001, SWENERTON et al., 2011).

1.2.2 Oligopeptidase B em Tripanosomatídeos

A invasão de células não-fagocíticas pelo *T. cruzi* ocorre através da indução da liberação de cálcio de reservatórios presentes na célula hospedeira (BURLEIGH et al., 1997). Este aumento na concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$) é necessário para que ocorra o recrutamento de lisossomos, os quais, juntamente com a membrana plasmática, irão fornecer os componentes membranares necessários para a formação do vacúolo parasitóforo, permitindo a entrada e permanência do parasito na célula (TARDIEUX et al., 1994; RODRÍGUEZ et al., 1995, 1997). As formas tripomastigotas de *T. cruzi* são capazes de promover o aumento da $[Ca^{+2}]_i$ em várias células de mamíferos, o que não é observado para as formas epimastigotas (não infectantes) deste parasito (TARDIEUX et al., 1994; BURLEIGH; ANDREWS, 1995).

O tamponamento do Ca^{+2} citosólico de células hospedeiras com MAPTA (TARDIEUX et al., 1994) ou a depleção dos estoques de Ca^{+2} intracelular com tapsigargina (RODRÍGUEZ et al., 1995) inibem significativamente a invasão do *T. cruzi* em células de mamíferos. Além disso, um rearranjo dos filamentos de actina de fibroblastos normais da

linhagem NRK é observado quando há mobilização de Ca^{+2} intracelular mediada pelo *T. cruzi* (RODRÍGUEZ et al., 1995), reforçando o papel deste importante evento em facilitar o acesso de lisossomos ao sítio de adesão do parasito à membrana plasmática. No entanto, enquanto alguns estudos apontam para um aumento na invasão celular em decorrência da desestabilização dos filamentos de actina (RODRÍGUEZ et al., 1995), outros indicam que tal desestabilização aumenta a adesão dos parasitos à célula, mas não a entrada de formas tripomastigotas de *T. cruzi* de cultura em diferentes linhagens celulares, incluindo células do músculo cardíaco (ROSESTOLATO et al., 2002).

Apesar de estar presente em todos os estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* (BURLEIGH et al., 1997), a OpB tem uma função crucial nas formas tripomastigotas deste parasito por estar envolvida no processo de invasão celular. Isto foi confirmado através da deleção do gene da OpB *T. cruzi*, que resulta na diminuição da capacidade destes parasitos de sinalizar a mobilização de Ca^{+2} , diminuindo sua capacidade de infectar camundongos e culturas de células de mamíferos (CALER et al., 1998).

O mecanismo de ação da OpB de *T. cruzi* ocorre de forma indireta, iniciando com a clivagem pela OpB de um precursor inativo para gerar um agonista de Ca^{2+} ativo (Figura 5). Este agonista é liberado pelo parasito e liga-se ao receptor acoplado à proteína G na superfície da célula hospedeira. Isto estimula a fosfolipase C (PLC) a produzir inositol 3,4,5 trifosfato (IP3), que se liga ao seu receptor e promove a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares como, por exemplo, do retículo endoplasmático (BURLEIGH; WOOLSEY, 2002).

Como consequência da liberação de Ca^{2+} , há o recrutamento de lisossomos da célula, em direção ao sítio de entrada do parasito, que irão se fundir à membrana plasmática e formar o vacúolo parasitóforo, um passo essencial para a sobrevivência do *T. cruzi* na célula do hospedeiro (LEY et al., 1990) e, também, para sua diferenciação em formas amastigotas (forma replicativa) que tem início no interior do vacúolo formado, estimulada pelo baixo pH desta organela (TOMLINSON et al., 1995).

Estudos recentes, utilizando cromatografia por exclusão de tamanho e ultracentrifugação analítica, demonstraram que a OpB de *T. cruzi* é um dímero em solução, uma associação resistente a alterações de salinidade e pH e independente de pontes dissulfeto intramoleculares. Considerando que o *T. cruzi* circula por mais de 150 espécies na natureza e milhões de diferentes células e tecidos, este parasito certamente enfrenta várias barreiras físicas e químicas. Este cenário

de tripanosomíases em animais, com importantes implicações veterinárias e econômicas.

Alterações no ritmo endócrino (BRANDENBERGER et al., 1996) e clivagens incomuns de peptídeos no sangue de ratos infectados com *T. brucei* (TETAERT et al., 1993) reforçam o importante papel da OpB em desestabilizar o metabolismo hormonal do hospedeiro durante infecções por este tripanosomatídeo. Além disso, os fármacos mais comumente utilizados no tratamento da Tripanosomíase Africana, pentamidina, diminazeno e suramina agem de modo a diminuir a atividade desta serina oligopeptidase (MORTY et al., 1998). Pentamidina e diminazeno possuem motivos arginina-like, que mimetizam substratos da OpB, enquanto a sumarina inibe uma variedade de serina peptidases. Dois grupos de inibidores de serina peptidases, peptidil clorometil cetonas e peptidil fosfato difenil, possuem atividade contra OpB de *T. brucei* e o aumento na sobrevivência de ratos infectados com *T. brucei* possivelmente é devido à ação de um destes dois componentes sobre a atividade da OpB (MORTY et al., 2000).

A OpB foi descrita em várias espécies do gênero *Leishmania* (MORTY, et al., 1999; IVENS et al., 2005; GUEDES et al., 2007; PEACOCK et al., 2007). A detecção da atividade da OpB no sobrenadante do meio de cultura demonstra que esta proteína é excretada por promastigotas de *L. donovani* (SILVERMAN et al., 2008). Além disso, a OpB é regulada positivamente em amastigotas de *L. braziliensis* e *L. donovani* quando comparada com formas promastigotas (GAMBOA et al., 2007; ROSNZWEIZ et al., 2008), enquanto há níveis de expressão similares em todas as formas biológicas de *L. major* e *L. mexicana* (HOLZER et al., 2006; GUEDES et al., 2007).

Estudos recentes em diferentes espécies do gênero *Leishmania* demonstram que, nestes organismos, a OpB é uma protease de alta atividade com substrato específico único quando comparado com outros tripanosomatídeos. A OpB é responsável por regular os níveis de enolase na superfície celular destes parasitos, a qual contribui para a virulência de vários agentes infecciosos. Sua conexão com a OpB sugere que este seja um ponto chave também para outros tripanosomatídeos (SWENERTON et al., 2011). Desde sua caracterização inicial até a análise por cristalografia desta proteína (MCLUSKEY et al., 2010), importantes dados sobre suas propriedades enzimáticas foram descritas, reforçando a importância da OpB como alvo para o desenvolvimento de novos tratamentos para doenças causadas por tripanosomatídeos.

Considerando a importância da OpB nas doenças determinadas por tripanosomatídeos, principalmente para a doença de Chagas, o papel crucial na sobrevivência e multiplicação do *T. cruzi* na célula hospedeira e a falta de conhecimento sobre a interação do *T. rangeli* com células do hospedeiro, o presente trabalho busca caracterizar a OpB de *T. rangeli*, através da análise de seus níveis de expressão e atividade. Em última análise, o estudo visa contribuir para a elucidação de questões fundamentais que diferenciam *T. cruzi* de *T. rangeli*, como a capacidade de invasão celular mediada pela mobilização de Ca^{+2} e formação de um vacúolo parasitóforo, bem como a presença ou não de um ciclo intracelular.

2 OBJETIVO GERAL

Caracterizar molecular e bioquimicamente a Oligopeptidase B (OpB) de *Trypanosoma rangeli* como possível proteína envolvida no processo de invasão celular.

2.1 Objetivos específicos

- Analisar comparativamente a sequência do gene da Oligopeptidase B de *T. rangeli* com organismos filogeneticamente relacionados;
- Avaliar os níveis de expressão da proteína Oligopeptidase B de *T. rangeli* nos diferentes estágios do ciclo celular deste parasito;
- Avaliar os níveis de expressão da Oligopeptidase B de *T. rangeli* durante a interação do parasito com a célula hospedeira;
- Correlacionar os níveis de expressão da proteína e a atividade da Oligopeptidase B de *T. rangeli* no processo de interação parasito/células *in vitro*;
- Avaliar a importância da Oligopeptidase B no processo de invasão celular pelo *T. rangeli*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Células

A fim de obter formas tripomastigotas de *T. cruzi*, realizar os ensaios de atividade da proteína OpB e, também, avaliar a interação entre os parasitos e as células hospedeiras, a linhagem celular Vero foi utilizada. Estas células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) pH 7,4 suplementado com 5% de Soro Bovino Fetal (SBF), 10 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de estreptomicina, a 37°C e 5% de CO₂, em garrafas de 25cm². Sua manutenção ocorreu através de passagens semanais ou quando atingiram confluência. Para isto as células foram descoladas das garrafas pela adição de tripsina 0,05% durante 5 minutos a 37°C. A ação da tripsina foi interrompida pela adição de meio DMEM pH 7,4 suplementado com 5% de SBF.

3.2 Parasitos

3.2.1 Cultivo das formas epimastigotas

O cultivo das formas epimastigotas da cepa Choachí de *T. rangeli* e da cepa Y de *T. cruzi* utilizadas no trabalho foi realizado através de passagens semanais dos parasitos em meio LIT (*Liver Infusion Triptose*) suplementado com 10% de SBF, 10 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de estreptomicina, a 27°C.

3.2.2 Obtenção das formas tripomastigotas

As formas tripomastigotas de *T. rangeli* foram obtidas aproximadamente no 7º dia de cultivo de formas epimastigotas em DMEM pH 8,0, conforme descrito por Koerich e colaboradores (2002) com pequenas modificações. Em suma, formas epimastigotas foram cultivadas em meio LIT até atingir a fase exponencial de crescimento. Para a diferenciação, 12 x 10⁷ epimastigotas foram lavados duas vezes com PBS (tampão salina fosfato) pH 7,4 e transferidos para garrafas de cultura celular de 25cm² sem aeração, contendo 15 ml de meio DMEM pH 8,0 (Sigma-Aldrich®) suplementado com 5% de SBF, 1 g/l de

glicose e 6 mM de L-glutamina. As culturas foram mantidas a 27°C por cerca de sete dias e a porcentagem de tripomastigotas foi avaliada através de contagem e análise morfológica de 100 parasitos em lâmina corada com Giemsa (Merck). A coleta dos parasitos por centrifugação ocorreu quando foram obtidas taxas iguais ou maiores que 85% de tripomastigotas.

Para obtenção de tripomastigotas de cultura de *T. cruzi*, monocamadas de células Vero foram infectadas com a cepa Y e as formas tripomastigotas foram obtidas do sobrenadante das culturas após o quinto dia de infecção (EGER-MANGRICH et al., 2001) e lavadas com PBS antes dos ensaios experimentais.

3.3 Obtenção do gene da OpB e ligação ao vetor de expressão

3.3.1 Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA genômico, culturas em fase exponencial de crescimento das cepas de *T. rangeli* e *T. cruzi* utilizadas foram lavadas duas vezes com PBS e tratadas com tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8,0, 1% SDS), acrescido de proteinase K (100 µg/ml), por 12 horas a 42°C. As etapas subsequentes foram realizadas através do método de fenol-clorofórmio, conforme protocolo padrão (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). O DNA obtido foi dosado e avaliado quanto a sua pureza em espectrofotômetro (Eppendorf *BioPhotometer*®), observando-se a absorbância a 260 nm e a 280 nm, além das relações 260/280 e 260/230. As amostras extraídas foram também visualizadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (1 µg/ml), sendo os resultados digitalmente registrados.

3.3.2 Amplificação gênica

A amplificação do gene da Oligopeptidase B de *T. rangeli* foi realizada através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) tendo o DNA genômico extraído como molde. O desenho dos iniciadores utilizados para a amplificação teve como molde a ORF completa da OpB de *T. rangeli* obtida pelo nosso grupo de pesquisa (GRISARD et al., 2010). Os iniciadores foram desenhados através do programa *Primer Select* do pacote DNASTAR® (Lasergene), de maneira a serem posteriormente inseridos na fase correta de leitura no vetor de expressão,

uma vez que sítios de clivagem de enzimas de restrição foram adicionados: OBTr-F-*Xho* I (5' – **CTC GAG** GCC GCG GTG TTG ATG GA - 3') e OBTr-R-*Bam*H I (5' – **GGA TCC** GTC TGC GGC ATC ACC ATC - 3'). Os códons destacados em negrito em cada um dos iniciadores referem-se aos sítios de clivagem das enzimas *Xho* I e *Bam*HI, respectivamente.

A reação ocorreu na presença de 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase em seu tampão apropriado (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 2 mM de dNTP (Invitrogen), 10 pmol de cada iniciador e 30 ng de DNA genômico de cada parasito utilizado. Como controle negativo, foi utilizada uma reação contendo todos os reagentes necessários à amplificação, à exceção do DNA molde. A amplificação foi realizada em um termociclador *Mastercycler® Gradient* (Eppendorf), iniciando com uma etapa de desnaturação a 95°C por cinco minutos, seguida por 30 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (95°C por 15 segundos), uma etapa de ligação dos iniciadores (68°C por 30 segundos) e uma etapa de elongação do DNA pela polimerase (72°C por 30 segundos). Ao término destes ciclos, as amostras foram submetidas a uma extensão final da cadeia de DNA a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação da PCR foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, e os resultados registrados digitalmente.

3.3.3 Clonagem

Os produtos específicos, obtidos por PCR, foram clonados utilizando-se o kit *pGEM-T-Easy*[®] (Promega) e transformados em *Escherichia coli* DH5- α em aparelho *MicroPulser*[®] (BioRad). Os clones recombinantes foram selecionados com base na coloração das colônias (azul/branco) crescidas em Meio LB (Luria Bertani) ágar contendo ampicilina (100 μ g/ml), X-Gal (20 μ g/ml) e IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) na concentração de 40 μ g/ml. A confirmação da presença e tamanho de inserto desejados foi realizada através de uma PCR utilizando iniciadores direcionados a sequências específicas do vetor e tendo como DNA molde uma colônia bacteriana total. A etapa de desnaturação ocorreu a 94°C por três minutos, seguida por 35 ciclos contendo uma etapa de desnaturação (94°C por 30 segundos), uma etapa de ligação dos iniciadores (55°C por 30 segundos) e uma etapa de

elongação do DNA pela polimerase (72°C por 2 minutos), seguidas de uma etapa de extensão final da cadeia de DNA a 72°C por 10 minutos.

3.3.4 Extração de DNA plasmídial e inserção em vetor de expressão

O clone contendo o gene da OpB foi crescido a 37°C sob agitação por 16 horas em 10 ml de meio LB contendo ampicilina (100 µg/ml). Decorrido o tempo de crescimento, os plasmídeos recombinantes foram extraídos através do procedimento padrão de lise alcalina (*mini-prep*), conforme descrito por Sambrook e Russell (2001). O plasmídeo de expressão pET-14b (Novagen®), presente em bactérias *E. coli* da cepa BL21(DE3), foi extraído da mesma maneira.

O plasmídeo *pGEM-T easy*® contendo o inserto da OpB e o vetor pET-14b íntegro foram submetidos a uma digestão inicial com a enzima *Xho* I a 37°C por duas horas, seguidos da digestão com a enzima *Bam*HI na mesma temperatura, durante 16 horas. Ao vetor pET-14b digerido foi acrescentado 5 U/µl da enzima fosfatase antártica (BioLabs) durante 30 minutos a 37°C, seguido de 5 minutos a 65°C para inativar a enzima. Este tratamento teve como objetivo remover a porção 5' fósforo do vetor, impedindo que o mesmo recircularizasse, favorecendo assim a posterior ligação. Após a digestão, os produtos foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%, sendo as bandas de interesse excisadas do gel e purificadas utilizando-se o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante.

A ligação do inserto no vetor de expressão ocorreu na presença de 3 U da enzima *T4 DNA ligase* (BioLabs), no tampão do fabricante. Os produtos de ligação foram então utilizados para a transformação por eletroporação em células eletrocompetentes *E. coli* BL21 (DE3). A seleção dos clones recombinantes foi realizada através de PCR diretamente das colônias, sendo posteriormente submetidos à extração do DNA plasmidial através de *mini-prep* (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Neste sistema de clonagem, a proteína é expressa com uma cauda de histidina que foi utilizada posteriormente para detecção e purificação da proteína recombinante.

3.3.5 Análise das sequências

O DNA plasmidial obtido a partir da clonagem em vetor *pGEM-T easy*® e em pET-14b foi sequenciado com o objetivo de

confirmar a presença e correta orientação do inserto. O sequenciamento ocorreu em um sequenciador automático *Megabace DNA Analysis System 1000*[®] (GE/Amersham Biosciences) utilizando-se o kit *DYEnamic ET Terminator*[®] (GE/Amersham Biosciences), segundo orientações do fabricante. As reações de sequenciamento foram realizadas na presença de 5 pmol dos iniciadores T7-F (5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3') e T7-R (5' – GCT AGT TAT TGC TCA GCG G – 3'), dirigidos ao vetor pET14-b, ou dos iniciadores OBTr-F-*XhoI* e OBTr-R-*BamHI*, dirigidos ao inserto. As reações de sequenciamento contaram com as seguintes etapas: desnaturação inicial (95°C por 25 segundos), seguida de 30 ciclos com etapas de desnaturação (95°C por 15 segundos), ligação dos iniciadores (55°C por 20 segundos) e extensão da cadeia de DNA (60°C por 90 segundos). Os produtos dessas reações foram precipitados com isopropanol 70% para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados, sendo subsequentemente eletroinjetados a 2 KV por 120 segundos e eletroeluídos por 150 minutos a 9 KV.

Todas as seqüências foram analisadas com o apoio do Laboratório de Bioinformática (MIP/CCB/UFSC). A qualidade das seqüências foi determinada utilizando-se o programa *Phred* do pacote *Phred/Phrap/Consed* (Ewing et al., 1998; Ewing; Green, 1998) e as seqüências nucleotídicas que não apresentaram um valor mínimo de qualidade (*Phred* ≥ 20) foram descartadas, sendo submetidas a um novo sequenciamento.

A confirmação da identidade do fragmento obtido foi realizada através da ferramenta *blastx* (ALTSCHUL et al., 1990) do programa BLAST disponível no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A seqüência de aminoácidos para as seis possíveis fases de leitura foi predita através do programa *Translate* do pacote *Expasy* (www.expasy.org) e analisada quanto à presença da cauda de poli-histidina e à existência de códons de parada. A presença de domínios conservados foi realizada através da ferramenta *Conserved Domain Architecture* (CDART) também do programa BLAST e do programa *Interpro*. A função molecular, bem como os processos biológicos nos quais a proteína está envolvida foram avaliados pelo programa *Gene Ontology* (GO). Alinhamentos com as seqüências de OpB de organismos filogeneticamente relacionados foram realizados através do programa *ClustalW2*. O programa *ProtParam* do pacote *Expasy*, foi utilizado para análise de parâmetros físico-químicos da proteína, além do programa *BioEdit*[®]. Na tentativa de identificar

regiões de similaridade que poderiam indicar relações funcionais, estruturais e/ou evolutivas entre duas sequências biológicas utilizou-se o programa *Pairwise Sequence Alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>).

3.4 Expressão heteróloga da OpB de *Trypanosoma rangeli* em *E. coli*

A expressão da proteína recombinante teve início com o crescimento das bactérias *E. coli* BL21 (DE3) por 16 horas a 37°C sob agitação, em 10 ml de meio LB (100 µg/ml ampicilina). Deste pré-inóculo, 2 ml foram adicionados a 30 ml do mesmo meio e o crescimento se deu a 37°C sob agitação, até que fosse atingida densidade óptica (D.O._{600nm}) entre 0,5 e 0,6 através de leitura espectrofotométrica em equipamento *BioPhotometer*[®] (Eppendorf). Decorrido o tempo de crescimento, 2 ml da cultura foram separados previamente à indução para servirem como controle não induzido e, aos 30 ml restantes, acrescentou-se o indutor de expressão IPTG. Para determinação das melhores condições de expressão, foram avaliadas diferentes concentrações do indutor IPTG (0,5 e 1 mM) diferentes temperaturas (15°C, 27°C e 37°C) e também, diferentes tempos de indução (3, 6 e 16 horas).

Após o término de cada crescimento, a cultura foi coletada por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento eluído em 1 ml de Tris-HCl pH 7,4 na concentração de 20 mM. O extrato proteico total bacteriano foi avaliado em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 10%, corado com azul de Coomassie R250 0,25% e a confirmação da expressão da proteína de interesse foi visualizada por *Western blot* como descrito no item 3.7.2. O anticorpo primário utilizado foi o Hisprobe (sc-8036) (Santa Cruz *Biotechnology*) direcionado a cauda de histidina na concentração de 1: 1.000 e o anticorpo secundário utilizado foi o anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1: 10.000). As imagens do gel e do *Western blot* foram digitalizadas em equipamento *Perfection 4990 Scanner*[®] (Epson).

3.5 Purificação da proteína recombinante

Para a purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade a metal, uma quantidade maior de cultura bacteriana foi

cultivada (250 ml) até atingir a D.O._{600nm} de 0,6 e a expressão heteróloga induzida durante 3 horas a 37°C com 1 mM de IPTG sob agitação. Após a indução, as bactérias foram cetrifugadas a 4.000 x g por 10 minuto a 4°C. Ao sedimento foi adicionado 0,4 mg/ml de Lizosima, sendo em seguida ressuspendido em 5 ml de Tris-HCl 1 M pH 7,4 acrescido de inibidor de protease (Sigma-Aldrich®). A extração da proteína se deu através de 10 ciclos de sonicação entre 11-14 W com 30 segundos de intervalo entre as sonicações. Nuclease foi adicionada a 0,1 µl/ml e a solução mantida a TA por 10 minutos. A fração solúvel foi separada da fração insolúvel através de centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos a 4°C. A fração insolúvel, sedimento em que se encontra a proteína de interesse, foi adicionada de Tampão B contendo 8M ureia, 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM Imidazol. A fim de que a proteína fosse liberada dos corpos de inclusão a solução foi mantida a 60°C por 1 hora sob agitação. Decorrido este tempo, o lisado foi centrifugado a 12.000 x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante, livre de debris celulares, misturado a resina NI-NTA Agarose (Qiagen), previamente equilibrada com Tampão B, por 1 hora a 4°C sob agitação constante em coluna de suporte. A coluna de suporte foi, então, aberta deixando gotejar, por ação gravitacional, o conteúdo que não se prendeu à resina. A purificação teve continuidade através de quatro lavagens com 2 ml de tampão composto por 8M ureia, 100mM NaH₂PO₄, 100 mM Tris-HCl pH 6,3 e seis eluições de 500 µl com tampão semelhante, exceto pelo pH ser 4,5. Alíquotas de cada etapa foram coletadas para posterior visualização em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 10%, corado com azul de Coomassie R250 0,25% . As proteínas eluídas foram submetidas a um processo de diálise a fim de remover o excesso de ureia e permitir o correto dobramento da proteína em sua estrutura secundária. Para tal, o conteúdo recuperado das eluições foi colocado em membrana de diálise, a qual permaneceu em contato com tampão constituído de 0,5 mM de EDTA, 500 mM de NaCl, 5 mM de DTT, 20% de glicerol e 100 mM de Tris HCl pH 8,5 durante 16 horas e mais 4 horas em mesmo tampão com 40% de glicerol. A confirmação da purificação foi realizada por *Western blot* e a quantidade de proteína recombinante estimada pelo método de microdosagem de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.6 Imunização dos camundongos e obtenção do soro policlonal

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas com idade aproximada de 45 dias, provenientes do Biotério Central da UFSC e mantidos no biotério do departamento (MIP) em caixas contendo serragem, com disponibilidade de água e ração *ad libitum*. Os procedimentos de produção de antissoros foram realizados observando-se os Princípios Éticos para o Uso de Animais de Laboratório, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, tendo sido aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da UFSC (Processo CEUA: 23080.025618/2009-81).

Para a obtenção do soro policlonal anti-oligopeptidase B de *T. rangeli*, quatro camundongos fêmea da linhagem BALB/c foram imunizados com 50µg da proteína de interesse previamente purificada, emulsificada em adjuvante Alu-gel (Serva). As quatro imunizações realizadas ocorreram pela via subcutânea em intervalos de dez dias. A obtenção do soro policlonal foi realizada uma semana após a última imunização, através da coleta do sangue dos animais por punção cardíaca. O sangue coletado foi refrigerado por 16 horas para formação de coágulo e, centrifugado a 1.900 x g por 10 minutos, sendo o soro transferido para novos tubos e armazenados a -80°C.

3.7 Avaliação do reconhecimento da OpB pelo soro murino anti-OpB através de Western blot

Para esta avaliação aproximadamente 40 µg dos extratos proteicos de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*, além de 1 µg proteína recombinante purificada foram aplicados em gel SDS-PAGE 10% seguido da transferência das proteínas para membrana de PVDF e processamento do *Blotting*.

3.7.1 Extração proteica

Aos extratos totais de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* foram adicionados cinco volumes de tampão de lise (50 mM NaCl, 200 mM Tris HCl pH 8,0 e 1% de NP40) aquecido a aproximadamente 95 °C e inibidor de protease (Sigma-Aldrich®) (1 µg/µl). Após homogeneização em vortex, as amostras foram

centrifugadas durante 30 minutos a 14.000 x g a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a quantidade de proteína dosada por Bradford.

3.7.2 Western blot

Após a quantificação dos extratos proteicos, os mesmos foram submetidos à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%. As proteínas foram, então, submetidas à transferência para membrana de PVDF (BioRad) durante 16 horas a 25 V, em módulo de transferência Mini-PROTEAN® *Tetra System* (BioRad), em banho de gelo, utilizando como tampão de transferência uma solução contendo 192 mM glicina, 25 mM Tris, 20% metanol. Terminada a transferência, a membrana foi mantida em solução de bloqueio constituída de leite desnatado 5% diluído em tampão de *blotting* (150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% Tween 20) por 16 horas seguida de 5 lavagem de 5 minutos com tampão de transferência. As incubações com os anticorpos primários ocorreram em 2% de leite desnatado dissolvido em tampão, durante 90 minutos sob agitação branda a temperatura ambiente, nas seguintes diluições: o soro policlonal anti-OpB foi diluído na proporção 1:200 e o anticorpo monoclonal Hisprobe (Santa Cruz *Biotechnology*) direcionado à cauda de poli-histidina presente em proteínas recombinantes expressas no vetor pET-14b, foi diluído 1:1.000. A detecção utilizando o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich®) ocorreu durante 60 minutos, na proporção 1: 10.000, após cinco lavagens da membrana. Em seguida, a membrana foi revelada através da utilização do reagente *Pierce ECL Western Blot* (Thermo Scientific) e exposição a filme radiográfico, utilizando o processador de filmes *SRX-101A* (*Konica Minolta Medical & Graphic*).

3.8 Espectrometria de massas

A análise por espectrometria de massas (*On-line Nano-LC MS-MS/MS*) da banda observada para OpB recombinante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada pelo Dr. Glauber Wagner no Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC - *Biological Mass Spectrometry Laboratory* - Atlanta, USA), com *NanoAcquity System*

(Waters Corporation) acoplado ao *LTQ Orbitrap Velos nanospray* (Thermo Scientific) utilizando um protocolo anteriormente estabelecido (WILLIAMSON et al., 2010) com algumas modificações. O espectro *m/z* foi processado usando *Mascot Distiller* e o programa *Mascot Software* (Matrix Science) foi empregado para a busca em banco de dados de sequências expressas de *T. rangeli* (GRISARD et al. 2010) e janelas abertas de leitura (ORFs) preditas.

As proteínas reveladas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) corados com Azul de Comassie foram coletadas e acondicionadas em microtubos estéreis a -20°C até o processamento para a análise por espectrometria de massas (MS). Cada banda foi previamente tratada com 500 μl de solução descorante I (50% metanol, 5% ácido acético) durante duas horas sob agitação a TA. Em seguida, foram incubadas com 200 μl de solução descorante II (50% acetonitrila (ACN) em 5 mM de carbonato de amônia (NH_4HCO_3) durante uma hora, em agitação a 37°C e desidratados com 200 μl de acetonitrila (ACN) durante 5 minutos. O excesso de ACN foi removido em centrifugação sob vácuo (SpeedVac, Eppendorf) durante 30 minutos a TA. Após esta etapa de descoloração e desidratação, as bandas foram tratadas com 10 mM de DTT para a redução dos grupamentos tiol das cisteínas durante 30 minutos a 60°C , seguido da alquilação destes grupos tiol com 50 mM de iodoacetamida (IAA) durante 30 minutos a TA ao abrigo de luz. Posteriormente os géis foram novamente incubados com solução descorante II e desidratados com ACN conforme descrito anteriormente. Na sequência, as proteínas foram submetidas a digestão proteolítica *in gel* com tripsina (Promega). Para tal, foi utilizado 1 μg de tripsina em 5 mM NH_4HCO_3 com 1 mM CaCl_2 pH 8,0 durante 16 horas a 37°C e após este período a digestão foi interrompida com 175 mM HCl (pH 7,5). Os peptídeos foram extraídos do gel com 100 μl de solução descorante II durante duas horas a 37°C , sendo o sobrenadante contendo os peptídeos transferido para um novo tubo e os géis submetidos a novo tratamento com 50 μl da solução descorante I durante uma hora a 37°C . Após este período, o sobrenadante foi transferido para o tubo contendo o sobrenadante obtido na primeira etapa de extração. Em seguida, a solução contendo os peptídeos foi desidratada por centrifugação a vácuo (SpeedVac, Eppendorf) e os peptídeos reconstituídos com 10 μl de 0,1% ácido fórmico (AF).

3.9 Avaliação da atividade da Oligopeptidase B

A atividade da Oligopeptidase B de *T. rangeli* foi avaliada utilizando como base o ensaio de atividade realizado para Oligopeptidase B de *T. cruzi* descrito por Caler (1998) com algumas adequações. Resumidamente, a atividade da proteína foi avaliada com base na capacidade da OpB de *T. cruzi* mobilizar Ca^{+2} da célula hospedeira. Tal fluxo de Ca^{+2} pode ser mensurado utilizando-se um indicador que acusa a mobilização pelo aumento de fluorescência, o indicador utilizado foi o Fluo-3/AM (Invitrogen™/Molecular Probes).

Para os ensaios com *T. rangeli*, tendo o *T. cruzi* como controle positivo, $2,5 \times 10^4$ células/poço da linhagem Vero foram crescidas a 37 °C, 5% CO_2 durante 20 horas em placa de 96 cavidades. Após duas lavagens com PBS/probenecida 1 X (PBS contendo 0,5 mM de probenecida) foi adicionada às células uma solução contendo 5 μM de Fluo-3/AM, 0,05 % de ácido plurônico F-127 20% (Invitrogen®/Life technologies™) e 0,5 mM de probenecida (Invitrogen™/Molecular Probes). As células foram mantidas nesta solução por 1 hora a TA, protegidas da luz. Mais duas lavagens com PBS/probenecida foram realizadas, seguidas de um período de 30 minutos em que as células foram mantidas em PBS/ probenecida, também protegidas da luz. Decorrido este tempo, o extrato solúvel de 12×10^7 parasitos (preparados de acordo com o item 3.7.1, excluindo-se a adição de inibidor de protease) ou a OpB recombinante foram acrescentados e a leitura da fluorescência realizada durante 110 segundos (10 segundos antes da adição dos extratos e 100 segundos após adição) a 37°C em leitor de placa TECAN *infinite M200* (Rchisto). O comprimento de onda (λ) de excitação utilizado para a leitura da fluorescência foi de 485 nm e o de emissão, de 525 nm. Como controle positivo da reação foram utilizados ATP a 0,1 M e Ionóforo de cálcio A23187 (Sigma-Aldrich®) a 5 μM .

A avaliação da atividade foi realizada em triplicata técnica e biológica. Os valores utilizados para plotar o gráfico são resultado das médias das triplicatas, seguidas da diferença entre as médias das fluorescências emitidas antes da adição dos extratos e depois da adição dos extratos. Os resultados foram avaliados quanto a sua significância através do método estatístico *Tukey* com $p < 0,01$ e análise de variância *one-way ANOVA* pelo programa *GraphPad Prism*® versão 5.01.

Algumas amostras passaram, também, por dois tratamentos adicionais antes das medições das fluorescências: (1) adição de soro

anti-OpB; o soro anti-OpB foi adicionado às amostras em uma proporção de 1:1 e mantidos em gelo entre 30 minutos e duas horas, antes de serem aplicados sobre a camada celular para leitura da fluorescência; (2) adição de inibidor de protease; às amostras foi adicionado coquetel de inibidor de protease (Sigma-Aldrich®) contendo os seguintes inibidores: benzenosulfonil-fluorido - AEBSF (104 mM), Aprotinina (80 µM), Bestatina (4 mM), L-trans-epoxisuccinil-leucilamido (4-guanidino) butano - E-64 (1.4 mM), Leupeptina (2 mM), Pepstatina A (1.5mM). A quantidade foi ajustada para uma concentração final de 100 µM de Leupeptina e adicionada às amostras cinco minutos antes das leituras (BURLEIGH et al., 1995).

3.10 Ensaios de interação parasito/ célula hospedeira *in vitro*

Os ensaios cinéticos de interação de formas tripomastigotas de *T. rangeli* cepa Choachí, utilizando a cepa Y de *T. cruzi* como controle, foram conduzidos como descrito por Romero e colaboradores (2005), com algumas modificações. Em suma, os ensaios foram realizados em triplicata biológica e técnica através do cultivo de monocamadas celulares da linhagem Vero, em placas de cultivo celular de seis poços. Os parasitos em suas formas tripomastigotas foram adicionados às monocamadas celulares nas proporções de trinta parasitos para cada célula para *T. rangeli* e dez parasitos para cada célula para *T. cruzi*. A interação foi avaliada em diferentes períodos (30 minutos, 3 e 10 horas), sendo as células mantidas a 37°C com 5% CO₂. Após cada tempo de interação, o sobrenadante foi coletado e após duas lavagens com PBS 1X, armazenado a -20°C para avaliar a expressão da proteína através de ensaios de *Western blot*, conforme descrito no item 3.7.1, e a -80°C em 500 µl de reagente TRIzol® (Ambion) para posterior extração de RNA total.

As amostras armazenadas a -20°C foram descongeladas em banho de gelo para a extração proteica conforme item 3.7.1. Para *T. rangeli*, 30 µg do extrato proteico total foi aplicado em gel SDS-PAGE e para *T. cruzi*, 15 µg. Em seguida, o gel foi processado para a realização do *Western blot* (item 3.7.2) utilizando o anticorpo primário anti-OpB (1:200) e secundário anti-IgG conjugado a peroxidase (1:10.000) para avaliar a expressão da OpB. Para o processamento do normalizador a membrana foi lavada por 5 minutos com: (1) água deionizada (*MilliQ*), (2) solução de NaOH 0,2 N, (3) novamente água

deionizada e (4) tampão de transferência. Sendo então, realizado novo processamento do *blotting* utilizando o anticorpo anti- α -tubulina (1: 10.000) como anticorpo primário. Diferenças na expressão proteica foram avaliadas através de densitometria das bandas reveladas utilizando-se o programa *Image J 1.74d* (NIH - *National Institutes of Health*).

A cadeia polipeptídica possui a sequência que corresponde ao sítio catalítico das proteínas da família prolil endopeptidase (Peptidase S9A) conservada (D-x(3)-A-x(3)-[LIVMFYW]-x(14)-G-x-S-x-G-G-[LIVMFYW]), bem como a tríade catalítica formada por uma Serina (S), uma Histidina (H) e um Aspartato ou Ácido aspártico (D), sendo a Serina o sítio ativo da enzima (Figura 6). A OpB de *T. rangeli* esta envolvida nos processos biológicos de proteólise, sendo enquadrada na função molecular das serina endopeptidases de acordo com os programas *Interpro* e *Gene Ontology* (GO).

A análise da sequência aminoacídica de *T. rangeli* com sequências de organismos relacionados, utilizando o programa *Pairwise Sequence Alignment*, mostrou uma similaridade de 89,5% com a sequência de *T. cruzi*, sendo esta a maior similaridade observada entre os organismos avaliados. Seguido de 86,0% de similaridade com *T. brucei* e 85,5%, com *T. evansi*. Com parasitos do gênero *Leishmania* não apresentaram mais que 79% de similaridade, sendo 78,9% para *L. braziliensis* e *L. infantum* e 78,4% com *L. major*. Os valores de similaridade referem-se a percentagem da soma dos aminoácidos idênticos e aminoácidos com propriedades semelhantes. A partir dos resultados de similaridade e do alinhamento das sequências, realizada através a programa ClustaW2 do pacote *Expasy*, observou-se que o domínio catalítico da Oligopeptidase B mantém-se bastante conservado, principalmente entre os parasitos do gênero *Trypanosoma*.

Os iniciadores desenhados, direcionados à sequência completa da OpB de *T. rangeli*, mostraram-se específicos para a amplificação do gene da OpB deste parasito. Apresentando, em gel de agarose, uma banda única próxima ao tamanho teórico esperado de 2.139 pb, para as duas cepas utilizadas, Choachí e SC-58. Não foram observados produtos nas reações de amplificação dos demais tripanosomatídeos analisados (Figura 7).

O produto de amplificação da cepa Choachí de *T. rangeli* foi utilizado para a clonagem em vetor de clonagem pGEM-T-easy, sendo posteriormente clonado em vetor de expressão pET-14b e submetido a sequenciamento conforme descrito no item 3.3 deste trabalho.

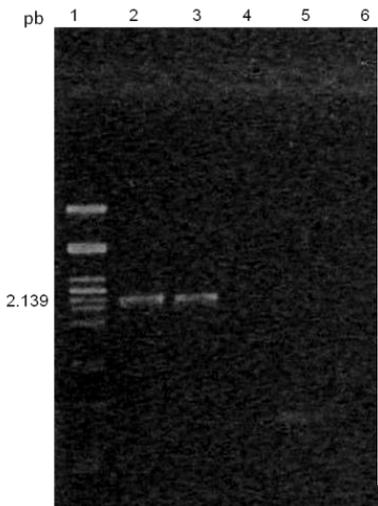


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio revelando a banda de aproximadamente 2.139 pb do gene da OpB de *T. rangeli*. 1 – Padrão de tamanho molecular; 2 – cepa Choachí de *T. rangeli*; 3 – cepa SC-58 de *T. rangeli*; 4 – cepa Y de *T. cruzi*; 5 – *L. amazonensis*; 6 – *L. braziliensis*.

4.2 Expressão heteróloga e purificação da OpB recombinante (OpBr)

A análise em gel SDS-PAGE apresentou uma banda de aproximadamente 80 kDa no extrato proteico insolúvel das bactérias BL21 (DE3) induzidas à produção da OpB recombinante, ausente no extrato bacteriano contendo o vetor pET-14b sem inserto (Figura 8A). A expressão foi confirmada através do reconhecimento da proteína pelo anticorpo monoclonal Hisprobe (Santa Cruz *Biotechnology*) direcionado a cauda de poli-Histidina, o qual reconheceu também a banda de 75 kDa do padrão de tamanho molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard*, BioRad) (Figura 8B).

A presença da proteína recombinante na fração insolúvel da bactéria, e não na fração solúvel, sugere que a mesma esteja sendo armazenada em corpos de inclusão bacterianos. Esta situação é comumente observada quando proteínas eucarióticas são expressas em grandes quantidades por uma célula bacteriana. Na tentativa de obter a proteína a partir de sua expressão na fração solúvel, diferentes condições de crescimento e indução foram utilizados, como temperatura e tempo de crescimento, bem como concentração de IPTG.

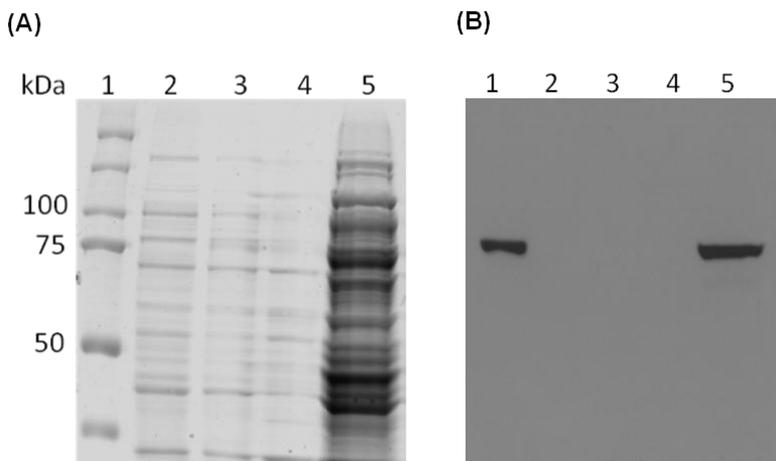


Figura 8: Expressão heteróloga da OpB na fração insolúvel do extrato bacteriano revelado em (A) gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 10% e confirmação da expressão pela presença de cauda de poli-Histidina por (B) *Western blot* revelando a banda esperada de aproximadamente 80 kDa. O anticorpo Hisprobe (Santa Cruz *Biotechnology*) foi utilizado como anticorpo primário (1:1.000) e como secundário, anti-IgG conjugado a peroxidase (1:10.000). 1 – Padrão de tamanho molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard*, BioRad); 2 – Extrato proteico de BL21 (DE3) contendo apenas o vetor pET-14b; 3 – Extrato proteico bacteriano sem adição de IPTG (controle não induzido); 4 – Fração solúvel após 3 horas da indução com 1mM de IPTG a 37°C; 5 – Fração insolúvel após 3 horas da indução com 1mM de IPTG a 37°C.

A indução da expressão da proteína em temperaturas mais baixas (15°C e 27°C), bem como por diferentes tempos (3, 6 e 16 horas), não foram suficientes para impedir a formação de corpos de inclusão, sendo a proteína novamente expressa somente na fração insolúvel das bactérias, com uma maior expressão a 37°C (Figura 9).

A expressão da OpB em outras linhagens bacterianas - BL21 (DE3) pLysS e BL21 (Rosetta) - linhagens resistentes tanto a ampicilina quanto a cloranfenicol, também foi avaliada (Figura 10). Entretanto, mesmo utilizando uma concentração mais baixa de IPTG (0,5 mM) e a temperatura de 15°C durante 16 horas a proteína continuou sendo expressa na fração insolúvel do extrato bacteriano.

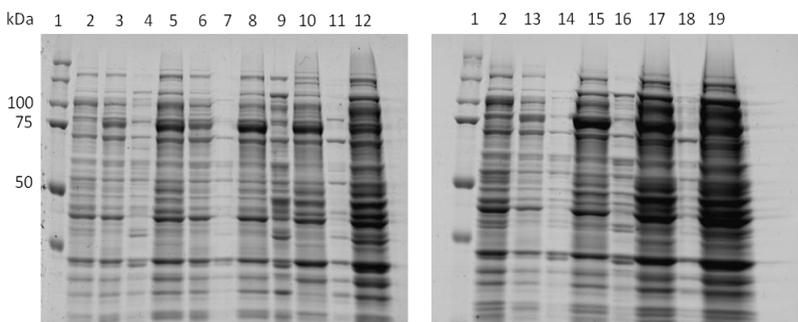


Figura 9: Análise da expressão heteróloga da OpB (~80 kDa) em diferentes temperaturas e tempos de indução através de gel SDS-PAGE a 10%. 1 – Padrão de Tamanho Molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard*, BioRad); 2 – Extrato proteico de BL21 (DE3) contendo apenas o vetor pET-14b; 3 – Controle não induzido a 15°C; 4 – Fração solúvel após 16 horas de indução a 15°C; 5 – Fração insolúvel após 16 horas de indução a 15°C; 6 – Controle não induzido a 27°C; 7 – Fração solúvel após 3 horas de indução a 27°C; 8 – Fração insolúvel após 3 horas de indução a 27°C; 9 – Fração solúvel após 6 horas de indução a 27°C; 10 – Fração insolúvel após 6 horas de indução a 27°C; 11 – Fração solúvel após 16 horas de indução a 27°C; 12 – Fração insolúvel após 16 horas de indução a 27°C; 13 – Controle não induzido a 37°C; 14 – Fração solúvel após 3 horas de indução a 37°C; 15 – Fração Insolúvel após 3 horas de indução a 37°C; 16 – Fração solúvel após 6 horas de indução a 37°C; 17 – Fração insolúvel após 6 horas de indução a 37°C; 18 – Fração solúvel após 16 horas de indução a 37°C; 19 – Fração insolúvel após 16 horas de indução a 37°C.

A diminuição da temperatura é uma das estratégias utilizadas para expressar proteínas de forma solúvel. No entanto, a baixas temperaturas as chaperonas de *E. coli*, responsáveis por se ligar às proteínas, estabilizando-as e facilitando o correto dobramento das mesmas, perdem sua atividade. A fim de minimizar este obstáculo, células competentes denominadas *ArcticExpress* foram modificadas para melhorar o processamento de proteínas a baixas temperaturas. Estas células co-expressam as chaperonas Cpn10 e Cpn60 provenientes de bactérias psicofílicas da espécie *Oleispira antarctica*. Quando expressas em bactérias *ArcticExpress*, estas chaperonas conferem uma melhoria no processamento de proteínas a baixas temperaturas (4-13°C), aumentando potencialmente a produção da proteína recombinante de

forma ativa e solúvel. No entanto, a expressão da proteína OpB de forma solúvel nesta linhagem celular também não foi observada (Figura 11).

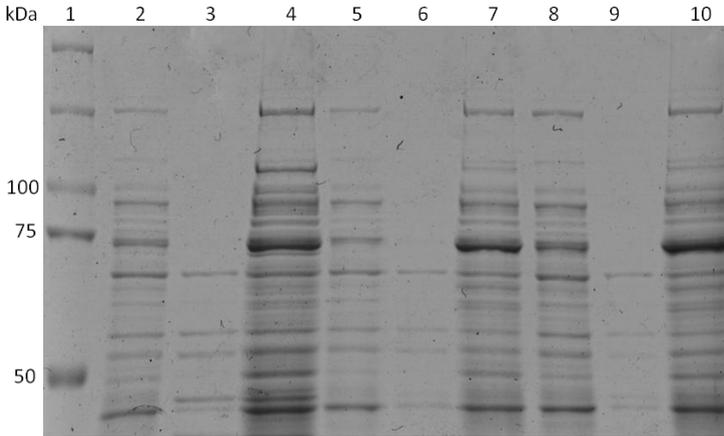


Figura 10: Expressão heteróloga da OpB por diferentes linhagens celulares após 16 horas de indução com 0,5 mM de IPTG visualizada através de SDS-PAGE a 10%. Não se observa expressão na fração solúvel dos extratos bacterianos das linhagens avaliadas. 1 – Padrão de Tamanho Molecular (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard, BioRad); 2, 5 e 8 – Controles não induzidos; 3 – BL21 (DE3) fração solúvel; 4 – BL21 (DE3) fração insolúvel; 6 – BL21 (DE3) pLysS fração solúvel; 7 – BL21 (DE3) pLysS fração insolúvel; 9 – BL21 (Rosetta) fração solúvel; 10 – BL21 (Rosetta) fração insolúvel.

Além disso, um protocolo visando remover a proteína recombinante dos corpos de inclusão, solubilizando-a, foi testado com base nos resultados obtidos por Carrió e Villaverde (2001). Este protocolo submete a cultura bacteriana a 200 µg/ml do antibiótico ao qual esta é resistente (BL21(DE3) – ampicilina e BL21 Rosetta e pLysS – cloranfenicol) após a cultura atingir a D.O. $_{600\text{ nm}}$ de 0,6, sendo a adição do antibiótico seguida de um período de redobramento da proteína de 2 horas e meia a 28°C. No entanto, os resultados foram mais uma vez insatisfatórios (Figura 12).

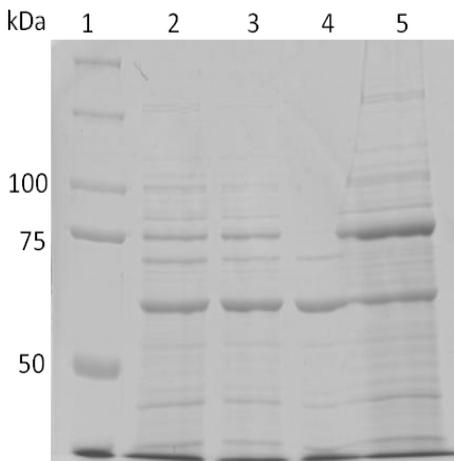


Figura 11: Gel SDS-PAGE a 10% revelando a ausência da OpBr na fração solúvel do extrato proteico de bactérias *ArcticExpress*. 1 – Padrão de Tamanho Molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard*, BioRad); 2 – Extrato bacteriano total; 3 – Controle não induzido; 4 – Fração solúvel após 24 horas de indução (1mM IPTG) a 12°C; 5 – Fração insolúvel após 24 horas.

Uma vez que não foi possível expressar a proteína em sua forma solúvel, o critério utilizado para determinar as melhores condições de expressão, e posterior purificação a partir da fração insolúvel, foi baseado no nível de expressão da proteína recombinante, o que foi determinado pela intensidade das bandas específicas em géis SDS-PAGE (Figura 9). Desta maneira, bactérias BL21 (DE3), transformadas com o plasmídeo pET-14b contendo o gene de interesse, tiveram a expressão da OpB de *T. rangeli* induzida através da adição de 1 mM de IPTG, a 37°C durante 3 horas.

Durante o processo de obtenção da proteína recombinante purificada observou-se a presença de uma banda entre 37 kDa e 50 kDa (Figura 13), além da banda esperada de aproximadamente 80 kDa. A proteína de massa molecular inferior é fortemente reconhecida pelo anticorpo Hisprobe (Santa Cruz *Biotechnology*). Este reconhecimento intenso sugere uma ligação preferencial desta proteína à resina de níquel, em detrimento da ligação da proteína de maior peso molecular.

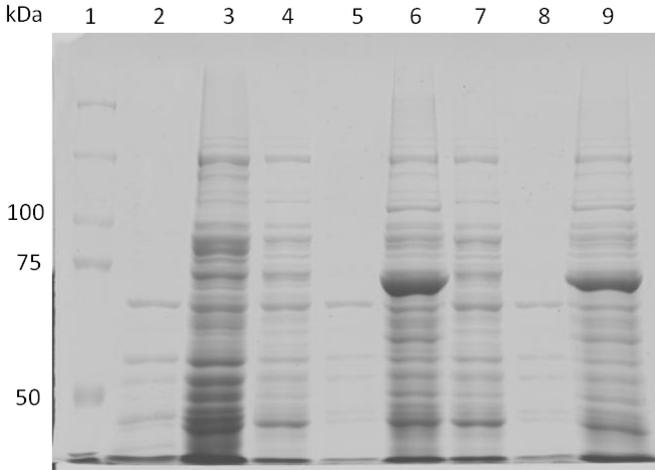


Figura 12: Expressão heteróloga da OpB utilizando protocolo de solubilização (CARRIÓ; VILLAVERDE, 2001), observa-se a expressão da OpB apenas nas frações insolúveis. 1 – Padrão de Tamanho Molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard*, BioRad); 2 – BL21 (DE3) fração solúvel; 3 – BL21 (DE3) fração insolúvel; 4 e 7 – Controles não induzidos de BL21 (Rosetta) e BL21 (DE3) pLysS, respectivamente; 5 – BL21 (Rosetta) fração solúvel; 6 – BL21 (Rosetta) fração insolúvel; 8 – BL21 (DE3) pLysS fração solúvel; 9 – BL21 (DE3) pLysS fração insolúvel.

Com o intuito de avaliar o reconhecimento de uma banda de menor peso molecular do que o esperado durante o processo de purificação, uma busca por sítios de autoclivagem na proteína foi realizada utilizando o programa *PeptideCutter* do pacote *Expasy*. Esta análise revelou a presença de um sítio de clivagem na posição 389 da sequência aminoacídica pela enzima Prolina-endopeptidase (Figura 14). Uma vez que no vetor pET-14b a cauda de poli-Histidina encontra-se na porção inicial da sequência, a banda observada é referente à porção aminoacídica 1 a 389, que resulta em uma fração proteica de peso molecular teórico de 43,5 kDa, de acordo com o observado no *blotting* (Figura 13).

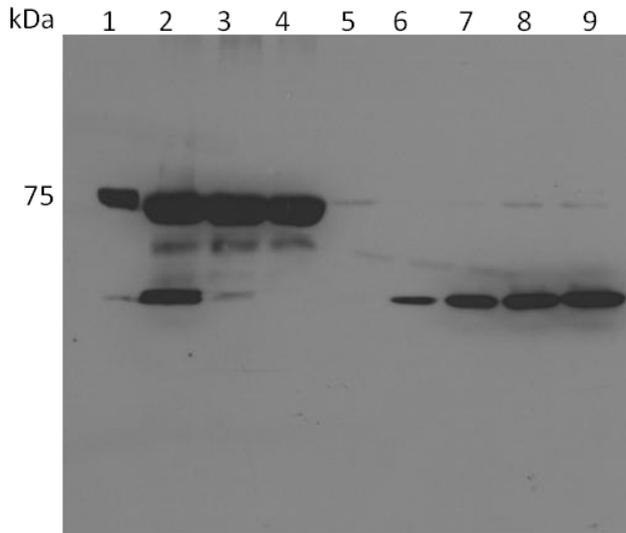


Figura 13: Análise da purificação da proteína recombinante através de *Western blot* utilizando como anticorpo primário o anticorpo Hisprobe (Santa Cruz *Biotechnology*) (1:1.000) e como secundário anti-IgG conjugado a peroxidase (1:10.000). Reconhecimento de uma banda entre 37 kDa e 50 kDa pelo anticorpo primário nas eluições. 1 – Padrão de Tamanho Molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard*, BioRad); 2 – Sobrenadante proteico após lise celular; 3 – *Flow-through*; 4 – Primeira lavagem; 5 – Quarta lavagem; 6 – Primeira eluição; 7 – Segunda eluição; 8 – Terceira eluição; 9 – Quarta eluição.

Tratamentos adicionais realizados na amostra com Lisozima, inibidor de proteases e nucleases, durante o processo de purificação (item 3.5) resultaram em uma redução da clivagem e favorecimento da ligação da proteína completa à resina, permitindo, assim, a purificação proteica completa da OpB (Figura 15). A confirmação de que a banda de aproximadamente 80 kDa observada referia-se à proteína OpB de *T. rangeli* foi realizada através de espectrometria de massas (Figura 16), apresentando resultado satisfatório, com uma cobertura de 49% (350/713), sendo 33 peptídeos únicos e 49 espectros únicos de um total de 240.

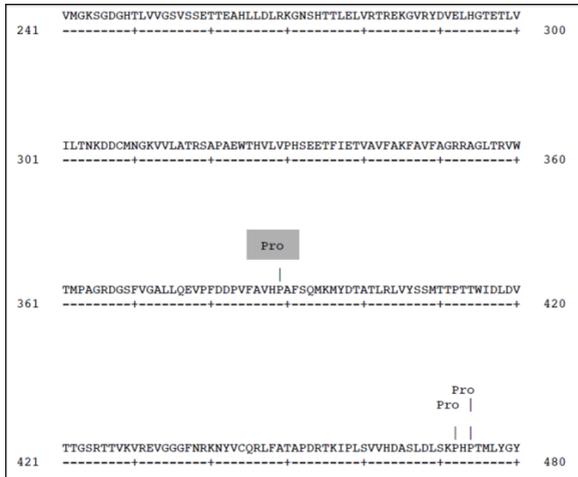


Figura 14: Mapa dos sítios de clivagem da proteína OpB de *T. rangeli* pela enzima Prolina-endopeptidase. Em destaque (cinza) o sítio de clivagem na posição 389, o qual corresponde a proteína de aproximadamente 40 kDa observada em *Western blot*.

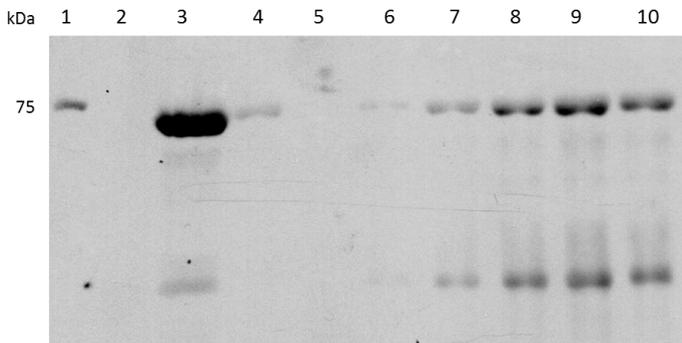


Figura 15: Favorecimento da purificação da proteína recombinante de 80 kDa após tratamento da amostra. *Western blot* utilizando o anticorpo primário Hisprobe (Santa Cruz *Biotechnology*) (1: 1.000) e, secundário anti-IgG conjugado a peroxidase (1: 10.000). 1 – Padrão de Tamanho Molecular (*Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standard*, BioRad); 2 – Fração solúvel; 3 – Sobrenadante proteico após lise celular; 4 – Primeira lavagem; 5 – Quarta lavagem; 6 – Primeira eluição; 7 – Segunda eluição; 8 – Terceira eluição; 9 – Quarta eluição; 10 – Quinta eluição.

| | | | | | |
|--------------------------------------|--|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| MERGP ^I ATPK | DHEVVFGHV | DGEDRGK ^N VI | NPPRRRNDPL | FWLRDDARKD | SEVIAHLKLE |
| RAYFEERTAD | IKDLSETLYK | EHIAHIQETD | MSAPYPHDSY | MYTREVAGL | SYKIHCRVPM |
| GKTPGKSGEE | QVILDENKLA | EGK ^T TFCVVHA | VKPAPFDHAL | VAYSVDYSGN | EVEYEVRFQD |
| AAADVVEGTN | GEIVWPGAS | CFFYTKDAA | QRDHKIWRHV | MGRPQSEDVC | LYTEDDPLFS |
| AVMGKSGDGH | TLVVGVSSE | TTEAHL ^L DLR | KGNSHTTLEL | VRTREKGVRY | DVELHGTTLL |
| VILTNKDDCM | NGKVVLATRS | APAEWTHVLV | PHSEETFIET | VAVFAKFAVF | AGRRAGLTRV |
| WTMPAGRDGS | FVGALLQEVF | FDDPFVAVHP | AFSQM ^F MYDT | ATLRLVYSSM | TPPTTWIDLD |
| VTTGSRITVK | VREVGGFNR | KNYVCORLEA | TAPDRTKIPL | SVVHDA ^L LDL | SKPHPTMLYG |
| YGSYGLCMEP | EFSIKYLPYV | DRGMIYVVAH | IRGGGEMGRA | WYEVGAKYLT | KRN ^T FSDFIA |
| SAEYLIESGL | TTPSQLACEG | ★ RSAGLLIGA | VLNMRPDLFQ | VALAGVPFVD | VMTTMC ^D PSI |
| PLTTGEWEW | GNPNEYK ^F FD | YMSSYS ^P MDN | VRAQDYPHLM | IQAGLH ^D PRV | AYWEPV ^K WAS |
| KLRA ^L KT ^D NN | ELL ^L K ^M DL ^L DS | GHFSAS ^D RYK | YWREMAIQQA | FVLKHLNART | LLRR |

Figura 16: Sequência aminoacídica da Oligopeptidase B de *T. rangeli* obtida por espectrometria de massas (MS). As letras com fundo em cinza indicam peptídeos identificados por LC-ESI-MS/MS. Sítio ativo da proteína (asterisco).

A proteína recombinante foi então dosada pelo método de Bradford e utilizada para a imunização de quatro camundongos BALB/c fêmeas com 50 µg/dose da proteína purificada. O soro de cada camundongo imunizado foi testado quanto ao reconhecimento da proteína recombinante e de extratos solúveis de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* (Figura 17), sendo o soro murino que apresentou maior reatividade utilizado para a avaliação dos níveis de expressão da proteína OpB durante o processo de interação de formas tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* com células Vero, bem como para os ensaios de atividade da OpB.

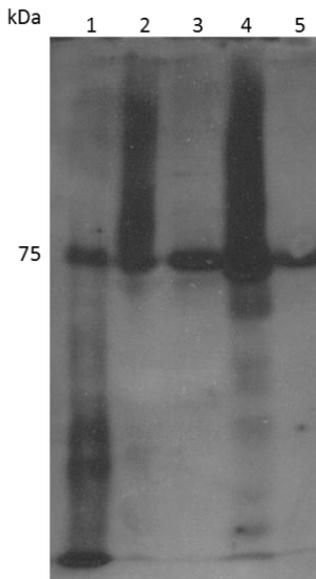


Figura 17: Reconhecimento da banda de 80 kDa pelo soro murino anti-OpB na OpBr, bem como nos extratos solúveis dos parasitos, através de *Western blot* utilizando o soro anti-OpB como anticorpo primário (1:200) e anti-IgG conjugado a peroxidase como anticorpo secundário (1: 10.000). 1- OpB recombinante; Extratos proteicos de formas 2 - Epimastigotas e 3 - Tripomastigotas de *T. rangeli* e formas 4 - Epimastigotas e 5 - Tripomastigotas de *T. cruzi*.

4.3 Avaliação da atividade da Oligopeptidase B

Uma vez que o mecanismo de ação da OpB no processo de interação parasito/célula hospedeira envolve a mobilização de Ca^{+2} para a formação do vacúolo parasitóforo, a atividade desta proteína foi avaliada através da fluorescência emitida quando as células hospedeiras (Vero), tratadas com reagente Fluo-3/AM, mobilizaram ou não Ca^{+2} intracelular. A responsividade do método foi avaliada adicionando-se ATP 0,1 M e ionóforo de cálcio $5 \mu\text{M}$ à monocamada de células Vero, o que levou a uma emissão rápida e significativa de fluorescência, que remete à mobilização de Ca^{+2} . Para todos os extratos, a fluorescência manteve-se relativamente constante durante todo o tempo observado (100 segundos).

Os extratos proteicos das formas tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* apresentaram uma emissão de fluorescência expressiva e estatisticamente significativa ($p < 0,01$) em relação aos controles negativos (Vero e PBS) como pode ser observado na Figura 18. No entanto, para as formas tripomastigotas de *T. rangeli* este aumento na fluorescência não é significativo em relação as formas epimastigotas deste parasito, como observado entre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*. A emissão de fluorescência observada para as formas epimastigotas dos extratos protéicos dos dois parasitos não é significativa em relação as controles negativos.

O tratamento dos extratos proteicos com o soro anti-OpB, produzido no decorrer deste trabalho, induz a uma redução na emissão da fluorescência de todos os extratos, no entanto, esta redução não é estatisticamente significativa. Com exceção para as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, em que o tratamento com o anticorpo anti-OpB reduziu significativamente ($p < 0,01$) a emissão de fluorescência. A proteína recombinante (OpBr) teve uma emissão de fluorescência próxima do basal em ambas as concentrações utilizadas (10 μg e 20 μg), constatando-se assim a ausência de atividade da proteína recombinante.

O tratamento dos extratos proteicos dos parasitos com coquetel de inibidores de proteases, contendo os inibidores: AEBSF, Aprotinina, Bestatina, E-64, Leupeptina, Pepstatina A, não foi eficaz na inibição da atividade da OpB. O que se observou, no entanto, foi um aumento na emissão da fluorescência das amostras tratadas, tanto para formas epimastigotas quanto para tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi* (dados não mostrados).

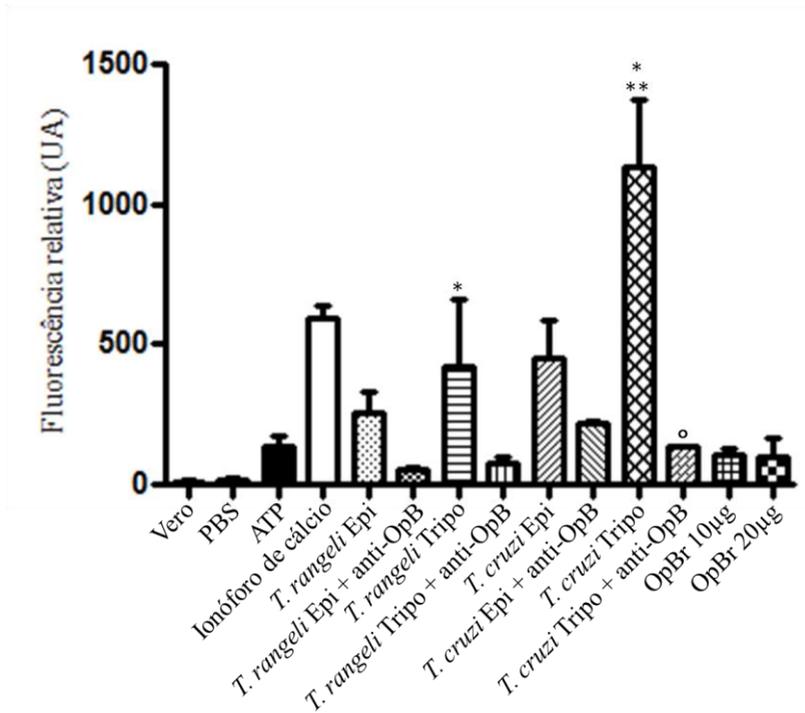


Figura 18: Mobilização de Ca²⁺ da célula hospedeira (Vero) pelos extratos solúveis de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*, com redução da atividade pela adição de soro anti-OpB e ausência de atividade pela OpBr. A atividade foi mensurada pela emissão de fluorescência resultante da mobilização de Ca²⁺ intracelular. (* diferença significativa em relação aos controles negativos – Vero e PBS, ** diferença significativa em relação as formas epimastigotas de *T. cruzi*, ° diferença significativa em relação a tripomastigotas de *T. cruzi* não tratados – $p < 0,01$).

4.4 Avaliação da Expressão da OpB durante interação parasito/célula por *Western blot*

A avaliação da expressão da OpB durante a interação dos parasitos com as células hospedeiras foi analisada por densitometria após o processamento das amostras (item 3.7.1) e revelação do *Western blot* (item 3.7.2). A análise (Figura 19) mostrou um aumento significativo ($p < 0,01$) da expressão da OpB em *T. rangeli* após trinta

minutos e 10 horas de interação parasito/célula hospedeira em relação à expressão desta proteína pelos parasitos que não entraram em contato com as células (0). Não sendo observada diferença significativa entre os três tempos de interação (30 minutos, 3 horas e 10 horas) permanecendo a expressão relativamente constante até o último tempo observado.

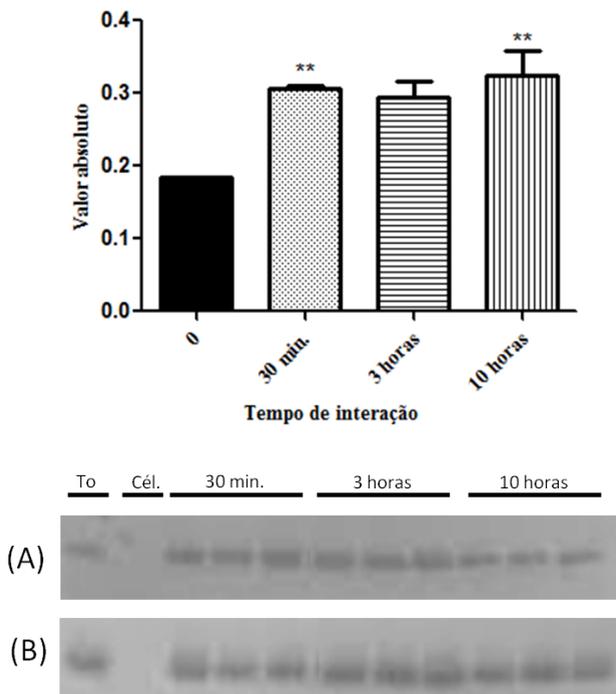


Figura 19: Aumento na expressão da OpB de *T. rangeli* durante diferentes tempos de interação parasito/ célula hospedeira. (A) *Western blot* utilizando como anticorpo primário soro anti-OpB (1:200) e (B) *Western blot* normalizador utilizando como anticorpo primário o anticorpo monoclonal anti- α -tubulina (1:10.000), como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG conjugado a peroxidase (1:10.000); (** $p < 0,01$)

Já para o *T. cruzi*, nos tempos iniciais de 30 minutos e 3 horas observou-se uma expressão semelhante ao que se tem para os parasitos que não interagiram com as células, sendo significativo o aumento da expressão apenas após dez horas de interação (Figura 20).

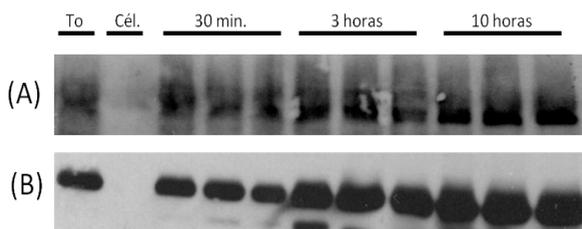
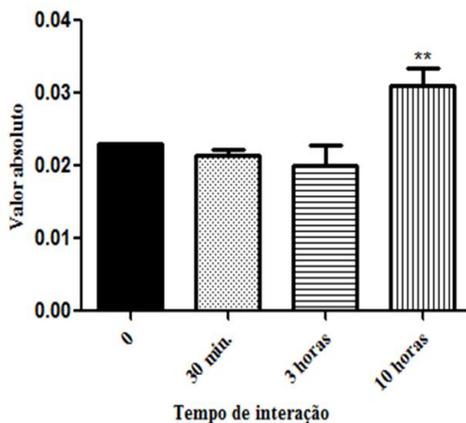


Figura 20: Aumento na expressão da OpB *T. cruzi* durante diferentes tempos de interação parasito/ célula hospedeira. (A) *Western blot* utilizando como anticorpo primário soro anti-OpB (1:200) e (B) *Western blot* normalizador utilizando como anticorpo primário o anticorpo monoclonal anti- α -tubulina (1:10.000), como anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG conjugado a peroxidase (1:10.000); (** $p < 0,01$).

5 DISCUSSÃO

A interação celular entre o parasito e o hospedeiro mamífero depende da participação de uma ampla variedade de moléculas que, ao desempenharem suas funções, irão possibilitar a entrada, sobrevivência e multiplicação do parasito no interior da célula hospedeira. Algumas dessas moléculas estão intimamente relacionadas à patogenicidade das doenças, como por exemplo enzimas proteolíticas, cujas funções as tornam atrativas como potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos e agentes quimioterápicos para o tratamento de doenças (DUSCHAK; COUTO, 2007; BASTOS et al., 2013).

A Oligopeptidase B tem um papel crucial no ciclo biológico de vários tripanosomatídeos, uma vez que está diretamente envolvida no processo de invasão celular por estes parasitos. Apesar de sua importância na patogenicidade de doenças causadas em humanos como Tripanosomíase Africana (MORTY et al., 2001) e Leishmaniose (GUEDES et al., 2007), esta proteína desempenha um função primordial na permanência e multiplicação do *T. cruzi* na célula hospedeira (BURLEIGH et al., 1997) devido, em última análise, à formação de um vacúolo parasitóforo. Devido à proximidade do *T. cruzi* e do *T. rangeli* em compartilhar vetores e reservatórios, os resultados obtidos neste trabalho para *T. rangeli* são primariamente comparados ao *T. cruzi*, embora alguns aspectos sejam passíveis de análise em relação a outros tripanosomatídeos.

A análise da sequência aminoacídica da OpB de *T. rangeli* com sequências de organismos filogeneticamente relacionados apresentou percentagens de similaridade maiores que 85% com parasitos do gênero *Trypanosoma*. Tais percentagens de similaridade, juntamente com o alinhamento das sequências aminoacídicas da OpB destes organismos, apontam para um alto grau de conservação entre as Oligopeptidases B de tripanosomatídeos.

Diferentes estudos apontam que a Oligopeptidase B seja um gene de cópia única em tripanosomatídeos (BURLEIGH et al., 1997; MORTY et al., 1999a; GUEDES et al., 2007, COETZER et al., 2008). Entretanto, a busca *in silico* pela OpB no banco de dados do TriTryp revela que o gene está presente em mais de um cromossomo, indicando que o gene deve possuir mais de uma cópia no genoma deste parasito. A busca *in silico* pelo gene da OpB na atual montagem do genoma do *T.*

rangeli revela uma única cópia para cada um dos genes que codificam para as proteínas Prolil oligopeptidase (Tr04194, *eval*=0, 83% identidade com *T. cruzi*) e Oligopeptidase B (Tr05271, *eval*=0, 84% identidade com *T. cruzi*). Ainda que possua uma boa cobertura e sequências de alta qualidade, esta análise *in silico* do genoma do *T. rangeli* não é conclusiva e deve ser confirmadas a posteriori através de ensaios de *Southern blot*.

O gene da OpB codifica um peptídeo de 713 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 80 kDa, conforme o esperado para proteínas pertencentes à família das prolil endopeptidases (COETZER et al., 2008) e também observado para outros tripanosomatídeos como para *T. evansi*, 80.664 kDa (MORTY et al., 2005) e *L. amazonensis*, 83,49 kDa (GUEDES et al., 2007). A OpB de *T. cruzi*, com a qual a sequência aminoacídica da OpB de *T. rangeli* apresentou maior similaridade, possui também, massa molecular predita de aproximadamente 80 kDa e migra em gel desnaturante com esta massa molecular. No entanto, em condições não desnaturantes, quando um tampão de amostra sem SDS e DTT é utilizado e, sem ferver previamente a amostra (SANTANA et al., 1992; BURLEIGH et al., 1997; FERNANDES et al., 2005) apresenta uma banda de 120 kDa, a qual seria a forma ativa da proteína *in gel* (FERNANDES et al., 2005).

No decorrer deste estudo, uma banda entre 37 kDa e 50 kDa foi reconhecida pelo anticorpo Hisprobe durante o processo de purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade a metal. Devido a um sítio de autoclivagem presente na proteína e ao forte reconhecimento pelo anticorpo anti-Histidina, esta proteína é, possivelmente, um produto de degradação da OpB. Da mesma maneira, uma banda de aproximadamente 40 kDa foi observada por Caler (1998) ao purificar a OpB recombinante de *T. cruzi*.

A OpB está presente em todos os estágios biológicos de tripanosomatídeos como *T. cruzi* (BURLEIGH et al., 1997) e *L. amazonensis* (GUEDES et al., 2007), o que também foi observado neste trabalho para o *T. rangeli*, uma vez que o soro anti-OpB reconheceu uma banda de aproximadamente 80 kDa no extrato proteico de formas epimastigotas e tripomastigotas deste parasito, confirmando a presença desta proteína em ambos os estágios biológicos. O soro policlonal reconheceu, também, uma banda de mesma massa molecular referente a OpBr, bem como nos extratos proteicos das duas formas biológicas de *T. cruzi*, neste caso, em sua forma desnaturada (FERNANDES et al., 2005).

Apesar de a OpB ter sua função principalmente relacionada às formas infectantes dos parasitos em que foi descrita (CALER et al., 1998), a expressão desta proteína em formas epimastigotas (não infectantes) pode ser em decorrência de seu envolvimento em outros processos e rotas metabólicas do ciclo biológico destes parasitos. Um importante evento biológico no ciclo de vida do *T. rangeli* no hospedeiro invertebrado é sua habilidade de ativar o sistema proPO (profenoloxidase) de triatomíneos. O sistema proPO de artrópodos requer clivagens proteolíticas para sua ativação. Cammarata (2009) demonstrou que o nível de PO (fenoloxidase) ativada aumenta significativamente após a incubação com serina proteases e diminui com a adição de inibidores de proteases.

Gomes e colaboradores (1999) demonstraram, ao estudar o sistema proPO de *R. prolixus*, que formas curtas, mas não longas, de *T. rangeli* são capazes de ativar a formação de melanina através do sistema proPO. Um estudo utilizando duas cepas diferentes deste parasito para inocular *R. prolixus*, no entanto, mostrou que a cepa H14, que não foi capaz de se multiplicar e invadir a glândula salivar, estimulou significativamente mais o sistema proPO que a cepa Choachí, que teve uma multiplicação rápida para invadir a glândula salivar e ser transmitida para o hospedeiro mamífero (WHITTEN et al., 2001). Entretanto, ainda existem poucos estudos relacionando este sistema e infecções por *T. rangeli* e, principalmente, sobre o papel das serina proteases na ativação do mesmo.

Durante o processo de interação do *T. cruzi* com a célula do hospedeiro mamífero ocorre mobilização de Ca^{+2} de ambas as células para a formação do vacúolo parasitóforo (BURLEIGH et al., 1997), onde o parasito permanecerá por pouco tempo até se diferenciar em formas amastigotas, dando continuidade ao ciclo biológico através de sua multiplicação. A OpB desempenha seu papel na invasão celular deste parasito ao ativar um precursor agonista de Ca^{+2} o qual irá desencadear a liberação de Ca^{+2} dos reservatórios celulares. Este aumento na concentração de Ca^{+2} é necessário para o recrutamento de lisossomos para o sítio de adesão do parasito à célula e consequente formação do vacúolo parasitóforo (TARDIEUX et al., 1994; RODRÍGUEZ et al., 1995, 1997).

A fim de avaliar se a OpB de *T. rangeli* desempenha papel semelhante ao desempenhado pela OpB de *T. cruzi*, células Vero foram tratadas com Fluo-3/AM e a mobilização de Ca^{+2} mensurada através da

fluorescência emitida devido à adição dos extratos proteicos solúveis dos parasitos. O extrato proteico solúvel das formas tripomastigotas de *T. rangeli* apresentou emissão de fluorescência significativa em relação aos controles e, como já era esperado, o mesmo aconteceu para o extrato proteico das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, o que já havia sido descrito por Burleigh e Andrews (1995).

Entretanto, em contradição com os resultados apresentados até então, em que formas epimastigotas de *T. cruzi* não foram capazes de mobilizar Ca^{+2} (BURLEIGH; ANDREWS, 1995; 1997), os extratos proteicos das formas epimastigotas, tanto de *T. cruzi* como de *T. rangeli*, foram capazes de mobilizar Ca^{+2} da célula hospedeira, no entanto esta mobilização não foi estatisticamente significativa em relação aos controles negativos nem em relação aos extratos das formas tripomastigotas destes parasitos.

Apesar de haver uma redução na emissão de fluorescência pelos extratos de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* tratados com o soro anti-OpB, o envolvimento da OpB na mobilização de Ca^{+2} intracelular em *T. rangeli* não pode ser confirmado através deste experimento, uma vez que esta redução não foi estatisticamente significativa. Entretanto, o soro anti-OpB reduziu de forma significativa a mobilização de Ca^{+2} no extrato proteico das formas tripomastigotas de *T. cruzi*, este resultado foi observado por Burleigh e Andrews (1997), de forma que o anticorpo direcionado à peptidase recombinante inibiu tanto a atividade da peptidase quanto a sinalização de Ca^{+2} na célula do hospedeiro mamífero, provando o direto envolvimento da OpB neste processo de sinalização.

No entanto, Fernandes e colaboradores (2005), observaram um aumento da atividade da OpB ao incubar a proteína recombinante com soro de indivíduos chagásicos e não-chagásicos. Sendo a atividade reduzida em razão da diluição dos soros. Neste mesmo trabalho, também foi mostrado que um dos principais componentes do soro, a imunoglobulina G (IgG), aumenta a atividade da OpB. Estes resultados foram observados apenas nas formas infectantes do parasito. Os resultados apresentados nesta dissertação, com relação à redução da atividade pela adição de soro anti-OpB podem, possivelmente, ser melhorados quanto a sua resposta e confiabilidade através de um aumento do tempo de tratamento das amostras com o antissoro, bem como com o aumento do número amostral.

Uma ampla variedade de proteínas está envolvida no processo de invasão celular, desde a adesão do parasito à célula até sua

internalização na célula hospedeira (ANDREWS et al., 1988; BARRY et al., 1990; KATZIN; COLLI, 1993; MANQUE et al., 2000; BUSCAGLIA, et al., 2006). Dentre estas proteínas existem outras, além da Oligopeptidase B, que estão envolvidas em cascatas de mobilização de Ca^{+2} , como por exemplo a gp82 (RUIZ et al., 1998; YOSHIDA et al., 2000). Estudos realizados pelo grupo de pesquisa do nosso laboratório, relativos a esta proteína, revelam a sua importância durante a interação do parasito com a célula hospedeira. Formas tripomastigotas de *T. rangeli* transfectadas com o gene que codifica para a proteína gp82 de *T. cruzi*, submetidos ao mesmo teste de atividade apresentam mobilização de Ca^{+2} significativamente maior em relação aos parasitos não transfectados. Desta maneira, pode-se atribuir a mobilização de Ca^{+2} que se manteve nas amostras tratadas como o soro anti-OpB, não só à baixa eficiência do soro, mas também à ação destas demais proteínas.

O tratamento dos extratos proteicos dos parasitos com os inibidores de proteases (E64, AEBSF; Pepstatina A; Aprotinina; Bestatina e Leupeptina) não foi eficaz na inibição da atividade da OpB. O que se observou, no entanto, foi um aumento na emissão da fluorescência das amostras tratadas. Resultados semelhantes foram observados para *T. cruzi* (BURLEIGH; ANDREWS, 1995; MCLUSKEY et al., 2010), *T. brucei* (MORTY et al., 1999a), *T. congolense* (MORTY et al., 1999b) em que os inibidores E-64, Pepstatina A, bem como EDTA e PMSF (fenilmetilsulfonilfluorido), não foram capazes de inibir a atividade da OpB destes tripanosomatídeos. Entretanto, o inibidor de serina proteases AEBSF reduziu a atividade da OpB de *T. cruzi* em 90% de acordo com os resultados de McLuskey e colaboradores (2010).

Apesar de os extratos proteicos solúveis dos parasitos apresentarem atividade, a OpBr de *T. rangeli* mostrou-se incapaz de mobilizar Ca^{+2} dos reservatórios presentes na célula hospedeira, tal resultado pode ser devido ao dobramento incorreto da proteína durante o processo de expressão e purificação da mesma. No entanto, o mesmo resultado foi observado para a OpBr de *T. cruzi* em sua forma ativa (120 kDa), a qual não foi capaz de mobilizar Ca^{+2} (BURLEIGH; ANDREWS, 1995; BRULEIGH et al., 1997).

Outra possível explicação para estes resultados é o fato de a OpB agir de forma indireta, ou seja, através da clivagem de um precursor inativo para gerar um agonista de Ca^{+2} ativo, o qual será liberado pelo parasito e irá reconhecer o receptor na superfície da célula

hospedeira, desencadeando o processo de liberação de Ca^{+2} (BURLEIGH; WOOLSEY, 2002). Este precursor inativo estaria presente nos extratos solúveis dos parasitos, porém ausente na OpBr.

Diversos estudos de interação parasito/célula hospedeira já foram realizados com cepas de *T. rangeli* isoladas de diferentes regiões geográficas e distintas linhagens celulares (EGER et al., 1997; GRISARD et al., 1999) buscando elucidar o ciclo de vida deste parasito. Em 1995, Osorio e colaboradores revelaram que o clone Ub66-5b da cepa San Agustín de *T. rangeli*, proveniente de cultura e de glândula salivar de *Rhodnius prolixus*, foi capaz de infectar a linhagem celular U937 (promonócito) em baixas proporções.

O mesmo acontece com as cepas SC-58, Macías e Choachí ao interagirem com células Vero e promonócitos J774G.8, em que apenas uma ou duas formas intracelulares foram observadas por célula infectada 72 horas após a interação (EGER-MAGRICH et al., 2001). Entretanto, ambos os autores constatam que, apesar de os parasitos manterem-se viáveis no interior das células por um tempo prolongado, superior a 144 horas (EGER-MANGRICH et al., 2001) e mais de 25 dias (OSORIO et al., 1995), não há evidência de multiplicação intracelular destes parasitos.

O trajeto percorrido pelo *T. rangeli* após seu primeiro contato com a célula hospedeira ainda não foi descrito com clareza. Desta maneira, procurou-se avaliar a participação da OpB neste processo, através da análise dos níveis de expressão desta proteína durante a interação do parasito com a célula hospedeira. A interação do *T. rangeli* com células Vero apresentou um nível significativamente maior de expressão da OpB já no primeiro tempo de interação avaliado (30 minutos) em comparação com o nível de expressão dos parasitos que não tiveram contato com as células. Tal expressão manteve-se relativamente constante durante os demais tempos observados (3 e 10 horas).

Este aumento rápido na expressão da OpB reforça o comportamento observado em ensaios de interação do *T. rangeli* com células não-fagocíticas (EGER et al. 1997, EGER-MANGRICH et al., 2001), nos quais as interações são rápidas, sendo necessário um aumento na expressão da proteína assim que o parasito entra em contato com a célula, porém ineficientes, já que não observa-se multiplicação das formas internalizadas. A partir deste resultado em que observa-se um aumento significativo da expressão da OpB em *T. rangeli*, experimento visando confirmar o recrutamento de lisossomos e

formação de um vacúolo parasitóforo, semelhante ao que se observa para *T. cruzi* poderão ser realizados.

Os ensaios de interação com as formas tripomastigotas de *T. cruzi*, entretanto, apresentaram aumento significativo de expressão da OpB somente após 10 horas de interação com as células. Este período condiz com o tempo necessário para a interação e internalização do parasito, uma vez que parasitos internalizados em vacúolos já podem ser observados a partir de 18 horas após a infecção (MEIRELLES et al., 1987). Observando-se para estes parasitos, como descrito por Romaña e Meyer (1942), uma interação mais lenta e eficiente, em que células infectadas rompem-se liberando novos tripomastigotas após o quinto dia de infecção.

Um outro ponto, relativo à metodologia utilizada neste ensaio, deve ser considerado com relação aos resultados obtidos para *T. cruzi*: as formas tripomastigotas utilizadas para a interação com as células Vero foram obtidas de cultura celular, ou seja, estes parasitos já estavam em constante contato com as células, apesar do tempo de preparo dos mesmos para a posterior realização do experimento. Desta maneira, durante os primeiros tempos avaliados (30 minutos e 3 horas) a expressão da OpB manteve-se semelhante ao observado para os parasitos no tempo zero. Sendo a expressão da OpB aumentada de maneira mais lenta (após 10 horas), porém de forma significativa, possivelmente para manter a eficiência da infecção.

Uma vez que há um aumento significativo na expressão da OpB quando o *T. rangeli* interage com a célula podemos afirmar a participação desta proteína no processo de interação parasito/ célula hospedeira, no entanto, a possibilidade de formação de um vacúolo parasitóforo não pode ser avaliada a partir deste resultado. Podemos inferir ainda, a partir destes resultados, que a atividade observada pela capacidade dos extratos de formas tripomastigotas de *T. rangeli* de mobilizar Ca^{+2} da célula hospedeira é proveniente, ao menos em parte, da ação da OpB. A fim de aprofundar os conhecimentos obtidos a respeito da expressão da OpB em *T. rangeli*, pretende-se avaliar a produção de mRNA por qPCR de forma a correlacionar o padrão de transcrição, os níveis de expressão da proteína e a atividade da Oligopeptidase B de *T. rangeli* no processo de interação parasito/células *in vitro*.

Além disso, a OpB de *T. rangeli* parece agir de forma semelhante à OpB de *T. cruzi*, com relação à necessidade de um

precursor inativo de Ca^{+2} , uma vez que a OpBr não apresentou atividade sozinha. Seguindo o curso dos resultados apresentados até aqui, aspectos mais pontuais da interação do parasito com a célula, como o recrutamento de lisossomos através da mobilização de Ca^{+2} observada e posterior formação de um vacúolo parasitóforo poderão ser avaliados, trazendo mais clareza ao percurso percorrido por este parasito no hospedeiro mamífero.

6 CONCLUSÕES

- A sequência gênica da OpB de *T. rangeli* constitui uma ORF de 2.139 pb, codificando para um polipeptídeo de 713 aminoácidos com 80.2 kDa de peso molecular e pI de 5.89.
- A análise da sequência aminoacídica da OpB de *T. rangeli* revelou a presença do domínio conservado da família protil endopeptidase, contendo a tríade catalítica formada por uma Serina, uma Histidina e um Aspartato conservada, onde a Serina é o sítio ativo;
- A expressão heteróloga da OpB em *E. coli* foi obtida com sucesso, sendo a proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade a metal a partir da fração insolúvel do extrato bacteriano;
- A OpB de *T. rangeli* em sua forma recombinante (OpBr) obtida pela expressão heteróloga em *E. coli* não apresenta atividade, avaliada pela mobilização de Ca^{+2} ;
- O soro policlonal dirigido a OpBr, produzido em camundongos BALB/c, reconhece uma proteína de aproximadamente 80 kDa nos extratos proteicos solúveis de formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli* e *T. cruzi*, bem como a proteína recombinante;
- Os extratos solúveis das formas tripomastigotas de *T. rangeli* mobilizam Ca^{+2} da célula hospedeira;
- As formas tripomastigotas de *T. rangeli* apresentam um aumento significativo na expressão da OpB quando em contato com células não-fagocíticas da linhagem Vero.

A OpB, presente nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. rangeli*, mostrou ter capacidade de mobilizar Ca^{+2} dos reservatórios da célula hospedeira, sendo tal capacidade observada apenas para formas tripomastigotas deste parasito. O envolvimento da OpB na interação do *T. rangeli* com células da linhagem Vero foi constatado pelo aumento da expressão desta proteína quando os parasito entraram em contato com a célula hospedeira.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para a elucidação do ciclo de vida do *T. rangeli*, principalmente com relação a sua interação com o hospedeiro mamífero, focando especialmente na participação de proteases neste importante evento. Desta maneira, a fim de aprofundar os conhecimentos obtidos a respeito da expressão da OpB em *T. rangeli*, pretende-se avaliar a produção de mRNA por qPCR de forma a correlacionar o padrão de transcrição, os níveis de expressão da proteína e a atividade da Oligopeptidase B de *T. rangeli* no processo de interação parasito/células *in vitro*.

Uma vez que, apesar de diminuída, ainda foi observada mobilização de Ca^{+2} nos extratos solúveis dos parasitos tratados com o soro anti-OpB, e sabendo-se da presença de outras proteínas do parasito envolvidas no processo de penetração e invasão do parasito utilizando também o mecanismo de mobilização de Ca^{+2} da célula hospedeira, espera-se encontrar um inibidor de proteases mais específico para OpB a fim de reforçar o papel desta proteína na invasão celular.

Uma característica interessante de vários tripanosomatídeos é sua capacidade de invadir células do hospedeiro de forma ativa, ou seja, células não fagocíticas através de mecanismos de sinalização celular próprios. Sabendo-se que a mobilização de Ca^{+2} pela OpB é um desses mecanismos e que tem como objetivo o recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada do parasito na célula, pretende-se avaliar este recrutamento através de uma reação de imunofluorescência indireta (RIFI) onde tanto a localização dos lisossomos quanto a reestruturação dos filamentos de actina poderão ser avaliados. Este resultado será de grande importância uma vez que ainda há várias dúvidas com relação ao que ocorre com o *T. rangeli* após sua entrada na célula e se há ou não a formação de um vacúolo parasitóforo como ocorre com o *T. cruzi*.

Outra maneira de se avaliar a importância da OpB na formação de um vacúolo parasitóforo para o *T. rangeli* seria a transfecção do gene da OpB de *T. cruzi* para o *T. rangeli* aclopado a um gene marcador, metodologia que já está padronizada e é utilizada de modo eficaz em nosso laboratório de pesquisa. Podendo-se avaliar ainda, caso haja a formação de um vacúolo pelos parasitos transfectados, a capacidade de este parasito multiplicar-se dentro da célula hospedeira.

Apesar da capacidade de infectar células não fagocíticas, as primeiras células com que o parasito entra em contato durante uma

infecção *in vivo* são células do sistema imune do hospedeiro, desta maneira, outra perspectiva para este trabalho é avaliar a expressão da OpB durante a interação do parasito com células fagocíticas, como macrófagos humanos por exemplo.

Uma vez que a OpB é também expressa nas formas epimastigotas de *T. rangeli* e que este parasito interage com células do hospedeiro invertebrado, como por exemplo as células do epitélio intestinal, glândula salivar, bem como hemócitos, estudos relacionados a função desta proteína na interação deste parasito com o hospedeiro triatomíneo podem proporcionar um maior esclarecimento à interação parasito/ vetor.

Além disso, uma vez que a proteína recombinante, obtida a partir da fração insolúvel dos extrato bacterianos, não apresentou a capacidade de mobilizar Ca^{+2} intracelular da célula hospederia, metodologias diferentes das realizadas neste trabalho poderão ser utilizadas com o objetivo de expressar e purificar a proteína OpB a partir do extrato bacteriano solúvel e posterior reavaliação da atividade desta proteína.

Por fim, este trabalho soma-se a outros estudos desenvolvidos pelo grupo no sentido de estudar a interação do *T. rangeli* com células de mamíferos, dentre os quais destacamos as diferentes moléculas de superfície como gp63, gp82 e gp85, possuindo estes estudos dados genômicos, transcriptômicos e proteômicos que permitem a avaliação da relevância biológica destas moléculas na interação *T. rangeli*-hospedeiro e *T. rangeli*-vetor.

8 REFERÊNCIAS

AFCHAIN D. et al. Antigenic Make-Up Of *Trypanosoma cruzi* Culture Forms: Identification Of A Specific Component. **J Parasitol**, 65: 507-514, 1979.

ALTSCHUL S. F. et al. Basic Local Alignment Search Tool. **J Mol Biol**, 215: 403-410, 1990.

ANDREWS N. W. et al. Stage-Specific Surface Antigens During The Morphogenesis Of *Trypanosoma cruzi*: Developmentally Regulated Expression Of A Glycosyl-Phosphatidylinositol Anchored Glycoprotein Of Amastigotes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 1: 561-562, 1988.

AÑEZ N.; EAST J. S. Studies in *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920.II. Its Effects On The Feeding Behavior In Triatomine Bugs. **Acta Trop**, 41: 93-95, 1984.

ANTHONY R. L. et al. Use Of Micro-ELISA For Quantitating Antibody To *Trypanosoma cruzi* And *Trypanosoma rangeli*. **J Trop Med Hyg**, 28: 969-973, 1979.

AZAMBUJA P., RATCLIFFE N. A., GARCIA E. S. Towards An Understanding Of The Interactions Of *Trypanosoma cruzi* And *Trypanosoma rangeli* Within The Reduviid Insect Host *Rhodnius prolixus* **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, 77: 397-404, 2005.

BARRETO-SANTANA D. et al. Comparative Biology And Feeding Behavior Of *Rhodnius neglectus* And *Rhodnius robustus* (Triatominae) Under Laboratory Conditions. **Rev Soc Bras de Med Trop**, 44:490-495, 2011.

BARRETT A. J., RAWLINGS N. D. Families and clans of serine peptidases. **Arch Biochem Biophys**, 318: 247-250, 1995.

BARRY J. D. et al. Specific Mechanisms For Activation And Expression Of Variant Surface Glycoprotein Genes In *Trypanosoma brucei*. **Biochem Soc Trans**, 18: 708-710, 1990.

BASSO B. et al. Vaccination With *Trypanosoma rangeli* Reduces The Infectiousness Of Dogs Experimentally Infected With *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine**, 25 :3855-3858, 2007.

BASSO B., MORETTI E. R., VOTTERO-CIMA E. Immune Response And *Trypanosoma cruzi* Infection In *Trypanosoma rangeli*-Immunized Mice. **Am J Trop Med Hyg**, 44: 413-419, 1991.

BASSO B. et al. Vaccination With *Trypanosoma rangeli* Reduces The Infectiousness Of Dogs Experimentally Infected With *Trypanosoma cruzi*. **Vaccine**, 25 :3855-3858, 2007.

BASSO B., MORETTI E., FRETES R. Vaccination With Epimastigotes Of Different Strains Of *Trypanosoma rangeli* Protects Mice Against *Trypanosoma cruzi* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 103: 370-374, 2008.

BASTOS I. M. et al. Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas disease, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. **Curr Med Chem**, 2013.

BRADFORD M.M. A Rapid And Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. **Anal Biochem**, 72: 248-254, 1976.

BRANDENBERGER G. et al., Disruption Of Endocrine Rhythms In Sleeping Sickness With Preserved Relationship Between Hormonal Pulsatility And The REM-NREM Sleep Cycles. **J Biol Rhythms**, 11: 258-267, 1996.

BURLEIGH B. A. et al. A Cytosolic Serine Endopeptidase From *Trypanosoma cruzi* Is Required For The Generation Of Ca^{2+} Signaling In Mammalian Cells. **J Cell Biol**, 136: 609-620, 1997.

BURLEIGH B. A., ANDREWS N. W. A 120-Kda Alkaline Peptidase From *Trypanosoma cruzi* Is Involved In The Generation Of A Novel Ca^{+2} -Signaling Factor For Mammalian Cells. **J Biol Chem**, 270: 5172-5180, 1995.

BURLEIGH B. A., ANDREWS N. W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Curr Opin Microbiol**, 461-465, 1998.

BURLEIGH B. A.; WOOLSEY A. M. Cell Signalling And *Trypanosoma cruzi* Invasion-Microreview. **Cel Microbiol**, 11: 701-711, 2002.

BUSCAGLIA C. A. et al. *Trypanosoma cruzi* Surface Mucins: Host-Dependent Coat Diversity. **Nature Ver Microb**, 4: 229-236, 2006.

CALER E. V. et al. Oligopeptidase B-Dependent Signaling Mediates Host Cell Invasion By *Trypanosoma cruzi*. **The EMBO Journal**, 17: 4975-4986, 1998.

CAMMARATA M., PARRINELLO N. The Ascidian Prophenoloxidase Activating System. **ISJ**, 6: 67-76, 2009.

CARRIÓ M. M.; VILLAVERDE A. Protein Aggregation As Bacterial Inclusion Bodies Is Reversible. **FEBS Letters**, 489: 29-33. 2001.

CAZZULO J. J. Proteinases Of *Trypanosoma cruzi*: Potential Targets For The Chemotherapy Of Chagas Disease. **Curr Top Med Chem**, 2: 1261-1271, 2002.

COETZER T. H. T, DEAN GOLDRING J. P., HUSON. L. E. J. Oligopeptidase B: A Processing Peptidase Involved In Pathogenesis. **Biochimie**, 90: 336 e 344, 2008.

COURA J. R. et al. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 90: 278-279, 1996.

CUBA CUBA A. Review Of The Biological And Diagnostic Aspects Of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Ver Soc Bras Med Trop**, 31: 207-220, 1998.

D'ALESSANDRO A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of Kinetoplastida**, 1976.

D´ALESSANDRO A., SARAVIA N. G. *Trypanosoma rangeli*. **Parasitic protozoa**. Edited by Kreir JP, Baker J. London: Academic; 1-54, 1992.

D´ALESSANDRO A. et al. *Trypanosoma rangeli*. **Protozoal Diseases**. Gille H. M. (editor). Editora Arnold, 398-412, 1999.

DE LEON J. R. Nota Preliminar Acerca De La Enfermedad De Chagas Em Guatemala. Casos Encontrados Em El Oriente De La Republica Y Probable Existencia De Un Nuevo Tripanosoma Humano. **Rev Cruz Roja Guatemalteca**, 9: 131-132. 1942.

DUSCHAK V. G., COUTO A. S. An Insight on Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, 2: 19-51, 2007.

EGER I. et al. Absence Of In Vitro Multiplication Of *Trypanosoma rangeli* Within A Murine Promonocyte Cell Line. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 92: 105, 1997.

EGER-MANGRICH et al. Interaction Of *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920 With Different Cell Lines In Vitro. **Parasitol Res**, 87: 505-509, 2001.

EWING B. et al. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. **Genome Res**, 8: 175-185, 1998.

EWING B., GREEN P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. **Genome Res**, 8: 186-194, 1998.

FERNANDES L. C. et al. Specific Human Antibodies Do Not Inhibit *Trypanosoma cruzi* Oligopeptidase B And Cathepsin B, And Immunoglobulin G Enhances The Activity Of Trypomastigote-Secreted Oligopeptidase B. **Microbes Infect**. 7: 375 e 384, 2005.

FERREIRA L. L. et al. A Standardizable Protocol For Infection Of *Rhodnius prolixus* With *Trypanosoma rangeli*, Which Mimics Natural Infections And Reveals Physiological Effects Of Infection Upon The Insect. **J Invertebr Pathol**, 105: 91-97, 2010.

FÜLÖP V.; BÖCSKEI Z.; POLGÁR. Prolyl Oligopeptidase: An Unusual b-Propeller Domain Regulates Proteolysis. **Cell**, 94: 161-70, 1998.

GAMBOA D., VANEYS G., VICTOIR K., Putative Markers Of Infective Life Stages In *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasitology**, 134: 1689-1698, 2007.

GARCIA E. S. et al. Parasite-Mediated Interactions Within The Insect Vector: *Trypanosoma rangeli* Strategies. **Parasites & Vectors**, 5:105, 2012.

GARCIA E. S., AZAMBUJA P. Development And Interactions Of *Trypanosoma cruzi* Within The Insect Vector. **Parasitol Today**, 7: 240-244, 1991.

GARCIA E.S. et al., *Rhodnius prolixus* Salivary Anti-Hemostatic Components Decrease With *Trypanosoma rangeli* Infection. **Exp Parasitol**, 78: 287-293, 1994.

GOMES S. A. O. et al. *Rhodnius prolixus* Infected With *Trypanosoma rangeli*: *in vivo* And *in vitro* Experiments. **J Invertebr Pathol**, 73: 289-293, 1999.

GRISARD E. C. et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 94: 203-209, 1999.

GRISARD E. C. et al. Transcriptomic Analyses Of The Avirulent Protozoan Parasite *Trypanosoma rangeli*. **Mol Biochem Parasitol**, 174:18-25, 2010.

GRISARD E. C.; STEINDEL M. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. **Parasitologia Humana**, Davis P. Neves (editor). Editora Atheneu, 12^a edição. 2005.

GUEDES H. L. M. et al. Oligopeptidase B From *L. amazonensis*: Molecular Cloning, Gene Expression Analysis And Molecular Model. **Parasitol Res**, 101: 853 e 863, 2007.

GUHL F., VALLEJO G. A. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: An Updated Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 98: 435-442, 2003.

HECKER H., SCHWARZENBACH M., RUDIN W. Development And Interactions Of *Trypanosoma rangeli* In And With The Reduviid Bug, *Rhodnius prolixus*. **Parasitol Res**, 76: 311-318, 1990.

HOARE C.A.; WALLACE F.G. Developmental Stages Of Trypanosomatid Flagellate: A New Terminology. **Nature**, 244: 69-70, 1966.

HOLZER T. R., MCMASTER W. R., FORNEY J. D. Expression Profiling By Whole-Genome Interspecies Microarray Hybridization Reveals Differential Gene Expression In Procyclic Promastigotes, Lesionderived Amastigotes, And Axenic Amastigotes In *Leishmania mexicana*. **Mol Biochem Parasitol**, 146: 198-218, 2006.

IVENS A. C., PEACOCK C. S., WORTHEY E. A. The Genome Of The Kinetoplastid Parasite *Leishmania major*. **Science**, 309: 436-42, 2005.

KATZIN A. M., COLLI W. Lectin Receptors In *Trypanosoma cruzi*: An N-Acetyl-Glucosamine Containing Surface Glycoprotein Specific For The Trypomastigote Stage. **Biochimica and Biophysica Acta**, 727: 403-411, 1993.

KOERICH L. B. et al. Differentiation Of *Trypanosoma rangeli*: High Production Of Infective Trypomastigote Forms *in vitro*. **P Research**, 88: 21-25, 2002.

KOLLIEN A. H., SCHAUB G. A. The Development Of *Trypanosoma cruzi* In Triatominae. **Parasitol Today**, 16: 381-387, 2000.

LEY V. et al. The Exit Of *Trypanosoma cruzi* From The Phagosome Is Inhibited By Raising The Ph Of Acidic Compartments. **J Exp Med**, 171: 401-413, 1990.

MAEDA F. Y., CORTEZ C., YOSHIDA N. Cell Signaling During *Trypanosoma cruzi* Invasion. **Frontiers in Immunology**, 3: 1-7, 2012.

MANQUE P. M. et al. Characterization Of The Cell Adhesion Site Of *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Stage Surface Glycoprotein gp82. **Infect Immun**, 68: 478-484, 2000.

MARINI V. et al. Vaccination With *Trypanosoma rangeli* Modulates The Profiles Of Immunoglobulins And IL-6 At Local And Systemic Levels In The Early Phase Of *Trypanosoma cruzi* Experimental Infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 106: 32-37, 2011.

MASLOW D. A.; SIMPSON L. Evolution Of Parasitism In Kinetoplastid Protozoa. **Parasitol Today**, 11: 30-32, 1995.

MCLUSKEY K. et al. Crystal Structure of *Leishmania major* Oligopeptidase B Gives Insight into the Enzymatic Properties of a Trypanosomatid Virulence Factor. **The journal of biological chemistry**, 285: 39249-39259, 2010.

MEIRELLES M. N. et al. *Trypanosoma cruzi*: Phagolysosomal Fusion After Invasion Into Non Professional Phagocytic Cells. **Cell Struct Funct**, 12:387-393, 1987.

MENTLEIN R. Proline Residues In The Maturation And Degradation Of Peptide Hormones And Neuropeptides. **FEBS Let**, 251-256, 1988.

MORAES M. H et al. Different Serological Cross-Reactivity Of *Trypanosoma rangeli* Forms In *Trypanosoma cruzi*-Infected Patients Sera. **Parasit Vectors**, 1: 20, 2008.

MORTY R. E. et al. Characterisation Of The Antitrypanosomal Activity Of Peptidyl Alpha-Aminoalkyl Phosphonate Diphenyl Esters. **Biochem Pharmacol**, 60: 1497-1504, 2000.

MORTY R. E. et al. Oligopeptidase B From *Trypanosoma brucei*, A New Member Of An Emerging Subgroup Of Serine Oligopeptidases. **J Biol Chem**, 274: 149-26, 1999 (a).

MORTY R. E. et al. Oligopeptidase B From *Trypanosoma evansi*. A Parasite Peptidase That Inactivates Atrial Natriuretic Factor In The Bloodstream Of Infected Hosts. **J Biol Chem**, 10925-10937, 2005.

- MORTY R. E. et al. Purification And Characterisation Of A Trypsin-Like Serine Oligopeptidase From *Trypanosoma congolense*. **Mol Biochem Parasitol**, 102: 145-155, 1999 (b).
- MORTY R. E., TROEBERG L., PIKE R. N. A Trypanosome Oligopeptidase As A Target For The Trypanocidal Agents Pentamidine, Diminazene And Suramin. **FEBS Lett**, 433: 251-256, 1998.
- MORTY R.E. et al. Trypanosoma-Derived Oligopeptidase B Is Released Into The Plasma Of Infected Rodents, Where It Persists And Retains Full Catalytic Activity. **Infect Immun**, 69: 2757-2761, 2001.
- MOTTA F. N. et al. The *Trypanosoma cruzi* Virulence Factor Oligopeptidase B (OPBTc) Assembles Into An Active And Stable Dimer. **PLoS ONE** 7: e30431, 2012.
- OSORIO Y. et al. Infectivity Of *Trypanosoma rangeli* In A Promonocytic Mammalian Cell Line. **J. Parasitol**, 81: 687-693, 1995.
- PACAUD M.; RICHARD C. Protease II From *Escherichia coli*. Purification And Characterization. **J Biol Chem**, 250: 7771-7779, 1975.
- PAIM R. M. M. et al. The Interaction Between *Trypanosoma rangeli* And The Nitrophorins In The Salivary Glands Of The Triatomine *Rhodnius prolixus* (Hemiptera; Reduviidae) Insect. **Biochemistry and Molecular Biology**, 43: 229 e 236, 2013.
- PEACOCK C. S., SEEGER K., HARRIS D. Comparative Genomic Analysis Of Three *Leishmania* Species That Cause Diverse Human Disease. **Nat Genet**, 39: 839-47, 2007.
- POLGÁR L. A Potential Processing Enzyme In Prokaryotes: Oligopeptidase B, A New Type Of Serine Peptidase. **Proteins**, 28: 375-379, 1997.
- PRESTES E. B. et al. *Trypanosoma rangeli* Protein Tyrosine Phosphatase Is Associated With The Parasite's Flagellum. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 107: 713-719, 2012.

PRESTES E. B. Marcadores Moleculares E Morfológicos Da Citocinese Em *Trypanosoma rangeli*, 2013 (dissertação).

RAWLINGS N. D., MORTON F. R., BARRETT A. J. MEROPS: The Peptidase Database. **Nucleic Acids Res**, 34: D270-D272, 2006.

REA D. et al. Expression, Purification And Preliminary Crystallographic Analysis Of Oligopeptidase B From *Trypanosoma brucei*. **Acta Cryst**, 62: 808-810, 2006.

REA D., FÜLÖP V. Prolyl Oligopeptidase Structure And Dynamics. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, 10: 306-310, 2011

RODRÍGUEZ A. et al. A Trypanosome-Soluble Factor Induces IP3 Formation, Intracellular Ca⁺² Mobilization And Microfilament Rearrangement In Host Cells. **J Cell Biol**, 129: 1263-1273, 1995.

RODRÍGUEZ, A. Lysosomes Behave As Ca⁺²-Regulated Exocytic Vesicles In Fibroblasts And Epithelial Cells. **J Cell Biol**, 137: 93-104, 1997.

ROMAÑA C., MEYER H. Estudo Do Ciclo Evolutivo Do “*Schizotrypanum cruzi*” Em Cultura De Tecidos De Embrião De Galinha. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 37: 19-27, 1942.

ROMERO I. C., SARAIVA N. G, WALKER J. Selective Action Of Fluoroquinolones Against Intracellular Amastigotes Of *Leishmania (Viannia) panamensis in vitro*. **J Parasitol**, 91: 1474-1479, 2005.

ROSENZWEIG D. et al. *Leishmania* Metabolism: From Sand Fly Gut To Human Macrophage. **The FASEB Journal**, 22, 2008.

ROSESTOLATO C. T. F. et al. Participation Of Host Cell Actin Filaments During Interaction Of Trypomastigotes Forms Of *Trypanosoma cruzi* With Host Cell. **Cell Structure and Function**, 27: 91-98, 2002.

RUIZ R. C. et al. Infectivity Of *Trypanosoma cruzi* Strains Is Associated With Differential Expression Of Surface Glycoproteins With Differential Ca⁺² Signalling Activity. **Biochem J**, 330: 505-511, 1998.

SAMBROOK J., RUSSELL D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York. 2001.

SANTANA J. M. et al. Purification And Characterization Of A New 120 Kda Alkaline Proteinase Of *Trypanosoma cruzi*, **Biochem Biophys Res Commun**, 187: 1466-1473, 1992.

SCHAUB G. A The Effects Of Trypanosomatids On Insects. **Adv Parasitol**, 31:255-319, 1992.

SCHAUB G. A. Pathogenicity Of Trypanosomatids On Insects. **Parasitol Today**, 10:463-468, 1994.

SILVERMAN J. M., CHAN S. K., ROBINSON D.P. Proteomic Analysis Of The Secretome Of *Leishmania donovani*. **Genome Biol**, 9: R35, 2008.

SIQUEIRA A. M. Subfilo Mastigophora. In: **Parasitologia Humana**, Davis P. Neves (editor). Editora Atheneu, 11^a edição, 2005.

SWENERTON R. K. et al. The Oligopeptidase B Of *Leishmania* Regulates Parasite Enolase And Immune Evasion. **Journal of Biological Chemistry**, 286: 429-40, 2011.

SZELTNER I. et al. The PREPL A Protein, A New Member Of The Prolyl Oligopeptidase Family, Lacking Catalytic Activity. **Cell Mol Life Sci**, 62: 2376 e 2381, 2005.

SZELTNER Z. et al. Substrate-Dependent Competency Of The Catalytic Triad Of Prolyl Oligopeptidase. **J Biol Chem**, 277: 44597-44605, 2002.

TARDIEUX I., NATHANSON M. H.; ANDREWS N. W. Role In Host Cell Invasion Of *Trypanosoma cruzi*-Induced Cytosolic Free Ca⁺² Transients. **J Exp Med**, 179: 1017-1022, 1994.

TETAERT D. et al. Unusual Cleavage Of Peptidic Hormones Generated By Trypanosome Enzymes Released In Infested Rat Serum. **Int J Pept Protein Res**, 41: 147-152, 1993.

TOMLINSON S. et al. The Induction Of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote To Amastigote Transformation By Low pH. **Parasitology**, 110: 547-554, 1995.

TROEBERG L. et al. Proteases From *Trypanosoma brucei brucei*. Purification, Characterisation And Interactions With Host Regulatory Molecules. **Eur J Biochem**, 728-736, 1996.

TSUJI A., YUASA K., MATSUDA Y. Identification of Oligopeptidase B in Higher Plants. Purification and Characterization of Oligopeptidase B from Quiescent Wheat Embryo, *Triticum aestivum*. **J Biochem**, 136: 673-681, 2004.

URDANETA-MORALES S.; TEJERO F. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: Mouse Model For High, Sustained Parasitemia. **J Parasitol**, 71: 409-414, 1985.

VALLEJO G. A. et al. Behavior Of The Infection And Morphologic Differentiation Of *Trypanosoma cruzi* And *T. rangeli* In The Intestine Of The Vector *Rhodnius prolixus*. **Rev Bras Biol**, 48: 577-587, 1988.

WAGNER G. et al. The *Trypanosoma rangeli* Trypomastigote Surfaceome Reveals Novel Proteins And Targets For Specific Diagnosis. **Jornal of Proteomics**, 82: 52-63, 2013.

VARGAS N. et al. Amplification Of A Specific Repetitive DNA Sequence For *Trypanosoma rangeli* Identification And Its Potential Application In Epidemiological Investigations. **Exp Parasitol**, 96: 147-159, 2000.

WHITTEN M. M. et al. Role Of Superoxide And Reactive Nitrogen Intermediates In *Rhodnius prolixus* (Reduviidae)/ *Trypanosoma rangeli* Interactions. **Exp Parasitol**, 98: 44-57, 2001.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact Sheet No 340: **World Health Organization**, 2012.

WILLIAMSON Y. M. et al. Mass Spectrometric Analysis Of Multiple Pertussis Toxins And Toxoids. **J Biomed Biotechnol**, 1-9, 2010.

YOSHIDA N. et al. Signal Transduction Induced In *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes During The Invasion Of Mammalian Cells. **Braz J Med Biol Res**, 33: 269-278, 2000.