

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

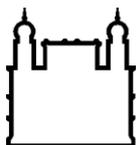
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

**COMPOSTO ATIVADOR DE PROCASPASE-1 INDUZ
APOPTOSE-LIKE EM *TRYPANOSOMA CRUZI***

EMANUELLA DE CASTRO

CURITIBA/PR

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia

Emanuella de Castro

COMPOSTO ATIVADOR DE PROCASPASE-1 INDUZ
APOPTOSE-LIKE EM *TRYPANOSOMA CRUZI*

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR, como requisito para a obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza.

Curitiba/PR

2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo dom da vida, a saúde e a sabedoria que me concedeu, e por estar sempre comigo me guiando e abençoando.

À minha orientadora, Dra. Tatiana Arruda Campos Brasil de Souza que me concedeu o prazer de ser sua aluna, e foi quem me incentivou durante todo esse período. Muito obrigada pelas constantes e produtivas orientações, que foram essenciais para a minha formação acadêmica, e por ter dedicado um tempo das suas férias para a conclusão desse trabalho. Obrigada pela paciência em ensinar, pela alegria contagiante, pela amizade e por ter confiado a mim esse lindo trabalho.

Aos demais pesquisadores do laboratório Dr. Nilson Tonin Zanchin e Dra. Beatriz Guimarães, que sempre muito atenciosos auxiliaram no andamento do trabalho com suas sugestões durante as reuniões de grupo.

À Dra. Andréa Rodrigues Ávila pela colaboração e pela oportunidade de aprender com sua experiência durante os ensaios de metaciclôgenese.

À Dra. Alessandra Melo de Aguiar e à M.e Thamile Luciane Reus que confiaram e se propuseram a ajudar na realização dos ensaios com células de mamíferos.

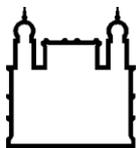
Ao Dr. Leonardo Foti e à Dra. Josiane Cardoso, membros da banca avaliadora do programa de pós-graduação, que participaram do andamento do trabalho sempre dispostos a ajudar e com novas sugestões durante as Jornadas acadêmicas.

Aos meus colegas de laboratório pela amizade, por todo auxílio oferecido e por terem deixado todo o trabalho mais divertido. Às minhas amigas Stephanie e Flávia pelas longas conversas e por terem me ajudado tanto durante todo esse período.

Aos meus pais, Dirceu e Doraci, e ao meu irmão, Emanuel por todo o apoio e compreensão, carinho e amor a mim dedicados. Sem vocês não seria nada, amo vocês.

Ao Herivelton, hoje meu esposo, por todo o apoio que me tem dado nesses 8 anos, e por me ajudar com opiniões, correções e revisões que me ajudaram muito. Obrigada por embarcar comigo em todas as minhas loucuras, te amo.

“A persistência é o menor caminho do êxito”
(Charles Chaplin)



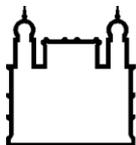
INSTITUTO CARLOS CHAGAS

COMPOSTO ATIVADOR DE PROCASPASE-1 INDUZ APOPTOSE-LIKE EM *TRYPANOSOMA CRUZI*

RESUMO DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Emanuella de Castro

A apoptose é um processo de morte celular extremamente regulado que requer interação de inúmeros fatores. São observadas alterações morfológicas características da morte celular por apoptose, geradas em consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados. A via de apoptose é utilizada como alvo para tratamento de doenças como Leishmaniose, portanto, o estudo de proteínas que regulam essa via em tripanosomatídeos se mostra bastante relevante. Diversos estudos mostraram a ocorrência de apoptose em organismos unicelulares, incluindo o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. Nesses organismos, as metacaspases (TcMCAs) parecem desempenhar um papel chave nesse processo, e foram identificadas duas metacaspases, a metacaspase-3 (TcMCA3) e a metacaspase-5 (TcMCA5). Esse trabalho forneceu dados a respeito da regulação de TcMCA3 através da interação com o composto ativador de procaspase-1 (PAC-1), um ativador de procaspase 3. A produção de TcMCA3 recombinante em *Escherichia coli* cepa *Tuner* (DE3) resultou na expressão e purificação de duas isoformas: TcMCA3 intacta (~50 kDa) e a enzima processada (~30 kDa). O ensaio de fluorimetria de varredura diferencial com a proteína recombinante e uma biblioteca de compostos que ativam apoptose em humanos identificou PAC-1 como um potencial ligante de TcMCA3. A interação de PAC-1 e TcMCA3 reduziu a viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi* com um IC₅₀ de 14,12 µM. PAC-1 causou perda no potencial mitocondrial e exposição de fosfatidilserina, características do processo apoptótico que foram identificados por citometria de fluxo. O tratamento em tripomastigotas metacíclicos não apresentou as mesmas características vistas em epimastigotas. Estes se mostraram mais resistentes ao tratamento, apresentando alteração no potencial de membrana mitocondrial, mas sem o rompimento da membrana celular ou exposição de fosfatidilserina. Análises de docking molecular mostram que a provável região da interação TcMCA3 e PAC-1 não é conservada em outros organismos. Além disso, ensaios de citotoxicidade com células de mamíferos (células 3T3) revelaram um IC₅₀ maior que o encontrado para epimastigotas, o que indica que Pac-1 afeta o parasita *T. cruzi* em doses menores que em células de mamíferos. Esses dados compõem o artigo "Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*, e são importantes para melhor compreensão da apoptose nesse organismo, e assim revelar um possível alvo para novos fármacos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

COMPOSTO ATIVADOR DE PROCASPASE-1 INDUZ APOPTOSE-LIKE EM *TRYPANOSOMA CRUZI*

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Emanuella de Castro

Apoptosis is a highly regulated cell death process that requires the interaction of numerous factors. Characteristic morphological changes are observed in apoptosis, generated as a consequence of specific molecular and biochemical events genetically regulated. The treatment of diseases such as Leishmaniasis targets the apoptosis pathway, therefore, the study of proteins that regulate this pathway in trypanosomatids is quite relevant. Several studies have shown the occurrence of apoptosis in unicellular organisms, including *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. In these organisms, the metacaspases (TcMCAs) appear to play a key role in this process, and two metacaspases have been identified in these organisms, the metacaspase-3 (TcMCA3) and the metacaspase-5 (TcMCA5). This work provided data regarding the regulation of TcMCA3 through interaction with the procaspase activating compound-1 (PAC-1), a procaspase 3 activator. The TcMCA3 recombinant production in *Escherichia coli* strain Tuner (DE3) resulted in the expression and purification of two isoforms: intact TcMCA3 (~50 kDa) and the processed enzyme (~30 kDa). The differential scanning fluorimetry assay with the recombinant protein and compounds that activates apoptosis in humans identified the PAC-1 as a potential TcMCA3 ligand. The interaction of PAC-1 and TcMCA3 reduced the viability of *T. cruzi* epimastigotes with an IC₅₀ of 14.12 µM. PAC-1 caused loss in mitochondrial potential and exposure of phosphatidylserine, features of the apoptotic process that were identified by flow cytometry. The treatment of metacyclic trypomastigotes did not result in the same characteristics seen in epimastigotes. Metacyclic trypomastigotes showed to be more resistant to the PAC-1 treatment, presenting alteration in the potential of mitochondrial membrane but without the rupture of the cellular membrane or exposure of phosphatidylserine. Molecular docking analyzes show that the probable region of the TcMCA3 and PAC-1 interaction is not conserved in other organisms. In addition, mammalian cell cytotoxicity assays (3T3 cells) revealed an IC₅₀ greater than that found for epimastigotes, indicating that PAC-1 affects the *T. cruzi* parasite at lower doses than in mammalian cells. These data comprise the article "Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*", and are important for understanding apoptosis in this organism, and thus reveal a possible target for new drugs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Prevalência estimada da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
Figura 1.2 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 1.3 Microscopia óptica das diferentes formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Figura 1.4 Características morfológicas de células em apoptose e em necrose.....	9
Figura 1.5 Mecanismo Anti-inflamatório de células apoptóticas.....	10
Figura 1.6 Ativação da procaspase durante a apoptose	11
Figura 1.7 - Estrutura do tetramero da caspase 3 complexo complexado ao peptídeo Ac-DEVD-CHO (PDB: 1PAU).....	12
Figura 1.8 Via extrínseca de ativação da apoptose.....	14
Figura 1.9 Via intrínseca de ativação da apoptose.....	15
Figura 1.10 - Estrutura da Metacaspase 2 de <i>Trypanosoma brucei</i> (TbMCA2)	18

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. DOENÇA DE CHAGAS	1
1.2. TRATAMENTO.....	3
1.3. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	4
1.4. TIPOS DE MORTE CELULAR EM <i>T. CRUZI</i>	7
1.4.1. Autofagia	7
1.4.2. Necrose	8
1.4.3. Apoptose	8
1.5. CASPASES	11
1.5.1. Vias de apoptose dependentes de caspase	13
1.6. METACASPASES	15
2. OBJETIVOS.....	20
2.2. OBJETIVO GERAL.....	20
2.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	20
3. ARTIGO 1: “Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in Trypanosoma cruzi”	21
4. DISCUSSÃO.....	36
5. CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
APÊNDICES.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é uma infecção parasitária, causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). Trata-se de uma doença negligenciada e endêmica na América Latina, onde cerca de 8 milhões de pessoas estão infectadas. É estimado que mais de 10.000 pessoas morram todos os anos por causa das manifestações clínicas causadas pela doença, além de mais de 25 milhões de pessoas que correm o risco de adquirir a doença (WHO, 2017).

A doença é encontrada principalmente em 21 países latino-americanos, mas ao longo do último século se espalhou para outros continentes principalmente pela movimentação populacional (figura 1.1) (WHO, 2017). Nos Estados Unidos da América, estima-se que 300 mil imigrantes residentes estejam infectados pelo *T. cruzi* (BERN; MONTGOMERY, 2009).

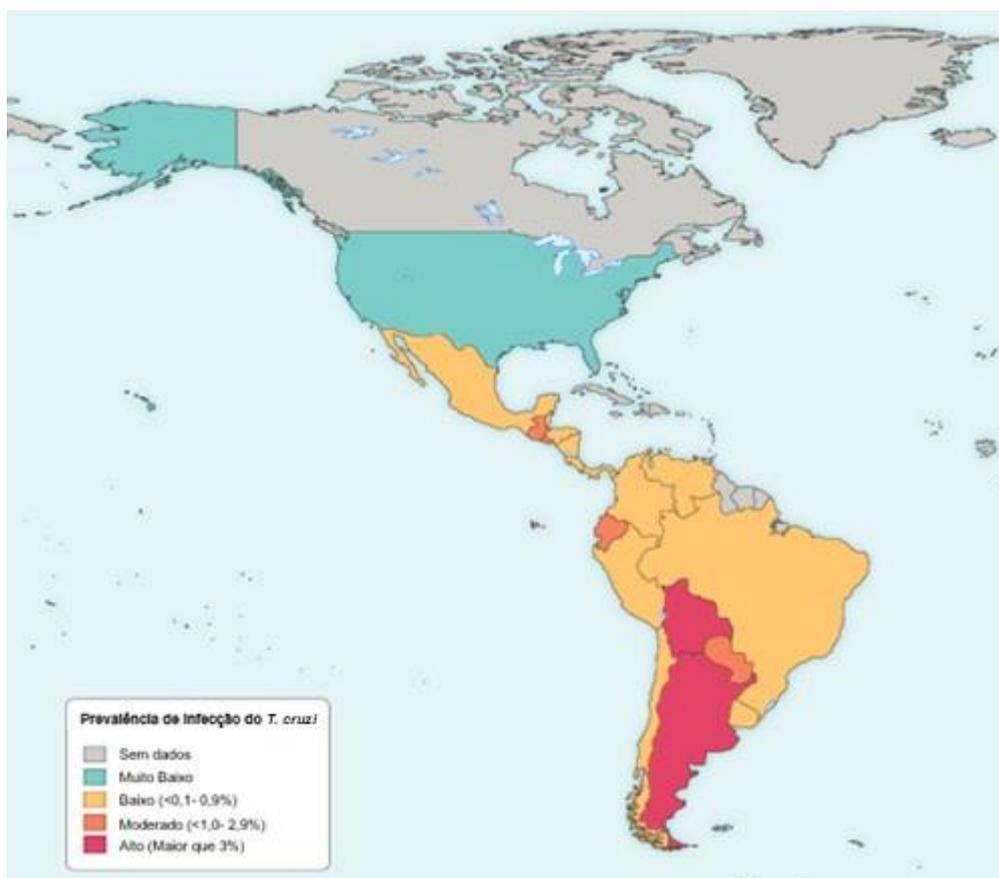


Figura 1.1. Prevalência estimada da infecção pelo *T. cruzi*. A transmissão é concentrada em áreas de infestação vetorial doméstica. No entanto, por ser uma infecção vitalícia quando sem tratamento, a prevalência reflete também infecções antigas e a migração humana. Fonte: Modificado de (CARYN BERN; M.P.H, 2015)

A infecção ocorre comumente via vetorial, onde as fezes do inseto vetor hematófago contaminado entram em contato com a corrente sanguínea do hospedeiro através de feridas ou mucosa. A infecção também pode ocorrer via congênita, via transfusão sanguínea, transplante de órgãos, acidentes laboratoriais e alimentos contaminados (CDC, 2017). Entre as formas de transmissão, a via oral tem se destacado nos últimos anos como a principal via, ficando a via vetorial como uma causa pouco prevalente (SOUZA; POVOA, 2016).

A doença de Chagas pode ser transmitida por mais de 40 espécies diferentes de triatomíneos, dentre estes, *Triatoma sp* são os principais transmissores da infecção (CARCAVALLO *et al.*, 1997).

A doença de Chagas apresenta dois estágios, as fases aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada pela presença do parasita no sangue do paciente, sendo facilmente diagnosticada através de um esfregaço sanguíneo. Entretanto, a fase aguda é assintomática em 95% das infecções. Quando sintomático, apresenta febre, mal-estar, dores musculares e articulares, sonolência, cólicas e diarreia, edema, distúrbios respiratórios e cianose (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Na região de inoculação pode haver um nódulo de pele (chagoma) ou um edema de pálpebra (sinal de Romaña). Cerca de 1% dos casos de infecção aguda são considerados graves, apresentando risco à vida devido a meningoencefalite ou miocardite (CARYN BERN; M.P.H, 2015).

No Brasil, há relatos de pacientes em fase aguda da doença de Chagas. Entre os anos de 2000 e 2013 foram registrados 1.570 casos, sendo 1.081 contaminados por via oral, 100 pela forma vetorial, 6 pela forma vertical, 372 ignoradas e 11 por outras formas, sendo a região Norte com o maior número de casos, 1430 (SOUZA; POVOA, 2016)

Dados do Ministério da Saúde mostram que no período de 2005 a 2013 foi registrada uma taxa média de letalidade da doença de Chagas aguda de 2,7%. A elevada letalidade em 2005 (20%) coincidiu com o surto de Chagas aguda por transmissão oral em Santa Catarina, momento em que pouco se sabia sobre essa forma de transmissão (MINISTERIO DA SAÚDE, 2015).

Quando não tratada efetivamente na fase aguda, a doença de Chagas evolui para sua fase crônica. Os pacientes podem permanecer nessa fase de modo assintomático, sem qualquer manifestação clínica da doença. Nessas situações, a doença de Chagas não é fatal. No entanto, alguns pacientes podem desenvolver a forma determinada da fase crônica que apresenta complicações cardíacas e/ou

digestivas (megaesôfago e megacólon), geralmente 10-30 anos após a infecção inicial. Em alguns casos pode haver a progressão direta da fase aguda para a forma crônica da doença de Chagas, e ainda casos de reativação da doença em pacientes imunocomprometidos (JR; RASSI; MARIN-NETO, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2006). SARTORI *et al.* (2007) definiu a reativação como a presença de manifestações clínicas que não são observadas em indivíduos imunocompetentes acometidos pela doença de chagas crônica: detecção de parasitas por microscopia em sangue ou líquido cefalorraquidiano, e altas cargas de amastigotas em biópsias ou amostras biológicas.

Progressivamente, a doença tem alcançado países não endêmicos, por conta do intenso processo migratório. As principais correntes migratórias partiram da América Latina rumo à Europa e Estados Unidos, sendo estimado 300.000 chagásicos na sua forma crônica morando permanentemente nos Estados Unidos e 67.000 na Espanha. Isso fez com que políticas públicas fossem propostas para lidar com este problema além de políticas específicas para testes sorológicos, para evitar a transmissão da doença em doações de sangue órgãos sólidos (SCHMIDT *et al.*, 2016).

O controle da doença de Chagas vem sendo realizado através do controle dos insetos vetores, o que continua a ser o método mais útil para a prevenção, já que ainda não foram produzidas vacinas contra o *T. cruzi* (WHO, 2017).

Estima-se que em 2015, mais de 80% das pessoas atingidas pela doença não tiveram acesso ao diagnóstico e ao tratamento, o que sustenta o elevado impacto de morbimortalidade e custo social da enfermidade (DIAS *et al.*, 2016).

1.2. TRATAMENTO

Desde 1970, o tratamento da doença de Chagas é feito através do uso do nifurtimox 4 [(5-nitrofurfurylidene)amino]-3-methylthiomorpholine-1,1-dioxide), um derivado do nitrofurano e o benzonidazol (N-benzyl-2-nitroimidazole-1-acetamide), derivado do nitroimidazol. Ambos os medicamentos atuam através da bio-redução do grupo nitro, formando radicais livres/metabólitos eletrolíticos (MAYA *et al.*, 2007).

Ambos os compostos foram desenvolvidos empiricamente ao longo de três décadas e apresentam resultados variáveis. A resposta ao tratamento varia de acordo com a fase da doença, período de tratamento, dose, idade, e a origem geográfica dos pacientes. As drogas são mais eficientes na fase aguda da doença, em infecções

crônicas de crianças menores de 12 anos, infecções congênitas e em acidentes de laboratório (COURA; CASTRO, 2002).

Além de não serem eficientes para todos os pacientes, o benzonidazol e nifurtimox causam também muitos efeitos colaterais. Durante o tratamento com Nifurtimox, os efeitos colaterais mais frequentes são a anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade ou sonolência e manifestações digestivas, como náuseas, vômitos e ocasionalmente cólicas intestinais e diarreia. Já o benzonidazol causa reações de hipersensibilidade no início do tratamento, toxicidade medular e neuropatias periféricas no final do tratamento. O tratamento não é indicado para pacientes grávidas, pacientes com infecções sistêmicas, insuficiência cardíaca, respiratória, renal ou hepática, hemopatias e neoplasias sem possibilidade de tratamento, pessoas de idade avançada e muito debilitadas (COURA; CASTRO, 2002; ROJO *et al.*, 2014).

O nifurtimox, até o momento, não é disponibilizado no mercado farmacêutico de nenhum país. Em situações em que o uso do nifurtimox é imprescindível devido a intolerância ao Benzonidazol, o medicamento deverá ser solicitado via escritório de OPAS (Organização Pan-Americana da Saúde) e da OMS (Organização Mundial da Saúde) pelo Ministério da Saúde (DIAS *et al.*, 2016). A interrupção do comércio do nifurtimox ocorreu possivelmente em razão do seu efeito tripanocida menor em algumas regiões endêmicas (COURA; CASTRO, 2002).

Os medicamentos alopurinol e os antifúngicos azólicos são conhecidos por suprimir a parasitemia por *T. cruzi* e podem ser úteis em situações de reativação em imunodeprimidos que não é possível a utilização do benzonidazol ou do nifurtimox (DIAS *et al.*, 2016)

1.3. *TRYPANOSOMA CRUZI*

O protozoário parasita *T. cruzi* (CHAGAS, 1909) pertence ao reino protista, sub-reino protozoa, filo Sarcomastigophora, sub-filo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* e espécie *Trypanosoma cruzi* (LEVINE *et al.*, 1980).

O gênero *Trypanosoma* constitui um dos mais importantes, pois inclui alguns organismos que causam doenças em humanos como a doença de Chagas (*T. cruzi*) e a doença do sono (*Trypanosoma brucei*), e em animais e plantas comercialmente importantes. Além da sua importância como patógeno humano, o *T. cruzi* apresenta

peculiaridades que o tornam um excelente modelo para estudo (SHAPIRO; ENGLUND, 1995).

Ao longo do seu ciclo de vida, *T. cruzi* apresenta estágios com morfologia e estrutura celulares distintas de acordo com seu habitat no hospedeiro mamífero e hospedeiro invertebrado (Figura 1.2) (GUEDES *et al.*, 2017).

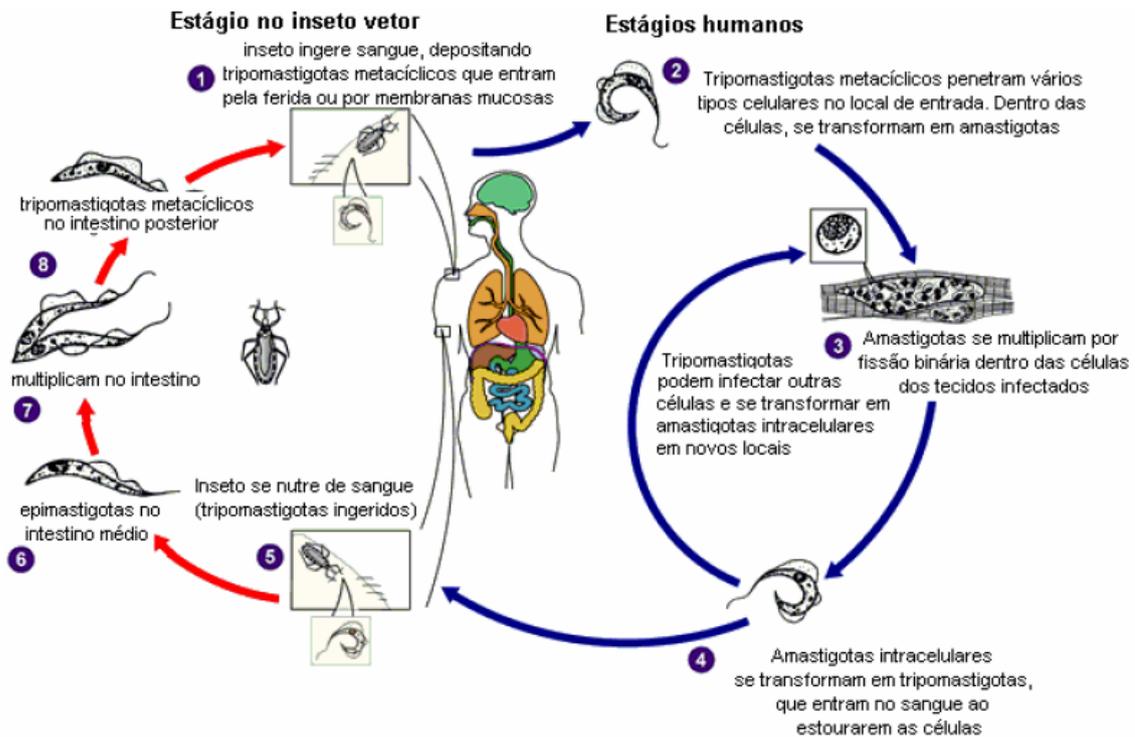


Figura 1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Modificado de (CDC, 2017)

As formas evolutivas do *T. cruzi* foram classificadas morfologicamente por microscopia ótica de acordo com a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e pela exteriorização do flagelo. As principais formas são: amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas. A forma amastigota é a forma intracelular do *T. cruzi*, encontrado nos tecidos do hospedeiro vertebrado. Possui um tamanho de aproximadamente 4 µm de diâmetro, e não apresenta flagelo exterior ou membrana ondulante (Figura 1.3 D). A forma epimastigota do *T. cruzi* é extracelular, flagelada e encontrada no trato digestivo do triatomíneo. Possui tamanho aproximado entre 20-40 µm de comprimento e 2-5 µm de largura. Seu cinetoplasto tem posição anterior ao núcleo e sua membrana ondulante não é bem desenvolvida (Figura 1.3 B). A forma tripomastigota é infectiva e encontrada tanto no hospedeiro vertebrado quanto no inseto vetor. O núcleo é central e o cinetoplasto com DNA altamente empacotado fica localizado na região posterior. A forma tripomastigota pode ser ainda classificada de acordo com o habitat do parasita, sendo chamada tripomastigota metacíclico quando

no intestino do inseto vetor e tripomastigota sanguíneo quando se encontra no sangue ou outros fluidos do hospedeiro vertebrado. O tripomastigota metacíclico tem tamanho aproximado de 17 μm com flagelo menor emergindo do corpúsculo basal perto do cinetoplasto com uma membrana ondulante geralmente estreita (Figura 1.3 C), enquanto que o tripomastigota sanguíneo tem 12 a 20 μm , o flagelo é maior e a membrana ondulante é estreita (Figura 1.3 A) (MARTINS *et al.*, 2012).

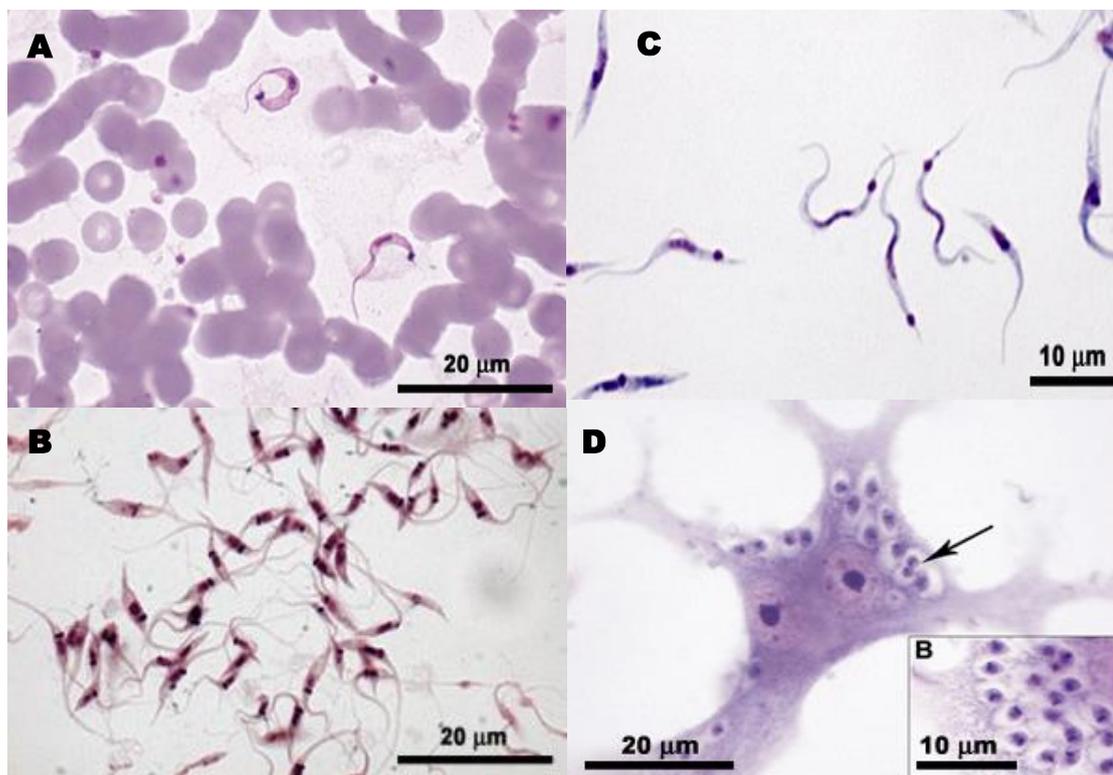


Figura 1.3 Microscopia óptica das diferentes formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. A – Formas tripomastigotas sanguíneas do *Trypanosoma cruzi*. B – Formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. C- Formas Tripomastigotas metacíclicas do *Trypanosoma cruzi* (metaciclogênese *in vitro*). D - Amastigotas intracelulares do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: (CARVALHO, 2017)

Além das principais formas evolutivas, foram identificadas também formas intermediárias. No hospedeiro invertebrado pode ser encontrado no estômago do triatomíneo formas arredondadas que possuem um flagelo e são chamadas de esferomastigotas (BRENER, 1973). No sangue periférico de mamíferos, os tripomastigotas são uma população pleomórfica constituída de uma mistura de 2 formas que são geralmente descritos como delgada ou larga (TYLER; ENGMAN, 2001).

Os transmissores do *T. cruzi* são insetos hematófagos, que ingerem o parasita que passará por uma sequência de transformações ao longo do tubo digestivo do

inseto. Os tripomastigotas sanguíneos ingeridos transformam-se em formas epimastigotas que se proliferam por divisão binária no intestino do vetor, que pode ocorrer por toda vida do vetor. No intestino grosso do inseto, os epimastigotas aderem hidrofobicamente à cutícula cerosa da parede do intestino posterior e se transformam em tripomastigotas metacíclicos (Figura 1.2) (BRENER, 1997; GUEDES *et al.*, 2017). As diferenciações do *T. cruzi* são estimuladas pelo AMP cíclico e por ativadores de adenilado ciclase (GONZALES-PERDOMO; ROMERO; GOLDENBERG, 1988).

Durante o repasto sanguíneo, as formas tripomastigotas metacíclicas serão então eliminadas junto com as fezes, então o parasita pode infectar o hospedeiro mamífero entrando em contato com a ferida da picada ou com mucosas. Dentro do hospedeiro vertebrado, *T. cruzi* irá penetrar uma célula para cumprir seu ciclo evolutivo. Ele pode infectar um gama de células presentes próximo ao local da infecção (musculatura lisa e estriada, macrófagos, células epiteliais, fibroblastos). No interior celular, o parasita se diferencia em amastigota e irá se proliferar por divisão binária no citoplasma da célula invadida. Uma vez que a célula esteja preenchida, o parasita se transforma na forma infectante tripomastigota sanguínea que rompe a parede celular e alcança a corrente sanguínea podendo infectar novas células ou completar o ciclo pela ingestão de sangue contaminado pelo inseto vetor (BRENER, 1997; GUEDES *et al.*, 2017).

1.4. TIPOS DE MORTE CELULAR EM *T. CRUZI*

1.4.1. Autofagia

A autofagia é uma via de sinalização complexa envolvendo mais de 30 proteínas ATG bem conservadas que removem ou remodelam estruturas celulares danificadas. É caracterizada pela formação de autofagossomos, vesículas de dupla membrana, que são responsáveis pelo englobamento dos constituintes citoplasmáticos, estruturas de membranas concêntricas e organelas circundantes, que em seguida se funde ao lisossomo onde o conteúdo é degradado e reciclado (ADADE; OLIVEIRA; PAIS, 2013; EDINGER; THOMPSON, 2004). A degradação precoce das organelas é acompanhado da preservação do citoesqueleto até estágios posteriores, sem resposta inflamatória (MENNA-BARRETO *et al.*, 2009).

Em *T. cruzi* foi relatada a presença dos genes do sistema de conjugação Atg8 (Atg3, Atg4, Atg7, Atg8), enquanto que Atg12, Atg5, e Atg10 os principais componentes da via do Atg 12 estão ausentes (ALVAREZ *et al.*, 2008).

Nos eucariotos unicelulares, a autofagia acontece quando os nutrientes ambientais se tornam esgotados. Os componentes citoplasmáticos são então catabolizados por (macro) autofagia para reutilização e ajudar na produção de ATP (KIEL, 2010).

1.4.2. Necrose

A necrose é o resultado final de uma catástrofe bioenergética resultante da depleção de ATP e inicia principalmente por acidentes celulares como insultos tóxicos ou danos físicos. É caracterizada morfológicamente por vacuolização do citoplasma e indução de uma resposta inflamatória em torno da célula por conta da liberação do conteúdo celular e moléculas pró inflamatórias (EDINGER; THOMPSON, 2004).

A morte celular de tripanossomatídeos por necrose já foi descrita (KUBATA *et al.*, 2005; MENNA-BARRETO *et al.*, 2009). As características desse tipo de morte envolvem alterações nas mitocôndrias, incluindo despolarização mitocondrial, depleção de ATP, geração de ROS, perda da homeostasia do cálcio, vacuolização do citoplasma, e a degradação da membrana plasmática (EDINGER; THOMPSON, 2004).

1.4.3. Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular que ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento das células, atua como um mecanismo homeostático mantendo as populações de células nos tecidos. Pode ocorrer também como um mecanismo de defesa, como em reações imunes ou quando as células são danificadas por agentes nocivos ou doenças (ELMORE, 2007).

Este processo foi primeiramente descrito por Kerr, Wyllie e Currie (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972) quando foi proposto que o termo apoptose indicava o processo de morte celular programada. A apoptose está envolvida nos processos de organogênese e hematopoese normal e patológica, na reposição tecidual, na atrofia de órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). A apoptose também está associada a muitas doenças humanas incluindo doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e doença de Huntington, doenças autoimunes e várias formas de câncer (COHEN, 1997).

A morte por apoptose é caracterizada por alterações morfológicas típicas. É possível identificar o encolhimento celular e a picnose, que é o resultado da condensação da cromatina, sendo esta a maior característica da apoptose. Ocorre também a compactação de organelas citoplasmáticas e dilatação do retículo endoplasmático. Há uma extensa formação de prolongamentos de membrana que é seguida pela fragmentação do núcleo e a separação de fragmentos celulares nos chamados corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos consistem em citoplasma com organelas envoltos por membrana celular com ou sem fragmento nuclear. Esses fragmentos celulares são então fagocitados por macrófagos, células parenquimais, ou células neoplásicas e degradadas nos fagolisossomos (figura 1.4) (COHEN, 1997; ELMORE, 2007)

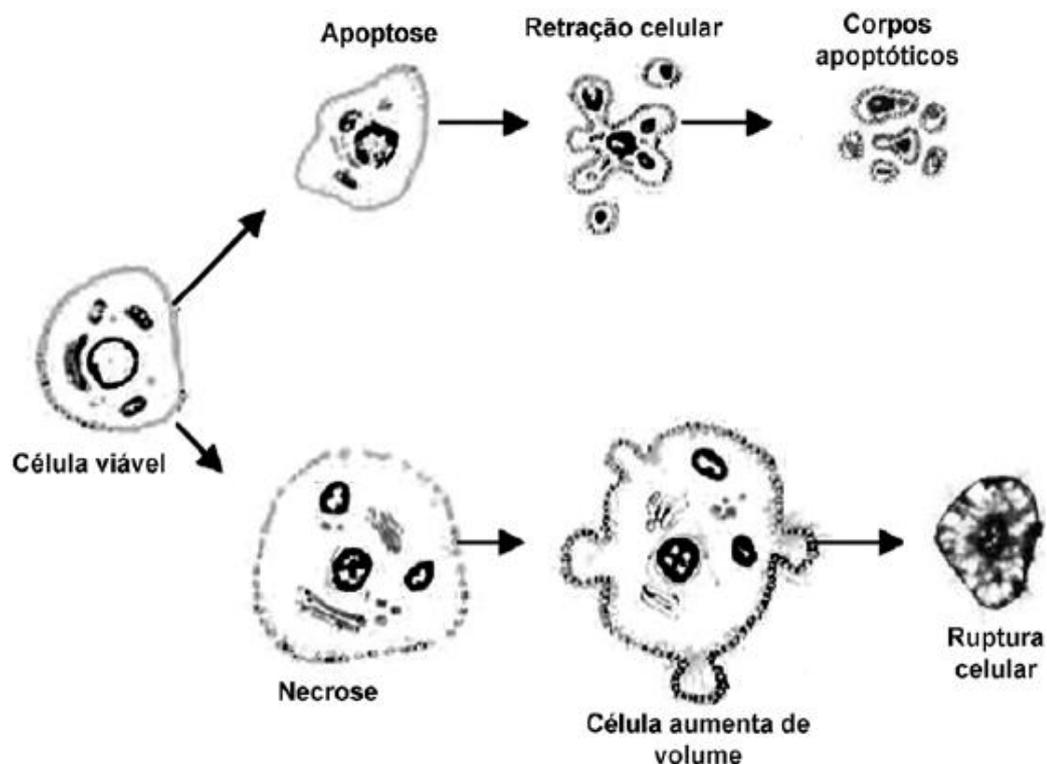


Figura 1.4 Características morfológicas de células em apoptose e em necrose. Na apoptose ocorre a retração celular, há a condensação da cromatina junto a membrana nuclear, a formação dos prolongamentos de membrana celular, a fragmentação do núcleo e a formação dos corpos apoptóticos a partir dos prolongamentos de membrana, que são rapidamente fagocitados evitando o processo inflamatório. Na necrose a células apresentam aumento do volume celular, agregação da cromatina, desorganização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática e consequente ruptura celular. Fonte: (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007)

Não é desencadeada reação inflamatória em torno do processo de apoptose ou da remoção dos corpos apoptóticos. Isso porque as células apoptóticas não liberam seus constituintes celulares no tecido intersticial circundante, os corpos apoptóticos formados são rapidamente fagocitados pelas células fagocíticas circundantes, impedindo o processo de necrose secundário, e as células que envolvem os corpos apoptóticos não produzem citocinas anti-inflamatórias (SAVILL; FADOK, 2000). Além disso agora sabe-se também que as células em apoptose podem bloquear o processo inflamatório, ao secretar Adenosina. Isso acontece inicialmente com a quebra da proteína canal de membrana chamada pannexin-1, pelas caspases em células apoptóticas, que leva a ativação da Pannexin-1. Isso resulta na liberação de adenosina monofosfato (AMP) que logo tem um grupo fosfato removido por uma 5'-nucleotidase expressa pelos fagócitos, produzindo adenosina. A Adenosina então se liga ao receptor A2a nos fagócitos que desencadeará uma resposta genética anti-inflamatória como pode ser visto na figura 1.5 (YAMAGUCHI et al., 2014 *apud* Wallach 2014).

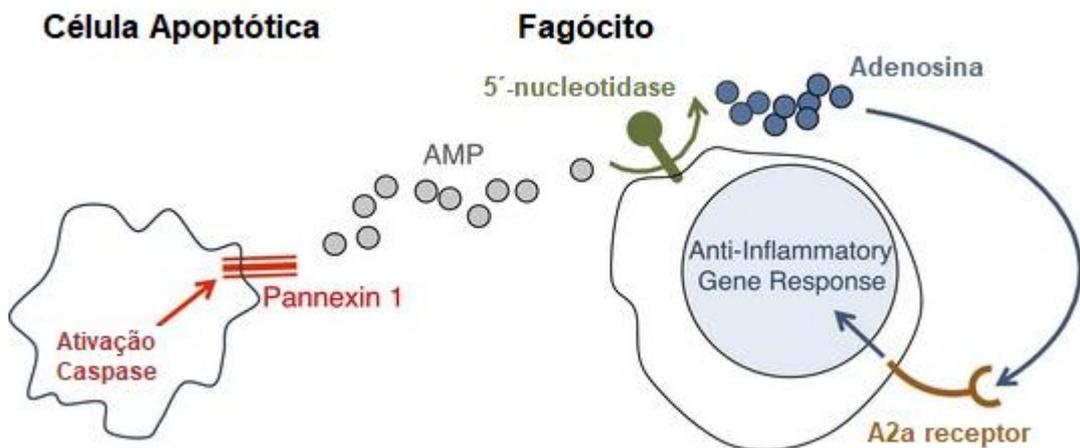


Figura 1.5 Mecanismo Anti-inflamatório de células apoptóticas. Yamaguchi *et al.*, 2014 mostrou que as células apoptóticas liberam Adenosina Monofosfato que é convertido a adenosina pelo fagócito. A molécula de adenosina pode então desencadear uma resposta genética anti-inflamatória ao se ligar ao receptor A2a. Modificado de (WALLACH; KOVALENKO, 2014)

Já foi descrito a presença do processo de apoptose-like em *T. cruzi* através de características morfológicas e bioquímicas similares a da apoptose quando expostos a situações de estresse (AMEISEN *et al.*, 1995; CORNILLON *et al.*, 1994; DAVIS *et al.*, 1992; NGUEWA *et al.*, 2004; PIACENZA; PELUFFO; RADII, 2001; WELBURN; LILLICO; MURPHY, 1999).

Nesses organismos foram encontradas evidências de um processo de apoptose-like como: a alteração no potencial de membrana mitocondrial, geralmente causado pela permeabilização da mitocôndria, e a degradação do DNA, encolhimento celular, e manutenção da membrana celular (COLA *et al.*, 2006).

1.5. CASPASES

As caspases são endoproteases importantes para a manutenção da homeostase através da regulação da apoptose e inflamação (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013). São proteases que utilizam uma cisteína como grupo nucleofílico para clivagem de substratos. No processo de apoptose, as caspases tem papel central e são as proteínas melhores estudadas. A ação dessas proteínas desencadeia várias alterações morfológicas características do processo de apoptose, tais como, a condensação e fragmentação do núcleo e externalização de fosfolipídios de membrana para sinalização da fagocitose (CHANG, 2000; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

As caspases são expressas em forma de pró enzimas inativas (procaspases) na maioria das células. As procaspases são constituídas por uma subunidade grande (p20), uma pequena (p10) e um pró-domínio N-terminal (ALBERTS *et al.*, 2010; MCLUSKEY *et al.*, 2012). Em algumas pro-caspases, as subunidades são separadas por espaçador pequeno que é removido do zimógeno durante a ativação (EARNSHAW; MARTINS; KAUFMANN, 1999).

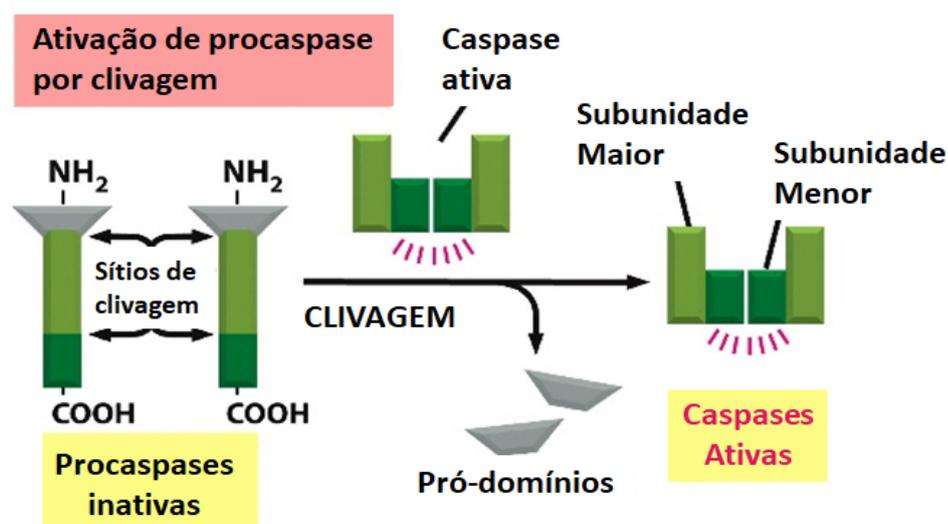


Figura 1.6 Ativação da procaspase durante a apoptose. Fonte: (ALBERTS *et al.*, 2010)

Os zimógenos inativos são ativados após eventos de sinalização que promovem a agregação em dímeros ou complexos de moléculas e a clivagem (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013). A clivagem das procaspases ocorre em um ou dois ácidos aspárticos específicos. A importância dos pró-domínios na regulação da apoptose é destacado pelo reconhecimento de moléculas adaptadoras, que se ligam a essa região e recruta-a para o complexo de sinalização (COHEN, 1997).

A estrutura cristalográfica tanto da caspase-1 (PDB: 1IBC) quanto da caspase-3 (PDB: 1PAU) revelou uma enzima ativa como um heterotetrâmero, contendo 2 subunidades menores e 2 subunidades maiores como pode ser visto na figura 1.7 (CHANG, 2000; NICHOLSON, 1999). Cada subunidade catalítica deriva de uma única molécula de procaspase e é composto por uma folha beta torcida, geralmente paralela, situada entre duas camadas de alfa hélices. Os heterodímeros se associam principalmente através da interação entre as subunidades p10 (CHANG, 2000) formando uma folha beta contínua de 12 folhas. Forma-se então um elipsoide compacto com dimensões aproximadas de 25 Å x 50 Å x 30 Å. (FUENTES-PRIOR; SALVESEN, 2004). O sítio catalítico é composto por regiões da subunidade maior (díade catalítica cisteína e histidina) e subunidade menor (resíduos para ligação ao substrato) e esse arranjo permite posicionar os dois sítio catalíticos nas extremidades opostas da molécula (EARNSHAW; MARTINS; KAUFMANN, 1999).

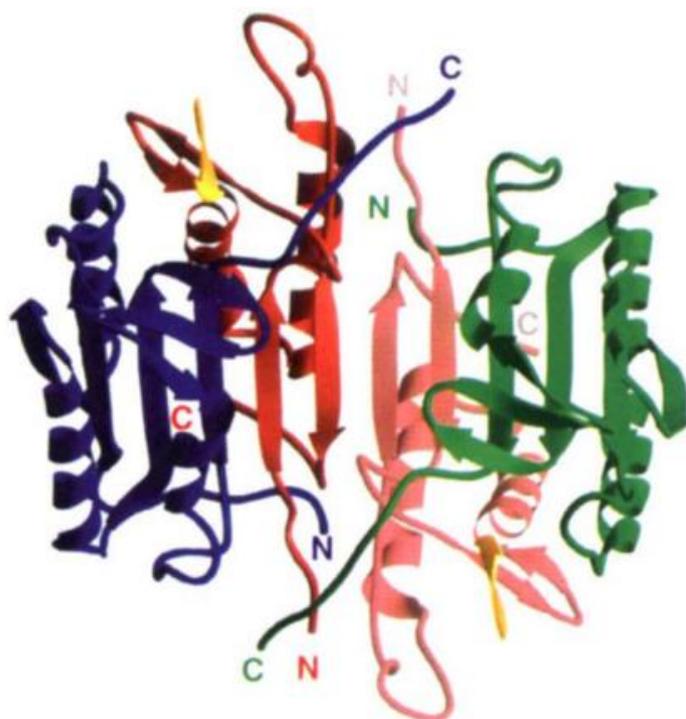


Figura 1.7 - Estrutura do tetrâmero da caspase 3 complexado ao peptídeo Ac-DEVD-CHO (PDB: 1PAU). O tetrâmero é formado por duas subunidades maiores que estão em azul e verde, e as subunidades menores evidenciadas em vermelho e rosa. As regiões N e C terminal das 4 cadeias estão indicadas. A molécula de inibidor está em amarelo. Fonte: (ROTONDA *et al.*, 1996)

A ativação de uma determinada caspase dispara uma ativação em cadeia de procaspases, a chamada cascata proteolítica. Essa cascata amplifica a via de sinalização e assim leva à morte celular rapidamente. As caspases foram categorizadas em caspases iniciadoras: caspase-2,-8,-9,-10, quando possuem pró-domínios longos e iniciam a cascata proteolítica; em caspases efetoras: caspase-3, -6,-7 quando possuem pró-domínios curtos ou inexistentes e atuam na clivagem de substratos e caspases inflamatórias (caspase -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14) (ELMORE, 2007; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). As caspases -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14 estão envolvidas na maturação de citoquinas, e sua contribuição na apoptose permanece não esclarecida (DENAULT; SALVESEN, 2002)

1.5.1. Vias de apoptose dependentes de caspase

Há duas possíveis vias de sinalização melhor compreendidas que podem ativar a apoptose em células animais, elas são chamadas de via extrínseca e via intrínseca.

A via extrínseca é responsável pela eliminação de células indesejadas durante o desenvolvimento e maturação do sistema imunológico e remoção de tumor mediada pelo sistema imunológico (BOATRIGT; SALVESEN, 2003). As vias de sinalização que iniciam a via extrínseca envolvem interações mediadas por receptores transmembrana Fas, que são membros da superfamília de genes do fator de necrose tumoral (TNF). Esses receptores Fas possuem um domínio citoplasmático de cerca de 80 aminoácidos que é chamado de domínio de morte, que é responsável pela transmissão do sinal de morte da superfície celular para o meio intracelular (ELMORE, 2007).

Com a ligação de um ligante de Fas que sinaliza para a apoptose, ocorre a trimerização e ativação do receptor Fas, esse por consequência forma microarranjos na superfície celular de forma a permitir que uma molécula adaptadora, FADD, seja recrutada para a cauda citosólica (BOATRIGT; SALVESEN, 2003). O FAAD se associa a pro-caspase-8 por dimerização do domínio de morte efetor e assim forma-se o complexo DISC que leva a ativação autocatalítica da pro-caspase-8 e a execução da apoptose é desencadeada como ilustrado na figura 1.8 (ALBERTS *et al.*, 2010; GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

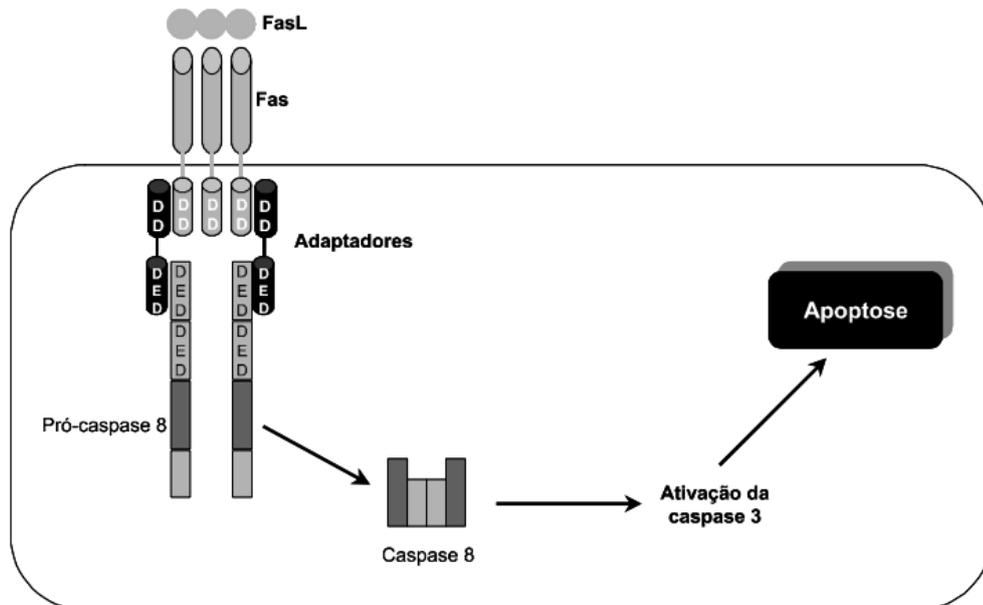


Figura 1.8 Via extrínseca de ativação da apoptose. O ligante FasL se liga ao receptor Fas e isso resultará a trimerização e consequente ativação dos receptores de morte específicos. A porção citoplasmática desses receptores, chamados de “domínio de morte”, interagem com moléculas conhecidas como FADD (adaptadores) que recrutam a pró-caspase 8 formando o complexo Disc (não mostrado) que desencadeará a ativação dessa enzima e por consequência a cascata de apoptose. DD: domínio de morte e DED: domínio efetor de morte. Fonte: (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007)

A Via intrínseca de ativação da apoptose é usada para eliminar células em resposta a radiação ionizante, quimioterápicos e dano mitocondrial. Os estímulos de morte causam mudanças na membrana interna da mitocôndria, o que resulta no aumento da permeabilidade do poro mitocondrial, perda do potencial de membrana mitocondrial e liberação do citocromo c (BOATRIGT; SALVESEN, 2003; ELMORE, 2007).

Além disso, a indução da perda do potencial de membrana mitocondrial e a mudança na permeabilidade mitocondrial levam a perda da homeostase celular com a interrupção da síntese de ATP, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio, que causa a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

A liberação do citocromo C leva ao recrutamento e ativação da caspase-9 em um complexo conhecido como apoptossomo. O componente central do apoptossomo é uma proteína conhecida como Apaf-1 (factor de ativação de protease apoptótica 1) que recruta a caspase-9 através do seu domínio N-terminal de recrutamento e ativação das caspases (BOATRIGT; SALVESEN, 2003). No apoptossomo acontece a clivagem da pro-caspase-9, liberando a caspase 9 ativa que vai desencadear a apoptose (Figura 1.9) (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007).

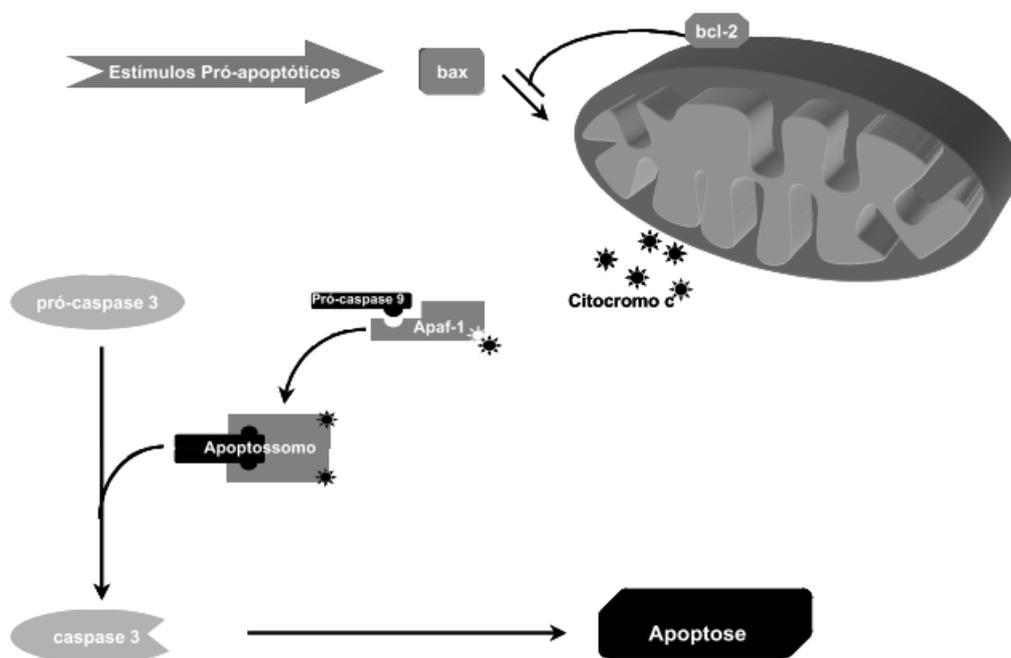


Figura 1.9 Via intrínseca de ativação da apoptose. Os diferentes estímulos pró apoptóticos são detectados pela mitocôndria, que leva a liberação de citocromo C e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol. No citosol, o citocromo C liga a Apaf-1 e a caspase-9 formando um complexo que é chamado de apoptossomo, promovendo assim a clivagem da pró-caspase-9 e liberando a caspase 9 ativa para ativar a caspase 3 e desencadear a apoptose. Fonte: (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007)

O controle e regulação desses eventos mitocondriais apoptóticos correm através de membros da família de proteínas Bcl-2. Elas regulam a permeabilidade da membrana e pode ser pró-apoptótica ou anti-apoptótica. As proteínas anti-apoptóticas incluem Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-W, BAG e as pró apoptóticas Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad Bim, Bik e Blk (ELMORE, 2007).

1.6. METACASPASES

As caspases não são encontradas em organismos não metazoários. As metacaspases, homólogos distantes das caspases, estão presentes em todas as linhagens eucarióticas não metazoárias e ausente em metazoários. Elas foram relacionadas a morte celular em plantas e eucariotos inferiores (KOSEC *et al.*, 2006; MCLUSKEY *et al.*, 2012). Nos protozoários, a morte celular programada pode representar mecanismos concomitantes ou alternativos para a seleção clonal, a evasão da resposta imune e regulação do tamanho da população (JIMENEZ *et al.*, 2008).

As metacaspases também são cisteíno proteases e possuem similaridade estrutural com as caspases e a díade catalítica cisteína-histidina. Todas compartilham um núcleo com dobra caspase/hemoglobina, que é formada por uma folha beta paralela com quatro fitas beta e três alfas hélices conservadas. Assim como as caspases, elas pertencem a família C14, clan CD, uma superfamília estrutural. (MCLUSKEY *et al.*, 2012; MESLIN *et al.*, 2011).

As metacaspases podem ser classificadas em tipo I e tipo II. As metacaspases do tipo I possuem um pró domínio N-terminal com uma sequência rica em prolina e são encontradas apenas em protozoários. As metacaspases do tipo II não possuem o pró-domínio, mas em contrapartida possuem uma região de ligação entre as subunidades p10 e p20 onde se localiza o sítio ativo da enzima (MCLUSKEY *et al.*, 2012; TSIATSIANI *et al.*, 2011).

As metacaspases possuem uma bolsa S1 altamente ácida que leva a uma especificidade básica para a arginina e lisina na posição P1, em vez da especificidade ao ácido aspártico que é observada nas caspases (MESLIN *et al.*, 2011).

Estudos mostram que as metacaspases estão envolvidas na regulação do ciclo celular, dissolução de agregados proteicos, virulência de organismos patogênicos, embriogênese em plantas e no controle e regulação da apoptose (TSIATSIANI *et al.*, 2011).

Em *Saccharomyces cerevisiae* YCA1 também foi descrito o envolvimento das metacaspases na morte celular com marcadores típicos de um processo apoptótico, como fragmentação do DNA, exposição da fosfatidilserina e condensação da cromatina quando há a superexpressão de YCA1. Esse processo foi inibido com a utilização do inibidor de caspase Z-VAD-fluorometilcetona conhecido por bloquear a apoptose em mamíferos (MADEO *et al.*, 2002).

As metacaspases foram identificadas e parcialmente descritas em todos os tripanosomatídeos (MESLIN *et al.*, 2011). A morte celular programada foi relatada em vários tripanosomatídeos, com evidências da formação de prolongamentos citoplasmáticos, fragmentação do DNA, exposição da fosfatidilserina, liberação de citocromo C, e alterações no potencial de membrana mitocondrial (AMEISEN *et al.*, 1995). Algumas evidências da função das metacaspases em tripanosomatídeos são relatadas a seguir.

Em *Trypanosoma brucei*, cinco genes codificadores de metacaspases são expressos (TbMCA1- TbMCA5). Estudos de expressão das metacaspase de *T. brucei* em *S. cerevisiae* mostraram que a superexpressão de TbMCA4 resultou na inibição

do crescimento e morte celular, assim, sugeriu-se que essa metacaspase tenha um papel no controle da proliferação celular acoplada à função mitocondrial, pois induz a perda de competência respiratória em células de levedura, mesmo sendo encontrada no núcleo (SZALLIES; KUBATA; DUSZENKO, 2002). TbMCA1 e TbMCA4 contêm substituições de aminoácidos nos seus resíduos catalíticos, a cisteína e a histidina são substituídas por um resíduo serina e tirosina, respectivamente. Isso sugere que essas proteínas sejam cataliticamente inativas, e talvez atuem na regulação de outras peptidases, como é o caso da cFLIP, um homólogo inativo da caspase-8 que regula a atividade da caspase 8 (YU; JEFFREY; SHI, 2009). A TbMCA4 também mostrou atuar como um fator de virulência ligado a membrana que é processado pela TbMCA3 (PROTO *et al.*, 2011) .

O processamento que a TbMCA2 sofre ocorre através da interação com íons de cálcio, e foi observado que a concentração desse íon interfere na estrutura secundária de TbMCA2, assim como interfere na especificidade ao substrato (MACHADO *et al.*, 2013).

Até o momento, só ocorreu a determinação estrutural de TbMCA2. A estrutura cristalográfica de um mutante inativo da TbMCA2 mostrou que essa proteína não apresenta a folha beta de seis fitas encontrada nas caspases, ela possui duas fitas extras resultando em uma estrutura monomérica com uma folha β de oito fitas, 2 \uparrow 1 \uparrow 3 \uparrow 4 \uparrow 7 \uparrow 8 \downarrow 5 \uparrow 6 \downarrow (Figura 1.10). Assim como nas caspases, foram encontradas 5 alfa-hélices e uma pequena folha beta em L3 cercado a folha central (MCLUSKEY; MOTTRAM, 2015).

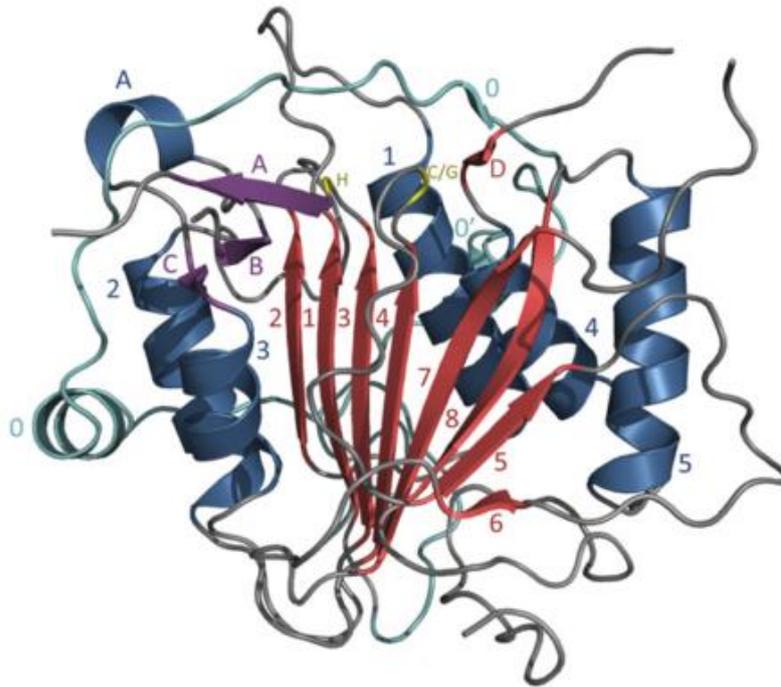


Figura 1.10 - Estrutura da Metacaspase 2 de *Trypanosoma brucei* (TbMCA2). Fonte: (McLUSKEY *et al.*, 2012).

Com exceção de *Leishmania infantum* e *Leishmania dovani* onde 2 metacaspases foram encontradas, as demais espécies de *Leishmania* expressam um único gene para metacaspases (MESLIN *et al.*, 2011). Em espécies de *Leishmania*, as metacaspases são necessárias para a morte celular induzida pelo estresse oxidativo (TSIATSIANI *et al.*, 2011).

Em *L. dovani*, LdMCA1 e LdMC2 são expressas tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota do parasita. Foi identificado que essas metacaspases estão localizadas nos acidocalcissomos que são liberados após a indução de apoptose por peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em *L. major*, a LmjMCA única foi ativada por autoprocessamento, sendo a região processada 300 vezes mais ativa que a metacaspase inteira (MESLIN *et al.*, 2011).

Foi notada também que a superexpressão de LmjMCA aumenta a sensibilidade *L. major* ao estresse oxidativo, medido através da exposição da fosfatidilserina e pela perda do potencial de membrana mitocondrial, quando comparada a parasitas normais. Além disso, foi identificado que o domínio catalítico central pode, sozinho, aumentar a sensibilidade do parasita a morte, indicando que a metacaspase afeta a mitocôndria indiretamente (ZALILA *et al.*, 2011).

Em *T. cruzi* foram identificados dois genes codificantes para metacaspases, eles são homólogos a metacaspase 3 (TbMCA3) e a metacaspase 5 (TbMCA5) de *T.*

brucei. TcMCA3 possui aproximadamente 16 cópias no genoma enquanto que a TcMCA5 possui apenas uma cópia (KOSEC *et al.*, 2006). TcMCA3 está presente em todo o ciclo de vida do parasita, enquanto que TcMCA5 é encontrada apenas na forma epimastigota (MESLIN *et al.*, 2011).

Em *T. cruzi* foram descritos parâmetros clássicos associados à apoptose, semelhante a encontrada em organismos pluricelulares. Foi identificada a redução do volume isotônico, a externalização da fosfatidilserina e a fragmentação do DNA internucleossômico, acompanhada de condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, em epimastigotas na fase estacionária do crescimento (JIMENEZ *et al.*, 2008).

O papel das metacaspases na apoptose do parasita foi sugerida ao demonstrar que essas proteínas sofriam uma realocização durante a apoptose induzida pelo soro humano fresco, essas metacaspases que estavam antes dispersas pelo citoplasma se realocaram para o núcleo do parasita. A superexpressão da TcMCA5 em epimastigotas mostrou que elas se tornam mais suscetíveis a uma morte celular programada quando expostas ao soro humano fresco. Além disso, a superexpressão da metacaspase 3 apresentou um efeito letal as células (KOSEC *et al.*, 2006).

A superexpressão das TcMCAs nos estágios replicativos do *T. cruzi* se mostrou prejudicial ao crescimento celular. Além disso, o aumento dos níveis de expressão da TcMCA3 em duas a seis vezes foi suficiente para prender o ciclo celular na transição da fase G1 para fase S, e também causou o aumento de diferenciação para tripomastigotas metacíclicos (LAVERRIÈRE; CAZZULO; ALVAREZ, 2012).

As primeiras evidências de apoptose em *T. cruzi* surgiram na década de 90 (AMEISEN *et al.*., 1995) e os estudos acima relatados mostraram que as metacaspases afetam a viabilidade e diferenciação do *T. cruzi*. Esses estudos mostraram ainda que as metacaspases podem participam de processos de morte celular por apoptose; portanto, a caracterização funcional e estrutural das metacaspases de *T. cruzi* é importante para compreender os mecanismos moleculares da apoptose nesse parasita, e devido a sua ausência em seres humanos, as metacaspases se tornam um alvo atraente para quimioterápicos.

2. OBJETIVOS

2.2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse trabalho é a identificação de um composto que interaja com a metacaspase-3 de *Trypanosoma cruzi*, e cause a morte celular por apoptose, para auxiliar no estudo desse processo nesse protozoário.

2.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Clonagem, expressão e purificação da TcMCA-3;
- Identificar compostos que se ligam à TcMCA3;
- Avaliar os efeitos na viabilidade celular;
- Avaliar se a morte celular apresentava características de um processo apoptótico por citometria de fluxo;
- Avaliar a interação desse composto em células que expressam caspase 3;
- Analisar *in silico* a interação do composto com a TcMCA-3;

3. ARTIGO 1: “Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*”

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento do mestrado resultaram no artigo “Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*”. Como incentivado pelo programa em pós-graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas, esse artigo será parte integrante dessa dissertação e substituirá as seções de Material e Métodos e Resultados encontrados na dissertação apresentada de maneira formal.

Nesse artigo mostramos a identificação de um composto que é capaz de interagir com a metacaspase-3 de *T. cruzi*, reduzir a viabilidade celular de cultura de epimastigotas e levar a um processo de apoptose-like, já que foi identificado características de um processo de apoptose por citometria de fluxo.

Além disso, mostramos que a interação entre o composto e a metacaspase-3 pode ser única, já que os resíduos de interação não são conservados em outros organismos, e em ensaios com cultura de células de mamíferos, que expressam caspases, a droga apresentou um IC50 maior do que visto para epimastigotas.

O artigo “Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*” foi publicado em dezembro de 2017 na Revista Apoptosis (qualis A2).

CASTRO, E. DE *et al* . Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. **Apoptosis**, v. 22, n. 12, p. 1564–1577, 2017.

Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*

Emanuella de Castro¹ · Thamile Luciane Reus² · Alessandra Melo de Aguiar² ·
Andrea Rodrigues Ávila³ · Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza¹

Published online: 20 October 2017
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

Abstract Some therapeutics for parasitic, cardiac and neurological diseases activate apoptosis. Therefore, the study of apoptotic proteins in pathogenic organisms is relevant. However, the molecular mechanism of apoptosis in unicellular organisms remain elusive, despite morphological evidence of its occurrence. In *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, metacaspase 3 (TcMCA3), seems to have a key role in parasite apoptosis. Accordingly, this work provides data concerning TcMCA3 regulation through its interaction with procaspase-activating compound 1 (PAC-1), a procaspase 3 activator. Indeed, PAC-1 reduced *T. cruzi* epimastigote viability with an IC₅₀ of 14.12 μM and induced loss of mitochondrial potential and exposure of phosphatidylserine, features of the apoptotic process. Notwithstanding, those PAC-1-inducible effects were not conserved in metacyclic trypomastigotes. Moreover, PAC-1 reduced the viability of mammalian cells with a greater IC₅₀ (25.70 μM) compared to *T. cruzi* epimastigotes, indicating distinct modes of binding between caspases and metacaspases. To shed light on the selectivity of metacaspases and caspases, we determined the structural features related to the PAC-1 binding sites in both types of proteins. These data are

important for improving the understanding of the apoptosis pathway in *T. cruzi* so that TcMCA3 could be better targeted with future pharmaceuticals.

Keywords Metacaspases · *Trypanosoma cruzi* · Apoptosis · PAC-1

Introduction

Apoptosis is a highly regulated process important for homeostasis in tissues and during embryonic development. This process is characterized by morphologic changes such as cell shrinkage, pyknosis, and extensive plasma membrane blebbing followed by karyorrhexis and separation of cell fragments into apoptotic bodies [1]. Phagocytes such as macrophages, dendritic cells, Kupffer cells, fibroblasts, and endothelial cells phagocytose the apoptotic bodies [2].

In metazoans, the control and execution of apoptosis is undertaken by caspases [3], and different therapeutics target these proteins to treat a variety of pathologies, including cardiac disease, neoplasia and neurologic disorders [4–6].

Until the 1990s, apoptosis was associated only with multicellular organisms. However, evidence for apoptosis in unicellular organisms has increased over the last decades [7–14]. The morphological alterations observed during apoptosis have been identified in *Trypanosoma cruzi* [7, 12, 13, 15], the etiologic agent of Chagas disease that is endemic in Latin-America [16]. Apoptosis may benefit parasite invasion by preventing early host inflammatory responses [17].

Trypanosoma cruzi does not possess genes coding for caspases, but it does have two homologous active metacaspases: metacaspase-3 (TcMCA3) and metacaspase-5 (TcMCA5). In unicellular organisms, metacaspases seem to regulate apoptosis [3]. Evidence for a role of TcMCAs in

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10495-017-1428-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza
tatianabrasil@fiocruz.br

- ¹ Laboratório de Proteômica e Engenharia de Proteínas, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, Curitiba, Brazil
- ² Laboratório de Biologia Básica de Células Tronco, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, Curitiba, PR, Brazil
- ³ Laboratório de Regulação da Expressão Gênica, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz, Curitiba, PR, Brazil

T. cruzi apoptosis include (1) the change in TcMCA localization from the cytoplasm to the nucleus in apoptotic epimastigote cells [17]; (2) increased vulnerability of *T. cruzi* epimastigotes over-expressing recombinant TcMCA5 to apoptosis [17, 18] and (3) the fundamental role of the regulation of TcMCA3 activity in cell cycle progression in all replicative forms of *T. cruzi* [19].

Metacaspases are attractive targets for chemotherapy due to their important role in parasites and their absence in humans [20, 21]. In this study, we combined several orthogonal techniques to gather information about the effects of the interaction of TcMCA3 with pro-apoptotic molecules. This knowledge is important for evaluating the role of TcMCA3 in *T. cruzi*, verifying the differences in apoptosis between trypanosomatids and metazoans and providing data characterizing apoptosis in *T. cruzi*.

Experimental procedures

TcMCA3 production

The coding sequence of metacaspases three was amplified by PCR using the following oligonucleotide primers: TcMCA3_F (CATATGAAATACCTGCTGCCGACC GCT) and TcMCA3_R (CTCGAGTGT GGC GATCCG GATCCAC). The amplified products were cloned into the pGEM-T-easy vector and validated by sequencing. The cloning vector pGEM-TcMCA3 was digested with *Nde*I and *Xho*I enzymes for subcloning into the pET22b expression vector (Qiagen). Positive clones were used to transform *E. coli* BL21 Tuner (DE3) (Novagen—EMBL Millipore).

An isolated colony was grown for 16 h at 37 °C in LB medium supplemented with ampicillin (50 mg/mL). Next, a dilution (1:100) was performed and the culture grown at 37 °C until OD₆₀₀ = 1.2. Addition of 1 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 16 h at 25 °C induced recombinant expression. The cells were collected by centrifugation at 6000×g for 15 min at 4 °C. Pellets were resuspended in 20 mM 50 mM NaCl in phosphate buffer pH 7.5. The cell suspension was lysed in the M-110L Pneumatic High Shear Fluid Processor (Microfluidics), and the supernatant was separated through centrifugation at 7000×g for 40 min. The supernatant was subjected to affinity chromatography.

Purification was performed on a Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC) system (GE Healthcare Life Sciences) with a HisTrap Chelating Column (GE Healthcare Life Sciences). Buffer A (500 mM NaCl in 20 mM phosphate buffer pH 7.4) was used for equilibration. Protein was eluted with 100 mM imidazole. The fractions from the chromatography were analyzed by polyacrylamide gel prepared using a traditional protocol [22]. Size-exclusion

chromatography (SEC) was carried out in a Superdex 200 16/600 GL (GE Healthcare Life Sciences) and 50 mM Tris pH 7.0 with 50 mM DTT as the mobile phase.

Western blot assay

Protein transfer from gels to Hybond-C membranes (GE Healthcare Life Sciences) was performed in a semi-dry system set at 25 V for 30 min. Rabbit anti-TcMCA3 rabbit serum (1:100) was used as the primary antibody with anti-rabbit IgG (1:10,000) coupled to peroxidase as the secondary antibody (Sigma Aldrich). A chemiluminescent substrate (ThermoFisher Scientific) was used for detection of horseradish peroxidase-bound protein.

LC-MS/MS acquisition

Purified TcMCA3 was identified by mass spectrometry as follows: proteins were reduced with DTT, alkylated with iodoacetamide and digested with trypsin overnight. The peptides were subjected to LC-MS/MS analysis using a Thermo Scientific Easy-nLC 1000 ultra-high-performance liquid chromatography (UPLC) system coupled online to a LTQ-Orbitrap XL ETD mass spectrometer (Mass Spectrometry Facility—RPT02H PDTIS/ Carlos Chagas Institute—Fiocruz Paraná) in the following manner: peptide mixtures were loaded onto a column (75 mm i.d., 15 cm long) packed in house with a 3.2 μm ReproSil-Pur C18-AQ resin (Dr. Maisch) with a flow of 500 nL/min and subsequently eluted with a flow of 250 nL/min from 5 to 40% ACN in 0.5% formic acid and 0.5% DMSO, in a 120-min gradient. The mass spectrometer was set in data-dependent mode to automatically switch between MS and MS/MS (MS2) acquisition. Survey full scan MS spectra (from *m/z* 300–2000) were acquired in the Orbitrap analyzer with resolution *R* = 60,000 at *m/z* 400 (after accumulation to a target value of 1,000,000 in the linear trap). The ten most intense ions were sequentially isolated and fragmented in the linear ion trap. Previous target ions selected for MS/MS were dynamically excluded for 90 s. Total cycle time was approximately 3 s. The general mass spectrometric conditions were as follows: spray voltage, 2.4 kV; no sheath and auxiliary gas flow; ion transfer tube temperature, 100 °C; collision gas pressure, 1.3 mTorr; normalized energy collision energy using wide-band activation mode; 35% for MS2. Ion selection thresholds were set at 250 counts for MS2. An activation *q* = 0.25 and activation time of 30 ms were applied in MS2 acquisitions.

Raw MS data analysis

The unreviewed proteome set of *T. cruzi*, composed of 48,637 sequences, was downloaded from the UniProt consortium on 17th November 2016. PatternLab 4.0 [23] was

used to generate a target-decoy database by grouping subset sequences, adding the sequences of 246 common mass spectrometry contaminants, and, for each sequence, including a reversed version of it. The final database used for PSM contained 48,883 sequences.

Peptide sequence matching

The Comet 2014 rev. 1 search engine [24], which is embedded into PatternLab for Proteomics 4.0 [23], was used to compare experimental tandem mass spectra against those theoretically generated from our sequence database to select the most likely peptide sequence candidate for each spectrum. Briefly, the search was limited to full peptide candidates; we imposed carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine as fixed and variable modifications, respectively. The search engine accepted peptide candidates within a 40-ppm tolerance from the measured precursor m/z and used the XCorr as the primary search engine score.

PSM validity was assessed using the search engine processor (SEPro) [25], which is embedded in PatternLab. Briefly, identifications were grouped by charge state (+2 and $\geq +3$) resulting in two distinct subgroups. For each result, the Comet XCorr, DeltaCN, DeltaPPM, and Peaks Matched values were used to generate a Bayesian discriminator. The identifications were sorted in non-decreasing order according to the discriminator score. A cutoff score was established to accept a false-discovery rate (FDR) of 1% at the peptide level based on the number of labeled decoys. This procedure was independently performed on each data subset, resulting in an FDR that was independent of charge state. Additionally, a minimum sequence length of six amino-acid residues was required. The results were post-processed to accept only peptide spectrum matches with less than 6 ppm from the global identification average and proteins with two or more identified peptides.

Differential scanning fluorimetry (DSF)

Thermal shift assays are a widely adopted technique to study thermal stabilization of proteins upon ligand binding. Such assays have been used extensively for detecting protein interacting partners and ultimately for drug discovery [26, 27]. The input for DSF consisted of 2 μM TcMCA3 and 10 μM ligands from Apoptosis Compound Library (Selleck Chemicals). A 200X SYPRO orange probed the denaturation process. The experiment was conducted in triplicate in a Real-Time PCR machine 7300 (Applied Biosystems).

GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) determined the inflection points of each denaturation curve (P_i) and the melting temperature variation (ΔT_m) was calculated using the equation: $\Delta T_m = P_i$ in the presence of ligand – P_i in the absence of ligand. The significance of the

differences observed was evaluated one way ANOVA with Benjamini–Hochberg procedure for data correction. False discovery rate of 0.05 were considered for statistically significance.

The tested compounds are listed in Table 1 [23].

In vitro viability assay

Different concentrations of PAC-1 were incubated with *T. cruzi* DM28c (1×10^5 cells) for 72 h. Epimastigotes incubated with DMSO were used as a negative control. Cell viability was verified by MTT assay [28]. Data were analyzed in Microsoft Office Excel, 365[®] in order to determine cell viability. These data were converted into a percentage of the control (normalizing control to 100% viability). These percentages were then transferred to GraphPad Prism[®] 6.0 to apply a Sigmoidal dose–response (variable slope) with four parameters. These parameters were used with rearranged Hill Function [45–47]. Outliers were analyzed using Grubbs (available online at <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). CompuSyn (CompuSyn Inc.) calculated IC_{20} , IC_{50} and IC_{80} , which are the concentrations that reduce cell viability by 20, 50 and 80%, respectively [29]. The results are presented as means of three experiments performed in triplicate.

Metacyclogenesis in vitro

Metacyclogenesis was performed as previously described [30]. Briefly, epimastigotes at the end of the logarithmic growth phase (cell density $\sim 6 \times 10^7$ cells/mL) are centrifuged at $7000 \times g$ for 5 min at 10 °C. Then, cells are subjected to nutritional stress by incubation in TAU medium at a concentration of 5×10^8 cells/mL for 2 h at 28 °C. After nutritional stress, 5×10^6 cells/mL are inoculated into 300 cm² bottles containing TAU3AAG medium and incubated at 28 °C for 72 h. The addition of PAC-1 occurs 24 h after the inoculation into TAU3AAAG medium. The concentration of PAC-1 was equal to that found to reduce the viability of epimastigotes by 50% (IC_{50}).

The number of epimastigotes and metacyclic trypomastigotes were counted in Neubauer chambers. One way ANOVA verified the significance of variance at $\alpha = 0.5$.

For cytometry assays, purification of metacyclic trypomastigotes from epimastigotes was performed as described [31]. Briefly, after centrifugation of culture supernatant at $7000 \times g$ for 10 min, the pellet was resuspended in saline phosphate buffer, pH 7.5, supplemented with glucose (PSG) and purified by ion exchange chromatography with a DEAE Sepharose column.

Table 1 List of ligands used in DSF

	Name	Target	References	Benjamini–Hochberg significance	Benjamini–Hochberg p value
1	NUTLIN_3	p53	[19]	Not significant	0.056171302
2	DANUSERTIB	Aurora kinase	[55]	Not significant	0.058166409
3	<i>TW-37</i>	<i>Bcl-2</i>	[56]	<i>Significant</i>	<i>0.000966548</i>
4	<i>YM155</i>	<i>Survivin promoter</i>	[57]	<i>Significant</i>	<i>0.014655867</i>
5	JNJ26854165	p53	[58]	Not significant	0.091841642
6	Thalidomide	Multiple	[59]	Not significant	0.803095307
7	<i>Pomalidomide</i>	<i>TNF-α</i>	[60]	<i>Significant</i>	<i>0.012844648</i>
8	Pifithrin- α	p53	[61]	Not significant	0.057260902
9	Necrostatin-1	Receptor-associated adaptor kinase RIP (RIP1)	[62]	Not significant	0.058166409
10	TG101209	Multiple	[63]	Not significant	0.233235137
11	<i>HA14-1</i>	<i>Bcl-2</i>	[64]	<i>Significant</i>	<i>0.033565358</i>
12	<i>Rita</i>	<i>p53</i>	[65]	<i>Significant</i>	<i>0.012844648</i>
13	<i>Apoptosis activator 2</i>	<i>Apaf-1</i>	[7]	<i>Significant</i>	<i>0.008873187</i>
14	<i>PAC-1</i>	<i>Procaspace-3</i>	[49]	<i>Significant</i>	<i>0.006262093</i>
15	<i>ABT-199 (GDC-0199)</i>	<i>Bcl-2</i>	[66]	<i>Significant</i>	<i>0.033565358</i>
16	<i>Tenovin-1</i>	<i>SIRT1 and SIRT2</i>	[67]	<i>Significant</i>	<i>0.012844648</i>
17	<i>Amuvatinib (MP-470)</i>	Multiple	[68]	<i>Significant</i>	<i>0.048319425</i>
18	<i>AT-101</i>	<i>Bcl-2</i>	[69]	<i>Significant</i>	<i>0.006262093</i>
19	<i>NSC-207,895</i>	<i>MDMX</i>	[70]	<i>Significant</i>	<i>0.012844648</i>
20	<i>Lenalidomide</i>	Multiple	[71]	<i>Significant</i>	<i>0.008873187</i>
21	Obatoclox mesylate	Bcl-2	[72]	Not significant	0.420450683
22	ABT-737	Multiple	[73]	Not significant	0.681444924

The interactions highlighted in italics increased TCMCA3 thermal stability as indicated by Benjamini–Hochberg significance

In vitro optical imaging

The morphology of epimastigotes and metacyclic trypomastigotes under metacyclogenesis were analyzed with a system for optical microscopy FLoid™ Cell Imaging Station (Molecular Probes Life Technology, France) with a magnification of $\times 20$. Images were computationally treat for an additional magnification of $\times 5$.

Mitochondrial membrane potential

To evaluate mitochondrial membrane potential, epimastigotes and metacyclic trypomastigotes were grown for 24 h in the presence or absence of PAC-1 incubated with 50 μM Rhodamine 123 (ThermoFisher scientific) for 15 min at 4 C (protected from light), washed and suspended in PBS. Fluorescence intensity was measured on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA; Flow Cytometry Facility—RPT08L PDTIS/Carlos Chagas Institute—Fiocruz Paraná) in 10^4 gated events and analyzed using FlowJo software. Data are presented as the mean \pm standard deviation of a triplicate experiment. Statistical analysis was performed

using one-way ANOVA with the post hoc Bonferroni test. *, ** and *** indicate significance in compared to untreated control of $p < 0.05$; $p < 0.01$, $p < 0.005$, respectively. F-values were 92.97 and 215.53 for experiments with epimastigotes and metacyclic trypomastigotes, respectively.

Phosphatidylserine exposure

Epimastigotes or metacyclic trypomastigotes grew for 24 h in the presence or absence of PAC-1. Then, cells were harvested and washed once with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). After centrifugation, the cells were suspended in a $\times 1$ Annexin binding buffer (ThermoFisher scientific) and stained with Alexa Fluor 488 annexin V and propidium iodide (PI, ThermoFisher scientific). After 15 min, cells were resuspended in 400 μL of binding buffer, and fluorescence intensity was measured on a FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA; Flow Cytometry Facility—RPT08L PDTIS/ Carlos Chagas Institute—Fiocruz Paraná).

Viable cells are both Annexin V and PI negative. Early apoptotic cells are Annexin V positive and PI negative and

late apoptotic and/or necrotic dead cells are both Annexin V and PI positive. Four samples constituted controls used in this assay. Negative controls comprised cells not treated with PAC-1 in the presence (negative control 1) and absence (negative control 2) of annexin V and PI. Positive control comprised cells treated with Triton X 1% in the presence of Annexin V (positive control 1) or PI (positive control 2). For metacyclic trypomastigotes positive control the cells was treated with 0.0125%.

Data are presented as the means \pm standard deviation of triplicate experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with the post hoc Bonferroni test. Significant differences compared to untreated controls are denoted by *, **, or ***, meaning significance at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.005$, respectively. F-values were 92.97 and 215.53 for experiments with epimastigotes and metacyclic trypomastigotes, respectively. In experiments with epimastigotes, F-values were 28.33, 271.97, 1.04 and 619.01 for quadrants 1–4, respectively.

Molecular modeling

The atomic coordinates of metacaspase 2 from *Trypanosoma brucei* (PDB ID: 4AFV) were used as a template for generating structural models of TcMCA3 by restraint-based modeling as implemented in the MODELLER program [32]. The alignment was constructed based on secondary structure homology as available in the HHpred server [33]. To guarantee sufficient conformational sampling, an ensemble of 50 models was built, from which the best final model was selected based on evaluation of the stereochemistry, the objective function from MODELLER (DOPE score), and by visual inspection.

Those models were then minimized using the steepest descent minimization algorithm as implemented in the UCSF chimera software [34]. Incomplete site chains were replaced using the Dunbrack rotamer library [35]. The quality of the best model was also examined by the MolProbity platform [36].

Molecular docking

PAC-1 structure was obtained from NCBI PubChem Data Bank (ID: 5344054) [37]. TbMCA2 (PDB: 2QFV) [38] and caspase 3 (PDB: 2QUA) [39] were also used in this study. AutoDock Vina [40] was used for molecular docking simulations with the appropriate parameters for receptor (merge charges, remove non-polar hydrogens, remove lone pairs, ignore waters, and ignore chains of non-standard residues) and ligand (merge charges, remove non-polar hydrogens and remove lone pairs). Number of binding modes and maximum energy difference (kcal/mol) were set to 9 and 3, respectively. The search was first restricted to calcium binding sites

determined within TbMCA2 (Supplementary Figure S1a) and then to a ligand binding site that should provide enough flexibility to accommodate a ligand (Supplementary Figure S1b).

The interaction of TcMCA3 under the 9 binding modes was analyzed with PDBePISA [41]. The predictions of contact area, energy of interactions and Gibbs free energy variation (ΔG , kcal/mol) of each complex were evaluated for selection of the best pose (Supplementary Tables S1 and S2).

Mammalian cells—cytotoxicity

For cytotoxicity assays, 3T3 NIH Clone A31 cells (Rio de Janeiro Cell Bank—BCRJ) were used. These cells were cultured according to datasheet instructions. Briefly, PAC-1 was diluted and prepared according to ICCVAM recommendations [42]. PAC-1 was immediately solubilized in culture medium and serial dilutions were applied to cell culture plates. To evaluate cytotoxicity, the neutral red uptake (NRU) assay was performed [43]. The NRU is a quantitative cell viability assay recommended by OECD [44] for determining the initial estimated doses for acute oral toxicity.

After 48 h of incubation with PAC-1 in different concentrations, the medium was discharged and cells were washed with D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline). Then, cells were stained with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ neutral red (Sigma-Aldrich) in DMEM (Gibco Invitrogen) and incubated at 37 °C for 3 h. Next, wells were rinsed with D-PBS and neutral red that was incorporated by extraction with a solution composed of 50% ethanol and 1% acetic acid (Merck). Plates were shaken for 20–45 min before the optical density of the samples was measured at 540 nm using a Synergy H1 Multi-Mode Reader (BioTek).

For each experiment, a separate plate of SDS concentrations was used as a positive control. For all tests, the acceptance criteria described in BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method by ICCVAM (Test Acceptance Criteria for Positive Control and Test Acceptance Criteria for Test Substances) were considered [43].

All data were analyzed according to ICCVAM recommendations [43–46]. Data were analyzed in Microsoft Office Excel, 365[®] in order to determine cell viability. These data were converted into a percentage of the control (normalizing control to 100% viability). These percentages were then transferred to GraphPad Prism[®] 6.0 to apply a Sigmoidal dose–response (variable slope) with four parameters. These parameters were used with rearranged Hill Function [45–47]. Outliers were analyzed using Grubbs (available online at <http://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). Based on the Hill equation, it was possible to calculate IC_{20} , IC_{50} and IC_{80} values, which are the concentrations that reduce cell viability by 20, 50 and 80%, respectively [29].

IC_{50} was also used for predicting LD_{50} and GHS class. The geometric mean IC_{50} was used to predict RC rat-only millimole regression with the formula $LD_{50} \text{ (mmol/kg)} = 0.439 \log IC_{50} \text{ (mM)} + 0.621$ ($R^2 = 0.452$) [42, 46, 47].

Results

TcMCA3 oligomers consisting of intact and processed domains interact with ten different caspase activators

TcMCA3 recombinant purification resulted into two major bands observed in SDS-PAGE and western blot assay (Fig. 1a). The upper band corresponded to the full-length TcMCA3 protein (~50 kDa) and the lower band was the processed enzyme. MS/MS confirmed this hypothesis and

suggested that cleavage occurs prior to residue 130 (Fig. 1b, MS/MS raw data available in <https://1drv.ms/f/s!AhYYT3fyJgkiAVUrf7IXda1CQng>).

In addition to the presence of two bands in SDS-PAGE, SEC indicated that the sample presented structural homogeneity (Supplementary Figure S2), suggesting an interaction between intact and processed TcMCA3. Therefore, TcMCA3 samples eluted via SEC were used in screening for ligands. The thermal stability of TcMCA3 increased upon binding of 13 compounds (hits) (Table 1). The targets in human cells were as follows: 1 target for procaspase 3, 1 target for Survivin promoter, 1 target for APAF-1, 1 target for MDMX, 1 target for p53, 1 target for TNF- α , 4 targets for Bcl-2 and 3 targets for multiple compounds (Table 1). Through the criteria described in Fig. 2, we selected PAC-1 to investigate the role of its interaction with TcMCA3 in *T. cruzi* apoptosis.



Fig. 1 TcMCA3 production and DSF. **a** SDS-PAGE (1) and western blot (2) indicate that TcMCA3 was purified as two isoforms in solution. **M** PageRuler Unstained Protein Ladder (ThermoFisher). **b** MS/MS confirmed that the two bands correspond to TcMCA3, with

its N-terminal present only in the upper band. Peptides found only in the 50 kDa band are highlighted in yellow. Peptides found only in the 30 kDa band are highlighted in green. Peptides found in both samples are highlighted in gray. (Color figure online)

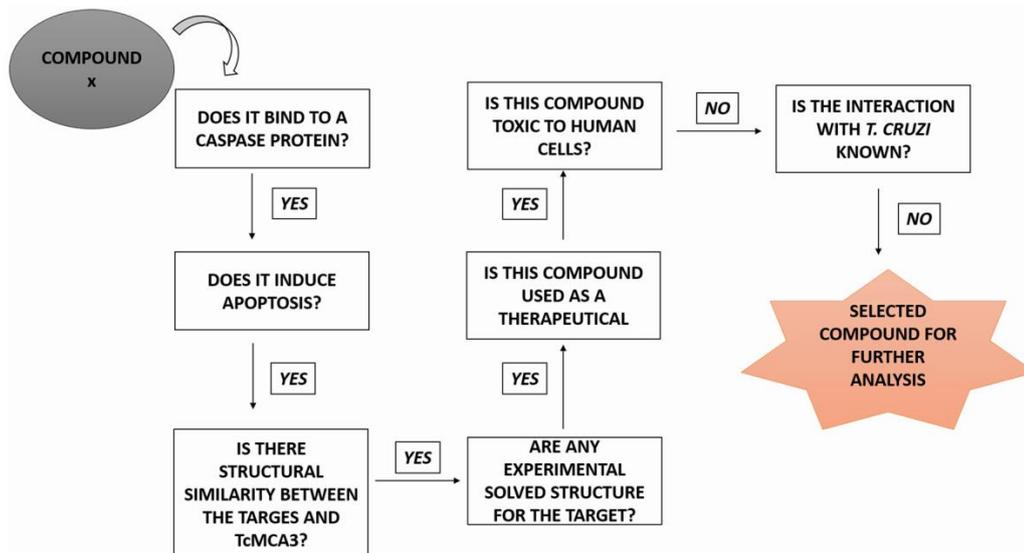


Fig. 2 Workflow for the selection of the best ligand of TcMCA3 for characterization

PAC-1 affects *T. cruzi* epimastigote viability in vitro and induces phosphatidylserine exposure

The MTT assay revealed that PAC-1 interferes with *T. cruzi* epimastigote viability, presenting an IC_{50} of $14.12 \mu\text{M}$ (Fig. 3a, b), and flow cytometry showed that PAC-1 causes a loss of mitochondrial membrane potential and phosphatidylserine exposure, features of apoptosis in metazoans. After 24 h of incubation, PAC-1 led to defective mitochondrial functioning (Fig. 4a) at all tested doses. Moreover, after 24 h of incubation, phosphatidylserine exposure occurred in cells treated with the IC_{20} and IC_{50} of PAC-1 (Fig. 4b). Distinct from other doses, the IC_{80} of PAC-1 induced membrane rupture, which significantly contributed to cell death (Fig. 4c).

PAC-1 affects viability at lower doses in *T. cruzi* than in mammalian cells

3T3 cells are a reference cell line for toxicity predictions. To provide data concerning PAC-1 toxicity, we investigated its effect in 3T3 cells. The calculated IC_{80} , IC_{50} and IC_{20}

values of PAC-1 were 75.43 ± 21.248 , 25.7 ± 13.49 and 8.99 ± 6.64 , respectively (Fig. 3c, d). Additionally, it was possible to predict an LD50 of 3167.73 ± 695.72 . This LD50 value indicates that PAC-1 is a GHS class 5 drug (Fig. 3d). The Globally Harmonized System Of Classification And Labelling Of Chemicals (GHS) for acute toxicity indicate that a class 5 substance has a LD50 from 2000 to 5000 mg/kg with a relatively low acute toxicity and that may present danger to vulnerable populations [48].

Metacyclic trypomastigotes resist to PAC-1 induced death

Surprisingly, PAC-1 affected the morphology of epimastigotes during differentiation (Fig. 5a–f). However, optical microscopy did not suggest changes in metacyclic trypomastigote morphology (Fig. 5a–f). Moreover, the number of differentiated cells did not vary significantly during metacyclogenesis with PAC-1 addition (Fig. 5f).

By comparing the effects of the epimastigote IC_{50} dose in epimastigotes and metacyclic trypomastigotes, it

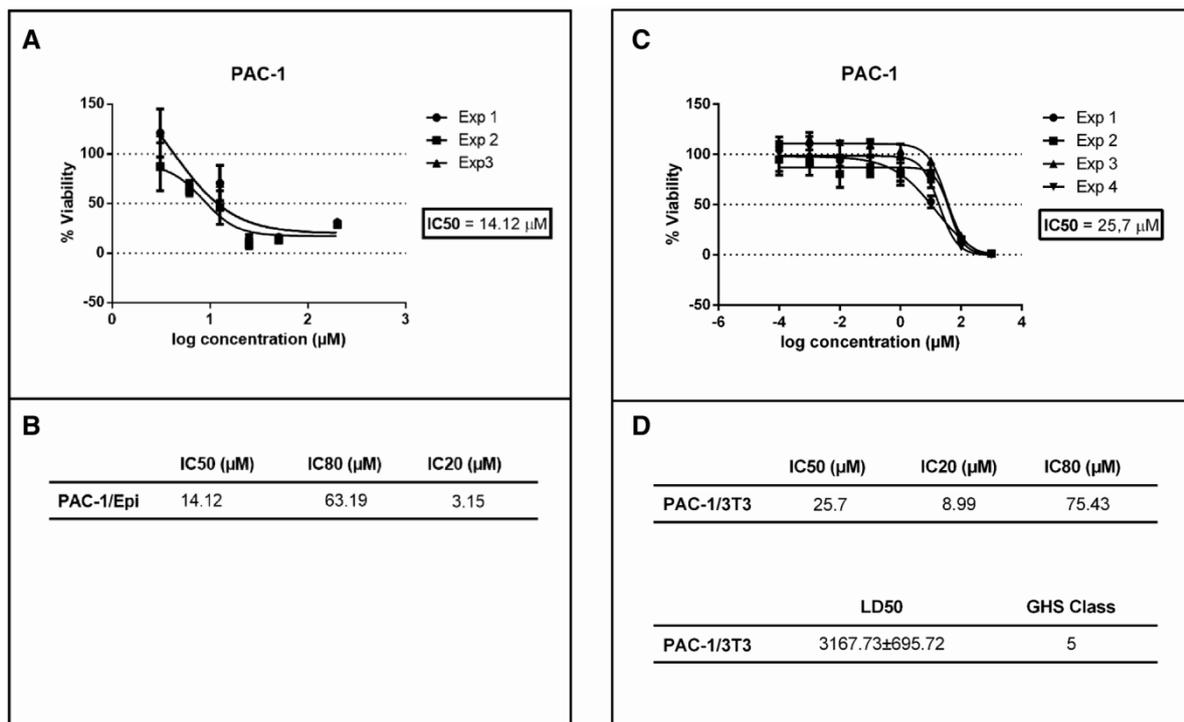


Fig. 3 Viability and cytotoxic assays. **a**, **b** Viability assay of *T. cruzi* epimastigotes treated for 72 h with PAC-1. A dose response curve that fits the Hill Function equation was obtained in each out of three independent experiments (**a**). CompuSym calculated IC_{50} , IC_{80} , and IC_{20} values (**b**). **c**, **d** Cytotoxicity assay. Murine BALB/c 3T3 clone A31 cells were treated with PAC-1 in at different concentra-

tions for 48 h. After that, cells were incubated followed by incubation with neutral red solution for 3 h. A dose response curve that fits the Hill Function equation was obtained in each out of four independent experiments (**c**). Based on the Hill Function equation, IC_{50} , IC_{80} , and IC_{20} values were calculated and LD 50 and GHS Cclass were predicted (**d**)

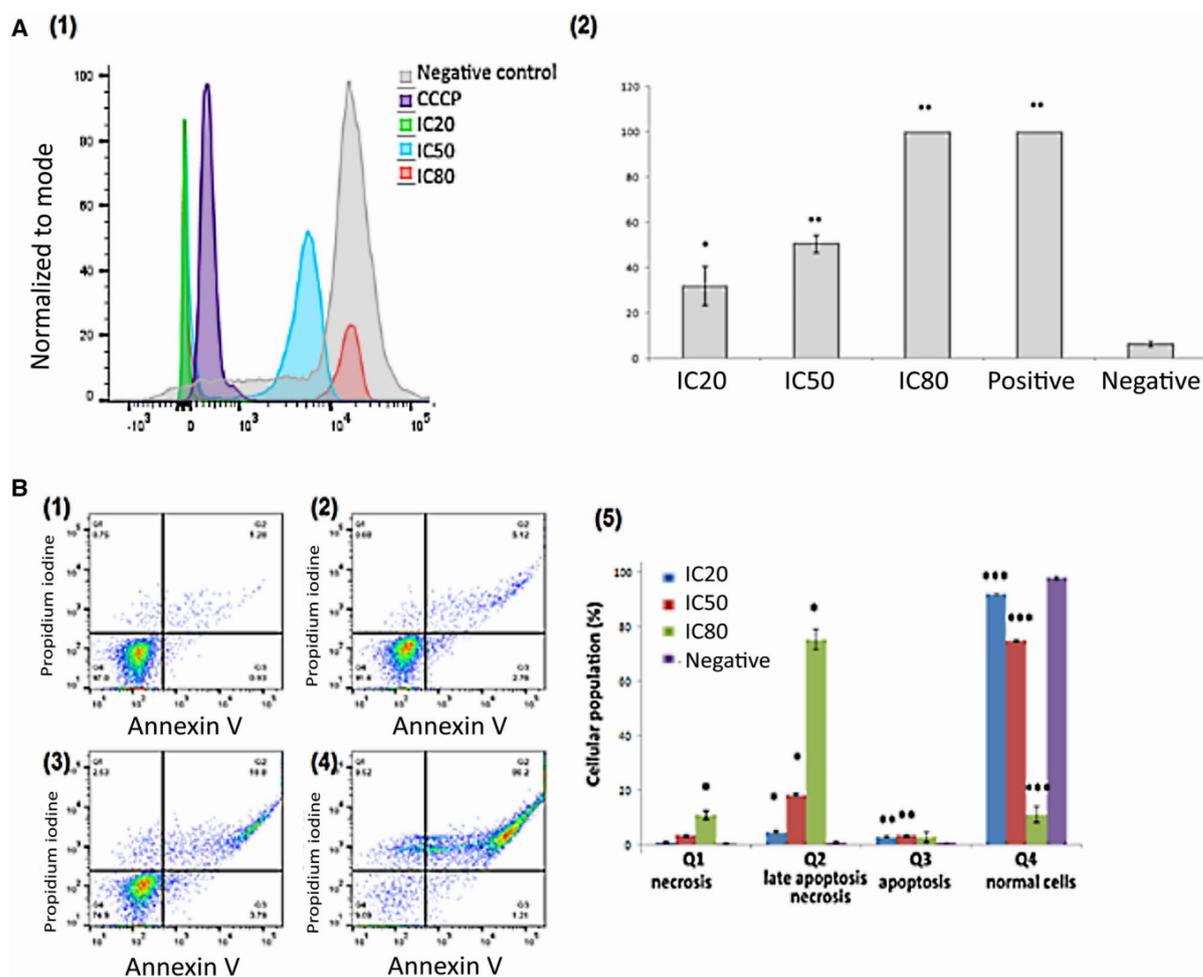


Fig. 4 Epimastigotes flow cytometry analysis. **a** Mitochondrial activity determined by rhodamine 123. Fluorescence emission histogram (1) of the mitochondrial membrane potential of epimastigotes treated for 24 h with IC20, IC50 and IC80 doses of PAC-1 and the percentage of parasites with negative fluorescence presented as mean \pm standard deviation of a triplicate experiment (2). Statistical analysis via one-way ANOVA with the post hoc Bonferroni test. Significant differences compared to untreated controls are shown as *p < 0.05 or **p < 0.01. **b** Evaluation of the membrane permeability

of epimastigotes treated with PAC-1. Epimastigotes after 24-h treatment with IC20 (2), IC50 (3), and IC80 (4) of PAC-1. Non-treated cells are shown in 1. In all cases, images are representative of the mean resulting from a triplicate experiment. 5 Graphic of the evaluation of membrane permeability of *T. cruzi* treated with PAC-1. Data are presented as mean \pm standard deviation of a triplicate experiment. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with the post hoc Bonferroni test. Significant differences: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005

was possible to verify that PAC-1 reduced mitochondrial function of both groups (Fig. 6a). However, cytometry data show that metacyclic trypomastigote cells are more resistant, having no cytoplasmic membrane rupture and no phosphatidylserine exposure (Fig. 6b).

The molecular mechanism of action for PAC-1 might be different from that of procaspase 3 activation

Molecular modeling of TcMCA3 presented good quality (Supplementary table S3) due to fold conservation with

TbMCA2. Both proteins possess seven β -sheets surrounded by six α -helices (Fig. 7).

TcMCA3 might interact with PAC-1 via 12 different residues: K¹⁸¹, H²²⁴, S²²⁵, G²⁶⁷, C²⁶⁸ (Van de Walls interactions), I⁴⁸, F¹⁸², A²⁶⁸, T³²⁷, Q³²⁸ (Hydrophobic interactions), and Y⁴⁵, H¹⁷¹ (Hydrogen interactions) (Fig. 7a). The probable PAC-1 binding site is in the proximity of the active site and might stabilize it in an open conformation, enhancing TcMCA3 activity (Fig. 7b).

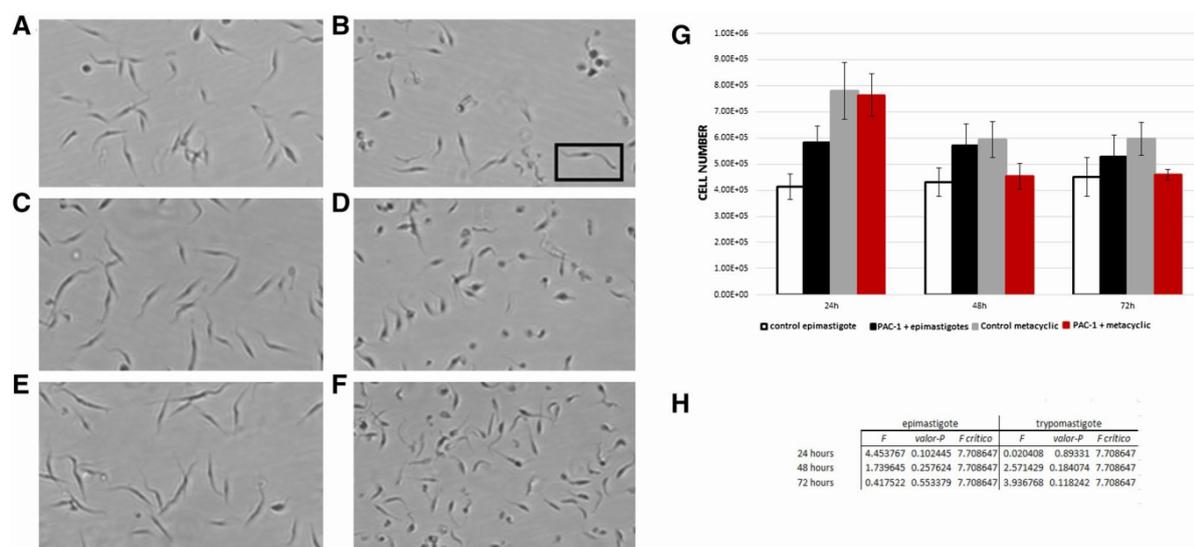


Fig. 5 Effect of PAC-1 on metacyclogenesis. **b, d, f** Show the morphology of parasites in TAU3AAG media after 24, 48 and 72 h of PAC-1 treatment, respectively. **a, c, e** Show the morphology of control cells at 24, 48 and 72 h, respectively. **g** Number of epimastigotes

and metacyclic trypomastigotes during metacyclogenesis. Control cells were cultured in the absence of PAC-1. **h** One-way ANOVA is shown in **g**

The PAC-1- and TcMCA3-interacting residues are not conserved in caspase 3, suggesting a different mode of binding between PAC-1-caspase 3 and Pac1-TcMCA3 (Fig. 7c). Superposing caspase 3 (PDB 4QUA) and TcMCA3 structures revealed differences in the regions around their active sites (Fig. 7d, e). Otherwise, TcMCA3 and TcMCA2 present high similarity (Fig. 7b), although their sequences are not conserved (Fig. 7c).

Discussion

Caspases exist as inactive proenzymes with protein activation resulting from cleavage of their p20 and p10 subunits. Several reports demonstrated the catalytic activation of metacaspases and their homologues [49–51]. Among trypanosomatids, there are indications of metacaspase processing in *Leishmania major* [52] and dependence of enzymatic activation upon processing. In *T. brucei*, activity might not be dependent upon cleavage [53], but TbMCA2 processing affects substrate binding site and enables hydrolysis of large substrates [54]. Different from previous reports [19], herein, we show that recombinant protein production results in two stable isoforms of TcMCA3, indicative of self-processing in vitro. This autocatalytic behavior of TcMCA3 is distinct from what has been previously reported [19] and might be a consequence of different tags and buffers used for recombinant expression and purification. Indeed, the presence of two stable bands identified by MS/MS as TcMCA3 suggests

specific cleavage in spite of protein degradation. Moreover, the similarity in SDS-PAGE profiles between TbMCA2 [54] and TcMCA3 auto-processing favor the hypothesis of TcMCA3 processing. Unfortunately, MS/MS was not able to determine with high accuracy the region of cleavage. However, the results suggest that it probably occurs before residue 130. In fact, determination of the metacaspase cleavage site remains obscure. Several reports have demonstrated metacaspase processing but were also unable to verify the cleavage site [49–51].

Currently, several companies are searching for specific caspase inhibitors due to their therapeutic potential [55]. Experimental data in animal models indicate that inhibition of this pathway could be useful in treatment of sepsis [56, 57], heart disease, stroke-related ischemia/reperfusion, and injury to the brain, liver and other organs [58, 59]. Identification of a compound that induces or protects against apoptosis in *T. cruzi* would allow in vitro manipulation of this process. Due to the conservation of metacaspases and caspase folding (Fig. 7f), we began the search using a well-characterized apoptotic compound. Furthermore, there is a great push for research into new uses for existing drugs because this approach avoids the immense cost associated with the development of new chemical entities and may be particularly useful in understudied diseases.

Importantly, this work identified 13 compounds that improved the thermal stability of TcMCA3. From those, we decided to evaluate the effect of the PAC-1 and TcMCA3 interaction in vitro. The choice of compound was based on

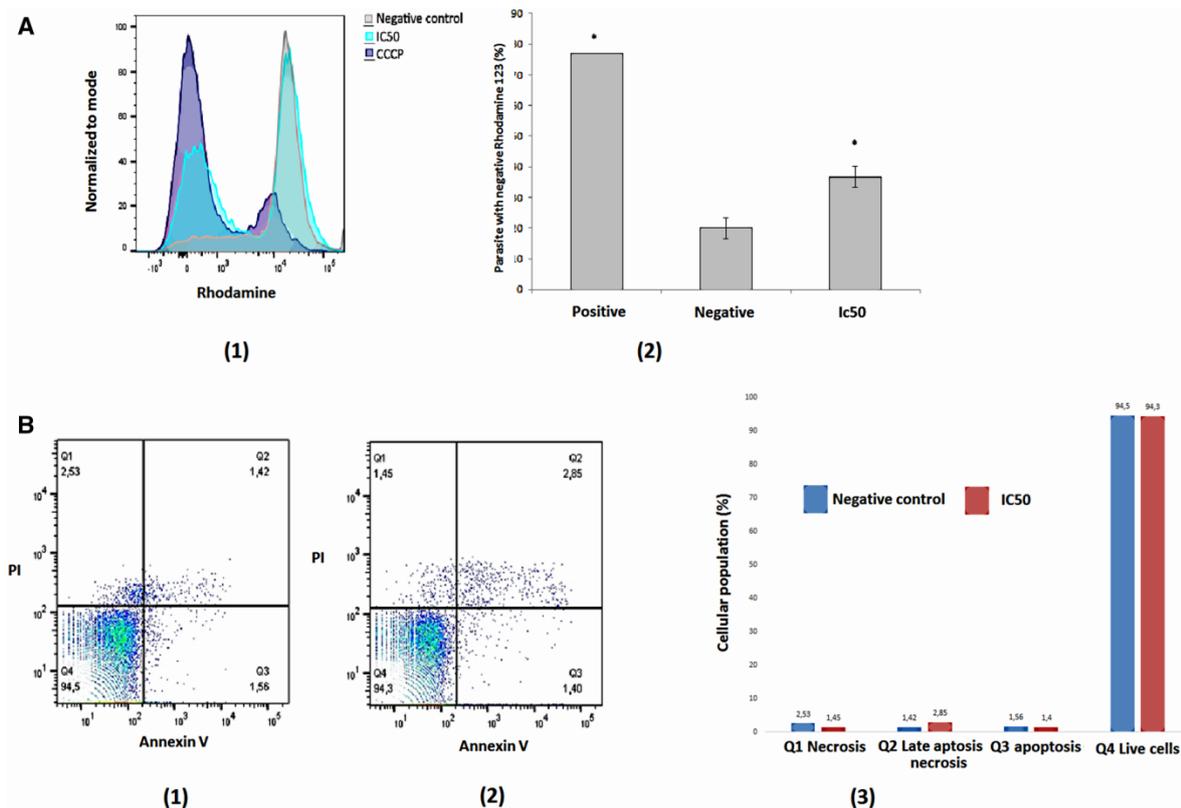


Fig. 6 Cytotoxicity in metacyclic trypomastigotes. **a** Mitochondrial activity probed by rhodamine 123. Fluorescence emission histogram (1) of membrane potential of metacyclic trypomastigotes treated for 24 h with the epimastigote IC50 dose of PAC-1. Percentage of parasites with negative fluorescence are presented as media \pm standard deviation of a triplicate experiment (2). One-way ANOVA statistical analysis with the post hoc Bonferroni test; A significant difference in relation to the untreated control was indicated by * $p < 0.05$. **b** Evalua-

tion of membrane permeability of metacyclic trypomastigotes treated with PAC-1. Metacyclic trypomastigotes after 24-h treatment with epimastigote IC50 of PAC-1 (2). Controls are presented in (1). In all cases, images are representative of the mean resulting from a triplicate experiment. Graphic of the evaluation of membrane permeability of *T. cruzi* treated with PAC-1 (3). No significant difference among data

the factors described in Fig. 2, and PAC-1 met these criteria. It is well established that PAC-1 induces apoptosis through procaspase-3 activation by sequestering inhibitory zinc ions, thus allowing procaspase-3 auto activation into caspase 3 [60]. Moreover, PAC-1 is a potential treatment in cancer [61] whose effectiveness is directly proportional to the procaspase-3 concentration present in cells [61].

PAC-1 and zinc form a tight complex with each other, with a dissociation constant of approximately 42 nM. Among several compounds (CuSO_4 , ZnSO_4 , CoCl_2 , FeCl_2 , MnCl_2 , FeCl_3 , MgCl_2), only Zinc and Cobalt strongly interact with procaspase-3 [60]. Distinct from caspases, metacaspases are dependent on calcium for activity [62]. TcMCA3 activity increases gradually after calcium addition [19] and in *T. brucei*, calcium binding induces an allosteric conformational change that promotes activity

[62]. In *T. brucei*, the calcium-binding site is comprised of four aspartic acid residues (D^{173} , D^{189} , D^{190} , and D^{220}) [62]. Aside from D^{190} , the other residues are conserved in *T. cruzi*. In addition, our docking analysis showed that PAC-1 interaction might not be likely to occur in the calcium binding site (Supplementary Table S2). Instead, energetically favored residues for interaction are not conserved between TbMCA2 and caspase 3 (Fig. 7). All these data indicate that TcMCA3 regulation might have unique features in *T. cruzi*.

Even if the mechanism of activation is distinct, the downstream effect in cells is quite similar. PAC-1 affected *T. cruzi* epimastigote viability by leading to phosphatidylserine exposure and mitochondrial inactivation, features of apoptosis. However, the effects of PAC-1 in metacyclic trypomastigotes differed greatly from those observed in

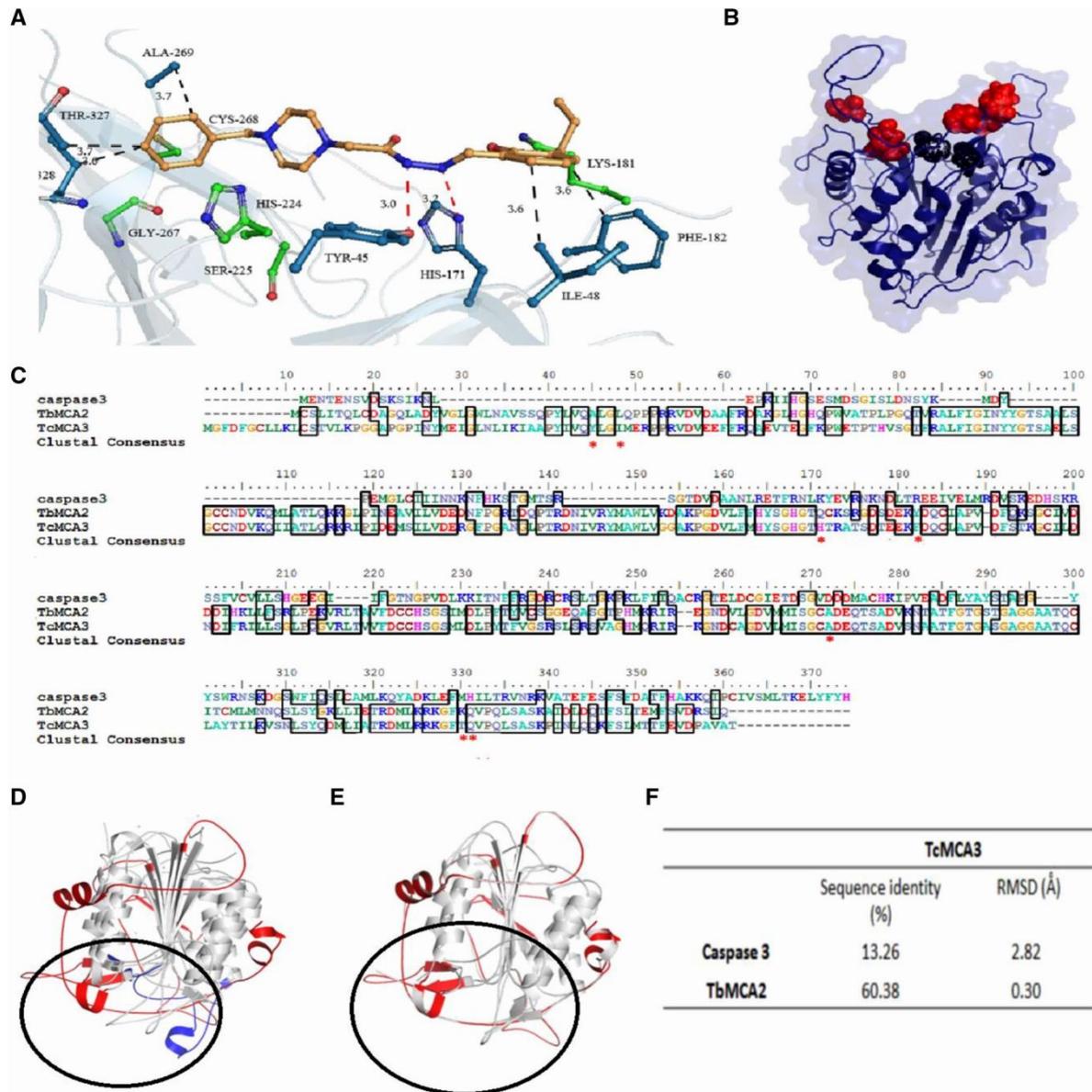


Fig. 7 PAC-1 and TcMCA3 interaction site. **a** PAC-1 binding pocket in TcMCA3 with interacting residues presented as sticks. Carbons of PAC-1 are displayed in wheat. Black and red lines represent hydrophobic and hydrogen interactions, respectively. Carbons of TcMCA3 residues contributing to Van der Waals interactions with PAC-1 are colored in green. **b** TcMCA3 structure model with regions that interact with PAC-1 highlighted as red spheres. The catalytic dyad location is shown as black spheres. **c** Sequence alignment between caspase 3, TbMCA2 and TcMCA3. Conserved residues among caspase 3, TbMCA2 and TcMCA3 are shown by black boxes. Residues of

TcMCA3 that might interact with PAC-1 are highlighted with red asterisks. **d** Superposition of the TcMCA3 model and caspase 3 (PDB 4QUA). Unique regions in TcMCA3 and caspase 3 are highlighted in red and blue, respectively. The circle indicates the PAC-1 binding pocket in TcMCA3. **e** Superimposition of the TcMCA3 model and TbMCA2 (PDB 4QFV). Regions shown in red in TbMCA2 are those found to diverge between TcMCA3 and caspase. The superimposed images indicate that they are conserved between TcMCA3 and TbMCA2. **f** RMSD values and sequence identity found after comparison of these three proteins. (Color figure online)

epimastigotes. Metacyclic trypomastigotes incubated with PAC-1 were more resistant to death than were epimastigotes. *T. cruzi* has a complex life cycle involving mammalian hosts and insect vectors [63]. Distinct from epimastigotes that divide by binary fission in the gut of the vector, the transmission stage parasites, metacyclic trypomastigotes cannot divide and must, therefore, penetrate mammalian host cells in order to continue the *T. cruzi* life cycle in the host [64]. Several studies concluded that *T. cruzi* utilizes its antioxidant system to protect itself against macrophage invasion at the onset of infection to ensure dissemination to distant tissues and organs [64]. Conceivably, trypomastigote-invading cells express higher levels of antioxidants that enable them to overcome mitochondrial stress [65].

In addition, previous work demonstrated that epimastigotes overexpressing TcMCA3 displayed a reduced percentage of propidium iodine positive cells when compared with uninduced controls, indicating a pro-survival effect of TcMCA3 overexpression [19]. However, stimulation of metacyclogenesis was dependent on the catalytic activity of TcMCA3 [19]. The effects caused by PAC-1 incubation with *T. cruzi* are antagonistic to TcMCA3 overexpression, strengthening the hypothesis that PAC-1 is an inhibitor of TcMCA3.

The first evidence of apoptosis in *T. cruzi* was reported in 1995 [7], but no isolated activators have been identified until now. Information concerning the regulation of this process and the enzymes involved remains elusive. Despite PAC-1 seeming to have greater affinity for cancer lineages (IC₅₀ of 3 nM) than for *T. cruzi* epimastigote (IC₅₀ of 14.12 μM), its IC₅₀ is in the range of Benznidazole (IC₅₀ of 22.69 μM) and Nifurtimox (IC₅₀ of 3.78 μM) [66]. Moreover, when comparing the IC values in mammalian cells (IC₂₀: 75.43, IC₅₀: 25.7, IC₈₀: 8.99) to IC values in *T. cruzi* epimastigote cells (IC₂₀: 3.15, IC₅₀: 14.12, IC₈₀: 63.19), we observed that these values are higher in 3T3 cells, indicating that PAC-1 kills *T. cruzi* at lower doses than mammalian cells. This is fortuitous in regard to therapeutic relevance, since PAC-1 will cause death in *T. cruzi* before it harms mammalian cells.

Above all, it is important to highlight the importance of this investigation beyond its clinical applications. Identification of a compound that binds to TcMCA3 and promotes apoptosis in *T. cruzi* enables the study of apoptosis in vitro to provide a better understanding of this process.

References

- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:496–516. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012. [Investigations](#)
- de Almeida CJG, Linden R (2005) Phagocytosis of apoptotic cells: a matter of balance. *Cell Mol Life Sci* 62:1532–1546. doi:10.1007/s00018-005-4511-y
- Uren A, O'Rourke K, Aravind LA et al (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6:961–967. doi:10.1016/S1097-2765(00)00094-0
- Schulz JB, Weller M, Moskowitz MA (1999) Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 45:421–429
- Rohn TT, Head E (2009) Caspases as therapeutic targets in Alzheimer's disease: is it time to "cut" to the chase? *Int J Clin Exp Pathol* 2:108–118
- Holtzman DM, Deshmukh M (1997) Caspases: a treatment target for neurodegenerative disease? *Nat Med* 3:954–955. doi:10.1038/nm0997-954
- Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O et al (1995) Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death Differ* 2:285–300
- Cornillon S, Foa C, Davoust J et al (1994) Programmed cell death in Dictyostelium. *J Cell Sci* 107(Pt 10):2691–2704
- Davis MC, Ward JG, Herrick G, Allis CD (1992) Programmed nuclear death: apoptotic-like degradation of specific nuclei in conjugating Tetrahymena. *Dev Biol* 154:419–432
- Vardi A, Eisenstadt D, Murik O et al (2007) Synchronization of cell death in a dinoflagellate population is mediated by an excreted thiol protease. *Environ Microbiol* 9:360–369. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01146.x
- Welburn SC, Lillico S, Murphy NB (1999) Programmed cell death in procyclic form *Trypanosoma brucei* rhodesiense: identification of differentially expressed genes during con A induced death. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:229–234
- Piacenza L, Peluffo G, Radi R (2001) L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:7301–7306. doi:10.1073/pnas.121520398
- Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B et al (2004) Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness? *Trends Parasitol* 20:375–380. doi:10.1016/j.pt.2004.05.006
- Ridgley EL, Xiong ZH, Ruben L (1999) Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* 340(Pt 1):33–40
- Jimenez V, Paredes R, Sosa MA, Galanti N (2008) Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. *J Cell Biochem* 105:688–698. doi:10.1002/jcb.21864
- CDC (2013) Chagas disease: epidemiology and risk factors. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>. Accessed 2 Dec 2016
- Kosec G, Alvarez VE, Agüero F et al (2006) Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators. *Mol Biochem Parasitol* 145:18–28. doi:10.1016/j.molbiopara.2005.09.001
- Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB et al (2000) Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* 403:199–203. doi:10.1038/35003208
- Laverrière M, Cazzulo JJ, Alvarez VE (2012) Antagonistic activities of *Trypanosoma cruzi* metacaspases affect the balance between cell proliferation, death and differentiation. *Cell Death Differ* 19:1358–1369. doi:10.1038/cdd.2012.12
- Meslin B, Zalila H, Fasel N et al (2011) Are protozoan metacaspases potential parasite killers? *Parasit Vectors* 4:26. doi:10.1186/1756-3305-4-26
- Alvarez VE, Niemirowicz GT, Cazzulo JJ (2013) Metacaspases, autophagins and metalloproteases: potential new targets

- for chemotherapy of the trypanosomiasis. *Curr Med Chem* 20:3069–3077
22. Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G (1970) A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 47:69–85
 23. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV et al (2015) Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc* 11:102–117. doi:10.1038/nprot.2015.133
 24. Eng JK, Jahan TA, Hoopmann MR (2013) Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics* 13:22–24. doi:10.1002/pmic.201200439
 25. Carvalho PC, Fischer JSG, Xu T et al (2012) Search engine processor: filtering and organizing peptide spectrum matches. *Proteomics* 12:944–949. doi:10.1002/pmic.201100529
 26. Vivoli M, Novak HR, Littlechild JA, Harmer NJ (2014) Determination of protein-ligand interactions using differential scanning fluorimetry. *J Vis Exp*. doi:10.3791/51809
 27. Pantoliano MW, Petrella EC, Kwasnoski JD et al (2001) High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J Biomol Screen* 6:429–440
 28. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
 29. ICCVAM (2006) In vitro cytotoxicity test methods: background review document. NIH publication no: 07e4518. *Natl Inst Environ Health Sci* 17
 30. Contreras VT, Salles JM, Thomas N et al (1985) In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 16:315–327
 31. de Souza W (1984) Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol* 86:197–283
 32. Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234:779–815. doi:10.1006/jmbi.1993.1626
 33. Söding J, Biegert A, Lupas AN (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* 33:W244–248. doi:10.1093/nar/gki408
 34. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC et al (2004) UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25:1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084
 35. Dunbrack RL (2002) Rotamer libraries in the 21st century. *Curr Opin Struct Biol* 12:431–440
 36. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ et al (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D* 66:12–21. doi:10.1107/S0907444909042073
 37. Bolton EE, Wang Y, Thiessen PA, Bryant SH (2008) PubChem: integrated platform of small molecules and biological activities. *Annu Rep Comput Chem* 4:217–241
 38. Peng Y, Zhong C, Huang W, Ding J (2008) Structural studies of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in different enzymatic states reveal substantial conformational changes during the catalytic reaction. *Protein Sci* 17:1542–1554. doi:10.1110/ps.035675.108
 39. Meier R, Drepper T, Svensson V et al (2007) A calcium-gated lid and a large beta-roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from *Serratia marcescens*. *J Biol Chem* 282:31477–31483. doi:10.1074/jbc.M704942200
 40. Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31:455–461. doi:10.1002/jcc.21334
 41. Krissinel E, Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372:774–797. doi:10.1016/j.jmb.2007.05.022
 42. ICCVAM (2006) Background review document: in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating acute oral systemic toxicity. NIH publication no.: 07e4518
 43. ICCVAM (2006) Recommended test method protocol: BALB/c 3T3 NRU cytotoxicity test method
 44. OECD (2010) Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests no 129. OECD Environment, Health and Safety Publications
 45. ICCVAM (2006) Test method evaluation report (TMER): in vitro cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. NIH publication no: 07e4519. National Institute for Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina
 46. Scanu M, Mancuso L, Cao G (2011) Evaluation of the use of human mesenchymal stem cells for acute toxicity tests. *Toxicol In Vitro* 25:1989–1995. doi:10.1016/j.tiv.2011.07.006
 47. Abud APR, Zych J, Reus TL et al (2015) The use of human adipose-derived stem cells based cytotoxicity assay for acute toxicity test. *Regul Toxicol Pharmacol* 73:992–998. doi:10.1016/j.yrtph.2015.09.015
 48. Vereinte Nationen (2011) Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals: (GHS), 4th edn. United Nations, New York
 49. Madeo F, Herker E, Maldener C et al (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell* 9:911–917. doi:10.1016/S1097-2765(02)00501-4
 50. Watanabe N, Lam E (2005) Two Arabidopsis metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. *J Biol Chem* 280:14691–14699. doi:10.1074/jbc.M413527200
 51. González IJ, Desponds C, Schaff C et al (2007) Leishmania major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. *Int J Parasitol* 37:161–172. doi:10.1016/j.ijpara.2006.10.004
 52. Zailila H, González IJ, El-Fadili AK et al (2011) Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in Leishmania major: Leishmania metacaspase catalytic domain and cell death. *Mol Microbiol* 79:222–239. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07443.x
 53. Moss CX, Westrop GD, Juliano L et al (2007) Metacaspase 2 of *Trypanosoma brucei* is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. *FEBS Lett* 581:5635–5639. doi:10.1016/j.febslet.2007.11.009
 54. Gilio JM, Marcondes MF, Ferrari D et al (2017) Processing of metacaspase 2 from *Trypanosoma brucei* (TbMCA2) broadens its substrate specificity. *Biochim Biophys Acta* 1865:388–394. doi:10.1016/j.bbapap.2017.01.002
 55. Neufeld KL Nuclear APC NKNA (Landes Bioscience) Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX)
 56. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY (1994) Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol Baltim Md* 152:5014–5021
 57. Ayala A, Herdon CD, Lehman DL et al (1996) Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood* 87:4261–4275
 58. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE et al (2000) Caspase inhibition protects from liver injury following ischemia and reperfusion in rats. *Transpl Int* 13(Suppl 1):S568–S572
 59. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y (1998) Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 97:276–281
 60. Peterson QP, Goode DR, West DC et al (2009) PAC-1 activates procaspase-3 in vitro through relief of zinc-mediated inhibition. *J Mol Biol* 388:144–158. doi:10.1016/j.jmb.2009.03.003

61. Putt KS, Chen GW, Pearson JM et al (2006) Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy. *Nat Chem Biol* 2:543–550. doi:[10.1038/nchembio814](https://doi.org/10.1038/nchembio814)
62. McLuskey K, Rudolf J, Proto WR et al (2012) Crystal structure of a *Trypanosoma brucei* metacaspase. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:7469–7474. doi:[10.1073/pnas.1200885109](https://doi.org/10.1073/pnas.1200885109)
63. Chagas C (1909) Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1:159–218. doi:[10.1590/S0074-02761909000200008](https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008)
64. Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA et al (2012) Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease: *T. cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol* 14:634–643. doi:[10.1111/j.1462-5822.2012.01764.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01764.x)
65. Castro H, Tomás AM (2008) Peroxidases of trypanosomatids. *Antioxid Redox Signal* 10:1593–1606. doi:[10.1089/ars.2008.2050](https://doi.org/10.1089/ars.2008.2050)
66. Palace-Berl F, Jorge SD, Pasqualoto KFM et al (2013) 5-Nitro-2-furfuriliden derivatives as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents: design, synthesis, bioactivity evaluation, cytotoxicity and exploratory data analysis. *Bioorg Med Chem* 21:5395–5406. doi:[10.1016/j.bmc.2013.06.017](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.06.017)
67. Lain S, Hollick JJ, Campbell J, Staples OD, Higgins M, Aoubala M, McCarthy A, Appleyard V, Murray KE, Baker L, Thompson A, Mathers J, Holland SJ, Stark MJR, Pass G, Woods J, Lane DP, Westwood NJ (2008) Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator. *Cancer Cell* 13:454–463. doi:[10.1016/j.ccr.2008.03.004](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.03.004)
68. Tibes R, Fine G, Choy G, Redkar S, Taverna P, Oganessian A, Sahai A, Azab M, Tolcher AW (2013) A phase I, first-in-human dose-escalation study of amuvatinib, a multi targeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 71:463–471. doi:[10.1007/s00280-012-2019-3](https://doi.org/10.1007/s00280-012-2019-3)
69. Zerp SF, Stoter R, Kuipers G, Yang D, Lippman ME, van Blitterswijk WJ, Bartelink H, Rooswinkel R, Lafleur V, Verheij M (2009) AT-101, a small molecule inhibitor of anti-apoptotic Bcl-2 family members, activates the SAPK/JNK pathway and enhances radiation-induced apoptosis. *Radiat Oncol* 4:47. doi:[10.1186/1748-717X-4-47](https://doi.org/10.1186/1748-717X-4-47)
70. Wang H, Ma X, Ren S, Buolamwini JK, Yan C (2011) A small-molecule inhibitor of MDMX activates p53 and induces apoptosis. *Mol Cancer Ther* 10:69–79. doi:[10.1158/1535-7163.MCT-10-0581](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0581)
71. Vallet S, Palumbo A, Raje N, Boccadoro M, Anderson KC (2008) Thalidomide and lenalidomide: mechanism-based potential drug combinations. *Leuk Lymphoma* 49:1238–1245. doi:[10.1080/10428190802005191](https://doi.org/10.1080/10428190802005191)
72. Shore GC, Viallet J (2005) Modulating the bcl-2 family of apoptosis suppressors for potential therapeutic benefit in cancer. *Hematology Am Soc Hematol Educ Progr* 2005:226–230. doi:[10.1182/asheducation-2005.1.226](https://doi.org/10.1182/asheducation-2005.1.226)
73. Konopleva M, Contractor R, Tsao T, Samudio I, Ruvolo PP, Kitada S, Deng X, Zhai D, Shi YX, Sneed T, Verhaegen M, Soengas M, Ruvolo VR, McQueen T, Schober WD, Watt JC, Jiffar T, Ling X, Marini FC, Harris D, Dietrich M, Estrov Z, McCubrey J, May WS, Reed JC, Andreeff M (2006) Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10:375–388. doi:[10.1016/j.ccr.2006.10.006](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.006)

4. DISCUSSÃO

As caspases existem como pró-enzimas inativas e sua ativação resulta da clivagem de suas subunidades p20 e p10. Vários trabalhos demonstraram a ativação catalítica das metacaspases e seus homólogos (GONZÁLEZ *et al.*, 2007; MADEO *et al.*, 2002). Entre os tripanossomatídeos, há indícios do processamento de metacaspases em *L. major* (ZALILA *et al.*, 2011) e da relação entre a atividade enzimática e o processamento. Em *T. brucei*, a atividade pode não ser dependente da clivagem (MOSS *et al.*, 2007), mas o processamento de TbMCA2 afeta o sítio de ligação ao substrato permitindo que enzimas processadas hidrolisem grandes substratos (GILIO *et al.*, 2017). Diferente de estudos anteriores (LAVERRIÈRE; CAZZULO; ALVAREZ, 2012), mostramos que a TcMCA3 recombinante é produzida em duas isoformas estáveis de TcMCA3, um indicativo do autoprocessamento *in vitro*. Este comportamento auto catalítico de TcMCA3 difere do que foi relatado anteriormente e pode ser uma consequência de diferentes tags e tampões utilizados para expressão e purificação recombinantes. De fato, a presença de duas bandas estáveis identificadas por MS/MS como TcMCA3 sugere uma clivagem específica, apesar da possibilidade de degradação proteica. Além disso, a semelhança nos perfis de SDS-PAGE entre TbMCA2 (GILIO *et al.*, 2017) e TcMCA3 favorece a hipótese do processamento de TcMCA3 ao invés de degradação inespecífica. Infelizmente, a análise por MS/MS não conseguiu determinar com precisão a região de clivagem. No entanto, os resultados sugerem que esta ocorra provavelmente antes do resíduo 130. Na verdade, a determinação do sítio de clivagem de metacaspase permanece obscura. Vários trabalhos demonstraram o processamento de metacaspases, mas também não conseguiram identificar o local de clivagem (GONZÁLEZ *et al.*, 2007; MADEO *et al.*, 2002).

O fato de apenas a TbMCA2 de *T. brucei* ter sua estrutura resolvida (MCLUSKEY *et al.*, 2012) aumenta a necessidade de elucidar a estrutura da TcMCA3 para a compreensão da reação auto catalítica que desencadeia sua ativação. Para isso temos como perspectiva, a realização da determinação estrutural da TcMCA3 por cristalografia de raios-x, no estado processado e no estado não processado e assim gerar dados a respeito dessa reação. O detalhamento estrutural do processo de ativação de TcMCA3 auxiliarão na busca por ativadores e/ou supressores dessa enzima.

Assim como a determinação estrutural, a caracterização cinética de TbMCA2 de *T. brucei* já foi realizada. Em 2013, Machado e colaboradores mostraram a preferência de TbMCA2 por resíduos básicos na região P1 e por resíduos polares na região P2 e P3 (MACHADO *et al.*, 2013). Com o intuito de identificar as sequências de aminoácidos alvo da metacaspase-3 na cascata de apoptose, também pretendemos realizar a sua caracterização cinética utilizando substratos FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*).

A busca por inibidores específicos de caspases é prioridade em várias empresas farmacêuticas devido ao seu potencial terapêutico (NEUFELD KL. NUCLEAR APC, [s.d.]). Os dados experimentais em modelos animais indicam que a inibição desta via pode ser útil no tratamento da sepse (AYALA *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1994), doenças cardíacas, isquemia relacionada à acidente vascular cerebral e lesões no cérebro, fígado e outros órgãos (CURSIO *et al.*, 2000; YAOITA *et al.*, 1998). A identificação de um composto que induz ou protege da apoptose em *T. cruzi* permitiria a manipulação *in vitro* desse processo. Devido às semelhanças estruturais existentes entre as metacaspases e as caspase (Seção 3, Fig. 7f), iniciamos a pesquisa usando compostos apoptóticos bem caracterizados. Há um grande impulso para a pesquisa de novos usos para medicamentos existentes, pois esta abordagem evita o imenso custo associado ao desenvolvimento de novos compostos químicos e pode ser particularmente útil em doenças negligenciadas.

Identificamos 13 compostos que melhoraram a estabilidade térmica de TcMCA3. Desses, decidimos avaliar o efeito da interação entre PAC-1 e TcMCA3 *in vitro*. A escolha do composto foi baseada nos fatores descritos na figura 2, seção 3, e entre todos os compostos identificados, PAC-1 se ajustou melhor a esses critérios. Sabe-se que PAC-1 induz apoptose em metazoários através da ativação da procaspase-3. A ativação da procaspase-3 é inibida pela interação dessa proteína com íons de Zinco. PAC-1 se liga à íons de zinco inibitórios, que permite a ativação automática da procaspase-3 em caspase-3 (PETERSON *et al.*, 2009). PAC-1 tem se mostrado um potencial fármaco para o tratamento do câncer, cuja eficácia é diretamente proporcional à concentração de procaspase-3 presente nas células (PUTT *et al.*, 2006).

O PAC-1 e o zinco formam um complexo rígido, com uma constante de dissociação de aproximadamente 42 nM. Entre vários compostos já testados (CuSO₄, ZnSO₄, CoCl₂, FeCl₂, MnCl₂, FeCl₃, MgCl₂), apenas zinco e cobalto interagem fortemente com procaspase-3 (PETERSON *et al.*, 2009). Diferente das caspases, as

metacaspases são dependentes do cálcio para a sua atividade (MCLUSKEY *et al.*, 2012). A atividade de TcMCA3 aumenta gradualmente após a adição de cálcio (LAVERRIÈRE; CAZZULO; ALVAREZ, 2012) e em *T. brucei*, a ligação de cálcio induz uma mudança conformacional alostérica que promove a ativação. Em *T. brucei*, o local de ligação ao cálcio é composto por quatro resíduos de ácido aspártico (D173, D189, D190 e D220) (MCLUSKEY *et al.*, 2012). Com exceção de D190, os outros resíduos são conservados em *T. cruzi*. Devido a já conhecida interação entre PAC-1/íons Zinco/procaspase-e, avaliamos inicialmente através do docking molecular, a probabilidade de PAC-1 interagir ao sítio de ligação de cálcio. No entanto, a análise de docking mostrou que a interação com PAC-1 provavelmente não ocorre no local de ligação ao cálcio (Tabela Suplementar S2, Apêndice). Em vez disso, os resíduos energeticamente favoráveis para essa interação são aminoácidos que não são conservada em TbMCA2 e caspase 3 (figura 7, seção 3). Todos esses dados indicam que a regulação TcMCA3 pode ter características únicas em *T. cruzi*.

Assim como para a caracterização do autoprocessamento da TcMCA3, a cristalografia de raios-x poderá auxiliar na compreensão atômica da interação entre o PAC-1, e a TcMCA3, já que essa análise, até o momento, só ocorreu *in silico*. Além disso, será possível ainda determinar o local de ligação ao cálcio em TcMCA3 e determinar a conservação dessa região com TbMCA2 de *T. brucei*.

Mesmo que o mecanismo de ativação seja distinto, o efeito nas células é bastante semelhante. PAC-1 afetou a viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi*, levando à exposição à fosfatidilserina e à inativação mitocondrial, características do processo de apoptose. No entanto, os efeitos do PAC-1 em tripomastigotas metacíclicos foram muito distintos dos observados em epimastigotas. Os tripomastigotas metacíclicos incubados com PAC-1 foram mais resistentes à morte do que os epimastigotas. *T. cruzi* tem um ciclo de vida complexo envolvendo hospedeiros de mamíferos e vetores de insetos (CHAGAS, 1909). Diferente dos epimastigotas que se dividem por fissão binária no intestino do vetor, os parasitas do estágio de transmissão, os tripomastigotas metacíclicos não podem se dividir e, devem penetrar as células hospedeiras de mamíferos para continuar o ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro. Vários estudos concluíram que *T. cruzi* utiliza seu sistema antioxidante para se proteger contra a invasão de macrófagos no início da infecção para garantir a disseminação de tecidos e órgãos distantes (NAGAJYOTHI *et al.*, 2012). Teoricamente, as células invasoras de tripomastigotas expressam níveis mais

elevados de antioxidantes que lhes permitem superar o estresse mitocondrial (CASTRO; TOMÁS, 2008)

Estudos mostram que epimastigotas que super expressam TcMCA3 apresentam uma porcentagem menor de células positivas para o iodeto de propídio, quando comparadas com controles não induzidos, indicando um efeito pró-sobrevivência da super expressão de TcMCA3 (LAVERRIÈRE; CAZZULO; ALVAREZ, 2012). No entanto, o estímulo da metaciclo gênese depende da atividade catalítica de TcMCA3 (LAVERRIÈRE; CAZZULO; ALVAREZ, 2012). Observamos que os efeitos causados pela incubação do *T. cruzi* com PAC-1 são antagônicos ao da super expressão de TcMCA3, fortalecendo a hipótese de que PAC-1 é um inibidor de TcMCA3.

A primeira evidência de apoptose em *T. cruzi* foi relatada em 1995 (AMEISEN *et al.*, 1995), mas nenhum ativador isolado foi identificado até agora. As informações sobre a regulação deste processo e as enzimas envolvidas ainda não foram esclarecidas. Apesar de o PAC-1 aparentar ter maior afinidade às linhagens celulares de câncer (IC₅₀ de 3 nM) do que para o epimastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀ de 14,12 µM), o IC₅₀ está na mesma ordem de grandeza do Benznidazol (IC₅₀ de 22,69 µM) e do Nifurtimox (IC₅₀ de 3,78 µM) (PALACE-BERL *et al.*, 2013). Além disso, ao comparar os valores de IC em células de mamífero (IC₂₀: 75.43, IC₅₀: 25.7, IC₈₀: 8.99) aos valores de IC em células de epimastigota de *T. cruzi* (IC₂₀: 3.15, IC₅₀: 14.12, IC₈₀: 63.19), percebemos que estes valores são maiores para as 3T3, indicando que o PAC-1 mata o *T. cruzi* em doses mais baixas do que as células de mamíferos. Isso é oportuno em relação à relevância terapêutica, uma vez que PAC-1 causará a morte em *T. cruzi* antes de prejudicar as células de mamíferos.

Acima de tudo, é importante destacar a importância desta investigação para além das suas aplicações clínicas. A identificação de um composto que se liga ao TcMCA3 e promova um apoptose em *T. cruzi* permite o estudo da apoptose *in vitro* para melhorar a compreensão do processo. E com o auxílio do composto ativador da apoptose em *T. cruzi* pretendemos identificar as proteínas que interagem com a TcMCA3 em células epimastigotas e tripomastigotas metacacíclicos apoptóticas pela técnica de cross-linking acoplada a espectrometria de massas e comparar com as interações realizadas em células em seu estado normal. Juntamente com a análise estrutural dos diferentes estados de TcMCA3 e a sua caracterização cinética poderemos indicar se as proteínas do interactoma são prováveis ativadores ou

supressores de TcMCA3, e assim elucidar a cascata de apoptose-like em *Trypanosoma cruzi*.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho deu início a caracterização de uma via ainda desconhecida em *T. cruzi*, e mostrou que a metacaspase-3 está envolvida nesse processo.

A TcMCA3 produzida de forma recombinante nesse trabalho contribuiu para a identificação do auto processamento da enzima, sendo observado a presença de duas isoformas estáveis, tendo a proteína inteira com aproximadamente 50kDa e a processada com aproximadamente 30kDa, sugerindo que a clivagem possa ocorrer após o resíduo 130, que difere do que foi sugerido em estudos anteriores (LAVERRIÈRE; CAZZULO; ALVAREZ, 2012).

Com a produção da proteína recombinante foi possível identificar um composto que interagisse com a TcMCA3, o PAC-1, e o modo de interação pode ser peculiar em *T. cruzi* já que os resíduos envolvidos na interação identificados no docking molecular, não são conservados na caspase-3 humana ou na metacaspase-2 de *T. brucei*.

Nos ensaios realizados com epimastigotas de *T. cruzi* e PAC-1, a presença da droga causou uma redução na viabilidade celular do parasita, e levou a exposição da fosfatidilserina com a redução do potencial de membrana mitocondrial, características bem estabelecidas de um processo apoptótico. Já para a forma tripomastigota metacíclica vemos ocorrer algum mecanismo distinto de regulação dessa via, pois esse se mostrou mais resistente a morte, com leve alteração no potencial de membrana mitocondrial.

Comparando os resultados obtidos com *T. cruzi* com células de mamíferos vemos um valor de IC50 menor para *T. cruzi*, o que mostra que o PAC-1 atinge o parasita em doses menores do que em mamíferos.

Os resultados apresentados nesse trabalho permitem estender a compreensão da via de apoptose em *T. cruzi*, através da identificação de um composto que se liga à TcMCA3 e promove a apoptose no parasita e abre perspectivas para elucidação desse processo, que pode ser utilizado como alvo de novos fármacos para a doença de Chagas.

REFERÊNCIAS

ADADE, C. M.; OLIVEIRA, I. R. S.; PAIS, J. A. R. Toxicon Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v. 69, p. 227–239, 2013.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Celula**. 5. ed. Porto Alegre: artmed, 2010.

ALVAREZ, V. E. *et al.* Autophagy Is Involved in Nutritional Stress Response and Differentiation in *Trypanosoma cruzi* * □. **The journal of biological chemistry**, v. 283, n. 6, p. 3454–3464, 2008.

AMEISEN, J. C. *et al.* Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. **Cell Death and Differentiation**, v. 2, n. 4, p. 285–300, out. 1995.

AYALA, A. *et al.* Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. **Blood**, v. 87, n. 10, p. 4261–4275, maio 1996.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States. **Clinical Infectious Disease**, v. 49, p. 52–54, 2009.

BOATRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 725–731, 2003.

BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. In: **Annual Review of Microbiology**. [s.l: s.n.]. v. 27p. 347–382.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. (Eds.). . **Clínica e terapêutica da doença de chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997. p. 25–29.

CARCAVALLO, R. U. *et al.* **Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997.

CARVALHO, T. U. DE. **Organização Estrutural do *Trypanosoma cruzi* - Microscopia eletrônica**. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>>.

CARYN BERN, M. D.; M.P.H. Chagas' Disease. **The new england journal of medicine**, p. 456–566, 2015.

CASTRO, H.; TOMÁS, A. M. Peroxidases of Trypanosomatids. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 9, p. 1593–1606, set. 2008.

CDC. **Parasites - American Trypanosomiasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/chagas/index.html>>.

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

CHANG, H. Y. Proteases for Cell Suicide : Functions and Regulation of Caspases. v. 64, n. 4, p. 821–846, 2000.

COHEN, G. M. Caspases : the executioners of apoptosis. v. 16, p. 1–16, 1997.

COLA, J. *et al.* APOPTOSIS-LIKE DEATH IN PARASITIC PROTOZOA. v. 23, p. 87–98, 2006.

CORNILLON, S. *et al.* Programmed cell death in Dictyostelium. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 1, p. 2691–2704, out. 1994.

COURA, J. R.; CASTRO, S. L. DE. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. v. 97, n. January, p. 3–24, 2002.

CURSIO, R. *et al.* Caspase inhibition protects from liver injury following ischemia and reperfusion in rats. **Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation**, v. 13 Suppl 1, p. S568-572, 2000.

DAVIS, M. C. *et al.* Programmed nuclear death: apoptotic-like degradation of specific nuclei in conjugating Tetrahymena. **Developmental Biology**, v. 154, n. 2, p. 419–432, dez. 1992.

DENAULT, J.; SALVESEN, G. S. Caspases : Keys in the Ignition of Cell Death. **Chem Rev.**, v. 102, p. 4489–4499, 2002.

DIAS, J. C. P. *et al.* II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas , 2015. v. 25, p. 7–86, 2016.

EARNSHAW, W. C.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. H. Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates and Functions during Apoptosis. **Annu. Rev. Biochem**, v. 68, p. 383–424, 1999.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design : apoptosis , necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 663–669, 2004.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.

FUENTES-PRIOR, P.; SALVESEN, G. S. The protein structures that shape caspase activity , specificity , activation and inhibition. **Biochem. J.**, v. 232, p. 201–232, 2004.

GILIO, J. M. *et al.* Processing of metacaspase 2 from *Trypanosoma brucei* (TbMCA2) broadens its substrate specificity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 4, p. 388–394, abr. 2017.

GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P.; GOLDENBERG, S. Cyclic AMP and Adenylate Cyclase Activators Stimulate *Trypanosoma cruzi* Differentiation. **Experimental parasitology**, v. 66, p. 205–212, 1988.

GONZÁLEZ, I. J. *et al.* Leishmania major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 2, p. 161–172, fev. 2007.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancrologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GUEDES, S. C. *et al.* Te Cellular Organization of Trypanosomatids during life Cycle. In: SILVA, M. S. DA; CANO, M. I. N. (Eds.). . **Frontiers in Parasitology: Molecular and Cellular Biology of Pathogenic Trypanosomatids**. 1. ed. Botucatu, São Paulo: Betham e Books, 2017. p. 3–360.

JIMENEZ, V. *et al.* Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 3, p. 688–698, out. 2008.

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

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br L. Cancer**, v. 26, p. 239–257, 1972.

KIEL, J. A. K. W. Autophagy in unicellular eukaryotes. p. 819–830, 2010.

KOSEC, G. *et al.* Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: Possible candidates for programmed cell death mediators. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 145, n. 1, p. 18–28, 2006.

KUBATA, B. K. *et al.* Kola acuminata proanthocyanidins : a class of anti-trypanosomal compounds effective against *Trypanosoma brucei*. v. 35, p. 91–103, 2005.

LAVERRIÈRE, M.; CAZZULO, J. J.; ALVAREZ, V. E. Antagonic activities of *Trypanosoma cruzi* metacaspases affect the balance between cell proliferation, death and differentiation. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 8, p. 1358–1369, 2012.

LEVINE, N. D. *et al.* A Newly Revised Classification of the Protozoa *. **Society of Protozoologists**, v. 27, n. 1, p. 37–58, 1980.

MACHADO, M. F. M. *et al.* Substrate specificity and the effect of calcium on *Trypanosoma brucei* metacaspase 2. **Febs Journal**, v. 280, n. 11, p. 2608–2621, 2013.

MADEO, F. *et al.* A Caspase-Related Protease Regulates Apoptosis in Yeast. **Molecular Cell**, v. 9, n. 4, p. 911–917, abr. 2002.

MARTINS, A. V. *et al.* Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. **Infectio**, v. 16, n. 1, p. 45–58, 2012.

MAYA, J. D. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host ☆. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 601–620, 2007.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. p. 1–29, 2013.

MCLUSKEY, K. *et al.* Crystal structure of a *Trypanosoma brucei* metacaspase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 19, p. 7469–74, 2012.

MCLUSKEY, K.; MOTTRAM, J. C. Comparative structural analysis of the caspase family with other clan CD cysteine peptidases. **Biochemical Journal**, v. 466, n. 2, p. 219–232, 2015.

MENNA-BARRETO, R. F. S. *et al.* Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 40, n. 2, p. 157–168, 2009.

MESLIN, B. *et al.* Are protozoan metacaspases potential parasite killers? **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 26, 2011.

MINISTERIO DA SAÚDE, S. DE V. EM S. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 21, 2015.

MOSS, C. X. *et al.* Metacaspase 2 of *Trypanosoma brucei* is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. **FEBS Letters**, v. 581, n. 29, p. 5635–5639, dez. 2007.

MOTTRAM, J. C. *et al.* Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. v. 19, n. 4, p. 182–187, 2003.

NAGAJYOTHI, F. *et al.* Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease: T. cruzi persistence in Chagas disease. **Cellular Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 634–643, maio 2012.

NEUFELD KL. NUCLEAR APC, N. K. N. A. **Madame Curie Bioscience Database [Internet]**. Austin (Tx): [s.n.].

NGUEWA, P. A. *et al.* Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness? **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 8, p. 375–380, ago. 2004.

NICHOLSON, D. W. Caspase structure , proteolytic substrates , and function during apoptotic cell death. p. 1028–1042, 1999.

PALACE-BERL, F. *et al.* 5-Nitro-2-furfuriliden derivatives as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Design, synthesis, bioactivity evaluation, cytotoxicity and exploratory data analysis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 17, p. 5395–5406, 2013.

PETERSON, Q. P. *et al.* PAC-1 Activates Procaspase-3 in Vitro through Relief of Zinc-Mediated Inhibition. **Journal of Molecular Biology**, v. 388, n. 1, p. 144–158, 2009.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; RADI, R. L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 13, p. 7301–7306, jun. 2001.

PROTO, W. R. *et al.* *Trypanosoma brucei* Metacaspase 4 Is a Pseudopeptidase and a Virulence Factor * □. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 286, n. 46, p. 39914–39925, 2011.

PUTT, K. S. *et al.* Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 10, p. 543–50, 2006.

ROJO, G. *et al.* Acta Tropica Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on *Trypanosoma cruzi* ex vivo infection of human placental chorionic villi explants. v. 132, p. 112–118, 2014.

ROTONDA, J. *et al.* The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. **Nature structural biology**, v. 3, n. 7, p. 619–625, 1996.

SARTORI, A. M. C.; IBRAHIM, K. Y.; WESTPHALEN, E. V. N. Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV / AIDS. v. 101, n. 1, p. 31–50, 2007.

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v. 407, p. 784–788, 2000.

SCHMIDT, A. *et al.* Epidemiologia no século XXI e aspectos clínicos da doença de chagas crônica. **Sociedade de cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 26, n. 4, p. 230–233, 2016.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 49, p. 117–43, 1995.

SOUZA, D. DO S. M. DE; POVOA, R. M. DOS S. **Aspectos Epidemiológicos e Clínicos da Doença de Chagas aguda no Brasil e na América Latina** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. [s.l: s.n.].

SZALLIES, A.; KUBATA, B. K.; DUSZENKO, M. A metacaspase of *Trypanosoma*

brucei causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. v. 517, p. 144–150, 2002.

TEIXEIRA, A. R. L. *et al.* Chagas disease. p. 788–798, 2006.

TSIATSIANI, L. *et al.* Metacaspases. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1279–1288, 2011.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. In: KEVIN M. TYLER, M. A. M. (Ed.). . **American Trypanosomiasis**. 7. ed. [s.l: s.n.]. v. 31p. 472–481.

WALLACH, D.; KOVALENKO, A. Keeping inflammation at bay. **elifesciences**, v. 3, p. 1–3, 2014.

WANG, S. D. *et al.* Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 152, n. 10, p. 5014–5021, maio 1994.

WELBURN, S. C.; LILLICO, S.; MURPHY, N. B. Programmed cell death in procyclic form *Trypanosoma brucei* rhodesiense identification of differentially expressed genes during con A induced death. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 229–234, abr. 1999.

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

YAMAGUCHI, H. *et al.* Immunosuppression via adenosine receptor activation by adenosine monophosphate released from apoptotic cells. **elifesciences**, v. 3, p. 1–15, 2014.

YAOITA, H. *et al.* Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. **Circulation**, v. 97, n. 3, p. 276–281, jan. 1998.

YU, J. W.; JEFFREY, P. D.; SHI, Y. Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIP L. **PNAS**, v. 106, n. 20, p. 8169–8174, 2009.

ZALILA, H. *et al.* Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in *Leishmania major*. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 1, p. 222–239, 2011.

APÊNDICES

Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*

Emanuella de Castro, Thamile Luciane Reus, Alessandra Melo de Aguiar, Andrea

Rodrigues Ávila, Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza

tatianabrasil@fiocruz.br

Supplementary data

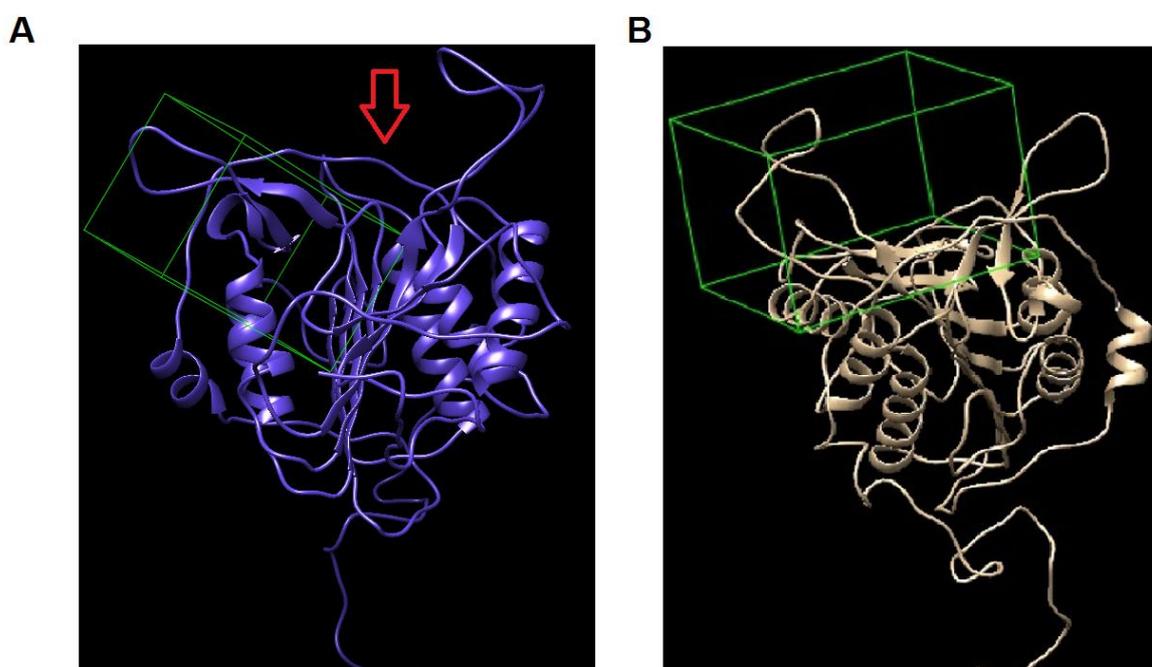


Figure S1 – Selected regions for molecular docking between TcMCA3 model and PAC-1. A- Calcium binding site described in TbMCA2. B- Ligand binding site flanked by two flexible loops (S¹⁷⁷-F¹⁸³ and A²⁷⁰-G²⁹³). Red arrow in A indicates the docked region in B.

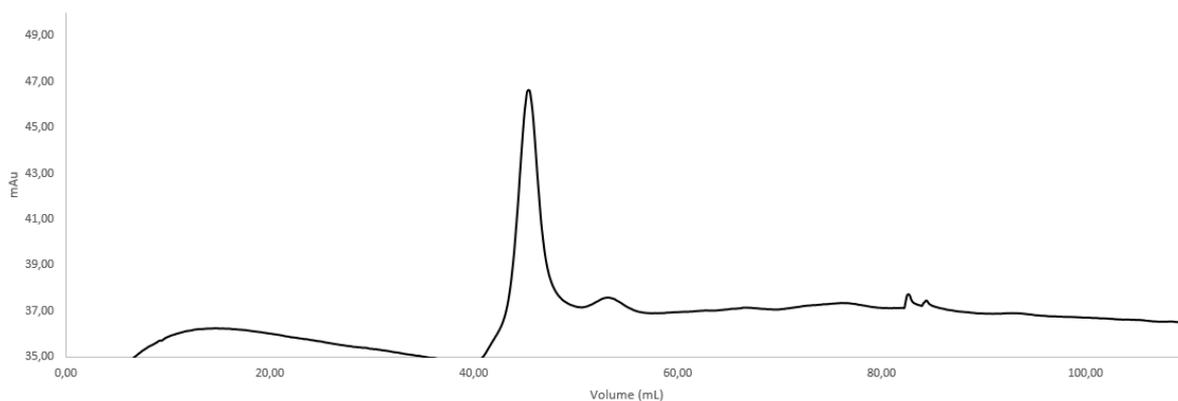


Figure S2- SEC chromatogram.

DOCKING NUMBER	Structure 1			Structure 2			Interface Area Å ²	Δ ⁱ G kcal/mol
	ⁱ N _{at}	ⁱ N _{res}	Surface Å ²	ⁱ N _{at}	ⁱ N _{res}	Surface Å ²		
1	29	1	672	49	21	17264	369.4	1,3
2	28	1	660	45	20	17264	353.1	1
3	29	1	651	57	23	17264	386.6	0
4	27	1	663	42	15	17264	305.1	-0,2
5	27	1	666	48	21	17264	393.7	0,3
6	28	1	664	49	21	17264	387.0	0,5
7	26	1	655	39	15	17264	315.4	-0,1
8	28	1	664	42	19	17264	363.0	0
9	27	1	662	41	15	17264	329.0	-2,1

Table S1 – Analysis of 9 nine poses in generate by Auto dock Vina in the PISA platform. The docked region was defined by two flexible loops (S¹⁷⁷-F¹⁸³ and A²⁷⁰-G²⁹³). The Docking 9 (shaded in green) was chosen for our analyses. ⁱN_{at} indicates the number of interfacing atoms in the corresponding structure. ⁱN_{res} indicates the number of interfacing residues in the corresponding structure. Surface Å² is the total solvent accessible surface area in square Ångstroms. Interface area in Å², calculated as difference in total accessible surface areas of isolated and interfacing structures divided by two. ΔⁱG indicates the solvation free energy gain upon formation of the interface, in kcal/M. The value is calculated as difference in total solvation energies of isolated and interfacing structures. Negative ΔⁱG corresponds to hydrophobic interfaces, or positive protein affinity. This value does not include the effect of satisfied hydrogen bonds and salt bridges across the interface. Structure 1 and 2 refers to PAC-1 TcMCA3, respectively.

DOCKING NUMBER	ⁱ N _{at}	ⁱ N _{res}	Surface Å ²	ⁱ N _{at}	ⁱ N _{res}	Surface Å ²	Interface Area Å ²	Δ ⁱ G kcal/mol	Δ ⁱ G P-value
1	29	1	663	57	20	17294	382.5	-0.4	-1.000
2	26	1	661	54	20	17294	360.7	0.2	-1000
3	27	1	656	50	17	17294	365.6	0.2	-1000
4	25	1	665	51	18	17294	339.3	-0.3	-1000
5	27	1	660	57	19	17294	348.9	-0.1	-1000
6	26	1	666	55	20	17294	345.7	0.3	-1000
7	27	1	661	53	23	17294	369.7	-0,1	-1000
8	25	1	654	47	16	17294	359.5	-0.2	-1000
9	24	1	667	49	19	17294	323.0	0.5	-1000

Table S2 – Analysis of 9 nine poses generate by Auto dock Vina in the PISA platform. The docked region was defined as calcium binding site described in TbMCA2. ⁱN_{at} indicates the number of interfacing atoms in the corresponding structure. ⁱN_{res} indicates the number of interfacing residues in the corresponding structure. Surface Å² is the total solvent accessible surface area in square Ångstroms. Interface area in Å², calculated as difference in total accessible surface areas of isolated and interfacing structures divided by two. ΔⁱG indicates the solvation free energy gain upon formation of the interface, in kcal/M. The value is calculated as difference in total solvation energies of isolated and interfacing structures. Negative ΔⁱG corresponds to hydrophobic interfaces, or positive protein affinity. This value does not include the effect of satisfied hydrogen bonds and salt bridges across the interface. Structure 1 and 2 refers to PAC-1 TcMCA3, respectively.

Poor rotameters	2.70%
Favored rotameters	90.88%
Ramachandran outliers	1.12%
Ramachandran favored	94.66%
Bad bonds	0.04%
Bad angles	1.38 %

Table S3 – TcMCA3 geometry evaluated by Molprobit.