

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

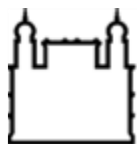
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Keyla Cristiny da Silva Gonçalves

Análise estrutural e molecular de aspártico peptidases em
Trypanosoma cruzi

RIO DE JANEIRO

Maio de 2019



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Keyla Cristiny da Silva Gonçalves

**Análise estrutural e molecular de aspártico peptidases
em *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências na área de Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Prof. Dra. Claudia Masini d'Avila Levy

Prof. Dr. Rubem F. S. Menna-Barreto

RIO DE JANEIRO

Maio de 2019

Ficha catalográfica

Gonçalves, Keyla Cristiny da Silva .

Análise estrutural e molecular de aspártico peptidases em *Trypanosoma cruzi* / Keyla Cristiny da Silva Gonçalves. - Rio de Janeiro, 2019.

xvii, 86f. f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

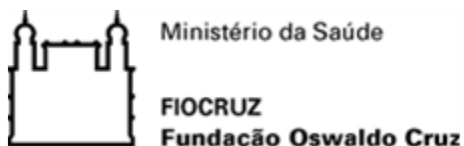
Orientadora: Claudia Masini d' Avila Levy.

Co-orientador: Rubem F.S. Menna-Barreto.

Bibliografia: f. 65-79

1. Aspártico peptidases. 2. Doença de Chagas. 3. Quimioterapia. 4. Doenças tropicais negligenciadas. 5. Reposicionamento de fármacos. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Keyla Cristiny da Silva Gonçalves

Análise estrutural e molecular de aspártico peptidases em *Trypanosoma cruzi*.

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Claudia Masini d'Avila Levy

Prof. Dr. Rubem F. S. Menna-Barreto

Aprovada em: 31 de maio de 2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Harrison Magdinier Gomes (Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ).

Prof. Dra. Patrícia Cuervo Escobar (Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ).

Prof. Dra. Marta Helena Branquinha de Sá (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ).

Prof. Dra. Patrícia Fampa Negreiros de Lima (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ).

Rio de Janeiro, 31 de maio de 2019.

Esta tese foi desenvolvida sob orientação dos Prof. Dra. Claudia Masini d'Avila Levy e Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto nos Laboratórios de Estudos Integrados em Protozoologia e Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

*E ainda que tivesse o dom de profecia,
E conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,
E ainda que tivesse toda a fé,
De maneira tal que transportasse os montes,
E não tivesse amor,
Nada seria.*

A BÍBLIA. *A suprema excelência do amor.* Tradução João Ferreira de Almeida, 2009 1512 p.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em minha vida não me deixando desamparada em nenhum momento.

A minha Mãe, meu maior exemplo de força e superação.

Ao Allan, por todo apoio e companheirismo.

A Dra. Claudia Masini d'Avila-Levy por seus ensinamentos (“a vida não é justa”), e apoio. Obrigada por sua orientação e por aceitar “descascar um abacaxi com faca de pão”.

Ao Dr. Rubem Menna Barreto pela orientação, por sempre encontrar um tempo na sua agenda, mesmo que fosse no trajeto até a oficina. Obrigada pelo apoio!

A Dra. Helena Lúcia Carneiro dos Santos por toda sua generosidade, carinho e paciência.

A Dra. Karina Rabelo pelo apoio científico e pessoal em diversos momentos dessa jornada, obrigada por toda sua ajuda e pela sua presença!

Aos colegas de laboratório Aline Garcia, Amanda Caetano, André Borges, Bianca Vitória, Carolina Boucinha, Caroline Lopes, Carolina Valença, Rhagner Bonono, Sheila Medeiros, Vitor Ennes Vidal, obrigada pela convivência.

A querida Thabata Duque, pelos cafés sempre marcados, mas quase nunca ocorridos onde dividíamos nossas aflições e alegrias.

A amiga Patrícia Fampa, pelo constante incentivo entre um exercício e outro.

Ao Dr. Harrison Magdinier Gomes, por gentilmente revisar a minha tese.

A Dra Flávia Motta, Izabela Marques Dourado, Graziela Feitosa e todo grupo do Instituto de Biologia da UNB por me receberem de forma tão carinhosa.

A todo grupo do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada à Micobactérias – LABMAM, aprendi muito com todos vocês. Em especial a Dra. Raquel L. F. Teixeira, Dra. Márcia Q. P. Lopes e aluna de mestrado Eloah A. Soares, obrigada pela confiança, empenho e dedicação que depositaram no projeto.

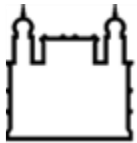
As minhas queridas amigas de muitos anos, Clarisse Gomes, Cris Avelino e Jú Ferraz pela sincera amizade que me dedicam. Obrigada por compreenderem a minha ausência nos mais diversos momentos.

À Dra. Leila de M. Lima, coordenadora da pós-graduação em biologia celular e molecular, pelo acolhimento no meu retorno do estágio no exterior, e em seu nome a todo quadro de funcionários do Instituto Oswaldo Cruz.

Agradeço às agências de fomento que permitiram a execução das etapas práticas do trabalho: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – código de financiamento 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

A todas as pessoas que, de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desta tese. Muito obrigada a todos!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

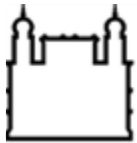
Análise estrutural e molecular de aspártico peptidases em *Trypanosoma cruzi*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Keyla Cristiny da Silva Gonçalves

As peptidases do *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, são importantes fatores de virulência e alvo para quimioterapia. As aspártico peptidases ainda não foram caracterizadas neste parasito, porém, inibidores de aspártico peptidase do vírus da imunodeficiência humana (IPs-HIV) tem ação tripanocida. O objetivo desse trabalho é caracterizar as aspártico peptidases em *T. cruzi*. Através de análises *in silico*, identificamos que dos três genes anotados como aspártico peptidases, dois genes, Presenilina *similar* (PS) e Peptidase Peptideo Sinal *similar* (PPs *similar*), compartilham o mesmo domínio proteico, o domínio PSN (*Presenilin/Signalpeptideo peptidase family*). A presenilina *similar* de *T. cruzi* possui nove domínios transmembranas e uma ampla dobra entre os domínios seis e sete, que resulta em uma espaçosa região hidrofóbica, o que indica que a presenilina *similar* de *T. cruzi* possui uma estrutura secundária altamente similar e indispensável para origem de uma presenilina ativa. A PPs *similar* de *T. cruzi* possui uma sequência de múltiplas passagens pela membrana, e revela uma grande semelhança com as presenilinas, incluindo a conservação do seu domínio. O gene anotado como *DNA damage inducible Ddi 1* (Ddi 1 *similar*) possui o domínio retroviral peptidase (RVP), característico dessa família de peptidases. A Ddi 1 *similar* de *T. cruzi* possui o domínio UBL (ubiquitina *similar*). A modelagem molecular do domínio (RVP) da proteína Ddi 1 *similar* de *T. cruzi* mostrou que esse domínio forma um homodímero que é característico das aspártico peptidases da família A2, e que cada monômero possui a sequência conservada Asp-Ser-Gly-Ala. O estudo de atração molecular (*docking*) mostrou uma diferente afinidade dos IPs-HIV pelo sítio ativo do domínio RVP da proteína, enquanto que pepstatina A e benzonidazol, controles positivo e negativo, apresentaram os melhores e piores índices de *docking*, respectivamente. Uma proteína heteróloga Ddi 1 *similar* foi expressa em *Escherichia coli* e purificada. A enzima purificada não apresentou atividade proteolítica contra substrato fluorogênico específico para Catepsina D, indicando que alterações estruturais importantes ocorreram na enzima heteróloga. O extrato total de *E. coli*, rico na proteína induzida, não foi capaz de degradar soro albumina bovina. Os IPs-HIV possuem ação tripanocida, porém o alvo intracelular e mecanismo de ação ainda não estão elucidados. Esse trabalho traz importantes contribuições para este campo, e abre perspectivas de explorar esta enzima para o desenho de novos fármacos, ou para modificações químicas nos IPs-HIV disponíveis para aumentar sua especificidade e potência.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Molecular and structural analysis of aspartyl peptidases in *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Keyla Cristiny da Silva Gonçalves

Peptidases from *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, are crucial virulence factors and targets for chemotherapy. Aspartyl peptidases are yet to be characterized in the parasite, nevertheless, aspartyl peptidase inhibitors of human immunodeficiency virus (PIs-HIV) are active against the parasite. Here, we aimed to investigate *in silico* and *in vitro* the role of aspartyl peptidases in *T. cruzi*. The *in silico* data revealed three aspartyl peptidase genes, two genes, Presenilin like and Signal Peptide Peptidase like, share a common domain, the PSN (Presenilin/Signal peptidase family). The Presenilin like has nine transmembrane domains and a long fold between domains six and seven that results in a potentially exposed hydrophobic region. This indicates that the secondary structure is important and critical for a functional and active enzyme. The Signal Peptide Peptidase like also possesses multiple membrane domains, resembling the presenilin protein. The Ddi 1 gene possesses the retropeptidase viral domain (RVP), which is characteristic of this family of enzymes. In addition, the Ddi 1 enzyme from *T. cruzi* has the domains UBL (ubiquitin-like). The molecular modelling of the RVP domain from *T. cruzi* revealed that a typical homodimer is formed, and each monomer contains the conserved Asp-Ser-Gly-Ala. The *in silico* docking experiments revealed a diverse affinity between the PIs-HIV and the modelled protein, while pepstatin A and benzonidazol, positive and negative controls, respectively, were the best and worst scored compounds. The Ddi 1 like protein from *T. cruzi* was cloned and expressed in *Escherichia coli*, the purified enzyme did not show proteolytic activity against a fluorogenic substrate specific for Cathepsin D, indicating that important structural alterations occurred in the heterologous enzyme. The total soluble extract of *E. coli*, rich in the induced protein, was not able to degrade bovine serum albumin.

The PIs-HIV has a well documented trypanocidal effect, while the exact intracellular target and mode of action are still uncovered. Our data contribute to elucidate this question, and paves the road for the rational design of new drugs, or modified compounds in the available PIs-HIV.

Sumário

Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1. Introdução.....	1
1.1 Formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.2 Organelas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.3 Genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.4 Ciclo evolutivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
1.5 Formas clínicas da doença de Chagas.....	7
1.6 Tratamento da doença de Chagas	8
1.7 Mecanismo de transmissão da doença de Chagas.....	9
1.8 Distribuição mundial da doença de Chagas.....	10
1.9 Co infecção <i>T. cruzi</i> /HIV	11
1.10 Aspártico peptidase como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos.....	13
1.11 Ação dos IPs-HIV sobre <i>Leishmania spp.</i> e <i>T. cruzi</i>	15
1.12 Ferramentas computacionais no desenvolvimento de novos fármacos.....	17
2. Justificativa.....	20
3. Objetivos.....	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4. Material e métodos.....	22
4.1 Reanálise das aspártico peptidases no genoma de <i>T. cruzi</i>	22
4.2 Análise filogenética.....	22
4.3 Modelagem comparativa da Ddi 1 <i>símile</i>	22
4.4 Estudo de <i>docking</i> com os IPs-HIV.....	23
4.5 Clonagem da sequência codificadora Ddi 1.....	24
4.6 Transformação bacteriana.....	24
4.7 Cinética de indução com isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG).....	25
4.8 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	25
4.9 Análise da cinética de indução de IPTG por <i>Western Blotting</i>	26

4.10	Expressão e purificação da proteína heteróloga Ddi 1.....	26
4.11	Análise da atividade proteolítica do lisado bruto de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	27
4.12	Análise da atividade enzimática da proteína heteróloga Ddi 1.....	27
5.	Resultados.....	28
5.1	Análise de aspártico peptidases preditas no genoma de <i>T. cruzi</i>	27
5.2	Análise das estruturas primárias de aspártico peptidases de <i>T. cruzi</i>	33
5.3	Análise filogenética.....	36
5.4	Construção e validação do modelo tridimensional (3D).....	39
5.5	Alinhamento dos modelos 3D do sítio ativo da proteína Ddi 1 <i>similar</i> e do domínio retroviral (RVP) aspártico peptidases do HIV.....	40
5.6	Atracamento molecular (<i>docking</i>) com os inibidores de aspártico peptidases do HIV e outros componentes.....	42
5.7	Testes de indução a 0,1 mM, 0,2 mM e 0,5 mM de IPTG	43
5.8	Análise da capacidade proteolítica do lisado bruto de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	45
5.9	Expressão e purificação da proteína heteróloga Ddi 1.....	46
5.10	Análise da atividade da proteína heteróloga Ddi 1 em substrato sintético.....	48
6.	Discussão.....	50
7.	Conclusão e perspectiva.....	64
8.	Referências bibliográficas.....	65
9.	Anexo I.....	80

Lista de Figuras

Figura 1: Estágios morfológicos encontrados durante o ciclo evolutivo de <i>T. cruzi</i>	2
Figura 2: Representação esquemática da seção longitudinal da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> mostrando as principais estruturas e organelas encontradas.....	4
Figura 3: Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	6
Figura 4: Sinais de entrada de <i>T. cruzi</i>	7
Figura 5: Principais rotas de imigrantes da América Latina para países não endêmicos.....	11
Figura 6: Análise comparativa da similaridade entre as sequências de aminoácido Ddi 1 <i>similar</i> de <i>T. cruzi</i> presente no haplótipo Esmeraldo e Não Esmeraldo.....	29
Figura 7: Análise comparativa da similaridade entre as sequências de aminoácido Presenilina <i>similar</i> de <i>T. cruzi</i> presente no haplótipo Esmeraldo e Não Esmeraldo.....	30
Figura 8: Predição da topologia transmembrana obtida na análise realizada pelo programa <i>TMHMM</i>	34
Figura 9: Predição da presença de peptídeo sinal e sítio de clivagem obtidos em análise realizada pelo programa <i>SignalP</i>	35
Figura 10: Árvore filogenética da Ddi 1 de diferentes espécies incluindo membros da família Trypanosomatidae.....	37
Figura 11: Árvore filogenética obtida a partir da análise de sequências polipeptídicas das proteínas com o domínio PSN.....	38
Figura 12: Visualização do modelo da estrutura 3D do domínio dimerizado aspártico peptidase retroviral (RVP) da proteína de Ddi 1 <i>similar</i> de <i>T. cruzi</i>	39
Figura 13: Alinhamento das estruturas tridimensionais do domínio aspártico peptidase retroviral (RVP) de Ddi 1 <i>similar</i> de <i>T. cruzi</i> e do vírus HIV-1 humano.....	41

Figura 14: Análise em SDS-PAGE 10% da expressão heteróloga de Ddi1 em <i>E. coli</i> induzida a 0,1 mM, 0,2 mM e 0,5 mM de IPTG por diferentes tempos.....	44
Figura 15: <i>Western blotting</i> utilizando anticorpo anti histidina na diluição de 1: 5000 relevado por quimioluminescência e visualizado em filme radiográfico.....	45
Figura 16: Teste de degradação proteolítica utilizando BSA como substrato.....	46
Figura 17: Purificação em coluna de afinidade a níquel da fração solúvel em condições nativas.....	47
Figura 18: <i>Western blotting</i> da purificação da proteína heteróloga Ddi 1	48
Figura 19: Análise da atividade proteolítica da enzima heteróloga Ddi 1 purificada sobre substrato fluorogênico.....	49

Lista de Tabelas

Tabela 1: Inibidores de aspártico peptidases do HIV.....	12
Tabela 2: Relação de genes putativos de aspártico peptidases <i>similar</i> e sua localização cromossômica no genoma de <i>T. cruzi</i> CL Brener, disponível no banco de dados TriTrypDB.....	28
Tabela 3: Percentual de identidade entre as sequências dos genes que codificam para <i>DNA-damage inducible protein</i> (Ddi 1 <i>similar</i>) e Presenilina <i>similar</i> aspártico peptidases empregando a ferramenta <i>Blastn</i>	29
Tabela 4: Análise comparativa dos percentuais de identidade e similaridade entre as proteínas Ddi 1 <i>similar</i> nas diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	31
Tabela 5: Análise comparativa dos percentuais de identidade e similaridade entre a proteína Presenilina <i>similar</i> nas diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	32
Tabela 6: Análise comparativa dos percentuais de identidade e similaridade entre a proteína Peptidase Peptídeo Sinal <i>similar</i> nas diferentes cepas de <i>T. cruzi</i>	32
Tabela 7: Domínios preditos nas proteínas Ddi 1 <i>similar</i> , Presenilina <i>similar</i> e Peptidases Peptídeo Sinal (PPS <i>similar</i>).....	33
Tabela 8: Parâmetros físico-químicos das proteínas Ddi 1 <i>similar</i> , Presenilina <i>similar</i> e PPS <i>similar</i> obtidos através de análise realizada pelo programa <i>ProtParam</i>	35
Tabela 9: Avaliação do atracamento molecular do modelo Ddi 1 <i>similar</i> de <i>T. cruzi</i> com os inibidores de aspártico peptidase do HIV e outros fármacos, na ausência de água.....	42

Lista de abreviaturas

HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
3D	Tridimensional
AMC	4-Metilcumarina
Aph-1	<i>Anterior pharynx defective 1</i>
APP	Proteína precursora amiloide
Blastn	<i>Basic Local Alignment Search Tool-nucleotide</i> (Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local de nucleotídeos)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Soro albumina Bovina)
D.O.	Densidade optica
DA	Doença de Alzheimer
DALY	<i>Disability Adjusted Life Years</i> (Anos de vida perdidos ajustados por incapacidade)
DAN	Éster metílico de DL-diazoacetil-norleucina
Ddi 1	<i>DNA damageinducible 1</i> (Dano ao DNA induzido 1)
DNA	<i>Deoxy ribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DTU	<i>Discrete Typing Units</i> (Unidade Discreta de Tipagem)
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i> (Quimioluminescência aprimorada)
EDTA	Ácido etileno-diaminotetracético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração de Comidas e Remédios)
g	Força gravitacional
g/L	Gramas por litros
gp63	Glicoproteína de 63 kDa
HAART	<i>Highly active antirretroviral therapy</i> (Terapia anti-retroviral de alta atividade)
Hz	Hertz
IPs	Inibidores de peptidases
IPs-HIV	Inibidores proteolíticos da aspártico peptidases do HIV
IPTG	Isopropil-11-tio- β -D-galactpiranosídeo
kb	Kilobases
KCl	Cloreto de potássio

kDa	Kilodaltons
MASP	Proteínas de superfície associadas a mucinas (MASP)
Mb	Megabases
Meio LB	Meio Lúria-Bertani
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
mL	Mililitros
ML	Máxima verossimilhança
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
NIC	Nicastrina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i> (Banco de dados de proteínas)
Pen-2	<i>Presenilinhancer</i>
pH	Potencial Hidrogênionico
pI	Ponto isoelétrico
PPS	Peptidase peptídeo sinal
PS	Presenilina
PS1	Presenilina 1
PSN	<i>Presenilin/Signal peptide peptidase family</i> (Família Presenilina/ Peptidase peptídeo sinal)
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RNAm	<i>Ribonucleic acid message</i> (Ácido ribonucleico mensageiro)
rpm	Rotação por minuto
RPV	<i>Retroviral like protease</i> (Retroviral protease <i>símile</i>)
SAPs	<i>Secreted aspartic peptidases</i> (Aspártico peptidase secretada)
SDS	<i>Sodiumdodecyl sulfate</i> (Dodecil sulfato de sódio)
SDS PAGE	<i>Sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio)

SL	Sequência líder
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS	Tris-salina
TBS-T	Tris-salina contendo detergente Tween
TS	Transialidasas
UBA	<i>Ubiquitin associated</i> (Ubiquitina associado)
UBL	<i>Ubiquitin like protein</i> (Ubiquitina <i>símile</i>)
UFC	Unidades formadoras de colônia
V	Volts
μM	Microlitro

1. Introdução

1.1 Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*

O parasito *Trypanosoma cruzi* pertence ao Filo Euglenozoa, Classe Kinetoplastea, Subclasse Metakinetoplastina, Ordem Trypanosomatidae (revisto por d'Avila-Levy *et al.* 2015). O parasito possui um ciclo de vida heteroxênico, isto é, desenvolve-se em dois hospedeiros, um inseto vetor e um hospedeiro vertebrado (revisto por Coura 2015). O parasito apresenta três principais formas evolutivas ao longo do seu ciclo de vida, que podem ser identificadas pela posição relativa do cinetoplasto em relação ao núcleo celular e local de emergência do flagelo: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas (Hoare & Wallace 1966) (Figura 1).

As formas amastigotas são arredondadas e infectivas ao hospedeiro vertebrado. Possuem um flagelo reduzido unido ao corpo celular, e, multiplicam-se por fissão binária no interior das células do hospedeiro. As formas epimastigotas apresentam um corpo alongado, flagelo livre que se origina na posição anterior ao núcleo. Estas formas são encontradas na porção anterior do trato intestinal do inseto vetor e se multiplicam por fissão binária. As formas tripomastigotas apresentam flagelo que se origina na posição posterior ao núcleo e se estende por todo corpo celular, até o ponto de emergência na bolsa flagelar, dando a impressão de uma membrana ondulante. As formas tripomastigotas não são replicativas, e representam os estágios infectivos tanto para o hospedeiro vertebrado, como para o inseto vetor. Quando no sangue de hospedeiros vertebrados, são chamados de tripomastigotas sanguíneos, responsáveis por infectar o triatomíneo vetor durante seu repasto sanguíneo. Quando são eliminados nas fezes e urina dos triatomíneos, são denominados de tripomastigotas metacíclicos (de Souza 2002).

1.2 Organelas de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi possui organelas típicas, como uma mitocôndria única e ramificada que se estende por todo corpo celular (Figura 2). No interior dessa organela, encontra-se o cinetoplasto, formado por DNA mitocondrial (Lukes *et al.* 2002; d'Avila-Levy *et al.* 2015), organizado de forma singular, que representa aproximadamente 30% do genoma do parasito. Além das características estruturais, o cinetoplasto é único em função e modo de replicação (Shapiro & Englund 1995; de Souza 2009; Povelones 2014).

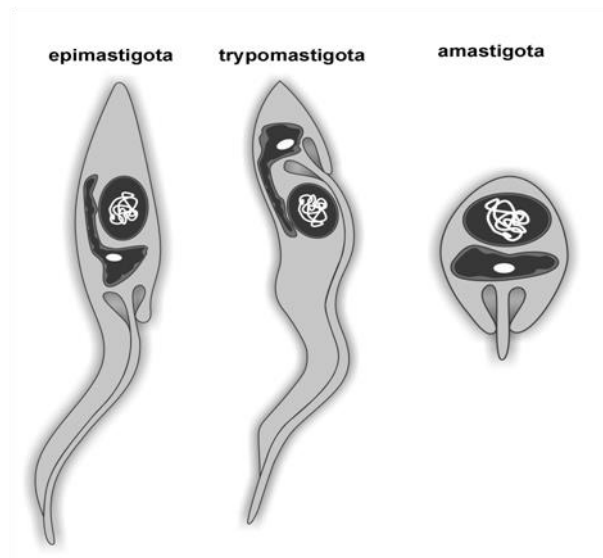


Figura 1: Estágios morfológicos encontrados durante o ciclo evolutivo de *T. cruzi* (adaptado de d'Avila-Levy *et al.*, 2015).

O glicosomo é uma organela evolutivamente relacionada ao peroxissomos de eucariotos, contudo, não há a presença da enzima catalase. Responsável por compartimentalizar grande parte das enzimas da via glicolítica, esta organela é essencial à sobrevivência do parasito (Opferdoes *et al.* 1977; revisto por Haanstra *et al.* 2014).

O acidocalcissomo é uma organela rica em cálcio, fósforo e outros cátions que atua como organela de armazenamento e está associada às adaptações osmóticas do parasito durante seus diferentes estágios evolutivos (Docampo & Moreno 2011).

O citoesqueleto é composto por uma cadeia de microtúbulos, filamentos intermediários e microfilamentos. Os microfilamentos são compostos por um tipo especial de actina, que se difere da proteína de mamíferos pelo processo de oligomerização e na interação com outras proteínas. Os microtúbulos são formados pela proteína tubulina, e representam o principal componente do citoesqueleto. Estão distribuídos por todo o corpo celular, exceto na região da bolsa flagelar. Se localizam imediatamente abaixo da membrana plasmática, compondo um arranjo helicoidal através do corpo celular. Estão ligados entre si, com a membrana plasmática, sendo denominados microtúbulos subpeliculares (de Souza 2002). Além dos microtúbulos subpeliculares, microtúbulos especializados estão presentes logo abaixo da membrana do complexo citóstoma-citofaringe e próximos ao corpúsculo basal, na região da bolsa flagelar (Alcantara *et al.* 2014).

O flagelo é constituído por um arranjo padrão de nove pares periféricos de microtúbulos e um par central, denominado axonema. É envolvido por uma membrana flagelar, composta

principalmente de proteínas de ligação ao cálcio e esterol. Adicionalmente, contém uma estrutura formada por um arranjo de filamentos, ligado ao axonema do flagelo, chamado de estrutura paraflagelar (de Souza 2002).

A bolsa flagelar é uma profunda invaginação da membrana plasmática em forma de saco, próxima a região onde o cinetoplasto está localizado. É desprovida de microtúbulos subpeliculares, o que faz dela um local onde ocorrem os processos de endocitose e exocitose. A bolsa flagelar desempenha um papel chave no tráfego de proteínas, sinalização celular, e evasão da resposta imunológica (Field & Carrington 2009). *T. cruzi* possui uma via endocítica altamente restrita. Nas formas epimastigotas, a endocitose ocorre em altos níveis através da bolsa flagelar, e também através de uma estrutura adicional, altamente especializada chamada citóstoma (de Souza 2002). Os reservossomos são descritos como estruturas únicas de epimastigotas, e considerados a principal fonte de degradação de proteínas nesta forma do parasito. Sua principal função tem sido relacionada ao estoque de macromoléculas, embora também possuam uma alta concentração de hidrolases lisossomais (de Souza 2002).

1.3 Genoma de *Trypanosoma cruzi*

Com aproximadamente 23 mil genes, o genoma diploide do parasito constitui-se de mais de 50% de sequências repetitivas. Essas sequências incluem retrotransposons e membros de grandes famílias multigênicas que codificam proteínas de superfície como a superfamília das transialidases (TS), mucinas, glicoproteínas de superfície 63 (gp63), e proteínas de superfície associadas a mucinas (MASP) (El-Sayed *et al.* 2005; Bartholomeu *et al.* 2009). A maior parte dos genes é transcrito constitucionalmente nas três principais formas evolutivas (Bartholomeu *et al.* 2002; Gentil *et al.* 2009). Contudo, sua adaptação a diferentes hospedeiros, é marcada por mudanças bioquímicas e morfológicas, o que exige um complexo mecanismo de controle de expressão gênica. A transcrição é policistrônica, e se caracteriza pela transcrição de diversos genes em um único e extenso pré RNA mensageiro (RNAm), que é posteriormente editado em um mecanismo conhecido como *trans-splicing*. Este processo produz RNAs monocistrônicos, e está associado à adição de uma sequência de 39 a 41 nucleotídeos chamada de sequência líder (SL) ou mini éxon, que contém uma estrutura de “cap” metilada na posição 5’ final, e uma cauda poli (A) na extremidade 3’ final, conferindo proteção e estabilização de cada molécula de RNAm (Clayton & Shapira 2007).

Este tipo de regulação gênica representa um eficaz mecanismo de adaptação, que pode estar relacionada a eficiência do parasito de colonizar diferentes hospedeiros, como os

mamíferos e insetos vetores, envolvendo um rápido mecanismo de reprogramação e síntese de proteínas.

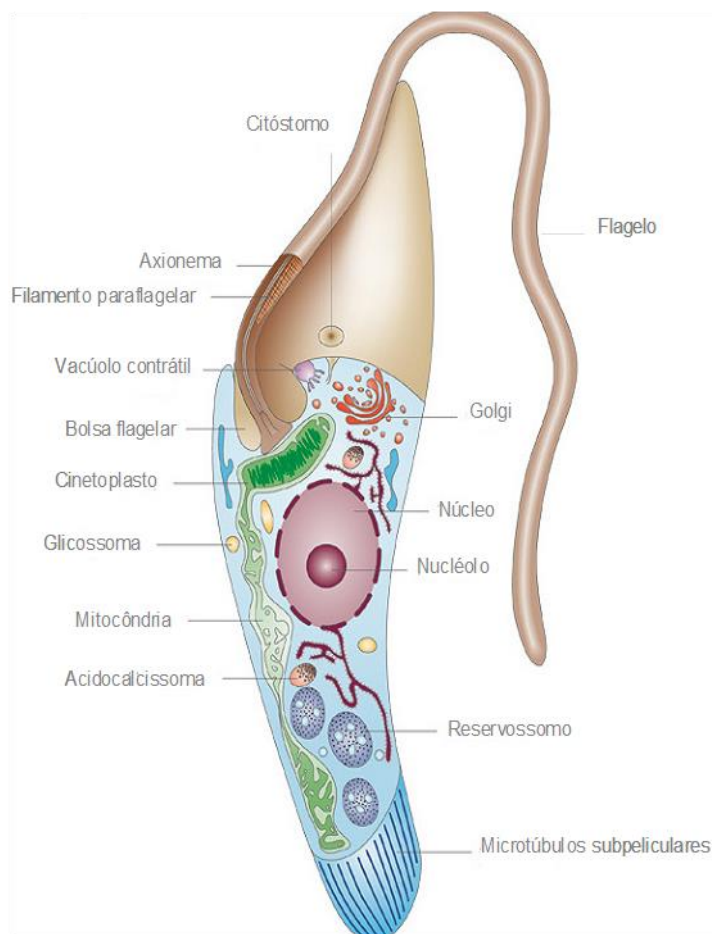


Figura 2: Representação esquemática da seção longitudinal da forma epimastigota de *T. cruzi* mostrando as principais estruturas e organelas encontradas (Docampo *et al.* 2005).

T. cruzi se divide classicamente por fissão binária, e embora a reprodução sexuada possa ocorrer, é considerada rara e de pouca importância evolutiva (Tibayrenc *et al.* 1990; Tibayrenc & Ayala 2002). Este parasito apresenta uma grande variedade genética, bem como peculiaridades bioquímicas variantes entre suas cepas e clones, formando uma espécie heterogênea, composta por uma mescla de diversos isolados circulantes na natureza (Mattei *et al.* 1977; Morel *et al.* 1980). Sua heterogeneidade continua sendo extensivamente estudada por métodos biológicos, bioquímicos e moleculares, na tentativa de explicar as diferentes manifestações clínicas da doença e suas diferenças geográficas na morbidade e mortalidade (Macedo *et al.* 2004; Manoel-Caetano & Silva 2007; Zingales 2018).

A menos de duas décadas, o primeiro projeto de sequenciamento genômico de *T. cruzi* foi publicado. Como sequência referência, utilizou-se o genoma do clone *T. cruzi* CL Brener (El-Sayed *et al.* 2005). O clone CL Brener é derivado da cepa CL (Brener & Chiari, 1963), e,

assim como a cepa parental apresenta importantes características em relação a infectividade em hospedeiros mamíferos, a diferenciação em meio líquido, a infecção de cultura celular (Alcantara & Brener, 1978), ao parasitismo preferencial por células cardíacas e musculares (Melo & Brener, 1978), a suscetibilidade as drogas (Filardi & Brener, 1987), e a presença de marcadores genéticos estáveis que permitem sua tipagem molecular (Zingales *et al.* 1997).

É considerado um organismo híbrido, oriundo da hibridação de duas linhagens genéticas principais (Souto *et al.* 1996), apresentando dois haplótipos parentais, com divergência entre suas sequências gênicas (El-Sayed *et al.* 2005).

O genoma foi montado e anotado sendo predito os dois haplótipos, denominados de haplótipo Esmeraldo (S) e não Esmeraldo (P). As sequências gênicas foram organizadas em 41 pares homólogos, com tamanhos que variam entre 78 kb e 2,3 Mb, denominados de cromossomos ou TcChr, e regiões consenso de DNA denominadas *contigs* e *scallfolds* (Weatherly *et al.* 2009).

A utilização de marcadores clássicos de taxonomia de tripanossomatídeos permitiu a delimitação de dois grandes grupos que demonstravam um claro dimorfismo entre os isolados do parasito. Estes grupos foram primariamente denominados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Souto *et al.* 1996), redivididos mais recentemente em seis grupos (TcI –TcVI), onde cada grupo é agora denominado Unidade Discreta de Tipagem (DTU), do inglês *Discrete Typing Units*, que por definição representa um conjunto de isolados, geneticamente semelhantes e identificáveis por marcadores moleculares e imunológicos análogos (Zingales *et al.* 2009). Os isolados pertencentes às DTUs TcI, TcIII e TcIV são relacionados ao ciclo silvestre de infecção, enquanto os isolados das DTUs TcII, TcV e TcVI são relacionados aos ciclos domésticos e peridoméstico da infecção. A possibilidade de expansão desses grupos é vinculada ao isolamento de novas cepas, como a recentemente criada DTU Tcbat (Marcili *et al.* 2009; Zingales *et al.* 2012; Lima *et al.* 2015).

Apesar de um sistema de classificação de grupos, que visa estabelecer a correlação entre as cepas infectantes, imunologia, manifestações clínicas, estratégias terapêuticas e epidemiologia, a infecção pelo *T. cruzi* é resultante do encadeamento de múltiplos fatores complexos, envolvendo o parasito e seus hospedeiros. A habilidade de utilizar diferentes recursos para sua manutenção e ciclo de vida em uma gama de reservatórios pode ser associada à adaptação generalista desse parasito, onde cada hospedeiro pode atuar como um crivo, favorecendo a seleção de diversos clones do parasito (Jansen *et al.* 2015).

1.4 Ciclo evolutivo de *Trypanosoma cruzi*

O parasito possui um ciclo heteroxênico, alternando entre um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor. O ciclo biológico ocorre quando o inseto ingere as formas tripomastigotas sanguíneas de um hospedeiro mamífero infectado. No intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas, que aderem a membrana perimicrovilar da porção média do intestino, onde se multiplicam intensamente por ciclos de divisão binária (Billingsley 1990; Gonzalez *et al.* 1999; Azambuja *et al.* 2005). Na porção final do intestino, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, que são eliminados com as fezes e urinas dos triatomíneos (Garcia *et al.* 2007). (Figura 3).

As formas tripomastigotas, quando alcançam a corrente sanguínea através de uma ferida na pele ou mucosa, dão início a infecção no hospedeiro vertebrado (de Souza 2009; Teixeira *et al.* 2012).

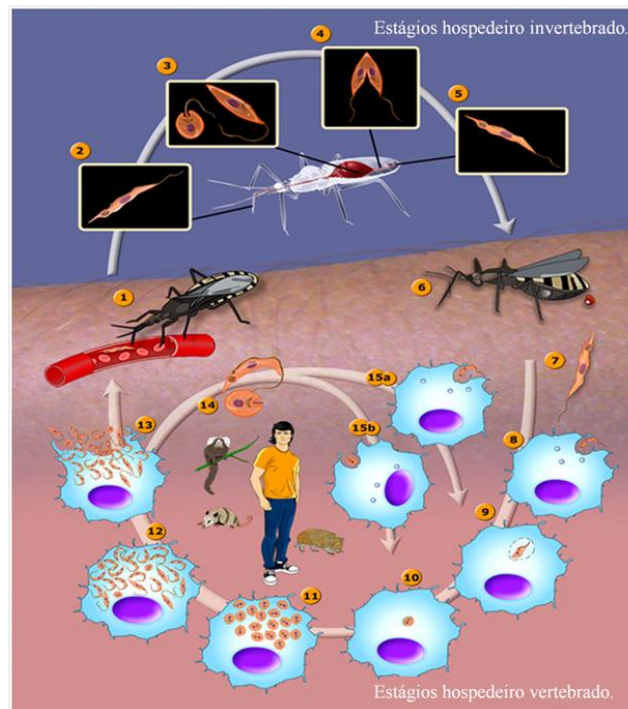


Figura 3: Ciclo biológico de *T. cruzi*. (1) O inseto vetor (fêmea ou macho) pica o hospedeiro mamífero e ingere as formas circulantes no sangue (tripomastigotas sanguíneas); (2) Formas tripomastigotas sanguíneas; (3) Tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas; (4) Epimastigotas se multiplicam no intestino médio; (5) Epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas na porção final do intestino; (6) Tripomastigotas metacíclicas são liberados junto com as fezes do inseto vetor; (7) Formas tripomastigotas metacíclicas; (8) Tripomastigotas metacíclicas infectando macrófagos; (9) Tripomastigotas metacíclicas diferenciam-se em amastigotas; (10) A amastigota é liberado do vacúolo parasitóforo; (11) As amastigotas multiplicam-se no citoplasma; (12) As amastigotas transformam-se em tripomastigotas; (13) Rompimento da célula hospedeira; (14) As formas amastigotas e tripomastigotas circulantes no sangue; (15a) Tripomastigotas e (15b) amastigotas infectam macrófagos. No centro da figura, os reservatórios animais mais importantes envolvidos na manutenção do parasito em ambientes domésticos e peridomésticos estão representados (Teixeira *et al.* 2012).

1.5 Formas clínicas da doença de Chagas

A doença de Chagas é caracterizada por duas fases clínicas distintas: fase aguda e fase crônica. A fase aguda, usualmente inicia-se após a picada do inseto vetor, quando as formas tripomastigotas metacíclicas penetram através da mucosa ocular ou pela pele. A fase aguda, pode apresentar manifestações clínicas de 8 a 10 dias após a penetração do parasito (Rassi Jr *et al.* 2000), mas em muitos casos, não é clinicamente reconhecida, por não possuir sintomatologia específica. O sinal de Romanã é uma lesão ocular típica de indício da entrada do parasito, caracterizado por um inchaço indolor em uma ou em ambas as pálpebras, resultado de congestão e hipertrofia conjuntiva. O chagoma de inoculação, um sinal de entrada do parasito através da pele, é caracterizado por uma lesão nodular eritematosa, indolor, algumas vezes ulcerada (Figura 4).



Figura 4: Sinais de entrada de *T. cruzi*. (A) Sinal de Romanã; (B e C) Chagoma de inoculação localizado no braço e destacado em círculo amarelo (Telleria & Tibayrenc 2017).

A mortalidade na fase aguda ocorre em torno de 5% dos casos assintomáticos, como consequência de meningoencefalite e miocardite. A cura espontânea, embora rara, já foi relatada (Francolino *et al.* 2003). A evolução natural da fase aguda, em torno de 95% dos indivíduos infectados, resulta no desaparecimento de todos os sintomas e sinais clínicos, o que ocorre em aproximadamente 2 meses. A fase crônica da doença inicia-se após o desaparecimento dos sintomas da fase aguda, e se caracteriza por níveis de parasitemia indetectáveis. Em um grande número de pacientes, a fase crônica se apresenta como forma indeterminada, levando a manifestações cardíacas, digestivas ou cardiodigestivas após décadas da contaminação inicial. Contudo, o direto desenvolvimento para a fase crônica tem sido relatado em alguns pacientes (Rassi J *et al.* 2017).

A forma cardíaca é a mais séria e frequente manifestação da fase crônica da doença de Chagas. Ocorre em torno de 20 a 30% dos pacientes crônicos, se manifestando separadamente ou concomitantemente em três principais síndromes: arritmia, insuficiência cardíaca e tromboembolismo sistêmico e pulmonar (Rassi *et al.* 1992).

A forma digestiva é caracterizada por alterações do trato digestivo, que resultam no comprometimento do sistema nervoso entérico, que leva a retenção de alimentos no esôfago e de fezes no reto e colo sigmoide, hipertrofia muscular e consequente dilatação, ocasionando a formação de megaesôfago e megacólon (Rezende 1959).

1.6 Tratamento da doença de Chagas

Apenas dois fármacos são utilizados para o tratamento da doença, nifurtimox e benzonidazol (Shikanai-Yasuda *et al.* 1990; Jannin & Villa 2007). Lançado na década de 60, o nifurtimox foi o primeiro quimioterápico utilizado no tratamento da fase aguda (Brenner 2000). Sua ação consiste em induzir o aumento do consumo de oxigênio pelo parasito, elevando assim a produção de radicais livres como ânions superóxidos, peróxido de hidrogênio e metabólitos eletrofílicos. A não eliminação completa desses radicais livres torna o parasito suscetível a esses intermediários (Docampo & Moreno 1986). Contudo, no Brasil, Venezuela, Chile e Argentina, este nitroderivado teve a sua produção interrompida (Coura & de Castro 2002). O benzonidazol, introduzido na década de 70, atua inibindo a síntese proteica do parasito (Apt & Zulantay 2011), e a sua eficácia na fase aguda já é bem estabelecida (Lazzari & Freilij 1988). Aditivamente, estudos indicam que a utilização desse fármaco na fase crônica da infecção previne o desenvolvimento de cardiopatias chagásicas crônicas severas, mesmo sem a completa eliminação do parasito (Garcia *et al.* 2005). Entretanto, em 2017, um estudo clínico do BENEFFIT (sigla em inglês para Avaliação do Benzonidazol para a interrupção da Tripanossomíase) demonstrou que o benzonidazol parece não ter nenhum efeito clínico na diminuição da progressão da cardiopatia chagásica (Rassi J *et al.* 2017).

Ambos os fármacos são utilizados por um longo período de tratamento e diversos efeitos colaterais, como alterações digestivas, hematológicas, dermatológicas, e de maior gravidade como neuropatias são observados. Devido a característica multiclonal da população do parasito e a sua ampla variabilidade genética, um agravante no uso desses fármacos é a seleção de cepas resistentes, conduzindo a falha do tratamento (Macedo & Pena 1998; Macedo *et al.* 2004). Outros quimioterápicos têm sido propostos para o tratamento da infecção por *T. cruzi*. Em modelos murinos, a anfotericina B diminui a carga parasitária e a mortalidade (Cencig *et al.* 2011). Inibidores de cruzaína têm sido amplamente testados em modelos animais de infecção, e o alopurinol tem se mostrado eficaz em terapias combinadas (Perez-Mazliah *et al.* 2012).

Alguns inibidores da biossíntese de ergosterol têm sido considerados como alternativa para drogas licenciadas, e têm mostrado bons resultados em modelos murinos de infecção (Veiga-Santos *et al.* 2015). Contudo, em testes clínicos, inibidores como posaconazol e ravacunazol não se mostraram eficazes no tratamento da fase crônica (Molina *et al.* 2014). O posaconazol tem sua atividade melhorada quando combinado com benzonidazol (Bustamante & Tarleton 2014), e esta combinação encontra-se em fase de testes clínicos (Perez-Molina *et al.* 2015).

1.7 Mecanismos de transmissão da doença de Chagas

A doença de Chagas é classicamente transmitida através do inseto triatomíneo (Figura 3). A transmissão endêmica vetorial em hospedeiros humanos e silvestres é restrita às Américas e é associada à distribuição dos vetores, que vai do Sul dos Estados Unidos, ao Sul da Argentina. Os triatomíneos pertencem a uma subfamília (Triatominae) de insetos predadores da família Reduviidae, e albergam em torno de 150 espécies. Embora todas as espécies de triatomíneos sejam vetores em potencial de *T. cruzi*, apenas cerca de 15 espécies apresentam tendências antropofílicas, e são regularmente associadas à transmissão da doença (Cohen & Gurtler 2001; Campbell-Lendrum *et al.* 2007; Abad-Franch *et al.* 2010). Neste aspecto, as espécies de maior importância são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* (Schofield & Galvao 2009). Contudo, a destruição do habitat natural, eliminação de fonte de alimentação e proximidade com habitações humanas podem iniciar o desenvolvimento de tendências a domiciliação de outras espécies de triatomíneos (Cordovez & Guhl 2015), o que deixa claro a necessidade de controle vetorial efetivo e rastreamento de espécies como estratégia de controle (Abad-Franch *et al.* 2010).

No Brasil, o aumento de casos agudos da doença tem sido associado a via de transmissão oral, em especial na região Amazônica (Coura *et al.* 2014). Em geral, a fonte de contaminação primária está relacionada a áreas silvestres, onde triatomíneos infectados e reservatórios de *T. cruzi* são encontrados, e onde ocorre a exposição e contaminação das fontes alimentares (Pereira *et al.* 2009; Pereira *et al.* 2010; Toso *et al.* 2011). A transmissão oral em áreas urbanas é circunstancial, geralmente derivada de triatomíneos infectados, que são transportados, e triturados juntamente com alimentos de áreas endêmicas (Nobrega *et al.* 2009; Xavier *et al.* 2014).

Programas de triagem de doadores e controle de bancos de sangue, implementados em países da América Latina na década de 80 (Dias & Brener 1984), reduziram drasticamente a transmissão de *T. cruzi* por transfusão sanguínea (Schmunis 2007; Coura 2013). Apesar disso, regiões endêmicas como o México, não possuem triagem efetiva de seus doadores, e métodos

eficazes de detecção do parasito em seus bancos de sangue (Medina 2014; Angheben *et al.* 2015).

A forma de transmissão congênita pode acontecer na fase aguda ou crônica da infecção materna, e se repetir em gestações sucessivas (Carlier *et al.* 2012; Carlier & Truyens 2015). A alta carga parasitária é relacionada a transmissão prenatal e perinatal (Virreira *et al.* 2007; Bern *et al.* 2009). Estima-se que 1.125.000 mulheres em idade fértil, sejam portadoras de *T. cruzi* em países endêmicos (Carlier & Truyens 2015).

Estudos em modelos murinos imunosuprimidos, indicam um potencial risco de transmissão por via sexual, uma vez que formas infectivas do parasito são encontrados em tecidos reprodutivos (Martin *et al.* 2015).

Além destes, outros mecanismos pouco frequentes de transmissão incluem: acidentes de laboratórios e transplante de órgãos (Coura 2015).

1.8 Distribuição mundial da doença de Chagas

De acordo com a OMS, a doença de Chagas afeta em torno de 6 milhões de pessoas em todo o mundo. A doença é majoritariamente endêmica em 21 países da América Latina, nos quais Argentina, Brasil, e Bolívia são os países com o maior número de pessoas infectadas, seguido do México na América Central (OMS 2018). Chile, Paraguai, Guatemala e sub-regiões andina como a Venezuela, Equador e Peru, possuem entre 100.000 – 200.000 pessoas infectadas (Peterson & Guhj 2010).

Em relação ao surgimento de novos casos através da via vetorial, a Bolívia se destaca. Juntos, Bolívia e Argentina são responsáveis por mais de 30% de novos casos da doença na América Latina. A região sub-andina contabiliza mais de 34% de novos casos. Dos sete países da América Central com a presença da doença, Guatemala, El Salvador, e Honduras somam mais de 84% dos novos casos.

No Sul dos Estados Unidos (EUA), a doença de Chagas é restrita ao ciclo silvestre, o que mantém baixo o surgimento de casos autóctones (Brown *et al.* 2010; Buhaya *et al.* 2015). Apesar disso, estima-se que 300 mil indivíduos acometidos pela doença vivam nos EUA (Manne-Goehler *et al.* 2016). O surgimento da doença em países não endêmicos está relacionado a migração de indivíduos infectados por *T. cruzi* (Pinazo & Gascon 2015). Estima-se que na Europa, existam entre 68.000 e 123.000 pessoas infectadas, a grande maioria vivendo na Espanha (Gascon *et al.* 2010). A presença de imigrantes infectados tem sido relatada também na Dinamarca, Alemanha, Itália, Países Baixos e Suíça. Casos congênitos foram relatados ainda na Romênia e na França (Castro *et al.* 2009). O número de latino-americanos infectados tem

aumentado significativamente na Ásia, Austrália e outros países da Oceania (Coura & Vinas 2010). (Figura 5).



Figura 5: Principais rotas de imigrantes da América Latina para países não endêmicos. Os valores representam a estimativa do número de indivíduos infectados nessas regiões (Coura & Vinas 2010).

1.9 Co-infecção *T. cruzi*/HIV

A melhora das condições sócio econômicas, o aumento da expectativa de vida e as tendências migratórias têm alterado a prevalência da doença de Chagas (Almeida *et al.* 2010; Almeida *et al.* 2011). Associado à pandemia do HIV, o surgimento de casos de co-infecções *T. cruzi*/HIV tornou-se frequente (Schmunis 2007; Bern 2015). Naturalmente, países endêmicos para doença de Chagas estão entre os que concentram o maior número de casos de co-infecção, alcançando taxas que podem variar de 1,3 a 7,1 %, da população infectada por *T. cruzi* (Perez-Molina 2014).

A Espanha se destaca como o único país não endêmico com alta taxa de co-infecção, atingindo 3,9% da população (Llenas-Garcia *et al.* 2012; Salvador *et al.* 2013). Mais de 21,2% dos novos casos diagnosticados com HIV em 2011 ocorreram em migrantes da América Latina, e 42.000 imigrantes foram diagnosticados com *T. cruzi* no mesmo período (Martinez-Perez *et al.* 2014).

A co-infecção *T. cruzi*/HIV leva a uma específica reativação da infecção parasitária (OMS, 2015), com o acometimento do sistema nervoso central (SNC), na forma de meningoencefalite difusa, aguda ou subaguda. Ocorre a formação de lesões necróticas hemorrágicas nodulares ou múltiplas de massa intracraniana, conhecida como “chagoma” (Pittella 2009). A falta de diagnóstico correto e tratamento precoce resultam em alta taxa de mortalidade (Sartori *et al.* 2007; Pinto *et al.* 2016). Não existe tratamento específico para essa manifestação da doença de Chagas. Sendo assim, a prevenção da reativação da doença em pessoas com HIV é essencial (Shikanai-

Yasuda *et al.* 1990; Jannin & Villa 2007). Em contrapartida, a introdução da HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*), no ano de 1996 (Palella *et al.* 1998), resultou em significativas mudanças no perfil de comorbidades em pessoas com HIV. Neste contexto, indivíduos co-infectados *T. cruzi*/HIV sob o tratamento HAART apresentavam menor índices de reativação da doença de Chagas e/ou melhor prognósticos de tratamento (Pozio & Morales 2005; Buccheri *et al.* 2015; Pinto *et al.* 2016).

Além da restauração do sistema imune dos pacientes com HIV, a mudança no curso clínico de infecções parasitárias oportunista estava relacionada ao efeito inibitório que os IPs-HIV, exerciam diretamente sobre parasitos, inibindo as peptidases (Pozio & Morales 2005; Mastrolorenzo *et al.* 2007; Alfonso & Monzote 2011).

Os IPs-HIV incluídos na HAART (Tabela 1), possuem ação farmacológica no ciclo de replicação do HIV. Ligam-se especificamente a aspártico peptidases do vírus, levando ao bloqueio da atividade proteolítica desta enzima, o que impossibilita a formação de vírus maduros e infecciosos (Goldfarb & Dunn 2013)

E, embora semelhantes no mecanismo de ação inibitória, os IPs-HIV variam em relação a sua farmacocinética, dosagem, e perfil de efeitos colaterais. Os principais efeitos colaterais incluem anormalidades metabólicas, abrangendo dislipidemia, resistência a insulina, hiperglicemia e lipodistrofia (Paul AK & George JM, 2015).

Tabela 1: Inibidores de aspártico peptidases do HIV

Nome genérico	Nome comercial	Abreviação	Fabricante	Aprovação FDA
Agenerase	Amprenavir	APV	GlaxoSmithKline	Abril de 1999
Aptivus	Tipranavir	TPV	BoehringerIngelheim Pharmaceuticals	Junho de 2005
Crixivan	Indinavir	IDV	Merck	Março de 1996
Invirase	Saquinavir	INV	Roche	Dezembro de 1995
Kaletra	Lopinavir	LPV	Abbott Laboratories	Setembro de 2000
Lexiva	Fosamprenavir	F-APV	GlaxoSmithKline	Outubro de 2003
Norvir	Ritonavir	RTV	Abbott Laboratories	Março de 1996
Prezista	Darunavir	DRV	Tibotec Pharmaceuticals	Junho de 2006

Reyataz	Atazanavir	ATV	Bristol-MeyersSquibb Company	Junho de 2003
Viracept	Nelfinavir	NFV	Pfizer	Março de 1997

Adaptado de (Santos & Braga-Silva 2013).

1.10 Aspártico peptidases como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos

As peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, em proteínas e em fragmentos de proteínas. Estas enzimas são classificadas de acordo com o aminoácido crítico para formação do sítio catalítico, ou pela dependência de íons metálicos para catálise (Barrett *et al.* 2001). As aspártico peptidases possuem tipicamente um centro ativo altamente conservado, contendo duas unidades de ácido aspártico essenciais para sua atividade enzimática (Pearl & Blundell 1984; Cooper *et al.* 1990; Dunn 2002). Estas enzimas são ativas em pH ácido, e clivam preferencialmente entre resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Powers *et al.* 1977). O mecanismo de catálise das aspártico peptidases difere de outros grupos de peptidases como serina, treonina e cisteína, uma vez que o nucleófilo que ataca a ligação peptídica é uma molécula de água ativada, em vez de um aminoácido da cadeia peptídica lateral. Na grande maioria dessas enzimas, o par de resíduos de ácido aspártico atua em conjunto na ligação e ativação da molécula de água catalítica (Rawlings *et al.* 2014a).

As aspártico peptidases são enzimas que apresentam diferenças em suas estruturas primárias, contudo, possuem alta similaridade entre suas estruturas terciárias (Geier *et al.* 1999). No banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>), o mais moderno e organizado sistema que classifica as peptidases em uma abordagem hierarquicamente evolutiva, dentro de classes, famílias e clãs (Rawlings *et al.* 2014b), as aspártico peptidases estão atualmente classificadas em 16 famílias, as quais estão distribuídas em 6 clãs. As famílias diferem de acordo com os resíduos conservados presentes no seu sítio ativo, a posição desses resíduos na cadeia peptídica, a especificidade do substrato, a quantidade de pontes dissulfeto na sua estrutura e o pH ótimo na qual as enzimas funcionam. Um clã alberga uma ou mais famílias, que hipoteticamente originaram-se de um ancestral comum, mas que divergiram em tal grau, que sua relação comparada com a estrutura primária, não pode ser comprovada. Assim, a homologia dos clãs é pautada pela similaridade da estrutura tridimensional das proteínas (Barrett & Rawlings 2007).

Dentre as aspártico peptidases encontradas em mamíferos, as mais conhecidas são as envolvidas no sistema digestivo humano como a pepsina (Fruton 2002) e a quimosina (Bela & Harboe 2013), e as enzimas intracelulares catepsina D e E (Fusek *et al.* 2013). Outras aspártico

peptidases descritas em mamíferos têm sido relacionadas a doenças, como a renina na hipertensão (Phillips & Schmidt-Ott 1999) e a β -secretase 1 na doença de Alzheimer (Vassar 2001; Cole & Vassar 2008).

Em microrganismos patogênicos ao homem, as aspártico peptidases secretadas – (*Secreted aspartic peptidases* – SAPs), descritas inicialmente no fungo *Candida albicans*, e a plasmepsina I e II encontradas em *Plasmodium falciparum*, são importantes fatores de virulência e alvos de investigação para o desenvolvimento de quimioterápicos (Dash *et al.* 2003; Madala *et al.* 2010).

As aspártico peptidases são também amplamente encontradas em retrovírus, como o HIV, vírus da leucemia, vírus da anemia infecciosa e vírus do tumor mamário, onde desempenham papéis críticos na maturação do polipeptídeo viral (Dunn 2002). Dentre as peptidases retrovirais, também chamadas de retropepsina, a mais bem estudada é a do HIV. Esta enzima é inicialmente sintetizada com outras proteínas na forma de uma poliproteína viral (Gag pol), que exerce um papel chave na propagação viral por clivar pontos precisos da poliproteína, que resultam na liberação de proteínas essenciais para a montagem e produção de partículas virais funcionais (Goldfarb & Dunn 2013).

Em tripanossomatídeos, as aspártico peptidases presentes no genoma pertencem ao Clã AA (família A28) e ao Clã AD (famílias A22 A e A22 B). O Clã AA alberga as aspártico peptidases ancestrais, e o Clã AD as aspárticos peptidases que hidrolisam ligações peptídicas dentro de membranas. O Clã AA é decomposto em 8 famílias, entre elas a família A1, que engloba as aspártico peptidases do tipo beta, que são caracterizadas por possuírem dois domínios similares do tipo (β - *barrel*) barril beta (Fujinaga *et al.* 1995), e a família A2 caracterizadas por possuírem domínio único do tipo barril beta (Jaskolski *et al.* 1991). Na família A1 encontram-se as enzimas pepsina, gastricina, reninas, catepsinas D e E, plasmepsinas e peptidase histo aspártica. Na família A2 das aspártico peptidases encontram-se as retropepsinas, incluindo a retropepsina do HIV (Santos *et al.* 2013). O Clã AD alberga todas as aspártico peptidases que possuem domínio transmembranas, contudo, diferente dos membros da família A1, pressupõe-se que esses domínios sejam do tipo helicoidais. A enzima presenilina, representante do Clã AD, forma o núcleo catalítico do complexo gama secretase, indispensável para a proteólise intermembranar de proteínas transmembranas do tipo 1, como a proteína precursora de amiloide (Dash *et al.* 2003; Laudon *et al.* 2007).

O papel significativo das aspártico peptidases em doenças humanas tem resultado em um extensivo estudo sobre a relação estrutural e funções dessas enzimas, e diversos inibidores foram desenvolvidos. Sem dúvida, o resultado mais bem-sucedido foi o desenvolvimento dos inibidores proteolíticos da aspártico peptidases do HIV (IPs-HIV) (Kohl *et al.* 1988; Huff 1991).

Desenhos baseados na especificidade do substrato e homologia estrutural da peptidase dimérica do HIV deram origem a compostos sintéticos inibitórios, dirigido ao sítio ativo desta enzima (Darke *et al.* 1988). Diversos compostos sintéticos dirigidos ao sítio ativo da aspártico peptidase viral passaram a ser relatados (Wlodawer & Erickson 1993).

Outros inibidores de aspártico peptidases têm sido utilizado como fármacos. Aliskiren, um inibidor da renina, de uso oral, que age bloqueando os passos iniciais do sistema renina-angiotensina, tendo ação anti-hipertensiva (Jensen *et al.* 2008; Wal *et al.* 2011). Inibidores direcionados a enzima β -secretase e catepsina D encontram-se hoje em processo de melhoramento de suas características como biodisponibilidade, maior especificidade e potência (Dash *et al.* 2003; Madala *et al.* 2010). A utilização de inibidores proteolíticos de aspártico peptidases tem se apresentado como uma eficiente rota terapêutica. Um maior conhecimento a nível bioquímico e estrutural sobre essa classe de enzima pode sinalizar novos caminhos para o tratamento de doenças negligenciadas através de reposicionamento de fármacos (Ennes-Vidal *et al.* 2017).

1.11 Ação dos IPs-HIV sobre *Leishmania* spp. e *T. cruzi*

Diversos estudos passaram a ser realizados para investigar a ação direta dos IPs-HIV em tripanossomatídeos. No gênero *Leishmania*, foi demonstrado o efeito destes compostos sobre a viabilidade de diversas espécies e isolados. Nelfinavir e saquinavir foram efetivos em diminuir a proliferação celular das formas promastigotas de todas as espécies e isolados testados até o momento (Valdivieso *et al.* 2007; Trudel *et al.* 2008; Santos *et al.* 2009; Valdivieso *et al.* 2010; Santos & Braga-Silva 2013). Esse efeito se estendeu às formas amastigotas em cultura e amastigotas intracelulares, quando incubados com nelfinavir, ritonavir e saquinavir (Trudel *et al.* 2008; Santos *et al.* 2009). Pouco tempo depois, o efeito direto dos IPs-HIV na atividade de aspártico peptidases de *Leishmania* spp. foi demonstrado através de ensaios bioquímicos (Santos *et al.* 2009; Valdivieso *et al.* 2010). Contudo, a identificação do alvo intracelular desses inibidores em *Leishmania* ocorreu posteriormente, com a caracterização a nível gênico e bioquímico de uma aspártico peptidase ativa pertencente à família das retropepsinas, e homóloga à Ddi 1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura foi utilizada como modelo para demonstrar a interação entre a Ddi 1 e os IPs-HIV. *S. cerevisiae knockout* para Ddi 1 endógena apresenta um fenótipo de secreção elevada de proteínas para o meio. Após ensaio de transfecção com o gene ortólogo Ddi 1 de *L. major*, essas leveduras tiveram seu fenótipo selvagem, que apresenta baixos níveis de secreção, restabelecido. Os IPs-HIV também induziram uma elevada secreção de proteínas em cepas selvagem, o que reforça a ligação destes inibidores à Ddi 1 (White *et al.* 2011b).

Em 2012, Perteguer e colaboradores isolaram um gene de *L. major* que codificava uma proteína em torno de 49 kDa, que exibia uma significativa homologia em sua estrutura primária com a sequência anotada de Ddi 1. A proteína foi clonada e expressa e apresentou atividade ótima em pH ácido, clivando preferencialmente substratos peptídicos da família das retropepsinas, capacidade de degradação de peptídeos maiores, e inibição da atividade por inibidores clássicos de aspártico peptidases como pepstatina A e DAN. Adicionalmente, a atividade da Ddi 1 recombinante foi inibida pelo IP-HIV nelfinavir (Perteguer *et al.* 2013). A modelagem molecular do domínio retroviral da Ddi 1 de *L. major* revelou uma estrutura em dímero, contendo uma sequência dupla de aminoácidos no padrão Asp-Ser-Gly-Ala, e uma conformação quase idêntica à exibida pelo homólogo retroviral da Ddi 1 de fungo, e similar ao domínio retroviral do vírus HIV (Perteguer *et al.* 2013).

Apesar dos importantes efeitos dos IPs-HIV, em *Leishmania*, a classe das aspártico peptidases em *T. cruzi*, passou a ser alvo de estudo detalhados somente a aproximadamente uma década. O sequenciamento do genoma deste parasito no ano de 2005, permitiu uma visão completa do seu repertório de peptidases, descrevendo a presença de três genes codificantes para aspártico peptidases (revisto por Santos *et al.* 2013).

Pinho e colaboradores (2009) identificaram atividade proteolítica com características bioquímicas de aspártico peptidases em extrato bruto das formas epimastigotas de *T. cruzi* (Pinho *et al.* 2009), porém a enzima não foi relacionada aos três genes anotados no genoma (Alvarez, Niemirowicz & Cazzulo, 2012). Estudos subsequentes utilizando a pepstatina A, um inibidor clássico de aspártico peptidases, sinalizaram a importante função dessa classe de enzima na biologia do parasito. Além dos efeitos sob viabilidade celular, a pepstatina A acelerou o processo de metaciclo genese e induziu importantes alterações do perfil de moléculas de superfície, como o aumento de gp63 e calpaínas *símile* (Sangenito *et al.* 2012). O efeito dos IPs-HIV em epimastigotas foi avaliado posteriormente. Ritonavir, lopinavir e nelfinavir apresentaram uma ação antiproliferativa em cepas pertencentes a distintas DTUs (Sangenito *et al.* 2014). Nelfinavir e lopinavir reduziram a viabilidade celular das formas tripomastigotas, causando importantes alterações morfológicas e estruturais como redução do corpo celular, diminuição ou perda total do flagelo. Aditivamente, o índice de associação parasito/célula foi substancialmente diminuído, assim como a multiplicação das formas amastigotas (Sangenito *et al.* 2016a; Sangenito *et al.* 2016b).

Embora evidências indiquem que os IPs-HIV atuem em um alvo intracelular no parasito, seu mecanismo de ação e o sítio intracelular ainda não foram completamente descritos. Estudos indicam que em *T. cruzi*, as interações com esses inibidores podem ocorrer em alvos distintos,

atuando diretamente sobre as aspárticos peptidases (Parikh *et al* 2005; Boddey *et al* 2010; Santos *et al* 2013; Sangenito *et al* 2014; Sangenito *et al* 2016) e nos proteassomos (André *et al* 1998; Piccinini *et al* 2005; De Barros *et al* 2007; Sangenito *et al* 2016). Nelfinavir e lopinavir foram capazes de reduzir significativamente a atividade do proteassomo em extrato bruto das formas epimastigotas e tripomastigotas (Sangenito *et al* 2016). A inibição do proteassomo em *T. cruzi* afeta a diferenciação intracelular das formas tripomastigotas em amastigotas, bem como o desenvolvimento intracelular das formas amastigotas (González *et al* 1996). Essa inibição resulta ainda em bloqueio da divisão celular, afetando mecanismos que desencadeiam a diferenciação de formas epimastigotas em tripomastigotas (Cardoso *et al* 2008).

1.12 Ferramentas computacionais no desenvolvimento de novos fármacos

Com a evolução da biologia molecular e de técnicas de isolamento e preparação de proteínas, novos alvos moleculares passaram a ter suas informações estruturais resolvidas mais facilmente. Bancos de dados de sequências peptídicas, estruturas tridimensionais e funções de proteínas passaram a ser disponibilizados. A criação de consórcios mundiais de mapeamentos genômico e proteômico de diversos organismos (Fischbach & Walsh 2009; Rosamond & Allsop 2000; Service 2000) impulsionaram o desenvolvimento de ferramentas e métodos computacionais que auxiliam o planejamento de novos fármacos (Lengauer & Rarey 1996; Shoichet *et al.* 2002; Giersiefen *et al.* 2003; Kitchen *et al.* 2004).

Um fármaco, de um modo geral, refere-se a micromoléculas que se ligam a proteínas e são capazes de modular a sua função. O desenho de fármacos baseia-se no entendimento minucioso do mecanismo de especificidade de ligação entre moléculas candidatas a alvos e compostos ligantes. O conhecimento a nível estrutural e físico químico do alvo molecular e seus possíveis ligantes minimizam o processo de busca por novos compostos com potencial farmacológico, e, conseqüentemente reduzem os custos financeiros (Jorgensen 2010; Hung & Chen 2014). Para planejar um fármaco baseado em estrutura, algumas etapas são necessárias (Marti-Renom *et al.* 2000). A estrutura tridimensional da molécula alvo precisa ser obtida através de técnicas experimentais como difração de raios X em proteínas puras cristalizadas ou por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) (Blundell *et al.* 1986; Bax 1989; Cain *et al.* 2014). Quando o alvo molecular não possui sua estrutura tridimensional resolvida experimentalmente, técnicas de modelagem comparativa computacional podem ser aplicadas para geração de modelo virtual (Chothia & Lesk 1986; Marti-Renom *et al.* 2000; Petrey & Honig 2005). A técnica de modelagem comparativa de estrutura, também conhecida como modelagem por homologia pode ser aplicada para geração de modelos de proteínas em seu

comprimento total, ou a um único domínio proteico. Essa metodologia prediz a conformação tridimensional baseando-se no alinhamento da sequência peptídica ou em modelos, usando como base comparativa proteínas homólogas com estruturas tridimensionais resolvidas experimentalmente (Sali & Blundell 1993; Berman *et al.* 2003). Diferentes bancos de dados disponibilizam estruturas tridimensionais de proteínas. O *Protein Data Bank* – PDB (Berman *et al.* 2000) é o principal banco de dados de estruturas de proteínas resolvidas experimentalmente através de técnicas de difração de raio X e ressonância magnética nuclear, sendo assim o principal banco de dados utilizado para a obtenção de estruturas tridimensionais (Burley *et al.* 2017). A geração de um modelo tridimensional por comparação de estruturas consiste em quatro etapas principais: (I) identificação de proteínas homólogas para serem utilizadas como moldes; (II) alinhamento da sequência alvo e dos modelos; (III) construção do modelo; (IV) predição de erros no modelo gerado.

Diversos programas computacionais de geração e armazenamento de estrutura tridimensionais por comparação são atualmente disponibilizados. O programa MODELLER (Sali & Blundell 1993), utiliza uma metodologia simples, com pouca intervenção do usuário para geração de um modelo tridimensional. O arquivo de entrada consiste no alinhamento da sequência peptídica a ser modelada e as estruturas moldes de comparação com as coordenadas atômicas. O programa calcula automaticamente um modelo comparativo, sem a presença de átomos de hidrogênio (Webb & Sali 2017). Com o modelo tridimensional da proteína alvo construído, é possível avaliar os mecanismos de ligação de diferentes micromoléculas ao sítio receptor da proteína alvo (Jorgensen 2010). Essa metodologia, baseada em métodos computacionais, conhecida como atracamento molecular (*docking molecular*) é uma ferramenta essencial no planejamento de fármacos (Kitchen *et al.* 2004; Leach *et al.* 2006; Hung & Chen 2014).

A capacidade de uma micromolécula ligar-se ao sítio alvo de uma proteína preservando o seu efeito biológico, está diretamente relacionada a sua habilidade de interação. Esta habilidade, por sua vez está relacionada a interação de características estruturais e físico-químicas da molécula alvo e de micromoléculas ligantes (Oravcova *et al.* 1996; Vuignier *et al.* 2010). A característica estrutural determina os arranjos espaciais moleculares definidos por orientação, posição espacial e rotação de ligações covalentes entre proteína e ligantes. As características físico-químicas definem o grau de afinidade e especificidade do ligante, baseados em forças eletroestáticas, força de dispersão, hidrofobicidade, ligação de hidrogênio e ligação covalentes (Yurchenco & Schittny 1990; Nooren & Thornton 2003).

Uma etapa essencial no ensaio de *docking* é a obtenção correta das coordenadas da estrutura tridimensional da proteína alvo. Cristais de proteínas obtidos experimentalmente

podem conter imprecisões, dentre outras, ausência de átomos e resíduos e mal posicionamento de cadeias laterais (Chayen & Saridakis 2008). Outro aspecto essencial para um bem-sucedido ensaio de *docking* é a preparação do sítio receptor, de forma a estabelecer o correto estado de protonação dos resíduos que participam na interação com as micromoléculas ligantes. Diversos programas são disponibilizados para análise e correção de estruturas tridimensionais e previsão do estado de protonação de resíduos do sítio ativo (Vriend 1990; Eisenberg *et al.* 1997; Rostkowski *et al.* 2011). De igual importância, as estruturas tridimensionais das micromoléculas ligantes necessitam ser manipuladas quanto ao seu estado de protonação, estado tautomérico e estado simétrico biologicamente ativo.

Um complexo proteína-ligante com alta afinidade apresenta alto nível de complementariedade estérica, ampla superfície de contato molecular e complementariedade eletrostática. Estas características resultam em uma interação proteína-ligante energeticamente favorável, uma vez que um complexo estável representa baixo gasto de energia livre (Branden & Tooze 1999). A energia utilizada durante a formação do complexo proteína-ligante são guiados por uma série de efeitos que podem ser estimados pela lei da termodinâmica (Ross & Subramanian 1981), o principal objetivo do ensaio de *docking* é prever a conformação e orientação de uma micromolécula em um sítio receptor, e avaliar a afinidade desse complexo através da energia livre de ligação, classificando de acordo com sua estabilidade energética. Na literatura, essa classificação é chamada de função *scoring* (Huang *et al.* 2010).

Atualmente, diversos programas de *docking* são disponibilizados (Grinter & Zou 2014; Pagadala *et al.* 2017). A principal distinção entre eles ocorre pelo método de busca e exploração das diferentes conformações de uma micromolécula ligante no sítio de ligação da proteína alvo, e pela função de avaliação de afinidade empregada na função de *scoring*. As funções de *scoring* são combinadas aos métodos de buscas para avaliar a qualidade das conformações geradas e ordená-las baseadas na afinidade ao receptor (Cavasotto & Orry 2007; Zavodszky *et al.* 2009).

Assim, a modelagem por homologia e *docking* molecular são metodologias relativamente simples e de baixos custos financeiros essenciais no planejamento de fármacos. A utilização dessas ferramentas tem se tornado uma estratégia viável na busca de tratamento efetivo de doenças tropicais negligenciadas como leishmanioses e doença de Chagas.

2. Justificativa

A doença de Chagas afeta diretamente 6 milhões de pessoas em todo o mundo (OMS 2015). O baixo investimento em pesquisas, diagnóstico e tratamento são fatores que contribuem para a continuidade dessa enfermidade no quadro de doenças tropicais negligenciadas. Um levantamento realizado entre os anos de 1990 – 2016, utilizando o indicador DALY - *Disability Adjusted Life Years* (Murray & Lopez 1996), aponta a doença, dentre as enfermidades tropicais negligenciadas, como a de maior impacto sobre DALY no Brasil (Martins-Melo *et al.* 2018). Esse fator impacta diretamente a perspectiva de desenvolvimento econômico do país.

Estudos sobre as características moleculares dos agentes causadores de doenças e seus hospedeiros proporcionam a descoberta de novos e potenciais alvos quimioterápicos, mas apesar disso, o avanço na aprovação de uma nova droga se estagna no gargalo do longo e dispendioso processo de desenvolvimento e aprovação terapêutica. Neste contexto, o reposicionamento de fármacos representa uma estratégia prática, na busca de resultados consistentes, que direciona os estudos para a utilização de compostos aprovados para outros usos, que possuem informações detalhadas sobre sua farmacologia, formulação e sua potencial toxicidade. Etapas iniciais desse processo envolvem análises primárias a níveis gênico, estrutural e bioquímico do alvo quimioterápico e os compostos farmacológicos. Assim, utilizando ensaios *in silico* e *in vitro* este trabalho investigou as aspártico peptidases em *T. cruzi* e sua interação com uma seleção de compostos inibitórios de aspártico peptidases, atualmente utilizados contra o HIV.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Buscar através de ferramentas *in silico* as proteínas preditas como aspártico peptidases anotadas no genoma de *Trypanosoma cruzi* e analisar suas características físico-químicas e estruturais.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar a proteína predita como aspártico peptidases com domínio homólogo ao domínio retroviral peptidase do HIV;
- Construir e validar modelos tridimensionais da proteína com domínio homólogo à retroviral peptidase do HIV através de modelagem comparativa;
- Realizaro *docking* molecular com o modelo tridimensional construído, utilizando como ligantes os IPs-HIV;
- Clonar, expressar e purificar o gene da aspártico peptidase com domínio homólogo ao domínio retroviral peptidase do HIV;
- Verificar a atividade proteolítica da proteína recombinante;

4. Material e métodos

4.1 Reanálise das aspártico peptidases no genoma de *T. cruzi*

A busca por aspártico peptidases no genoma de *T. cruzi* foi realizada por palavra chave no banco de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>). As sequências de proteínas das enzimas selecionadas foram submetidas a análises utilizando ferramentas de bioinformática disponíveis *online*. Para o alinhamento das sequências foi utilizado o programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Os programas Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e ProDom (<http://prodom.prabi.fr>) permitiram a inferência de possíveis domínios funcionais e motivos protéicos conservados nessas sequências. Para a predição de peptídeo sinal, identificação de regiões transmembranares e predição da localização subcelular foram utilizados os programas SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) e PSORT (<http://www.psort.org/>), respectivamente. Além disso, utilizou-se o PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite>) para a identificação nas sequências de motivos potenciais para o sítio ativo, sítio de ligação e modificações pós-traducionais.

4.2 Análise filogenética

A análise filogenética foi realizada com base no alinhamento dos domínios conservados das proteínas. Os domínios conservados das proteínas Ddi 1 *símile*, Presenilina *símile* e PPS *símile* foram identificados pelo programa InterProt (<http://prodom.prabi.fr/>) e confirmado pelo programa Smart. As sequências foram alinhadas pelo ClustalW no pacote do programa Mega 6.0 (Kumar *et al.* 2004). Para a construção da árvore, a escolha do melhor modelo evolutivo para análise de máximo Verossimilhança foi realizada no programa MEGA utilizando o critério de Akaike. Para análise filogenética foram selecionadas proteínas homólogas a Ddi 1 e a presenilina em tripanossomatídeos com genoma disponível, bem como ortólogos em *Mus musculus* (ID 71829 / ID 19764), *Homo sapiens* (ID 414301/ID 5663), *Danio rerio* (ID 386644/ID 30221), *Drosophila melanogaster* (ID 32616/ ID 40260), *Caenorhabditis elegans* (ID 177413 ID 351), *Arapidopsis thailania* (ID 820522/ID 83738) e *Oriza sativa* (ID4328632/ ID 4324260).

4.3 Modelagem comparativa da Ddi 1 *símile*

A estrutura cristalográfica do domínio retroviral peptidase (RVP) da proteína Ddi 1 de *T. cruzi* ainda não foi resolvida. As sequências proteicas alvo (*T. cruzi* cepa CL brener;

Tc00.1047053510155.40 e Tc00.1047053511585.40) foram utilizadas como buscador no BLASTp para identificar no banco de dados PDB (*protein data bank*) proteínas homólogas com estrutura cristalográfica resolvida. As estruturas selecionadas como modelo foram o domínio da retroviral peptidases da proteína Ddi 1 *similar* de *Homo sapiens* (PDB ID 4RGH) e *S. cerevisiae* (PDB ID 4Z2Z). A modelagem comparativa foi realizada com os modelos selecionados e o módulo automodelo do MODELLER 9v16 (Sali & Blundell 1993). Os dois modelos homodiméricos dos domínios de aspártico peptidases (resíduos 227-353/354) das proteínas alvo de *T. cruzi* foram selecionados baseado no ranqueamento DOPE. Esses modelos que correspondem ao domínio das aspártico peptidases retroviral foram denominados tcrRP-A e tcrRP-B, que correspondem aos modelos das proteínas Tc00.1047053510155.40 e Tc00.1047053511585.40, respectivamente. Para aprimorar a estrutura geométrica dos modelos tcrRP-A e tcrRP-B, foi realizada minimização energética utilizando a interface UCSF CHIMERA com campo de força Amber ff14SB (Pettersen *et al.* 2004). A qualidade estequiométrica dos dois modelos refinados foi avaliada com ERRAT e VERIFY 3D a partir do servidor SAVES (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>) e MOLPROBITY (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>).

Um alinhamento múltiplo foi realizado no ClustalW através do *Multiple Sequence Viewer* do Maestro (Schrödinger Suite) para avaliar a identidade e similaridade entre as sequências dos modelos gerados da aspártico peptidase retroviral de *T. cruzi* e a peptidases do HIV-1 (PDB ID 3OXC). A superposição das estruturas terciárias e o desvio da raiz quadrada média (RMSD - *root mean square deviation*) entre elas foi obtida pelo “super” comando no *softwarePymol* v1.8.2.1 (<http://www.pymol.org/>). Outros alinhamentos e comparações com essas estruturas foram realizados com o algoritmo TM-align (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/>)(Zhang & Skolnick 2005).

4.4 Estudo de *docking* com IPs-HIV

Para avaliar o potencial de ligação e modo de ligação dos IPs-HIV ao domínio da peptidase da proteína Ddi 1 *similar* de *T. cruzi* realizamos o *docking* molecular. Como controle positivo foi utilizado a pepstatina A, e controle negativo o benzonidazol. Os nove IPs-HIV foram testados como ligantes: ritonavir, lopinavir, saquinavir, indinavir, tipranavir, amprenavir, nelfinavir, darunavir e atazanavir. Os ligantes foram obtidos em formato sdf do PubChem e junto com os modelos protéicos gerados foram preparados no Maestro pelo módulo de preparação e ligantes (LigPrep), selecionando o campo de força OPLS-2005.

Os dois modelos das proteínas foram preparados com adição dos átomos de hidrogênio

e os estados de protonação determinados em pH 3.5 com PROPKA. As grades foram geradas em torno do sítio ativo. A grade foi configurada para 35Å, com as seguintes coordenadas x=-220.53, y=32.3, e z=16.96 paratcrRP-A, e x=66.35, y=-8.35, e z=13.47 paratcrRP-B. Essas coordenadas foram determinadas usando os resíduos Asp248A, Asp248B e Arg279B, como controles, pois representam os resíduos do sítio ativo. Após preparação do ligante e da enzima, e geração da grade, as simulações de *docking* foram realizadas com o protocolo de extra precisão (XP) do Glide (GlideXP, versão 6.7) (Friesner *et al.* 2006). Os inibidores em potencial foram ensaiados contra o domínio do sítio ativo da tcrRP-A e tcrRP-B. Os inibidores foram ranqueados com base nos *docking scores*.

4.5 Clonagem da sequência codificadora Ddi 1

Baseados em análises *in silico*, a sequência gênica Tc00.1047053510155.40 cepa CL Brener (TritrypDB) foi selecionada para clonagem e expressão da proteína heteróloga. A clonagem foi realizada através da síntese química nucleotídica do gene Ddi 1 de *T. cruzi* e inserção no vetor de clonagem pUC 57 C e subclonagem no vetor de expressão pET-19b. O plasmídeo utilizado contém uma etiqueta de 10 histidinas que é adicionado na porção N-terminal da proteína de interesse e um sítio de atuação de enterocinase para posterior retirada da etiqueta de histidina. A clonagem do gene foi realizada pela empresa *GenScript* (Piscataway, EUA).

4.6 Transformação bacteriana

A cepa de *E. coli* BL21 (DE3) quimicamente competente foi transformada por choque térmico com o plasmídeo descrito acima contendo o gene Ddi 1 de *T. cruzi*. A transformação foi realizada através da incubação de células bacterianas com 500 ng de DNA plasmidial a 42 °C por 1 min, seguido de incubação no gelo por 2 min. As células transformadas foram inoculadas em meio LB (5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de triptona, 10 g/L NaCl, pH 7,0) a 37 °C por 1 h sob agitação constante de 140 rpm. O volume de 5 µL da cultura crescida foi adicionado em placas contendo meio LB ágar (20 g/L ágar, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, pH 7,0) acrescido de 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h. O número total de unidades formadoras de colônias foi determinado (UFC) e a eficiência da transformação foi definida como o número de colônias por mg de DNA plasmidial utilizado.

4.7 Cinética de indução com isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG)

Para confirmar a presença e solubilidade da proteína recombinante, testes de indução com Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) em pequenas escalas de expressão foram realizados, conforme descrito abaixo:

Pré crescimento: 5 µL de *E. coli* BL21 (DE3) previamente transformada foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 100 mg/mL de ampicilina por 16 horas a 37 °C sob agitação constante de 140 rpm.

Crescimento: Diferentes sistemas contendo 200 µL do pré crescimento saturado foram crescidos em 20 mL de meio LB contendo 100 mg/mL de ampicilina a 37 °C sob agitação constante de 140 rpm. O crescimento bacteriano foi determinado por densidade óptica (D.O) lido em espectrofotômetro a 600 nanômetros. As culturas foram consideradas crescidas para a indução quando a D.O alcançou a leitura de 0,6 nm.

Indução: As culturas foram induzidas pela adição de IPTG nas concentrações de 0,1 mM, 0,2 mM e 0,5 mM. A indução foi conduzida a 24 °C sob agitação constante de 140 rpm por 16 horas. Alíquotas de 2 mL de cultura foram coletadas nos tempos 0 h, 1h, 2h, 3h, 4h e 16 h de indução.

Para a obtenção da concentração proteica total de cada amostra, o crescimento celular foi normalizado a uma taxa de 0,1 D.O a cada 10 µL de cultura. As células foram centrifugadas a 2500 ×g por 2 min a 28 °C. O precipitado foi ressuspensão em tampão de lise (50 mM Tris HCl, 100 mM KCL, 10 mM EDTA pH 8,0) suplementado com *cocktail* de inibidores de protease (Sigma). Em seguida, as células foram lisadas utilizando sonicador de banho (60 Hz), por 7 ciclos de 60 segundos com intervalos de 60 segundos em banho de gelo.

Amostras de proteínas totais não induzidas, proteínas totais induzidas, proteínas insolúveis e proteínas solúveis foram preparadas para análise em eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida SDS PAGE.

4.8 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

A eletroforese das proteínas em SDS-PAGE foi realizada no sistema *Mini Protean Tetra Cell* (BioRad) (Laemmli, 1970). As amostras foram desnaturadas a 100°C por 5 min e as proteínas empacotadas em gel contendo 3% de poliacrilamida e separadas em gel contendo 12% de poliacrilamida. A migração proteica foi realizada em solução tampão (Tris 250 mM, glicina 2,5 M, SDS 1%) durante 1 h a 100 V. Para a visualização das proteínas, o gel foi incubado em

solução corante (0,1% azul de Coomassie, 25% metanol, 5% ácido acético) durante 30 min. O excesso do corante foi removido em solução descorante (ácido acético 7%).

4.9 Análise da cinética de indução por IPTG por *Western Blotting*

Após o SDS-PAGE 12%, as amostras de proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A transferência ocorreu através do sistema *wet Blotting* (BioRad) embebido em solução tampão de transferência (25 mM Tris; 150 mM glicina; 0,1% SDS e 20% metanol) a 100 V por 1 h. O marcador de peso molecular utilizado foi *Precision Plus Protein™* (BioRad), com a presença de 10 proteínas abrangendo pesos variando de 10 a 250 kDa. A eficiência da transferência de proteínas foi confirmada por MemCode™ (*Thermo Scientific*).

Após a confirmação da transferência, a membrana foi incubada, durante a noite, em solução de bloqueio Tris salina (TBS) (50 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,0), acrescido de 10% de leite desnatado; após esta incubação a membrana foi lavada 2 vezes em solução Tris-salina-Tween (TBS-T, TBS acrescido de 0,1% Tween 20), em seguida a membrana foi incubada com o anticorpo primário específico para His C-Terminal HRP (Novagen) na diluição de 1:5,000 em solução TBS-T acrescida de 5% de leite desnatado, por 2 h sob agitação. Após incubação com o anticorpo primário, a membrana foi novamente lavada por 2 vezes com solução TBS-T, e incubada com anticorpo secundário anti-IgG conjugado com fosfatase alcalina (ThermoFisher), na diluição de 1:30,000 em solução TBS-T acrescido de 5% de leite desnatado. A membrana foi revelada utilizando o substrato quimioluminescente ECL (Biorad) e as proteínas visualizadas em autoradiografia, após 5 s de exposição e revelação.

4.10 Expressão e purificação da proteína heteróloga Ddi 1

Para a expressão em grande escala e purificação, 500 µL do pré inoculo de *E. coli* BL21 (DE3) foram inoculados em 500 mL de meio LB contendo 100 mg/mL de ampicilina a 25°C sob agitação constante de 140 rpm. Ao alcançar D.O 0,6 a cultura bacteriana foi induzida com 0,5 mM de IPTG por 16 h. O volume total foi centrifugado a 4000 × g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em 5 mL de tampão de lise (50 mM Tris HCl, 100 mM KCl, 10 mM EDTA pH 8,0), e as células foram lisadas por ondas ultrassônicas, utilizando sonicador de ponta a 25% de amplitude por 4 ciclos, com pulsos de 40 s de intervalo com 40 s de repouso em banho de gelo. A suspensão foi centrifugada a 15.000 × g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante filtrado em membrana 0,45 µm.

A proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade (Ni Sepharose High Performance-GE Healthcare). Resumidamente, 1 mL de resina previamente equilibrada conforme instruções do fabricante, foi montada em seringa de 3 mL. O filtrado foi adicionado a coluna, e o fluxo (1 mL/min) foi controlado com o auxílio de uma bomba peristáltica. Após a passagem de todo o volume, a coluna foi lavada com 5 mL de solução de lavagem pH 8.0 (500 mM NaCl, 20 mM Tris HCl e 20 mM Imidazol), e a amostra foi eluída com solução de eluição pH 8.0 (500 mM NaCl, 20 mM Tris HCl e 400 mM Imidazol) em alíquotas de 0,5 mL. A presença de proteínas foi confirmada por SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Blue R-250.

4.11 Análise da atividade proteolítica do lisado bruto de *E. coli* BL21 (DE3)

A atividade proteolítica referente a aspártico peptidases do lisado bruto de *E. coli* BL21 (DE3) foi avaliada utilizando Soro Albumina Bovina (BSA) como substrato. Alíquotas de 2 mL de cultura de BL21 (DE3) induzidas a 0,5 mM IPTG e crescidas a 24 °C foram coletadas nos tempos 4 e 16 h de indução. As células foram processadas conforme descrito acima e a concentração de proteínas foi medida através de ensaio de Bradford (BioRad, Hercules, CA). Cem microgramas de proteína foram incubados com 1mg por mL de BSA em solução tampão (ácido cítrico 0,1 M, fosfato de sódio 0,2 M) pH 3,5 a 37 °C por 24 h. Catepsina D purificada comercial foi utilizada como controle positivo da reação. As amostras proteicas foram visualizadas por SDS PAGE 10% corado com azul de Coomassie R-250.

4.12 Análise da atividade enzimática da proteína heteróloga Ddi 1

A determinação de atividade de aspártico peptidases, purificada em cromatografia de afinidade, foi realizada através da liberação do ácido 7-amino-4- metilcumarina (AMC) presente no substrato específico para catepsina D (AMC-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys (DNP)-d-Arg-NH₂) (Sigma-Aldrich). Após a clivagem entre dois resíduos de fenilalanina pela enzima ativa, moléculas de AMC são liberadas, e ao serem excitadas em um comprimento de onda de 328 nm emitem fluorescência a 393 nm. Uma reação enzimática padrão utilizando 2,4 µg de catepsina D purificada foi realizada como controle positivo. Os resultados foram normalizados com uma curva padrão de fluorescência emitida por AMC. A concentração de proteínas foi determinada pelo ensaio de Bradford (Thermo Scientific), e a leitura foi realizada em equipamento fluorímetro Flex station II.

Em placa padrão de 96 poços, 3,75 µg do eluído da coluna foram incubados com 20 µM MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys (DNP)-DArg-NH₂ trifluoroacetato por 30

minutos a 37 °C. A leitura foi realizada durante 60 minutos com intervalos de 1 minuto entre cada leitura.

5. Resultados

5.1 Análise de aspártico peptidases preditas no genoma do *T. cruzi*

A busca de sequências de aspártico peptidases no genoma de *T. cruzi*, clone CL Brener, confirmou genes anotados como proteínas preditas com domínio de aspártico peptidases (Tabela 1). Os genes da proteína *DNA-damage inducible protein* (Ddi 1 *similar*) e *Presenilin similar aspartic peptidases* (Presenilina) estão presentes em cópia dupla e estão localizados em cromossomos distintos, diferentemente, do gene do *Signal peptide peptidases* que é cópia única.

Tabela 2: Relação de genes preditos como aspártico peptidases *similar* e sua localização cromossômica no genoma de *T. cruzi* CL Brener, disponível no banco de dados TriTrypDB.

Código de identificação	Gene	Localização cromossômica
Tc00.1047053510155.40	<i>DNA-damage inducible protein</i>	TcCHR33-P
	<i>Ddi 1 similar protein</i>	TcCHR33-S
TcCLB.503543.10	<i>Presenilin-like aspartic peptidases</i>	TcCHR7-P
		TcCHR7-S
TcCLB.507951.260	<i>Signal peptide peptidases, putative, aspartic peptidases</i>	TcCHR36-P

A identificação dos genes de cópia dupla Tc00.1047053510155.40 (Ddi 1) e TcCLB.503543.10 (Presenilina) em *T. cruzi*, nos levou a investigar a conservação gênica através de alinhamento de sequências nucleotídicas. O percentual de identidade entre as cópias

dos genes Ddi 1 *similar* e presenilina *similar* aspártico peptidases foi de 98%, através da ferramenta *Blastn* (Tabela 3).

Tabela 3: Percentual de identidade entre as sequências dos genes que codificam para *DNA-damage inducible protein* (Ddi 1 *similar*) e Presenilina *similar* aspártico peptidases empregando a ferramenta *Blastn*

Identificação	Tamanho	Identidade	Cobertura	Bit Score
Tc00.1047053510155.40	1443 pb	98%	100%	2527
Tc00.1047053511585.40				
TcCLB. 503543.10	1119 pb	98%	100%	1929
TcCLB. 508277.50				

Passamos a avaliar a conservação peptídicas do produto dos genes Ddi1 *similar* e Presenilina *similar*. O alinhamento das sequências polipeptídicas da proteína Ddi 1 *similar* de *T. cruzi* revelou a presença de 13 trocas de aminoácidos (Figura 6).

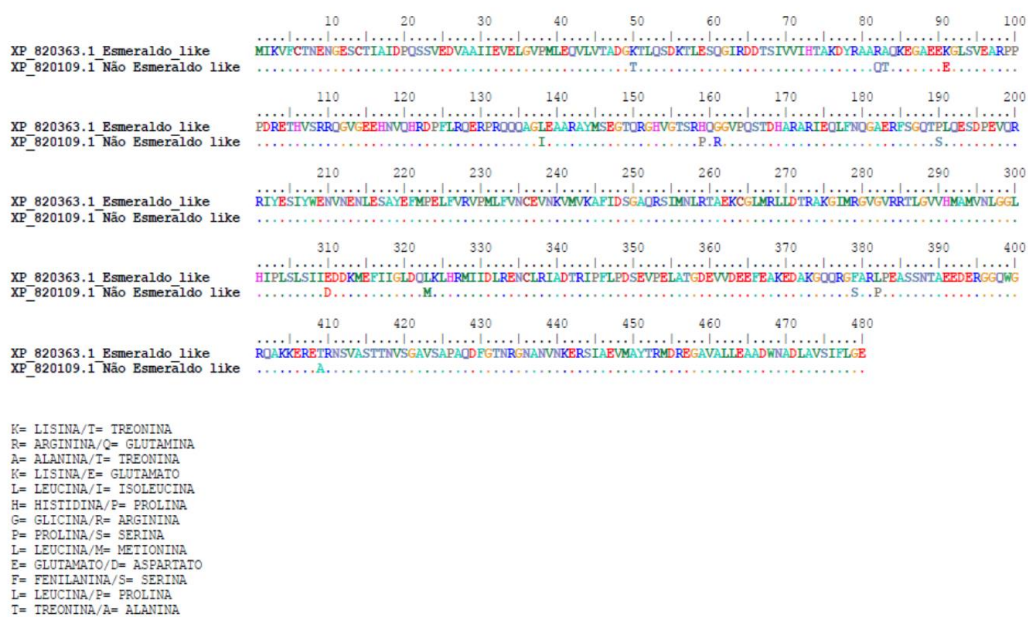


Figura 6: Análise comparativa da similaridade entre as sequências de aminoácido Ddi 1 *símile* de *T. cruzi* presente no haplotipo Esmeraldo e Não Esmeraldo. Os pontos (•) representam aminoácidos idênticos. As trocas de aminoácidos são indicadas na tabela.

De modo similar, foi observado entre as sequências polipeptídicas da proteína Presenilina *símile* 11 trocas de aminoácidos (Figura 7).

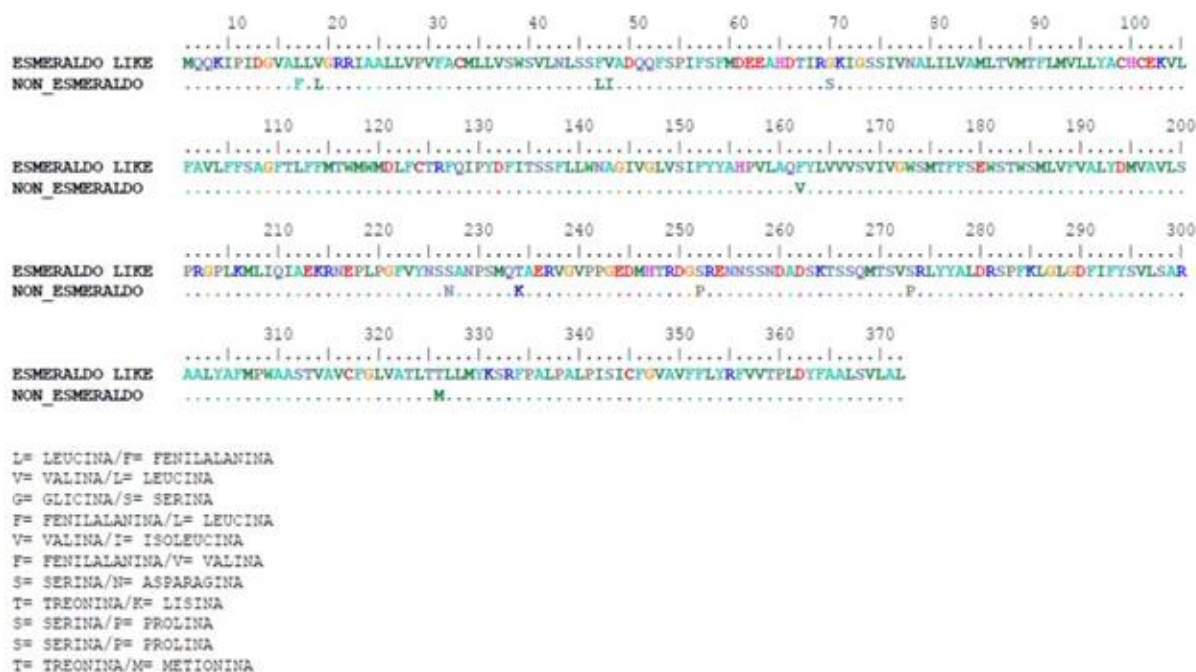


Figura 7: Análise comparativa da similaridade entre as sequências de aminoácido Presenilina *símile* de *T. cruzi* presente no haplótipo Esmeraldo e Não Esmeraldo. Os pontos (•) representam aminoácidos idênticos. As trocas de aminoácidos são indicadas pela letra que representa o aminoácido.

Elevados percentuais de identidade e de similaridade entre as sequências proteicas foram observados entre as diferentes cepas de *T. cruzi*. Os valores de identidade e similaridade foram calculados através do algoritmo SIAS - *Sequence Identity And Similarity* (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>), para cada proteína de interesse: Ddi 1 *símile* (Tabela 4), Presenilina *símile* (Tabela 5) e Peptidase peptídeo sinal *símile* (Tabela 6).

Tabela 4: Análise comparativa dos percentuais de identidade e similaridade entre as proteínas Ddi 1 *símile* nas diferentes cepas de *T. cruzi*.

	<i>T. cruzi</i> não Esmeraldo	<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	<i>T. cruzi</i> Marinkellei	<i>T. cruzi</i> Sylvio	<i>T. cruzi</i> Dm28c
<i>T. cruzi</i> não Esmeraldo	100/100				
<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	97.29/97.29	100/100			
<i>T. cruzi</i> Marinkellei	88.95/88.95	89.16/90.41	100/100		
<i>T. cruzi</i> Sylvio	98.12/98.12	96.66/97.08	88.54/90.0	100/100	
<i>T. cruzi</i> Dm28c	98.11/98.11	97.79/89.71	83.36/88.36	100/90.64	100/100

Tabela 5: Análise comparativa dos percentuais de identidade/similaridade entre a proteína Presenilina *símile* nas diferentes cepas de *T. cruzi*.

	<i>T. cruzi</i> não Esmeraldo	<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	<i>T. cruzi</i> Marinkellei	<i>T. cruzi</i> Sylvio	<i>T. cruzi</i> Dm28c
<i>T. cruzi</i> não Esmeraldo	100/100				
<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	97.04/98.44	100/100			
<i>T. cruzi</i> Marinkellei	87.87/94.28	87.87/94.28	100/100		
<i>T. cruzi</i> Sylvio	97.31/98.96	97.58/98.78	87.87/94.62	100/100	
<i>T. cruzi</i> Dm28c	98.11/98.94	97.79/89.77	88.36/88.36	100/90.84	100/100

Tabela 6: Análise comparativa dos percentuais de identidade/similaridade entre a proteína Peptidase Peptídeo Sinal *símile* nas diferentes cepas de *T. cruzi*.

	<i>T. cruzi</i> Esmeraldo	<i>T. cruzi</i> Marinkellei	<i>T. cruzi</i> Sylvio
<i>T. cruzi</i> não Esmeraldo	100/100		
<i>T. cruzi</i> Marinkellei	100/100	100/100	
<i>T. cruzi</i> Sylvio	100/100	100/100	100/100

Em consequência da elevada similaridade entre as sequências polipeptídicas, foram selecionadas para análises de predições das características bioquímicas, estruturais e funcionais, as sequências proteicas preditas para os genes sob identificação Tc00.1047053510155.40 (Ddi

1 *similar*), TcCLB.503543.10 (Presenilina *similar*), e TcCLB.507951.260 (Peptidase Peptídeo Sinal *similar*).

5.2 Análise das estruturas primárias de aspártico peptidases de *T. cruzi*

A predição das características bioquímicas, estruturais e funcionais foi realizada através de busca *in silico* em diferentes *softwares* disponíveis *online*, utilizando as sequências proteicas preditas pelos três genes anotados como aspártico peptidases. Nesta análise, foi verificado inicialmente presença de domínios conservados (Tabela 7).

Tabela 7: Domínios preditos nas proteínas Ddi 1 *similar*, Presenilina *similar* e Peptidase Peptídeo Sinal (PPS *similar*).

	Id domínio	Localização	E-Value
Ddi 1 <i>similar</i>	UBL*	2-76	1.8e-06
	Asp-peptidase	208-331	1.9e-55
Presenilina <i>similar</i>	PSN#	68-358	4.22e-34
PPS <i>similar</i>	PSN#	49-283	1.54e-36

*Domínio ubiquitina *similar*; #Domínio Presenilina/Peptidases Peptídeo Sinal

Além dos domínios conservados, foi observado nas proteínas Presenilina *similar* e na PPS *similar* a presença de regiões transmembranas. Estas regiões foram então analisadas empregando o programa *TMHMM* para a predição de domínios transmembranas. As proteínas Presenilina *similar* e PPS *similar* apresentaram uma predição de nove domínios transmembranas (Figura 8).

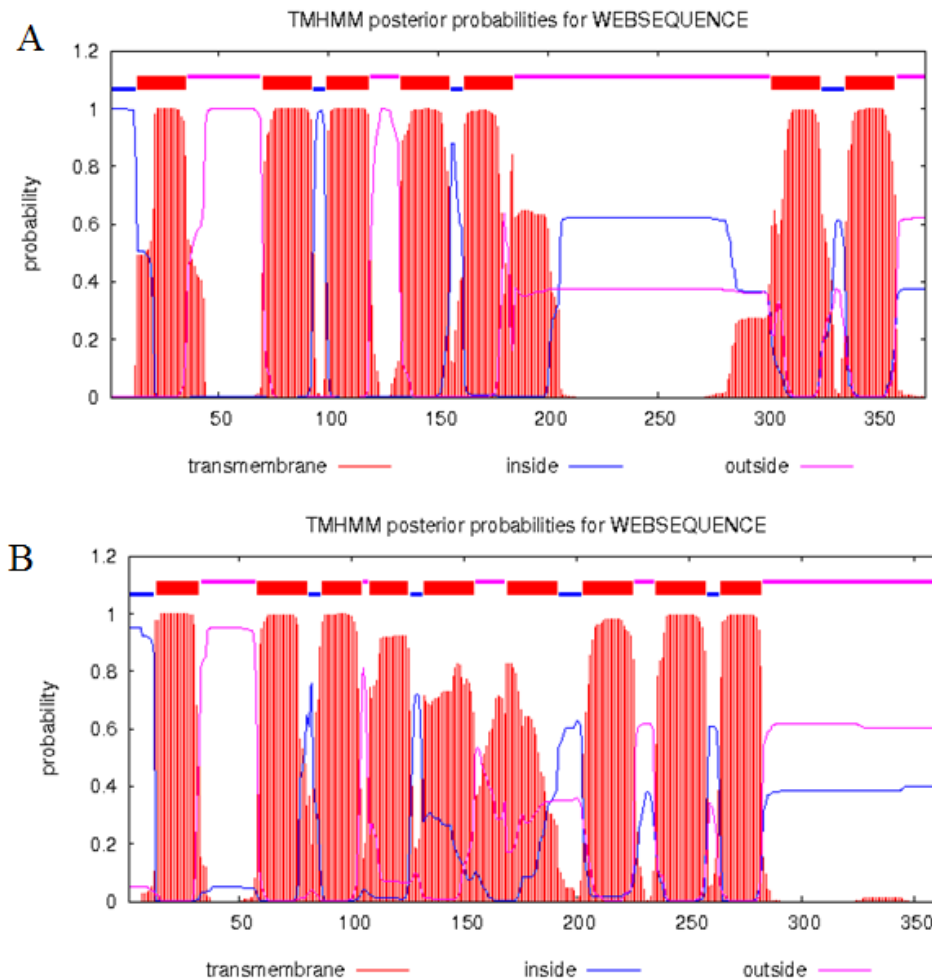


Figura 8: Predição da topologia transmembrana obtida na análise realizada pelo programa *TMHMM*.(A) Presenilina *similar*; (B) PPS *similar*.

A presença e localização dos sítios de clivagem de peptídeo sinal em sequências de aminoácidos foi predita pelo programa *SignalP*. Este programa analisa a presença de peptídeo sinal e sítios de clivagem, utilizando uma combinação entre redes neurais artificiais e modelos ocultos de *Markov* (Klee & Ellis 2005). De acordo com essa ferramenta, não foi observado a presença e sítio de clivagem de peptídeo sinal nas proteínas Presenilina *similar* e PPS *similar* (Figura 9).

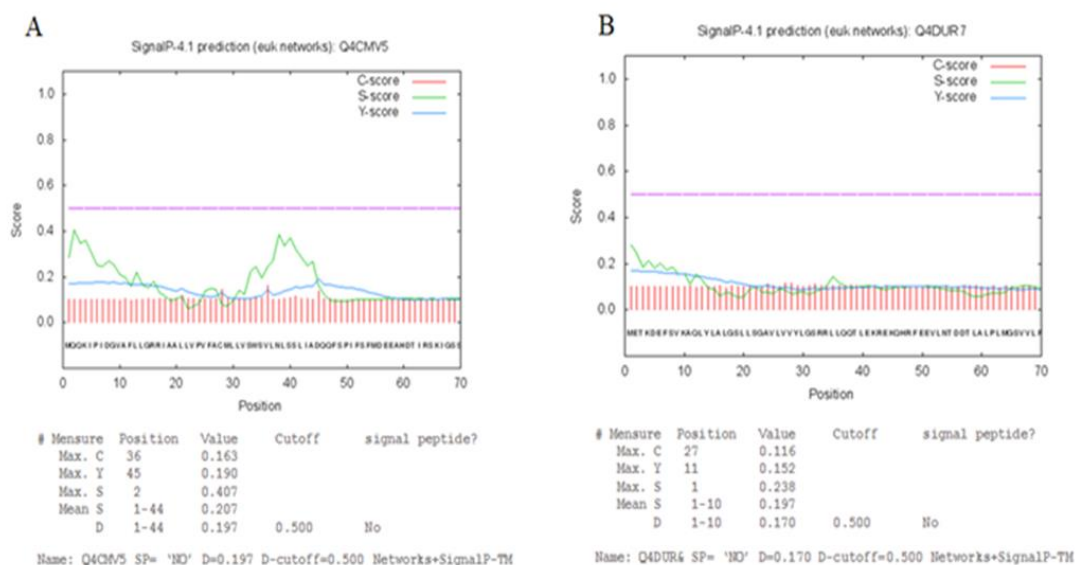


Figura 9: Predição da presença de peptídeo sinal e sítio de clivagem obtidos em análise realizada pelo programa *SignalP*. (A) Presenilina *similar*; (B) PPS *similar*.

As características físico-químicas das proteínas Ddi 1 *similar*, Presenilina *similar* e PPS *similar* foram analisadas no programa *ProtParam* (Tabela 8). Este programa prediz o número de aminoácidos, massa molecular, ponto isoelétrico teórico (pI), fórmula molecular e número de átomos das proteínas (Gasteiger *et al.* 2005).

Tabela 8: Parâmetros físico-químicos das proteínas Ddi 1 *similar*, Presenilina *similar* e PPS *similar* obtidos através de análise realizada pelo programa *ProtParam*.

Proteína	N.º de aminoácidos	Massa molecular (kDa)	pI teórico	Fórmula molecular	N.º de átomos
Ddi 1 <i>similar</i>	480	53.289	5.0	C ₂₂₈₁ H ₃₆₇₈ N ₆₈₆ O ₇₄₄ S ₂₁	7410
Presenilina <i>similar</i>	372	41.627	6.88	C ₁₉₄₇ H ₂₉₇₀ N ₄₅₈ O ₅₀₂ S ₂₅	5902
PPS <i>similar</i>	363	40.358	5.07	C ₁₈₇₃ H ₂₉₂₁ N ₄₄₇ O ₅₁₉ S ₁₁	5771

5.3 Análise filogenética:

A proteína Presenilina *similar* e a proteína PPS *similar* compartilham o mesmo domínio conservado PSN (Presenilina/Peptidases Peptídeo Sinal). Por este motivo, foi gerada uma única árvore utilizando as sequências que compartilham esse domínio. Organismos classificados como espécies chaves dentro de cada domínio, pertencentes a grupos taxonômicos distintos foram utilizados para comparação.

Para a análise filogenética da proteína Ddi 1 de *T. cruzi* foi utilizado o domínio RVP. Na Figura 10, podemos visualizar que o domínio RVP das proteínas Ddi 1 *similar* apresenta-se conservado em todos os diferentes grupos taxonômicos analisados. Na árvore gerada pela análise de máxima verossimilhança (ML), a família Trypanosomatidae se mostrou um grupo monofilético. E o grupo externo apresentou alto valor de *bootstrap* confirmando serem esses grupos distantes filogeneticamente dos outros clados analisados.

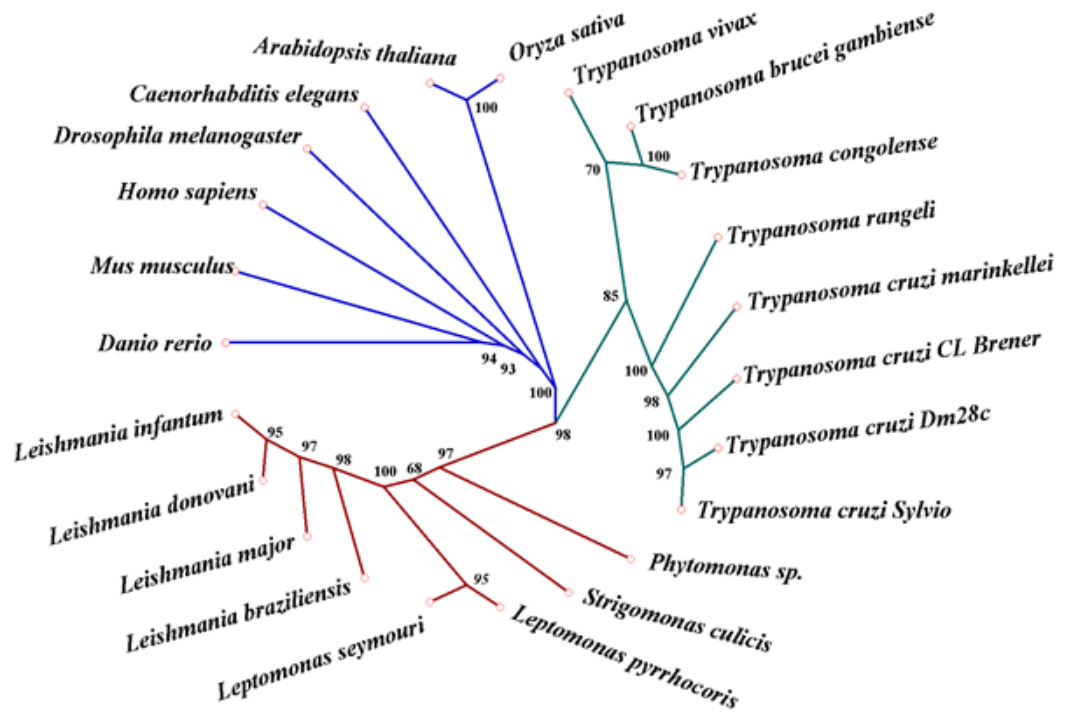


Figura 10: Árvore filogenética do domínio RVP da proteína Ddi 1 de diferentes organismos. Árvore filogenética foi obtida a partir da análise de sequências polipeptídicas do domínio conservado RVP das proteínas Ddi 1 *similar* usando o método probabilístico de máxima verossimilhança. Os valores de *bootstrap* são mostrados em cada nó.

O domínio PSN (Presenilina/ Peptidases Peptídeo Sinal) compartilhados entre as duas proteínas é conservado em todas as espécies analisadas. Observamos um grupo de organismos originado de um único ancestral comum, exclusivo, que caracterizam as diferentes proteínas. Vale ressaltar que a sequência referente a PPS *similar* de *T. cruzi*, na figura está mais proximamente relacionado a Presenilina *similar* (Figura 11).

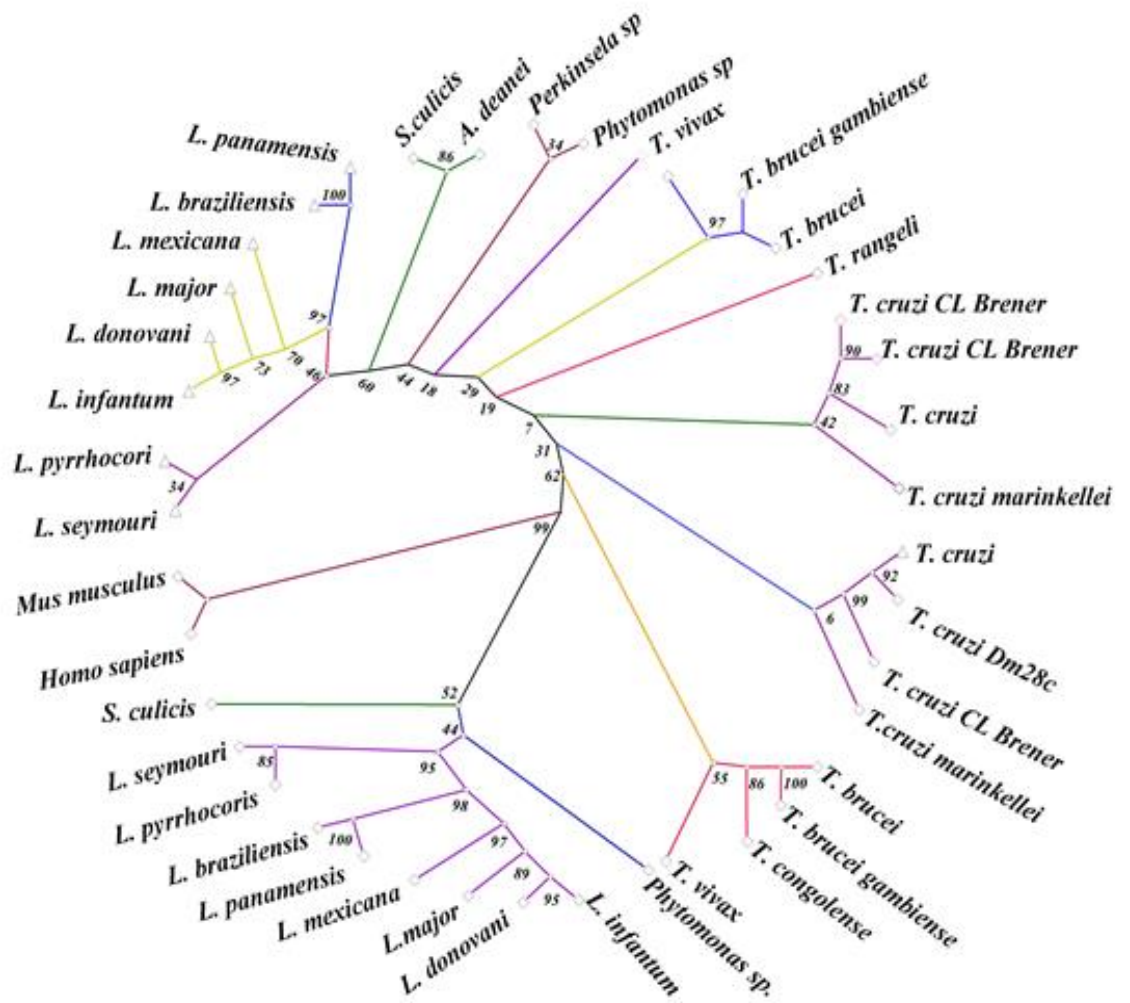


Figura 11: Árvore filogenética obtida a partir da análise de seqüências polipeptídicas das proteínas como domínio PSN (Presenilina/Proteases Peptídeo Sinal) usando o método probabilístico de máxima verossimilhança. Os valores de *bootstrap* são mostrados em cada nó. Na figura, os triângulos representam as seqüências de Peptídeo sinal *similar*, os losangos representam as seqüências de Presenilina *similar*.

5.4 Construção e validação do modelo tridimensional (3D):

Para a construção de modelo tridimensional e posteriores análises de atracamento molecular (*docking*), selecionamos a sequência proteica predita pelo gene Ddi 1 *similar* de *T. cruzi*. A ausência de sequências de proteínas estruturalmente resolvidas similares a esta proteína do parasito possibilitou apenas a modelagem do domínio aspártico peptidase retroviral (RVP), presente na proteína. O modelo 3D do domínio RVP da proteína Ddi 1 *similar* foi gerado através de modelagem molecular comparativa, utilizando como molde, procedimento e coordenadas do domínio dimerizado da aspártico peptidase retroviral (RVP) de levedura (PDB ID 2I1A). A qualidade do modelo 3D gerado foi validada através de diferentes métodos. O gráfico de *Ramachandran* (Ramachandran *et al.* 1963) representa um desses resultados de validação, que avalia a estrutura tridimensional da proteína apontando sua qualidade estereoquímica. Esse gráfico assinala quais resíduos encontram-se nas regiões energeticamente favorável ou desfavorável. A Figura 12 demonstra o modelo gerado para a proteína e seu respectivo *Ramachandran plot*, que apresentou 96% de resíduos na região favorável, e 96,6% de resíduos em regiões permitidas.

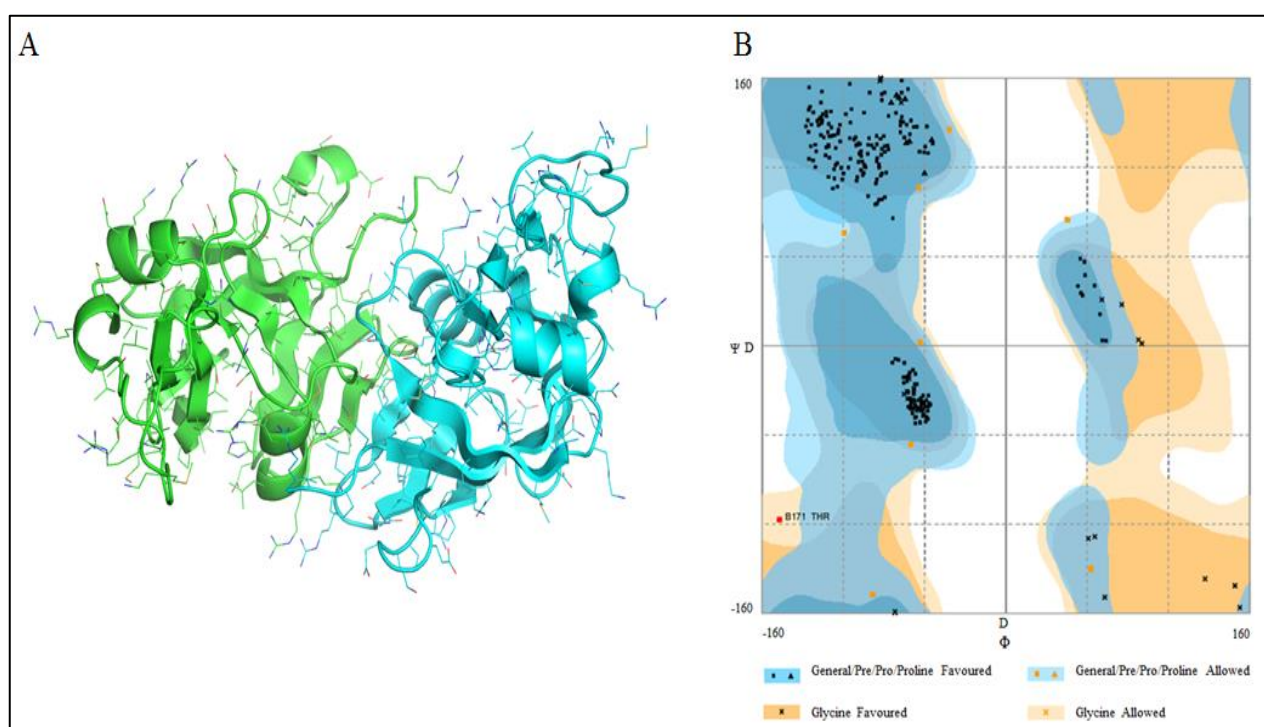


Figura 12: Visualização do modelo da estrutura 3D do domínio dimerizado aspártico peptidase retroviral (RVP) da proteína de Ddi 1 *similar* de *T. cruzi*. (A) Representação da conformação dos resíduos de aminoácidos da cadeia principal e das cadeias laterais (“arame”), e representação dos elementos de estrutura secundária (“cartoon”); (B) Validação do modelo através do gráfico de *Ramachandran*. Em azul escuro estão as regiões favoráveis; em azul claro as regiões adicionalmente permitidas; em amarelo claro as regiões generosamente permitidas e em branco as regiões desfavoráveis.

5.5 Alinhamento dos modelos 3D da proteína Ddi 1 *similar* de *T. cruzi* e do domínio retroviral peptidase (RVP) do HIV-1:

A presença do domínio conservado retroviral peptidase (RVP) na proteína Ddi 1 *similar* sugere a semelhança estrutural entre o mesmo domínio em proteínas de diferentes organismos. Com o objetivo de visualizar essa semelhança, foi realizado um alinhamento múltiplo de sequências entre os modelos gerados para o domínio retroviral peptidase da proteína Ddi 1 de *T. cruzi* e HIV-1. O resultado obtido (Figura 13) confirma uma semelhança de domínios entre *T. cruzi* e HIV-1. O domínio retroviral peptidase (RVP) da Ddi 1 *similar* de *T. cruzi*, assim como o domínio da proteína referência de levedura Ddi 1 (PDB ID 2I1A) utilizada na modelagem comparativa, dobram-se para formar um homodímero, que é característico das aspártico peptidases da família A2, em que cada dímero fornece um resíduo de ácido aspártico associado com o mecanismo catalítico. Contudo, a comparação entre as estruturas 3D da proteína viral e do parasito evidencia diferenças estruturais entre as fendas catalíticas, que mostram que o domínio retroviral peptidase (RVP) da Ddi 1 *similar* de *T. cruzi* possui uma amplitude maior nesta fenda quando comparada com o domínio retroviral peptidase (RVP) do vírus HIV-1.

5.6 Atracamento molecular (*docking*) com os inibidores de aspártico peptidase do HIV e outros compostos

Os modelos tridimensionais gerados do domínio retroviral peptidase (RVP) da proteína Ddi 1 *similar* de *T. cruzi* foram utilizados neste ensaio. Dentre os compostos ligantes foram incluídos como controle positivo a pepstatina A (4742), e o controle negativo foi considerado o benzonidazol, cujo alvo intracelular não é relacionado as aspártico peptidases. Durante a etapa de preparação do receptor e dos ligantes, um pH de 3,5 foi utilizado para prever os estados de protonação nestes compostos. O programa utilizado é capaz de gerar possíveis estados de protonação para a faixa de + ou - 2, além de realizar uma minimização de energia ao final do *docking*, podendo assim, gerar mais de uma pose por ligante com pontuação distinta. Foram considerados os menores valores de pontuação para cada composto. Ao final do ensaio, os compostos foram classificados empregando como critério a função de pontuação própria do programa utilizado. A Tabela 9 corresponde aos resultados da triagem virtual com o GLIDE XP. O GScore variou entre -0,914 e -8,546 Kcal/mol para o modelo Ddi 1 *similar* do *T. cruzi*.

Tabela 9: Avaliação do atracamento molecular do modelo Ddi 1 *similar* de *T. cruzi* com os inibidores de aspártico peptidase do HIV e outros fármacos, na ausência de água.

TcrRP-A		TcrRP-B	
Composto	Docking Score	Composto	Docking Score
1. pepstatina A*	-9,526	1. ritonavir	-8,244
2. ritonavir	-7,667	2. pepstatina A*	-7,898
3. lopinavir	-7,157	3. lopinavir	-7,869
4. saquinavir	-6,557	4. nelfinavir	-6,624
5. indinavir	-6,527	5. darunavir	-6,072
6. tipranavir	-6,318	6. saquinavir	-5,213
7. amprenavir	-6,115	7. amprenavir	-4,824
8. nelfinavir	-6,076	8. indinavir	-4,781
9. darunavir	-5,729	9. tipranavir	-4,673
10. benzonidazol#	-4,147	10. atazanavir	-4,5
11. atazanavir	-1,664	11. benzonidazol#	-3,662

*Controle positivo

#Controle negativo

5.7 Testes de indução a 0,1 mM, 0,2 mM e 0,5 mM de IPTG

As análises por SDS-PAGE dos testes de indução por IPTG realizados, foi observada uma banda intensa com aproximadamente 59 kDa compatível com o tamanho da Ddi 1 presente nas frações referente as proteínas totais e insolúveis. (Figura 14 A, B e C), indicando a superexpressão da proteína heteróloga Ddi 1 majoritariamente nas frações insolúveis. Uma marcação pouco expressiva da proteína na fração solúvel pode ser observada após a indução a 0,2 mM de IPTG por 4 h (Figura 14B). Não foi observada a presença da proteína com tamanho similar ao da proteína heteróloga na ausência do indutor IPTG.

Para confirmar se a proteína heteróloga Ddi 1 estava sendo expressa nas frações solúveis, foi realizado ensaio de imunoidentificação utilizando anticorpo contra a cauda de histidina fusionado a proteína heteróloga. O anticorpo reconhece uma proteína de tamanho compatível com a Ddi 1 na fração solúvel induzidas a 0,1 mM de IPTG por 16 h e a 0,5 mM de IPTG por 16 h (Figura 15), indicando que apesar da ausência de detecção da proteína pelo corante Coomassie Blue em análise por SDS-PAGE a proteína heteróloga é expressa na fração solúvel bacteriana.

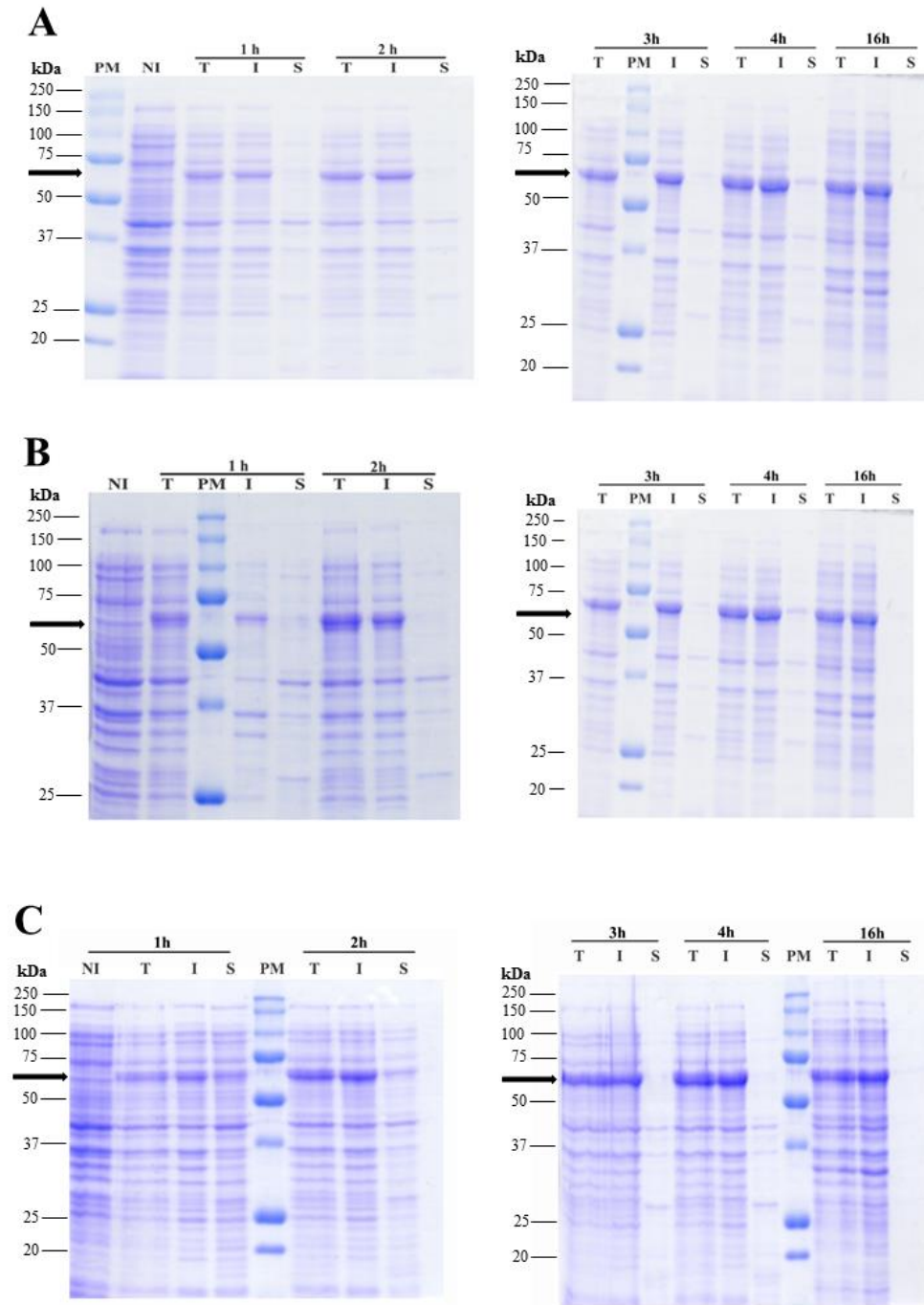


Figura 14: Análise em SDS-PAGE 10% da expressão heteróloga de Ddi1 em *E. coli* induzidas a diferentes concentrações de IPTG e tempos de indução. A) Indução a 0,1 mM por 1 h, 2h, 3 h, 4 h e 16 h. (PM) Padrão de massa molecular; (NI) Proteínas não induzidas; (T) Proteínas totais; (I) Proteínas insolúveis; (S) Proteínas solúveis. Gel corado com Coomassie Blue R-250. B) Indução a 0,2 mM por 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 16 h. (NI) Proteínas não induzidas; (T) Proteínas totais; (PM) Padrão de massa molecular (I) Proteínas insolúveis (S) Proteínas solúveis. Gel corado com Coomassie Blue R-250. C) Indução a 0,5 mM por 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 16 h. (NI) Proteínas não induzidas; (T) Proteínas totais; (I) Proteínas insolúveis; (S) Proteínas solúveis; (PM) Padrão de massa molecular. As setas indicam a banda de aproximadamente 59 kDa relativa a Ddi 1. Gel corado com Coomassie Blue R-250.

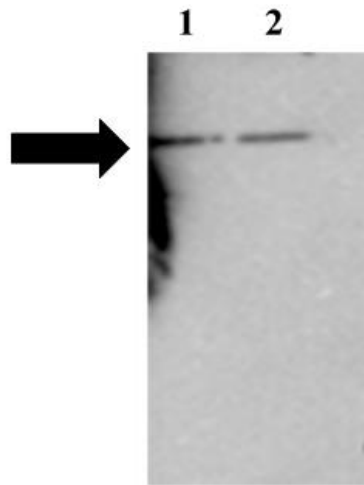


Figura 15: *Western blotting* utilizando anticorpo anti histidina na diluição de 1: 5000 relevado por quimioluminescência e visualizado em filme radiográfico. Imunoidentificação da proteína heteróloga Ddi 1. (1) Proteínas solúveis após indução com 0,1 mM de IPTG por 16 h; (2) Proteínas solúveis após indução com 0,5 mM de IPTG por 16 h. A seta indica a banda de aproximadamente 59 kDa relativa a Ddi 1.

5.8 Análise da capacidade proteolítica do lisado bruto de *E. coli* BL21 (DE3)

Nós avaliamos se o lisado bruto do crescimento bacteriano possuía capacidade proteolítica. Para isso, utilizamos como substrato albumina sérica bovina (BSA).

Em análise através de SDS-PAGE (Figura 16) o lisado bruto não foi capaz de hidrolisar o BSA. No sistema controle, composto apenas pela proteína BSA em solução ácida, é possível observar a perda monomérica da proteína BSA e a formação de peptídeos de diferentes tamanhos, variando entre 15 e 66 kDa. Um padrão similar ao sistema controle, com ausência de degradação é observado no sistema contendo o lisado bruto obtido após 4 h e 16 h de indução. Em contraste, a adição da enzima catepsina D ao sistema contendo BSA e o lisado bruto obtido após 4 h e 16 h de indução, apresentou atividade de degradação, com a formação de diversos peptídeos e a degradação parcial da banda de alto peso molecular da proteína BSA após 24 h de incubação. Indicando que a atividade proteolítica observada sob o BSA estava relacionada a catepsina D.

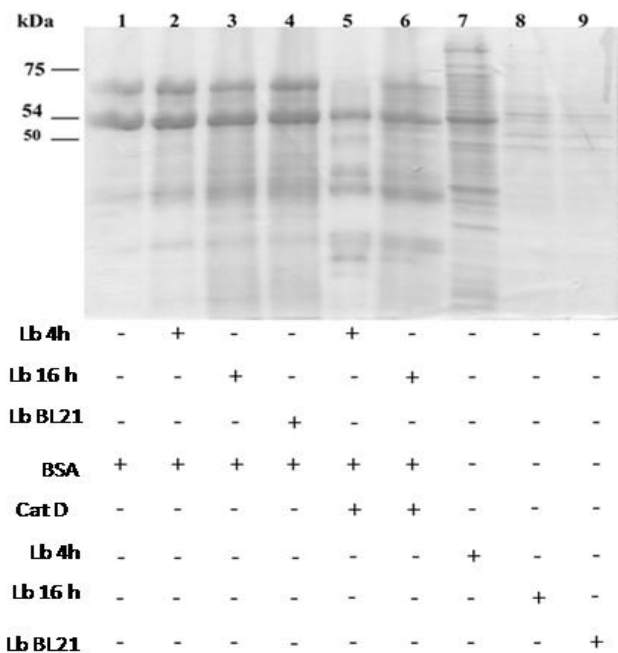


Figura 16: Teste de degradação proteolítica utilizando BSA como substrato. 100 µg de proteínas foram incubadas com substrato BSA (1mg/mL) em ácido cítrico 0,1 M, fosfato de sódio 0,2 M) pH 3,5 a 37 °C por 24 h. Slot 1) BSA; Slot 2) Lisado bruto 4 h de indução e BSA; Slot 3) Lisado bruto 16 h de indução e BSA; Slot 4) Lisado bruto *E. coli* BL21 sem plasmídeo e BSA; Slot 5) Lisado bruto 4 h de indução, BSA e Cat D; Slot 6) Lisado bruto 16 h de indução, BSA e Cat D; Slot 7) Lisado bruto 4 h de indução; Slot 8) Lisado bruto 16 h de indução; Slot 9) Lisado bruto *E. coli* BL21 sem plasmídeo. (Lb 4 h) Lisado bruto 4 h de indução; (Lb 16 h) Lisado bruto 16 h de indução; (Lb BL21) Lisado bruto de *E. coli* BL21 sem plasmídeo; (Cat D) Enzima comercial catepsina D. As proteínas são visualizadas por SDS-PAGE 10 % corado com Coomassie Blue R-250.

5.9 Expressão e purificação da proteína heteróloga Ddi 1

A fração solúvel da proteína Ddi 1 foi purificada usando cromatografia de afinidade a metal imobilizado. Na análise através de SDS-PAGE (Figura 17) das frações eluídas da coluna com tampão imidazol 400 mM, foi possível observar a presença da proteína Ddi 1 em banda única e com um tamanho esperado de aproximadamente 59 kDa. Também observamos que o aumento da estringência através do aumento das etapas de eluição resultou em um maior montante da proteína recuperada, confirmando que a proteína heteróloga Ddi 1 foi expressa em abundância e possui alta afinidade ao níquel. Contudo, proteínas contaminantes com ligação inespecífica ao níquel podem ser observadas.

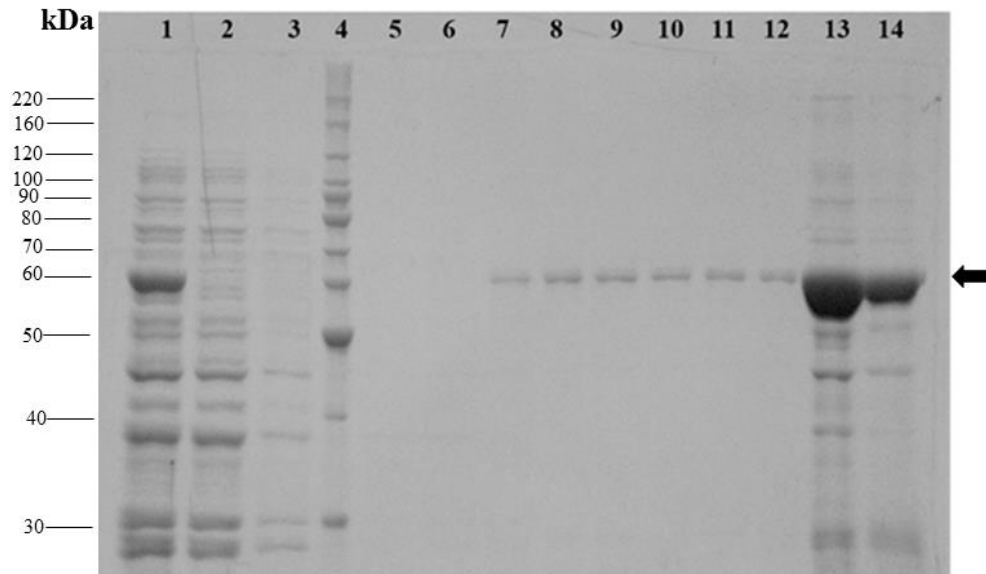


Figura 17: Purificação em coluna de afinidade a níquel da fração da proteína Ddi 1 heteróloga. (1) Extrato total; (2) Fração não ligada a coluna; (3) Alíquota de lavagem; (4) Padrão de massa molecular (5-14) Frações eluídas com tampão Imidazol 400 mM. A seta indica a banda de aproximadamente 59 kDa relativa a Ddi 1. As proteínas são visualizadas em SDS-PAGE 10 % coradas com Coomassie Blue R-250.

A purificação cromatográfica foi analisada também por *western blotting* utilizando o anticorpo anti histidina (Figura 18). Uma banda de aproximadamente 59 kDa correspondente ao tamanho da Ddi 1 foi fortemente reconhecida pelo anticorpo na fração solúvel da lise bacteriana, na fração não ligada à coluna e na fração solúvel purificada. Contudo bandas remanescentes de diferentes tamanhos moleculares são visualizadas nas diferentes alíquotas da fração solúvel purificada. Em nenhuma das alíquotas avaliadas, foi observada apenas a presença da proteína Ddi 1, indicando que a fração da proteína heteróloga obtida está enriquecida, mas não purificada.

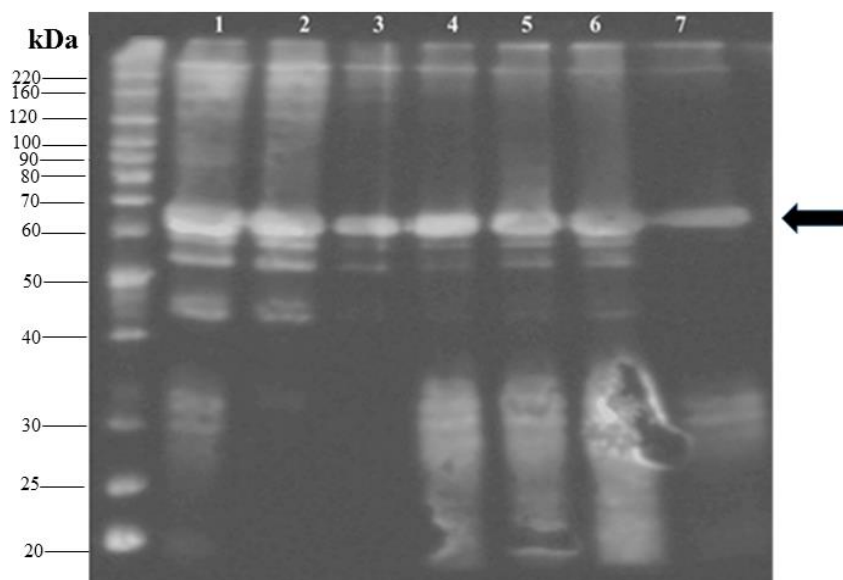


Figura 18: *Western blotting* da purificação da proteína heteróloga Ddi 1. (1) Fração solúvel; (2) Fração não ligada a coluna; (3) Fração purificada alíquota 1; (4) Fração purificada alíquota 2; (5) Fração purificada alíquota 3; (6) Fração purificada alíquota 4; (7) Fração purificada alíquota 5. Foi utilizado o anticorpo anti-histidina na diluição de 1: 30,000 revelado por quimioluminescência. A seta indica a banda de aproximadamente 59 kDa relativa a Ddi 1. A imagem foi obtida pelo programa *Image Quant software Image 400*.

5.10 Análise da atividade enzimática da proteína heteróloga Ddi 1 em substrato sintético

A fração enriquecida da proteína Ddi 1 e o extrato bruto foram avaliada quanto a capacidade de clivar o substrato sintético para aspártico peptidase da família A1, D (MCA-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys(DNP)-d-Arg-NH₂). Sob as condições estabelecidas, o extrato bruto e a fração enriquecida da proteína Ddi 1 não apresentaram atividade proteolítica contra esse substrato (Figura 19). Esse resultado pode ser confirmado quando comparado com a curva de atividade de Catepsina D, usada como controle positivo.

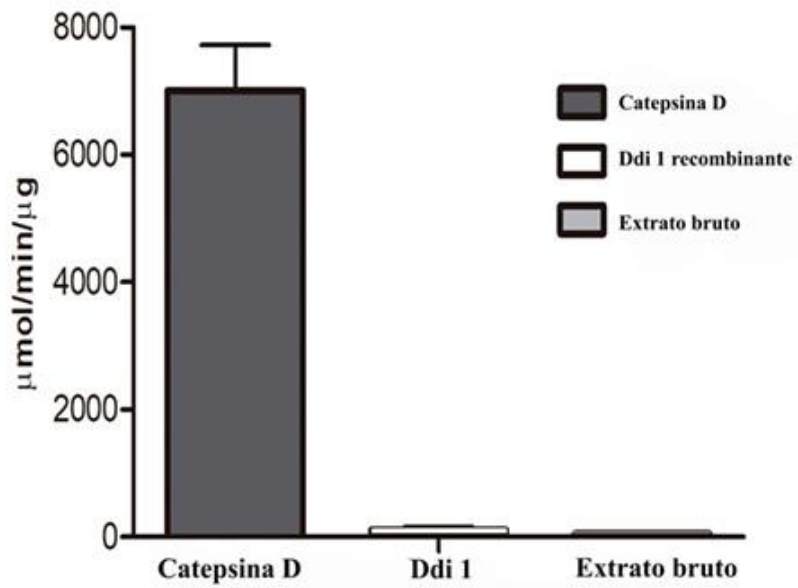


Figura 19: Análise da atividade proteolítica na enzima heteróloga Ddi 1 *simile* enriquecida sobre substrato fluorogênico. A atividade enzimática foi medida mediante a clivagem do substrato específico para catepsina D e expressa em μmol de AMC liberado por min. por μg de proteína.

6. Discussão

As ferramentas de bioinformática atualmente disponíveis nos permitem fazer predições de proteínas ainda não caracterizadas bioquimicamente. Neste trabalho, utilizamos ferramentas de bioinformática para analisar as aspártico peptidases anotadas no genoma de *T. cruzi*.

O clone CL Brener, cepa referência utilizada no primeiro projeto genoma de *T. cruzi*, é um clone derivado de uma cepa híbrida que faz parte da DTU VI (Zingales *et al.* 2009), que advém de um evento de fusão entre genótipos pertencentes aos grupos DTU II e III (de Freitas *et al.* 2006; El-Sayed *et al.* 2005). Assim, a hibridação destes grupos gerou dois haplótipos que são referidos como “Esmeraldo *similar*” (oriundo do grupo DTU II) e “Não Esmeraldo” (DTU III) (Aslett *et al.* 2010; Teixeira *et al.* 2012). A discrepância do número cópias gênicas das aspártico peptidases nos haplótipos reafirmam o descrito por El-Sayed e colaboradores (2005), que relataram que sequências gênicas de Esmeraldo *similar* e Não Esmeraldo são distintas e podem ser utilizadas na identificação dos grupos II e III de *T. cruzi*.

Os resultados obtidos desta análise confirmaram a existência de três genes preditos como aspártico peptidases. O gene Peptidase peptídeo sinal *similar* (TcCLB.507951.260) está presente apenas no haplótipo Não Esmeraldo, representante do grupo DTU III. O gene Presenilina *similar* encontra-se presente nos dois haplótipos, apresentando 98% de identidade gênica, sob o código de identificação TcCLB.508277.50, Esmeraldo *similar* e TcCLB.503543.10, Não Esmeraldo. De maneira similar, o gene da Ddi 1 *similar* encontra-se anotado nos dois haplótipos sob o código de identificação Tc00.1047053511585.40 Esmeraldo *similar* e Tc00.10470535 10155.40, Não Esmeraldo, com 98% de identidade gênica entre eles.

A análise das sequências polipeptídicas da proteína Presenilina *similar* indicam que dos 372 resíduos de aminoácidos, houve a troca de 11 resíduos de aminoácidos entre as sequências Esmeraldo *similar* e Não Esmeraldo. A análise das sequências polipeptídicas da proteína Ddi 1 *similar* dos 480 resíduos de aminoácidos, identificamos a troca de 13 aminoácidos entre as sequências.

Todavia, elevados percentuais de identidade e similaridade foram observados entre estas proteínas e entre as diferentes cepas do *T. cruzi*. Tal fato sugere uma alta pressão seletiva para conservação desta proteína, que pode estar relacionada a funções biológicas críticas. A análise dos domínios das três proteínas anotadas como aspártico peptidases evidenciaram a presença de domínios conservados. Os resultados mostram que as proteínas Peptidase peptídeo sinal *similar* e Presenilina *similar* compartilham o mesmo domínio conservado. Esse domínio faz parte do Clã AD, família A 22A, família de peptidases tipo presenilina 1.

Diante da importância das peptidases em eventos biológicos cruciais de diversos organismos, estudos dirigidos e focados a esta família de enzimas vêm sendo realizados na família

Trypanosomatidae (Besteiro *et al.* 2007). O sequenciamento do genoma de *Leishmania major*, *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* mostrou que estas espécies apresentam semelhante arranjo de peptidases (Besteiro *et al.* 2007). A aspártico peptidase do tipo presenilina 1 em *Leishmania* tem sido descrita como ativa e capaz de hidrolisar proteínas de membrana do tipo I, e sua participação no processo de morte celular por autofagia, tem sido avaliada (Valdivieso *et al.* 2007).

Nossos resultados *in silico* confirmam a presença de uma Presenilina *similar*, com o domínio PSN (Presenilina/ Peptidase Peptídeo Sinal). A presenilina 1 é uma proteína de 50-55 kDa, e todos os membros desta família possuem nove domínios transmembranas com amplas dobras (*loops*) entre os domínios seis e sete (Laudon *et al.* 2005). Essas amplas dobras incluem uma região hidrofóbica importante para o processamento do complexo que dá origem ao sítio ativo (Podlisny *et al.* 1997; Fukumori *et al.* 2010; Chavez-Gutierrez *et al.* 2012).

Esta proteína foi descrita pela primeira vez em 1995, em estudos sobre a doença de Alzheimer (DA), sendo nomeada como presenilina 1 (PS1) humana (Levy-Lahad *et al.* 1995; Sherrington *et al.* 1995). Concomitantemente, com a descoberta da presenilina 1 (PS1) humana, um ortólogo em *Caenorhabditis elegans*, chamado de SEL 12 foi identificado como um componente essencial da via de sinalização Notch (Levitan &Greenwald 1995). Esta via regula muitos processos do desenvolvimento e da renovação tecidual de metazoários (Kopan & Ilagan 2009). Contudo, a função mais conhecida e estudada da Presenilina é sua participação na regulação e no processamento da proteína precursora amiloide (APP) na doença de Alzheimer (Kopan & Ilagan 2009; Chavez-Gutierrez *et al.* 2012; De Strooper & Karran 2016; Jeong 2017).

De modo similar, a Presenilina *similar* de *T. cruzi* possui nove domínios transmembranares e uma ampla dobra entre os domínios seis e sete com uma espaçosa região hidrofóbica. Esses resultados indicam que a Presenilina *similar* de *T. cruzi* possui estruturas secundárias altamente similares e indispensáveis para origem de uma Presenilina ativa. Na árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança, a proteína PPS *similar* de *T. cruzi* CL Brener se mostrou mais próxima filogeneticamente a Presenilina *similar* deste protozoário, do que as PPS *similar* dos membros restantes da família Trypanosomatidae. Isso sugere que a proteínas PPS *similar* e Presenilina *similar* neste parasito possuem uma relação mais próxima entre si. Dados da literatura descrevem estreitas semelhanças estruturais e funcionais entre as proteínas Peptidases Peptídeo Sinal e as Presenilinas (Weihofen *et al.* 2002).

O complexo Gama secretase é composto por proteínas integrais de membranas sendo formado por quatro componentes proteicos, Presenilina (PS), Nicastrina (NIC), *anterior pharynx defective 1* (Aph-1) e *Presenilin enhancer -2* (Pen-2), sendo a Presenilina o componente catalítico desse complexo (Tanzi and Bertram 2005). Essa peptidase atua em proteínas integrais de

membrana, sendo identificadas em diversos organismos como metazoários, plantas e mamíferos (Levy-Lahad *et al.* 1995; Sherrington *et al.* 1995; Brunkan & Goate 2005; Kopan & Ilagan 2009).

No retículo endoplasmático, após a formação dos quatro componentes proteico, a atividade da Presenilina é desencadeada por fatores químicos celulares. Essa atividade ocorre por mecanismo de auto clivagem, e resulta na geração de dois fragmentos, um N-terminal e um C-terminal, que permanecem firmemente associados, contribuindo cada um com um resíduo de ácido aspártico para o sítio ativo. Essa conformação indica que o heterodímero NTF/CTF é a forma ativa da presenilina (Thinakaran *et al.* 1996; Ratovitski *et al.* 1997; Wolfe *et al.* 1999; Esler *et al.* 2000; Li *et al.* 2000; Fukumori *et al.* 2010). Embora a presença de todas as unidades proteicas que formam o complexo gama secretase resulte na atividade ótima da Presenilina, a formação do complexo não é essencial a sua atividade (Voss *et al.* 2013).

A Presenilina é inibida por inibidores de aspártico peptidase que mimetizam o estado análogo de transição do complexo gama secretase, ligando-se diretamente a Presenilina em sua forma heterodimérica (Esler *et al.* 2000; Li *et al.* 2000). Esse mecanismo de inibição evidencia que o sítio ativo aspártico peptidases localiza-se na interface de duas subunidades transmembranares. Os dois resíduos de ácido aspártico parecem estar alinhados um com o outro na membrana, a uma profundidade coerente com a posição que a gama secretase cliva o Precursor da Proteína amiloide (APP). Essa característica é compartilhada com pelo menos duas outras famílias de peptidases integrais de membrana completamente distantes, a família S2P de metalopeptidases, envolvida no metabolismo de colesterol de mamíferos (Zelenski *et al.* 1999), e na esporulação em bactéria (Rudner *et al.* 1999), e a família de serino peptidases cilíndricas, que estão envolvidas no processamento de receptores EGF em *Drosophila* (Lee *et al.* 2001).

A Presenilina possui um sítio de ancoragem para o substrato, localizado em um local distinto do sítio ativo, mas assim como no sítio ativo, situa-se entre as subunidades N-terminal e C-terminal, o que faz com que o substrato ou parte dele tenha que passar entre as duas subunidades para acessar o sítio ativo (Kornilova *et al.* 2005).

Por exercer um papel central na patogênese da doença de Alzheimer, a Presenilina é explorada como importante alvo terapêutico. Quanto a funções fisiológicas normais, Presenilina possui outros substratos que não a proteína PPS, sendo os receptores integrais de membrana da família Notch os mais bem caracterizados.

A via de regulação dos receptores Notch 1 são essenciais para o desenvolvimento de organismos multicelulares. Após o processamento da porção carboxiterminal pela Presenilina, ocorre a liberação domínio intracelular que se desloca para o núcleo e interage com fatores de transcrição específicos que controlam a expressão e regulação de genes envolvidos diferenciação celular (Selkoe & Kopan 2003). Em camundongos, a ausência da Presenilina 1

resulta na desregulação do sistema embrionário, causando a morte ou expulsão prematura do embrião, enquanto a ausência da presenilina 1 e 2 apresenta um fenótipo embrionário letal, que se assemelha ao *knockout* de Notch1 (Zhang et al. 2000; Herreman *et al.* 2000). A participação da Presenilina no tráfico de proteínas e homeostase do cálcio também são relatadas (Selkoe & Kopan 2003; De Strooper *et al.* 2012).

As variadas funções celulares da Presenilina têm sido amplamente atribuídas à sua capacidade de clivar diversos substratos aparentemente pouco específicos. Contudo, essa mesma característica levanta a questão se a principal função desta enzima é atuar como uma peptidase de degradação geral para resíduos de proteína ligados à membrana (Kopan & Ilagan 2004).

As PPS possuem uma intrigante semelhança com as Presenilinas (Weihofen *et al.* 2002). São descritas em organismos Procariotos e Eucariotos, incluindo fungos, plantas e protozoários (Krawitz *et al.* 2005; Martoglio & Golde 2003; Ponting *et al.* 2002). Localizam-se predominantemente no retículo endoplasmático e atuam dentro do domínio transmembrana, clivando o peptídeo sinal remanescente que permanecem ligados a membrana do retículo endoplasmático após a clivagem pela enzima peptidase sinal (Lemberg, 2002, Sato *et al.* 2006).

Nossas análises *in silico*, revelam a mesma semelhança entre a PPS *símile* e Presenilina *símile* de *T. cruzi*. A PPS *símile* contém dois resíduos de ácido aspártico conservados posicionados no meio do domínio transmembrana, e as sequências que contém esses aspartatos assemelham-se com as da Presenilina. Por sua vez, identificamos a presença do domínio conservado PSN na PPS *símile* do parasito. A subfamília A22A, a qual pertence esse domínio, contém um *motif* PAL conservado próximo a porção C-terminal que é fundamental para a preservação normal do sítio ativo, reconhecimento e abertura do substrato (Wang *et al.* 2004; Sato *et al.* 2008).

A topologia das PPS *símile* assemelha-se com a da Presenilina, onde os dois resíduos de ácido aspártico alinham-se um com o outro na membrana (Friedmann *et al.* 2004). Como nas aspártico peptidases solúveis, a necessidade de dois resíduos de ácido aspártico conservado no sítio ativo é absoluta, e mutações nesse sítio resultam em anulação completa da atividade proteolítica (Sato *et al.* 2006). A orientação do domínio transmembrana contendo os aspartatos nas PPS estão aparentemente opostos ao das Presenilinas. Essa característica pode estar relacionada com a capacidade da PPS de clivar proteínas de membrana do tipo II, que apresentam porção amino terminal na face citosólica, enquanto as Presenilinas clivam proteínas de membrana do tipo I com a porção carboxila terminal na face citosólica (Weihofen *et al.* 2002).

A PPS forma um homodímero, e sua marcação com inibidor análogo do estado de transição sugere que este dímero é cataliticamente ativo (Nyborg *et al.* 2004), contudo, a dimerização não é essencial para a atividade proteolítica (Narayanan *et al.* 2007).

As PPSs são menos complexas que as Presenilinas, na medida em que se apresentam ativas como proteína única, e sem a necessidade de cofatores. Além disso, não sofrem endoproteólise para a formação de duas subunidades distintas durante sua maturação em proteína ativa. Proteínas PPS e Presenilinas têm sua atividade inibida por alguns dos mesmos inibidores peptídeos miméticos e peptídeos helicoidais (Kornilova *et al.* 2005; Sato *et al.* 2006; Weihofen *et al.* 2003), e a atividade da PPS pode ser alterada por componentes que modulam o complexo gama secretase (Sato *et al.* 2006).

Ensaio enzimáticos demonstraram que, assim como a Presenilina, a PPS é capaz de clivar substratos *in vitro*, contudo, a análise dos produtos clivados demonstrou que a PPS cliva o substrato apenas uma vez, e em local não específico (Sato *et al.* 2006). Duas proteínas homólogas a PPS, SPPL2a e SPPL2b foram associadas a clivagem do TNF- α (Fluhrer *et al.* 2006) e a clivagem da proteína associada a demência Bri2 (Martin *et al.* 2008). Em contraste com os ensaios enzimáticos *in vitro*, a clivagem do TNF- α pela SPPL2b parece ocorrer mais de uma vez (Fluhrer *et al.* 2006).

As PPS atuam ainda no processo de vigilância imunológica, clivando peptídeos sinais oriundos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) do tipo I que são apresentados na superfície das células, como uma sinalização para as células *natural killer* que a síntese do MHC está ocorrendo em níveis normais (Lemberg *et al.* 2001). Interessantemente, o vírus da hepatite C utiliza a PPS para a maturação de sua proteína central, elevando essa peptidase a um promissor alvo para terapia antiviral (McLauchlan *et al.* 2002).

Embora integrem o Clã das aspártico peptidases, PPS e Presenilina não compartilham semelhanças com as aspártico peptidases solúveis como Pepsina, Renina e aspártico peptidase do HIV, confirmando a diversidade das aspárticos peptidases.

Diferentemente, a proteína solúvel Ddi 1 *similar* anotada no genoma de *T. cruzi* pertence a uma importante família de proteínas transportadoras de substratos poli ubiquitinados para degradação via proteossoma, que se diferem das proteínas clássicas de transporte por seu padrão de interação e função proteolítica, atribuída ao domínio conservado retroviral peptidase (RVP) (Sirkis *et al.* 2006).

Ddi 1 é uma proteína multidomínios, formada por um domínio N-terminal ubiquitina *like* (UBL), um domínio central retroviral peptidase (RVP) e um domínio C-terminal ubiquitina associado (UBA). Possui presença ubíqua nos organismos, e Ddi 1 de *Saccharomyces cerevisiae* é o membro mais bem caracterizado desta família (Sirkis *et al.* 2006).

A estrutura cristalográfica do domínio RVP *similar* de *S. cerevisiae* revela que este domínio apresenta uma conformação homodimérica, independente da presença do domínio C-terminal UBA (Bertolaet *et al.* 2001; Sirkis *et al.* 2006; Gabriely *et al.* 2008), e o sítio ativo apresenta a tríade catalítica Asp-Thr-Gly em conformações geométricas idênticas ao domínio RVP do HIV (Li *et al.* 2011).

Em *L. major*, a modelagem molecular do domínio RVP da proteína Ddi 1 *similar* revelou uma estrutura em dímero que contém uma sequência de aminoácidos dupla de Asp-Ser-Gly-Ala, e uma conformação quase idêntica à exibida pelo homólogo retroviral da Ddi 1 *similar* do fungo, e similar ao domínio RVP do vírus HIV. Mostrou ainda uma fenda mais ampla do domínio RVP, quando comparado ao domínio RVP do vírus, sugerindo que a Ddi 1 *similar* de *L. major* pode acomodar substratos mais volumosos do que os substratos acessíveis as aspártico peptidases do HIV-1 (Perteguer *et al.* 2013).

Nossos resultados corroboram com o descrito na literatura. A modelagem molecular do domínio RVP da Ddi 1 *similar* de *T. cruzi* dobra-se para formar um homodímero, que é característico das aspártico peptidases da família A2, e que cada monômero possui a sequência Asp-Ser-Gly-Ala responsáveis pela formação do sítio catalítico. O modelo mostrou ainda uma conformação estrutural semelhante ao domínio RVP do vírus HIV.

A comparação do modelo tridimensional gerado para o domínio RVP da proteína Ddi 1 *similar* *T. cruzi* e o domínio RVP do vírus HIV evidenciam diferenças estruturais entre as fendas catalíticas, ressaltando uma maior amplitude da fenda do domínio RVP de *T. cruzi*. Essa maior amplitude pode indicar, que assim como em *L. major*, esse domínio pode acomodar substratos mais volumosos (Perteguer *et al.* 2013), sugerindo ainda que uma modificação conformacional nesses substratos possa gerar maior afinidade ao sítio de ligação. Em contrapartida, a estrutura cristalográfica do domínio RVP da Ddi 1 de *S. cerevisiae*, molde utilizado na modelagem molecular da Ddi 1 *similar* de *L. major* e na Ddi 1 *similar* de *T. cruzi* evidencia uma fenda mais ampla quando comparada a fenda do domínio RVP do vírus HIV, mas, ainda não está estabelecido se esta é uma característica da proteína, ou um artefato da cristalografia (Li *et al.* 2011). Os resultados dessas análises foram publicados na revista científica *BMC Research Notes* com o título "Docking simulation between HIV peptidase inhibitors and *Trypanosoma cruzi* aspartyl peptidase", onde configurei como autora (Anexo I).

A proteína Ddi 1 de *S. cerevisiae* está envolvida em uma série de interações com múltiplas proteínas. Além de atuar como proteína de transporte, Ddi 1 tem participação no mecanismo de controle do ciclo celular e supressão de secreção de proteínas. O domínio UBA parece ser importante na interação da Ddi 1 com algumas das proteínas padrões como a Rad23 (uma proteína envolvida na excisão e reparo de nucleotídeos), que formam um heterodímero

com a Ddi 1, mas não com mutantes Ddi 1 na ausência do domínio UBA (Bertolaet *et al.* 2001). Deleções na região UBA também rendem células defeituosas na fase S do ciclo celular (Clarke *et al.* 2001). O domínio UBA em ambas Ddi 1 e Rad23 interage diretamente com a Ubiquitina (Bertolaet *et al.* 2001) e a ligação mono-ubiquitina requer a dissociação do heterodímero Ddi 1 *símile*-Rad23 (Kang *et al.* 2006). O domínio UBA da Ddi 1 interage com proteínas Ho ubiquitinadas e o domínio UBL liga-se ao proteassomo para liberar a proteína Ho desse complexo (Kaplun *et al.* 2005). O domínio UBL de ambos Ddi 1 (Kaplun *et al.* 2005) e Rad23 (Bertolaet *et al.* 2001) associados com o proteassomo exercem um papel no controle celular por mediar a degradação de Pds1 pelo proteassomo e permitir o estabelecimento da anáfase. Recentemente, Ddi 1 foi descrita como substrato proteico para metacaspase de leveduras e tripanossomas. A atuação da metacaspase sobre a proteína Ddi 1 resulta na remoção do domínio UBA, bem como de uma região proteica sem assinatura envolvida no reconhecimento ao proteassoma (Fishbain *et al.* 2011), diminuindo a estabilidade da Ddi 1 (Bouvier *et al.* 2018). Resultados semelhantes foram obtidos por meios de análises proteômicas, onde o Ddi 1 ortólogo de *Candida albicans* foi identificado como um potencial substrato para Ddi 1 (Leger *et al.* 2016). De uma forma geral, metacaspases atuam em proteínas que participam no metabolismo de carboidratos (Silva *et al.* 2011; Tsiatsiani *et al.* 2013; Leger *et al.* 2016), sugerindo que em leveduras e tripanossomas diferentes caminhos de sinalização podem levar a clivagem da Ddi 1 como substrato.

Nossos resultados *in silico* demonstraram a presença do domínio ubiquitina *símile* (UBL), e a ausência do domínio associado a ubiquitina (UBA) na proteína Ddi 1 *símile* de *T. cruzi* clone CL Brenner, confirmando dados da literatura que descrevem a presença do domínio UBL em mamíferos, fungos e protozoários (Nowicka *et al.* 2015). Perteguer e colaboradores relatam a presença dos domínios UBL e UBA em *L. major* (Perteguer *et al.* 2013), o que sugere que o domínio UBA não é conservado na família Trypanosomatidae. Interessantemente, a perda do domínio UBA foi descrita em mamíferos, o que pode estar relacionado a perda da funcionalidade desse domínio e consequente evolução de eucariotos (Nowicka *et al.* 2015).

A proteína Ddi 1 tem sido indicada como o alvo dos IPs-HIV em protozoários parasitas do gênero *Leishmania* (Valdivieso *et al.* 2007; Valdivieso *et al.* 2010; White *et al.* 2011b). Nesse parasito, a expressão da proteína Ddi 1 heteróloga pode fornecer importantes resultados bioquímicos, demonstrando que a enzima possuía atividade proteolítica contra diferentes substratos seletivos para retropeptidase do HIV, e que essa atividade era sensível a inibidores proteolíticos da aspártico peptidase viral, indicando que enzimas da família Ddi 1 *símile* podem ser funcionalmente ativas em membros da família Trypanosomatidae (Perteguer *et al.* 2013).

Nosso grupo de pesquisa vem avaliando o efeito dos IPs-HIV em *T. cruzi*. Em ensaios *in vitro*, os IPs-HIV apresentaram uma ação antiproliferativa nas formas epimastigotas do *T. cruzi*. Além disso, os inibidores ritonavir, lopinavir e nelfinavir mostraram maior efetividade, exercendo um efeito antiproliferativo em diferentes linhagens (Sangenito *et al.* 2014). Esses resultados corroboram com os nossos resultados *in silico* de atração molecular, que mostram uma diferente afinidade dos IPs pelo sítio ativo do domínio RVP da proteína Ddi 1 *similar* gerada por modelagem computacional. A reconstrução filogenética do domínio RVP da proteína Ddi 1 *similar* demonstrou a alta conservação desse domínio entre todos os organismos eucariotos (Krylov & Koonin 2001; White *et al.* 2011a). A família Trypanosomatidae se mostrou um grupo monofilético, formando dois grupos distintos. Um grupo é formado pelas espécies *Leishmania* spp., *Phytomonas* spp., *Strigomonas* spp., e *Leptomonas* spp., e um segundo grupo constituído por *Trypanosoma* spp.

Na busca de resultados bioquímicos que pudessem confirmar o alvo dos IPs-HIV no parasita *T. cruzi*, o gene codificante para proteína Ddi 1 foi clonado em plasmídeo de expressão e posteriormente inserido em plataforma de expressão procariótica *E. coli* BL21 (DE3).

Como não existe um protocolo padrão para expressão de proteínas recombinantes, testes de indução em menores escalas de cultura com IPTG em diferentes concentrações e diferentes tempos de expressão são necessários para se estabelecer o melhor protocolo de expressão para a proteína de estudo.

Nossos resultados demonstraram que a proteína heteróloga foi abundantemente expressa, estando presente em pequenas quantidades na fração solúvel, e majoritariamente na fração insolúvel da bactéria. Este fato pode estar relacionado ao stress metabólico sofrido pelo hospedeiro em resposta ao DNA exógeno e a síntese de proteína heteróloga, que resultam em um desvio de recursos metabólicos do hospedeiro para manutenção da alta replicação e expressão recombinante (Glick 1995; Donovan *et al.* 1996). Uma resposta comum ao stress metabólico sofrido por *E. coli* é a expressão de proteínas em forma de agregados insolúveis ou compactadas em corpos de inclusão (Anfinsen 1973; Carrio & Villaverde 2003). As proteínas expressas em corpos de inclusão de uma forma geral, são inativas (Villaverde & Carrio 2003) ou necessitam de etapas adicionais de extração, solubilização e renaturação (Sun *et al.* 2013; Vallejo & Rinas 2004). Assim, testes de atividade proteolítica foram realizados com a Ddi 1 expressa na fração solúvel da bactéria.

Primeiramente avaliamos se o lisado bruto de *E. coli* BL21(DE3) possuía atividade proteolítica sobre o substrato natural BSA. É amplamente descrito na literatura a influência da temperatura e tempo de expressão na qualidade de proteína heteróloga. Assim, alíquotas de diferentes tempos de indução de *E. coli* BL21 (DE3) foram coletadas e o lisado bruto obtido.

Em análise por SDS-PAGE foi possível observar que, sob as condições testadas o lisado bruto não apresentou atividade proteolítica contra BSA (Figura 16). A proteína BSA foi previamente descrita como substrato natural de aspártico peptidases por apresentarem diferentes sítios de clivagem como resíduos duplos de aminoácidos hidrofóbicos em sua cadeia peptídica (Sun *et al.* 2013), representando assim um bom substrato para testes bioquímicos iniciais. Sob condições ácidas, a proteína BSA perde a sua conformação nativa monomérica, gerando uma variedade de fragmentos de proteína, com dois fragmentos de alto peso molecular em torno de 40 e 60 kDa (Estey *et al.* 2006). A perda da conformação monomérica do BSA é observada no sistema branco do experimento. Um padrão idêntico foi observado quando o lisado bruto obtido após a indução por 4 ou 16 h, foi incubado com BSA, indicando que essas frações não apresentam atividade sobre o substrato. Esse resultado pôde ser confirmado quando comparamos o sistema contendo a enzima catepsina D, na presença das do lisado bruto obtido após a indução por 4 ou 16 h. A adição da enzima catepsina D resultou em degradação do substrato, com a formação de diversos peptídeos de baixo peso molecular e degradação parcial da banda de maior peso molecular de BSA. Esses resultados indicam que a ausência de atividade do extrato bruto de *E. coli* BL21(DE3), não estava relacionado ao tempo de indução bacteriana.

Subsequentemente, o lisado bruto de *E. coli* BL21(DE3) foi purificado utilizando coluna de afinidade a níquel, e a fração enriquecida da coluna de purificação foi testada contra substrato específico para aspártico peptidases do tipo catepsina D. De forma similar ao lisado bruto, a fração enriquecida de Ddi 1 heteróloga não apresentou atividade proteolítica contra substrato sintético específico para aspártico peptidases.

Embora existam diversas técnicas para o estudo de perfil de proteínas o isolamento e purificação de proteínas continua sendo necessário. Dado as propriedades únicas de cada proteína, não existe um protocolo padrão, sendo necessário a realização de testes individuais. Para a determinação da estrutura tridimensional de uma proteína, frequentemente é necessário a expressão de uma proteína recombinante para obtenção de quantidades necessárias a cristalização (Franciset *al.*, 2010). A expressão heteróloga de uma proteína é resultado da harmonia de diversos processos como regulação a nível transcricional, edição de RNA mensageiro, tradução da proteína e, quando necessário, modificações pós traducionais. Além dos fatores moleculares, a ausência de atividade proteolítica pode estar relacionada a escolha da plataforma de expressão. Interessantemente, aspártico peptidases recombinantes tem sido expressas em diferentes plataformas de expressão como fungos, *E. coli* e baculovírus, apresentando diferentes características entre as proteínas heterólogas (Shintani & Ichishima 1994; Shintani *et al.* 1996; Villaverde & Carrio 2003; Chart *et al.* 2009). Contudo, não é claro

qual hospedeiro vai produzir a proteína heteróloga em quantidades suficiente e na forma solúvel. Embora cada vetor de expressão ofereça vantagens particulares, a primeira escolha para expressão de proteínas heterólogas por sua simplicidade e rendimento é a plataforma procariótica *E. coli*. Bactérias *E. coli* BL21(DE3) são cepas amplamente usadas na expressão e produção de proteínas heteróloga devido a presença do gene DE3 responsável pela sua capacidade de produzir T7 polimerase e sua deficiência em peptidases citoplasmática e de membrana do tipo Lom e OmpT, que favorecem o isolamento de proteínas recombinantes intactas e em abundância (Sorensen, 2005).

Apesar dessas características, a aspártico peptidase pepsina I de *Aspergillus* sp., expressa em cepas de *E. coli*, utilizando vetor pET 12a (+) foi produzida majoritariamente em corpos de inclusão (Shintani *et al.* 1996). De forma similar, a aspártico peptidases recombinante de *Plasmodium* sp, Aplasmepsina 4 quando expressa em *E. coli* BL21(DE3), utilizando diferentes vetores pET, apresenta-se compactada em corpos de inclusão (Li *et al.* 2004). Interessantemente, aspártico peptidase recombinante de *Aspergillus repens* MK82 foi eficientemente produzida na forma solúvel quando expressa na cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS utilizando vetor de expressão pET 28b(+) (Takenaka *et al.* 2019). Corpos de inclusão referem-se a proteína heteróloga agregada em uma forma insolúvel no periplasma ou citoplasma da bactéria. Proteínas expressas nessa conformação podem ser purificadas e concentradas, contudo a renaturação de proteínas agregadas em sua forma nativa representa uma fase crítica desse protocolo (Vallejo & Rinas 2004; Singh *et al.* 2015). O mecanismo de formação de corpos de inclusão não é completamente claro, podendo estar envolvido stress do hospedeiro, tamanho da proteína, tipo do promotor e formação impropria de pontes dissulfetos. Contudo é amplamente descrito na literatura que corpos de inclusão são formados a partir de proteínas parcialmente enoveladas, ou enoveladas incorretamente (Rinas & Bailey 1992; Speed *et al.* 1996; Betts *et al.* 1997; Aramvash *et al.* 2018), e que temperatura do crescimento bacteriano está grandemente relacionada a formação desses agregados protéicos (Bishai *et al.* 1987; Schein 1989; Chalmers *et al.* 1990; Pei *et al.* 2015; Singh *et al.* 2015). Durante a realização dos testes iniciais da expressão da proteína heteróloga Ddi 1 de *T. cruzi* diferentes temperaturas de crescimento e indução bacteriana foram testadas. As bactérias foram crescidas e induzidas a 24 e 37 °C e a fração solúvel do extrato bruto testado contra substrato para catepsina D. A variação de temperatura do crescimento e indução bacteriana testados não resultou em detecção de atividade proteolítica da proteína Ddi 1 heteróloga de *T. cruzi* (resultados não mostrados). O plasmídeo de expressão utilizado para a expressão da proteína heteróloga Ddi 1 de *T. cruzi* foi o pET 19b. Esse vetor de expressão possui resistência a ampicilina, uma etiqueta de marcação de 10 histidina na porção N terminal e um sítio de clivagem de enteroquinase. Sua expressão requer

uma cepa hospedeira lisogenizada por um fragmento de fago DE3 codificando a RNA polimerase T7, sob o controle de IPTG induzindo o promotor *Lac UV5*. Contudo, dezenas de diferentes plasmídeos pET são atualmente viáveis, possuindo múltiplos sítios de clonagem para diferentes proteínas de fusão e sítios de clivagem de peptidases, permitindo diversas modificações e testes de expressão de proteínas heteróloga (Studier *et al.* 1990; Dubendorff & Studier 1991). Assim, a mudança no vetor pET de expressão, juntamente com proteínas marcadoras e de fusão podem ser uma alternativa na busca da expressão da proteína Ddi 1 de *T. cruzi* na forma solúvel.

Em geral, proteínas formadas por poucos resíduos, compostas por domínio único possuem uma cinética rápida de enovelamento. Ao contrário, a superexpressão de proteínas multidomínios frequentemente necessitam de assistentes moduladores para seu correto enovelamento (Baneyx & Mujacic 2004). Em relação a proteína modelo deste trabalho, Ddi1 de *T. cruzi* é formada por uma cadeia de 480 aminoácidos e três diferentes domínios proteicos, o que pode dificultar o seu correto enovelamento. Chaperonas moleculares que atuam como assistentes moduladores favorecem o enovelamento correto da proteína por proteger as superfícies interativas da proteína recém-formada de interações próprias, com o solvente e por catalisarem o rearranjo de pontes de ligação dissulfeto (Baneyx & Mujacic 2004). Chaperonas da família HSP70 como a DNaK GroEL podem ser utilizadas para prevenir a formação de corpos de inclusão por reduzir a agregação e promover a degradação de proteínas desnoveadas (Ben-Zvi & Goloubinoff 2001; Mogk *et al.* 2002). Sistema de bi chaperonas formadas por DNaK e ClpB atuam na solubilização e desagregação de proteínas (Schlieker *et al.* 2002). A chaperona GroEL da família Hsp60 medeia o transito entre proteínas solúveis e insolúveis, participando positivamente na desagregação de proteínas recém-sintetizadas (Kitagawa *et al.* 2002; Kuczynska-Wisnik *et al.* 2002). A expressão simultânea de genes que codificam chaperonas juntamente com o gene da proteína Ddi 1 de *T. cruzi* representa uma boa estratégia na busca da proteína na fração solúvel da bactéria. Resultados recentes indicam que a co-expressão de chaperonas moleculares em vetor pET juntamente com o gene de Huridina PA, uma proteína de propriedades ácidas encontrada em glândulas salivares de sanguessugas, aumentou em torno de 3,5 vezes a produção periplasmática da proteína recombinante (Seyed Hosseini Fin *et al.* 2019).

As propriedades da cadeia polipeptídica da proteína a ser expressa podem estar relacionadas com a formação de corpos de inclusão (Carrio & Villaverde 2003). É descrito na literatura a presença de regiões favoráveis a agregação (regiões *hot pots*), que na forma protéica globular, de uma forma geral, fazem parte do nucleo hidrofóbico ou participam da interação com outras subunidades protéicas, não alterando a estabilidade conformacional da proteína

(Ventura *et al.* 2004; Ventura 2005). As características estruturais secundárias de uma proteína também podem estar relacionadas a formação de corpos de inclusão. Interações intermoleculares envolvendo estruturas secundárias do tipo folha beta pregueada promovem a formação de corpos de inclusão por formarem ligações de ponte de hidrogênio entre as proteínas recém expressas (Ami *et al.* 2003; Carrio & Villaverde 2005).

Em análises *in silico* a sequência da proteína Ddi 1 de *T. cruzi* apresentou diversas regiões de folhas betas pregueadas. Esta característica particular da Ddi 1 pode estar relacionada à expressão da proteína heteróloga na forma insolúvel. Além disso, a superexpressão de proteínas multidomínios continua sendo um desafio. As proteínas da família Ddi 1 são formadas por três principais domínios, um domínio N-terminal ubiquitina like (UBL), um domínio central retroviral peptidase *símile* e um domínio C terminal ubiquitina associado (UBA). Historicamente, o método para obtenção heteróloga de complexos multiprotéico ocorre através da expressão de cada subunidade individualmente, seguida pela reconstituição das subunidades *in vitro*. Essa abordagem usualmente requer processos de reenovelamento de mais de um membro do complexo. Contudo, a co-expressão de anticorpos tetraméricos tem sido bem estabelecida (Chadd & Chamow 2001; Birch & Racher 2006). Uma outra possibilidade a ser considerada é a produção heteróloga apenas do domínio ativo de uma proteína multidomínios. Recentemente, *Sushant* e colaboradores clonaram em vetor pET 28a e expressaram em *E. coli* BL21 (DE3) secções dos domínios da proteína Ddi 1 de *Leishmania major*. A atividade proteolítica do domínio total ou dos domínios parciais não foi relatada. Contudo, esse ensaio possibilitou a cristalização do domínio retropepsina *símile* da enzima Ddi 1 de *Leishmania*, confirmando a sua estrutura em dímero e a presença de uma cavidade que pode atuar como região de ligação do substrato. Adicionalmente, ensaios de interferometria de biocamadas confirmaram a interação direta dos IPs-HIV com o domínio retropeptidase viral de Ddi 1 de *L. major* (Kumar & Suguna 2018).

Procedimentos simples e robustos de triagem de expressão aplicáveis a uma grande variedade de proteínas incluindo alvos desafiadores como proteínas multidomínios são atualmente disponíveis (Xiao *et al.* 2010; Keates *et al.* 2012). Esses procedimentos fornecem uma grande quantidade de informações a níveis de solubilidade de proteínas e são baseados em testes de pequenos volumes de cultura de *E. coli*, seguido de comparação e ranqueamento das condições mais favoráveis (Vincentelli *et al.* 2011). Esses protocolos de expressão podem ser usados não apenas para produzir proteínas heteróloga para cristalização, mas também para avaliar um grande volume de parâmetros de expressão que podem ser utilizados na solubilidade geral de proteínas (Bird 2011; Kerrigan *et al.* 2011). Esses estudos indicam que a seleção racional de parâmetros de cultivo, em geral é suficiente para produzir proteínas heteróloga de

interesse na forma solúvel em *E. coli*. Esse consenso é baseado principalmente na expressão heteróloga de proteínas em meio de autoindução, a baixas temperaturas e usando cepas que expressem RNAs transportadores raros para superar a presença de códons raros em genes eucariotos (Studier 2005).

Outro parâmetro que pode ser avaliado na expressão heteróloga de proteínas usando *E. coli* é a influência positiva de etiquetas marcadoras que melhoram a solubilidade da proteína como tioredoxina, proteínas SUMO e proteínas de ligação a maltose, que após a purificação podem ser facilmente removidas por peptidases específicas (Studier 2005; Zanier *et al.* 2013). Além disso, a ausência de maquinaria correta de modificações pós traducionais, frequentemente necessárias para a produção de proteínas eucarióticas em *E.coli*, podem ser hoje dribladas pela co-expressão de glicosiltransferases, oligossacarídeos transferases, sulfidrilasoxisidases e dissulfeto isomerases, fornecendo uma maneira simples de modificar proteínas de interesses com modificações comuns como glicosilação e pontes dissulfetos (Nguyen *et al.* 2011; Valderrama-Rincon *et al.* 2012). Todas essas estratégias reforçam a possibilidade de testes futuros com o gene clonado Ddi 1 de *T. cruzi* na busca da produção da proteína heteróloga Ddi 1 majoritariamente na forma solúvel em *E.coli*.

Outra possibilidade a ser considerada é a expressão da proteína Ddi 1 em plataforma eucariótica de expressão. A expressão homóloga, de uma forma geral permite a expressão e montagem de complexos próximos aos nativos, incluindo padrões de modificações pós-transducionais, e incorporação de fatores desconhecidos que podem facilitar a formação e a função da proteína. Ddi 1 recombinante de *L.major* expressa em células de baculo vírus foi capaz de hidrolizar diferentes substratos, atuando preferencialmente contra substratos da família das retropepsinas, hidrolizando também substrato específico para catepsina D e substrato natural BSA (Perteguer *et al.* 2013).

O sistema de expressão eucariótica *Leishmania tarentole* vem sendo amplamente utilizado. Seu sistema de expressão inclui maquinaria de glicosilação completa e formação de pontes dissulfeto, o que representa uma potencial vantagem sobre os sistemas de expressão procarióticos como *E. coli* (Fernández-Robledo *et al.*, 2010).

O gene da proteína Ddi 1 de *T. cruzi* foi previamente clonado no plasmídeo de expressão pLEX-hig para futura expressão da enzima heteróloga em *Leishmania tarentole*. Ensaios futuros serão realizados na busca da proteína Ddi 1 de *T.cruzi* em sua forma nativa para análises bioquímicas e estruturais.

7. Conclusão e perspectivas

Este trabalho de tese apresenta relevantes informações a respeito das aspártico peptidases em *T. cruzi*. Nossos dados *in silico* confirmaram que a proteína Ddi 1 de *T. cruzi* possui o domínio retroviral peptidase, característico dessa família de proteínas. Mostramos pela primeira vez, que esse domínio possui características estruturais de um domínio ativo, e o uso de diferentes inibidores homólogos as aspártico peptidases do HIV apresentaram uma alta afinidade de ligação. Esses dados lançam luz a perspectiva das aspártico peptidases como um potencial alvo quimioterápico no tratamento da doença de Chagas, e fazem da reproposta de inibidores de aspártico peptidases, uma área interessante a ser mais explorada.

Expressa na plataforma de expressão eucariótica *E. coli*, a proteína Ddi 1 de *T. cruzi* não apresentou atividade proteolítica sobre dois diferentes substratos peptídicos, sendo necessários novos testes de expressão na busca da proteína heteróloga ativa.

8. Referências bibliográficas

- OMS(2015) Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates Wkly Epidemiol Rec 6(90):33-43
- Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. (2018). Accessed [citado 2018 Fev 01]
- Abad-Franch F, et al. (2010) Modeling disease vector occurrence when detection is imperfect: infestation of Amazonian palm trees by triatomine bugs at three spatial scales. PLoS Negl Trop Dis 4(3):e620
- Alcantara CL, Vidal JC, de Souza W, Cunha-e-Silva NL (2014) The three-dimensional structure of the cytostome-cytopharynx complex of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. J Cell Sci 127(Pt 10):2227-37
- Alfonso Y, Monzote L (2011) HIV Protease Inhibitors: Effect on the Opportunistic Protozoan Parasites. Open Med Chem J 5:40-50
- Almeida EA, et al. (2010) Chagas' disease and HIV co-infection in patients without effective antiretroviral therapy: prevalence, clinical presentation and natural history. Trans R Soc Trop Med Hyg 104(7):447-52
- Almeida EA, Ramos Junior AN, Correia D, Shikanai-Yasuda MA (2011) Co-infection *Trypanosoma cruzi*/HIV: systematic review (1980-2010). Rev Soc Bras Med Trop 44(6):762-70
- Ami D, Bonecchi L, Cali S, Orsini G, Tonon G, Doglia SM (2003) FT-IR study of heterologous protein expression in recombinant *Escherichia coli* strains. Biochim Biophys Acta 1624(1-3):6-10
- Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. Science 181(4096):223-30
- Angheben A, et al. (2015) Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. Blood Transfus 13(4):540-50
- Apt W, Zulantay I (2011) [Update on the treatment of Chagas' disease]. Rev Med Chil 139(2):247-57 doi:/S0034-98872011000200016
- Aramvash A, Sabet A, Mansurpur M, Azizi A, Bahrami A, Kamali M (2018) Comparison of Purification Processes for Recombinant Human Growth Hormone Produced in *E. coli*. Iranian Journal of Science and Technology 42:1696-1705
- Aslett M, et al. (2010) TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. Nucleic Acids Res 38(Database issue):D457-62
- Azambuja P, Garcia ES, Ratcliffe NA (2005) Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. Trends Parasitol 21(12):568-72
- Baneyx F, Mujacic M (2004) Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. Nat Biotechnol 22(11):1399-408
- Barrett AJ, Rawlings ND (2007) 'Species' of peptidases. Biol Chem 388(11):1151-7
- Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA (2001) The MEROPS database as a protease information system. J Struct Biol 134(2-3):95-102
- Bartholomeu DC, et al. (2009) Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Nucleic Acids Res 37(10):3407-17
- Bartholomeu DC, Silva RA, Galvao LM, el-Sayed NM, Donelson JE, Teixeira SM (2002) *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. Exp Parasitol 102(3-4):123-33
- Bax A (1989) Two-dimensional NMR and protein structure. Annu Rev Biochem 58:223-56
- Bela SP, Harboe M (2013) Chymosin Handbook of Proteolytic Enzymes. p 37-42
- Ben-Zvi AP, Goloubinoff P (2001) Review: mechanisms of disaggregation and refolding of stable protein aggregates by molecular chaperones. J Struct Biol 135(2):84-93
- Berman H, Henrick K, Nakamura H (2003) Announcing the worldwide Protein Data Bank. Nat Struct Biol 10(12):980

- Berman HM, et al. (2000) The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nat Struct Biol* 7 Suppl:957-9
- Bern C (2015) Chagas' Disease. *N Engl J Med* 373(5):456-66 doi:10.1056/NEJMra1410150
- Bern C, et al. (2009) Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis* 49(11):1667-74
- Bertolaet BL, et al. (2001) UBA domains mediate protein-protein interactions between two DNA damage-inducible proteins. *J Mol Biol* 313(5):955-63
- Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 37(10):1063-75
- Betts S, Haase-Pettingell C, King J (1997) Mutational effects on inclusion body formation. *Adv Protein Chem* 50:243-64
- Billingsley PF (1990) The Midgut Ultrastructure of Hematophagous Insects. *Annu Rev Entomol* 35:219-48
- Birch JR, Racher AJ (2006) Antibody production. *Adv Drug Deliv Rev* 58(5-6):671-85 doi:10.1016/j.addr.2005.12.006
- Bird LE (2011) High throughput construction and small scale expression screening of multi-tag vectors in *Escherichia coli*. *Methods* 55(1):29-37 doi:10.1016/j.ymeth.2011.08.002
- Bishai WR, Rappuoli R, Murphy JR (1987) High-level expression of a proteolytically sensitive diphtheria toxin fragment in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169(11):5140-51
- Blundell TL, et al. (1986) Three-dimensional structural aspects of the design of new protein molecules. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 317(1540)
- Bouvier LA, Niemirowicz GT, Salas-Sarduy E, Cazzulo JJ, Alvarez VE (2018) DNA-damage inducible protein 1 is a conserved metacaspase substrate that is cleaved and further destabilized in yeast under specific metabolic conditions. *FEBS J* 285(6):1097-1110
- Branden C, Tooze J (1999) Introduction to Protein Structure. Garland Pub., New York
- Brener Z (2000) Terapêutica experimental na doença de Chagas In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Neto M (eds) *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Guanabara Koogan Ed., 2^a ed., p 379-388
- Brown EL, et al. (2010) Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* among eleven potential reservoir species from six states across the southern United States. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(8):757-63
- Brunkan AL, Goate AM (2005) Presenilin function and gamma-secretase activity. *J Neurochem* 93(4):769-92
- Buccheri R, et al. (2015) Chagasic Meningoencephalitis in an Hiv Infected Patient with Moderate Immunosuppression: Prolonged Survival and Challenges in the Haart Era. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 57(6):531-5
- Buhaya MH, Galvan S, Maldonado RA (2015) Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines collected at Indio Mountains Research Station. *Acta Trop* 150:97-9
- Burley SK, Berman HM, Kleywegt GJ, Markley JL, Nakamura H, Velankar S (2017) Protein Data Bank (PDB): The Single Global Macromolecular Structure Archive. *Methods Mol Biol* 1607:627-641
- Bustamante JM, Tarleton RL (2014) Potential new clinical therapies for Chagas disease. *Expert Rev Clin Pharmacol* 7(3):317-25
- Cain R, Narramore S, McPhillie M, Simmons K, Fishwick CW (2014) Applications of structure-based design to antibacterial drug discovery. *Bioorg Chem* 55:69-76
- Campbell-Lendrum DH, et al. (2007) House-level risk factors for triatomine infestation in Colombia. *Int J Epidemiol* 36(4):866-72
- Carlier Y, Truyens C (2015) Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop* 151:103-15

- Carlier Y, Truyens C, Deloron P, Peyron F (2012) Congenital parasitic infections: a review. *Acta Trop* 121(2):55-70
- Carrío MM, Villaverde A (2003) Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Lett* 537(1-3):215-21
- Carrío MM, Villaverde A (2005) Localization of chaperones DnaK and GroEL in bacterial inclusion bodies. *J Bacteriol* 187(10):3599-601
- Castro, A.M., Vinaud M, Teixeira A (2009) Chagas Disease: A global health problem In: Teixeira A, Vinaud M, A.M. C (eds) EMERGENCI CHAGAS DISEASE. BENTHAM BOOKS
- Cavasotto CN, Orry AJ (2007) Ligand docking and structure-based virtual screening in drug discovery. *Curr Top Med Chem* 7(10):1006-14
- Cencig S, Coltel N, Truyens C, Carlier Y (2011) Parasitic loads in tissues of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with AmBisome. *PLoS Negl Trop Dis* 5(6):e1216
- Chadd HE, Chamow SM (2001) Therapeutic antibody expression technology. *Curr Opin Biotechnol* 12(2):188-94
- Chalmers JJ, et al. (1990) Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor. *Appl Environ Microbiol* 56(1):104-11
- Chart H, Daniel RM, Cheasty T (2009) The expression of lipopolysaccharide by strains of *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* and *Shigella boydii* and their cross-reacting strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 292(1):21-6
- Chavez-Gutierrez L, et al. (2012) The mechanism of gamma-Secretase dysfunction in familial Alzheimer disease. *EMBO J* 31(10):2261-74
- Chayen NE, Saridakis E (2008) Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nat Methods* 5(2):147-53 doi:10.1038/nmeth.f.203
- Chothia C, Lesk AM (1986) The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J* 5(4):823-6
- Clarke DJ, et al. (2001) Dosage suppressors of pds1 implicate ubiquitin-associated domains in checkpoint control. *Mol Cell Biol* 21(6):1997-2007
- Clayton C, Shapira M (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* 156(2):93-101
- Cohen JE, Gurtler RE (2001) Modeling household transmission of American trypanosomiasis. *Science* 293(5530):694-8
- Cole SL, Vassar R (2008) The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the beta-secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. *J Biol Chem* 283(44):29621-5
- Cooper JB, Khan G, Taylor G, Tickle IJ, Blundell TL (1990) X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* 214(1):199-222 doi:10.1016/0022-2836(90)90156-G
- Cordovez JM, Guhl F (2015) The impact of landscape transformation on the reinfestation rates of *Rhodnius prolixus* in the Orinoco Region, Colombia. *Acta Trop* 151:73-9
- Coura JR (2013) Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(8):962-7
- Coura JR (2015) Special issue on Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110(3):275-6 doi:10.1590/0074-0276150001
- Coura JR, de Castro SL (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(1):3-24
- Coura JR, Vinas PA (2010) Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465(7301):S6-7
- Coura JR, Vinas PA, Junqueira AC (2014) Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109(7):856-62

- d'Avila-Levy CM, Boucinha C, Kostygov A, Santos HL, Morelli KA, Grybchuk-Iermenko A, Duval L, Votypka J, Grellier P, Lukes J (2015) Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110(8):956-65
- Darke PL, et al. (1988) HIV-1 protease specificity of peptide cleavage is sufficient for processing of gag and pol polyproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 156(1):297-303
- Dash C, Kulkarni A, Dunn B, Rao M (2003) Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38(2):89-119
- de Freitas JM, et al. (2006) Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2(3):e24
- de Marco A, et al. (2018) Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids. *FEMS Microbiol Reviews* 43(1):53-72
- de Souza W (2002) Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res* 88(12):1013-25
- de Souza W (2009) Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1:89-100
- De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS (2012) Presenilins and gamma-secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(1):a006304
- De Strooper B, Karran E (2016) The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 164(4):603-15
- Dias JCP, Brener S (1984) Chagas disease and blood transfusion. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79 (Suppl.):139-147.
- Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN (2005) Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* 3(3):251-61
- Docampo R, Moreno SN (1986) Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed Proc* 45(10):2471-6
- Docampo R, Moreno SN (2011) Acidocalcisomes. *Cell Calcium* 50(2):113-9
- Donovan RS, Robinson CW, Glick BR (1996) Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology* 16:145-154
- Dubendorff JW, Studier FW (1991) Creation of a T7 autogene. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase under control of its cognate promoter. *J Mol Biol* 219(1):61-8
- Dunn BM (2002) Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem Rev* 102(12):4431-58
- Eisenberg D, Luthy R, Bowie JU (1997) VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods Enzymol* 277:396-404
- El-Sayed NM, et al. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309(5733):409-15
- Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Branquinha MH, Dos Santos AL, D'Avila-Levy CM (2017) Why calpain inhibitors are interesting leading compounds to search for new therapeutic options to treat leishmaniasis? *Parasitology* 144(2):117-123
- Esler WP, et al. (2000) Transition-state analogue inhibitors of gamma-secretase bind directly to presenilin-1. *Nat Cell Biol* 2(7):428-34
- Estey T, Kang J, Schwendeman SP, Carpenter JF (2006) BSA degradation under acidic conditions: a model for protein instability during release from PLGA delivery systems. *J Pharm Sci* 95(7):1626-39
- Field MC, Carrington M (2009) The trypanosome flagellar pocket. *Nat Rev Microbiol* 7(11):775-86 doi:10.1038/nrmicro2221

- Fischbach MA, Walsh CT (2009) Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 325(5944):1089-93
- Fishbain S, Prakash S, Herrig A, Elsasser S, Matouschek A (2011) Rad23 escapes degradation because it lacks a proteasome initiation region. *Nat Commun* 2:192
- Fluhrer R, et al. (2006) A gamma-secretase-like intramembrane cleavage of TNFalpha by the GxGD aspartyl protease SPPL2b. *Nat Cell Biol* 8(8):894-6
- Francolino SS, et al. (2003) New evidence of spontaneous cure in human Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(1):103-7
- Friedmann E, et al. (2004) Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins. *J Biol Chem* 279(49):50790-8
- Friesner RA, et al. (2006) Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem* 49(21):6177-96
- Fruton JS (2002) A history of pepsin and related enzymes. *Q Rev Biol* 77(2):127-47
- Fujinaga M, Chernai MM, Tarasova NI, Mosimann SC, James MN (1995) Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. *Protein Sci* 4(5):960-72
doi:10.1002/pro.5560040516
- Fukumori A, Fluhrer R, Steiner H, Haass C (2010) Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis. *J Neurosci* 30(23):7853-62
- Fusek M, Mares M, Vetvicka (2013) Cathepsin D. In: Rawlings ND, Salvesen G (eds) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 1 edn. Elsevier, p 54–63
- Gabriely G, Kama R, Gelin-Licht R, Gerst JE (2008) Different domains of the UBL-UBA ubiquitin receptor, Ddi1/Vsm1, are involved in its multiple cellular roles. *Mol Biol Cell* 19(9):3625-37 doi:10.1091/mbc.E07-05-0462
- Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P (2007) Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol* 53(1):11-21
- Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos de Carvalho AC, Ribeiro dos Santos R, Soares MB (2005) Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 49(4):1521-8
- Gascon J, Bern C, Pinazo MJ (2010) Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* 115(1-2):22-7
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: (ed) JMW (ed) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, p 571-607
- Geier G, Banaj HJ, Heid H, Bini L, Pallini V, Zwilling R (1999) Aspartyl proteases in *Caenorhabditis elegans*. Isolation, identification and characterization by a combined use of affinity chromatography, two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and databank analysis. *Eur J Biochem* 264(3):872-9
- Gentil LG, Cordero EM, do Carmo MS, dos Santos MR, da Silveira JF (2009) Posttranscriptional mechanisms involved in the control of expression of the stage-specific GP82 surface glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 109(2):152-8
- Giersiefen H, Hilgenfeld R, Hillisch A (2003) Modern methods of drug discovery: an introduction. *EXS*(93):1-18
- Glick BR (1995) Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnol Adv* 13(2):247-61
- Goldfarb NE, Dunn BM (2013) Human Immunodeficiency Virus 1 Retropepsin *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier, p 190–199

- Gonzalez MS, Nogueira NF, Mello CB, de Souza W, Schaub GA, Ajambuja P, Garcia ES (1999) Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol* 92(2):100-8
- Grinter SZ, Zou X (2014) Challenges, applications, and recent advances of protein-ligand docking in structure-based drug design. *Molecules* 19(7):10150-76
- Haanstra JR, Bakker BM, Michels PA (2014) In or out? On the tightness of glycosomal compartmentalization of metabolites and enzymes in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 198(1):18-28
- Herreman A, Serneels L, Annaert W, Collen D, Schoonjans L, De Strooper B (2000) Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2(7):461-2
- Hoare CA, Wallace FG (1966) Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*(244):69-70
- Huang SY, Grinter SZ, Zou X (2010) Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions. *Phys Chem Chem Phys* 12(40):12899-908
- Huff JR (1991) HIV protease: a novel chemotherapeutic target for AIDS. *J Med Chem* 34(8):2305-14
- Hung CL, Chen CC (2014) Computational approaches for drug discovery. *Drug Dev Res* 75(6):412-8
- Jannin J, Villa L (2007) An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1:95-7
- Jansen AM, Xavier SC, Roque AL (2015) The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop* 151:1-15
- Jaskolski M, Tomasselli AG, Sawyer TK, Staples DG, Hinrikson RL, Scheneider J, Kent SB, Wlodawer A (1991) Structure at 2.5-Å resolution of chemically synthesized human immunodeficiency virus type 1 protease complexed with a hydroxyethylene-based inhibitor. *Biochemistry* 30(6):1600-9
- Jensen C, Herold P, Brunner HR (2008) Aliskiren: the first renin inhibitor for clinical treatment. *Nat Rev Drug Discov* 7(5):399-410
- Jeong S (2017) Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Mol Cells* 40(9):613-620 doi:10.14348/molcells.2017.0096
- Jorgensen WL (2010) Drug discovery: Pulled from a protein's embrace. *Nature* 466(7302):42-3
- Kane JF, Hartley DL (1988) Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* 6(5):95-101
- Kang Y, Vossler RA, Diaz-Martinez LA, Winter NS, Clarke DJ, Walters KJ (2006) UBL/UBA ubiquitin receptor proteins bind a common tetraubiquitin chain. *J Mol Biol* 356(4):1027-35
- Kaplun L, Tzirkin R, Bakhrat A, Shabek N, Ivantsiv Y, Raveh D (2005) The DNA damage-inducible UbL-UbA protein Ddi1 participates in Mec1-mediated degradation of Ho endonuclease. *Mol Cell Biol* 25(13):5355-62
- Keates T, et al. (2012) Expressing the human proteome for affinity proteomics: optimising expression of soluble protein domains and *in vivo* biotinylation. *N Biotechnol* 29(5):515-25
- Kerrigan JJ, Xie Q, Ames RS, Lu Q (2011) Production of protein complexes via co-
doi:10.1016/j.pep.2010.07.015
- Kitagawa M, Miyakawa M, Matsumura Y, Tsuchido T (2002) *Escherichia coli* small heat shock proteins, IbpA and IbpB, protect enzymes from inactivation by heat and oxidants. *Eur J Biochem* 269(12):2907-17

- Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J (2004) Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov* 3(11):935-49
- Klee EW, Ellis LB (2005) Evaluating eukaryotic secreted protein prediction. *BMC Bioinformatics* 6:256 doi:10.1186/1471-2105-6-256
- Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, Dabis LJ, Heimbach JC, Dizon RA, Scolnick EM, Sigal IS (1988) Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(13):4686-90
- Kopan R, Ilagan MX (2004) Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(6):499-504
- Kopan R, Ilagan MX (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the doi:10.1016/j.cell.2009.03.045
- Kornilova AY, Bihel F, Das C, Wolfe MS (2005) The initial substrate-binding site of gamma-secretase is located on presenilin near the active site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(9):3230-5
- Krawitz P, Haffner C, Fluhrer R, Steiner H, Schmid B, Haass C (2005) Differential localization and identification of a critical aspartate suggest non-redundant proteolytic functions of the presenilin homologues SPPL2b and SPPL3. *J Biol Chem* 280(47):39515-23
- Krylov DM, Koonin EV (2001) A novel family of predicted retroviral-like aspartyl proteases with a possible key role in eukaryotic cell cycle control. *Curr Biol* 11(15):R584-7
- Kuczynska-Wisnik D, Kedzierska S, Matuszewka E, Lund P, Taylor A, Lipinska B, Lakowska E (2002) The *Escherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured *in vivo* during extreme heat shock. *Microbiology* 148(Pt 6):1757-65
- Kumar S, Suguna K (2018) Crystal structure of the retroviral protease-like domain of a protozoal DNA damage-inducible 1 protein. *FEBS Open Bio* 8(9):1379-1394
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5(2):150-63
- Laudon H, Hansson EM, Melemln K, Berrigaman A, Farmery MR, Winblad B, Lendahl U, von Heijne G, Naslund J (2005) A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem* 280(42):35352-60
- Laudon H, Winblad B, Naslund J (2007) The Alzheimer's disease-associated gamma-secretase complex: functional domains in the presenilin 1 protein. *Physiol Behav* 92(1-2):115-20
- Lazzari JO, Freilij H (1988) Tratamiento de la enfermedad de Chagas crônica em Argentina. *Rev Pat Trop* 27:11-19
- Leach AR, Shoichet BK, Peishoff CE (2006) Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. *J Med Chem* 49(20):5851-5 doi:10.1021/jm060999m
- Lee JR, Urban S, Garvey CF, Freeman M (2001) Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell* 107(2):161-71
- Leger T, Garcia C, Camadro JM (2016) The Metacaspase (Mca1p) restricts O-glycosylation during farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. *Mol Cell Proteomics* 15(7):2308-23 doi:10.1074/mcp.M116.059378
- Lemberg MK, Bland FA, Weihofen A, Braud VM, Martoglio B (2001) Intramembrane proteolysis of signal peptides: an essential step in the generation of HLA-E epitopes. *J Immunol* 167(11):6441-6
- Lengauer T, Rarey M (1996) Computational methods for biomolecular docking. *Curr Opin Struct Biol* 6(3):402-6
- Levitan D, Greenwald I (1995) Facilitation of lin-12-mediated signalling by sel-12, a *Caenorhabditis elegans* S182 Alzheimer's disease gene. *Nature* 377(6547):351-4 doi:10.1038/377351a0

- Levy-Lahad E, et al. (1995) Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269(5226):973-7
- Li M, Dimaio F, Zhou D, Gustchina A, Lubkowski J, Dauter Z, Baker D, Wlodawer A. (2011) Crystal structure of XMRV protease differs from the structures of other retropepsins. *Nat Struct Mol Biol* 18(2):227-9
- Li T, Yowel CA, Hung SH, Westiling J, Lam MT, Dunn BM, Dame JB (2004) Recombinant expression and enzymatic subsite characterization of plasmeprin 4 from the four *Plasmodium* species infecting man. *Mol Biochem Parasitol* 135(1):101-9
- Li YM, et al. (2000) Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature* 405(6787):689-94
- Lima L, Espinoza-Alvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varon JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MM (2015) Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop* 151:166-77
- Llenas-Garcia J, Hernando A, Fiorante S, Maseda D, Matarraz M, Salto E, Rubio R, Pulido F (2012) Chagas disease screening among HIV-positive Latin American immigrants: an emerging problem. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(8):1991-7
- Lukes J, Guilbride DL, Votypka J, Zikova A, Benne R, Englund PT (2002) Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell* 1(4):495-502
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD (2004) *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(1):1-12
- Macedo AM, Pena SD (1998) Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today* 14(3):119-24
- Madala PK, Tyndall JD, Nall T, Fairlie DP (2010) Update 1 of: Proteases universally recognize beta strands in their active sites. *Chem Rev* 110(6):PR1-31 d
- Manne-Goehler J, Umeh CA, Montgomery SP, Wirtz VJ (2016) Estimating the Burden of Chagas Disease in the United States. *PLoS Negl Trop Dis* 10(11):e0005033
- Manoel-Caetano FS, Silva AE (2007) Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cad Saude Publica* 23(10):2263-74
- Marcili A, Valente VC, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, Naiff RD, Campaner M, Coura JR, Miles MA, Teixeira MM (2009) *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol* 39(5):615-23
- Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sanchez R, Melo F, Sali A (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:291-325
- Martin DL, Lowe KR, McNeill T, Thiele EA, Roellig DM, Zajdowicz J, Hunter SA, Brubaker SA (2015) Potential sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Acta Trop* 149:15-8
- Martin L, Fluhrer R, Reiss K, Kremmer E, Saftig P, Haass C (2008) Regulated intramembrane proteolysis of Bri2 (Itm2b) by ADAM10 and SPPL2a/SPPL2b. *J Biol Chem* 283(3):1644-52
- Martinez-Perez A, Norman FF, Monge-Maillo B, Perez-Molina JA, Lopez-Velez R (2014) An approach to the management of *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease) in immunocompromised patients. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12(3):357-73
- Martins-Melo FR, Carneiro M, Ramos AN, Jr., Heukelbach J, Ribeiro ALP, Werneck GL (2018) The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. *PLoS Negl Trop Dis* 12(6):e0006559

- Martoglio B, Golde TE (2003) Intramembrane-cleaving aspartic proteases and disease: presenilins, signal peptide peptidase and their homologs. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2:R201-6
- Mastrolorenzo A, Rusconi S, Scozzafava A, Barbaro G, Supuran CT (2007) Inhibitors of HIV-1 protease: current state of the art 10 years after their introduction. From antiretroviral drugs to antifungal, antibacterial and antitumor agents based on aspartic protease inhibitors. *Curr Med Chem* 14(26):2734-48
- Mattei DM, Goldenberg S, Morel C (1977) Biochemical strain characterization of *Trypanosoma cruzi* by restriction endonuclease cleavage of kinetoplast-DNA. *FEBS Lett* 74(2):264-8
- McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B (2002) Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *EMBO J* 21(15):3980-8
- Medina JR (2014) Blood safety in the XXI century. Transfusion transmitted infectious diseases. International and Mexican view. *Gac Med Mex* 150:78-83
- Mogk A, Mayer MP, Deuerling E (2002) Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. *Chembiochem* 3(9):807-14
- Molina I, et al. (2014) Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* 370(20):1899-908
- Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L (1980) Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(11):6810-4
- Murray CJ, Lopez AD (1996) Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 274(5288):740-3
- Narayanan S, Sato T, Wolfe MS (2007) A C-terminal region of signal peptide peptidase defines a functional domain for intramembrane aspartic protease catalysis. *J Biol Chem* 282(28):20172-9
- Nguyen VD, Hatahet F, Salo KE, Enlund E, Zhang C, Ruddock LW (2011) Pre-expression of a sulfhydryl oxidase significantly increases the yields of eukaryotic disulfide bond containing proteins expressed in the cytoplasm of E.coli. *Microb Cell Fact* 10:1
- Nobrega AA, et al. (2009) Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis* 15(4):653-5 doi:10.3201/eid1504.081450
- Nooren IM, Thornton JM (2003) Diversity of protein-protein interactions. *EMBO J* 22(14):3486-92
- Nowicka U, et al. (2015) DNA-damage-inducible 1 protein (Ddi1) contains an uncharacteristic ubiquitin-like domain that binds ubiquitin. *Structure* 23(3):542-557
- Nyborg AC, Kornilova AY, Jansen K, Ladd TB, Wolfe MS, Golde TE (2004) Signal peptide peptidase forms a homodimer that is labeled by an active site-directed gamma-secretase inhibitor. *J Biol Chem* 279(15):15153-60
- Opperdoes FR, Borst P, Bakker S, Leene W (1977) Localization of glycerol-3-phosphate oxidase in the mitochondrion and particulate NAD⁺-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the microbodies of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem* 76(1):29-39
- Oravcova J, Bohs B, Lindner W (1996) Drug-protein binding sites. New trends in analytical and experimental methodology. *J Chromatogr B Biomed Appl* 677(1):1-28
- Pagadala NS, Syed K, Tuszynski J (2017) Software for molecular docking: a review. *Biophys Rev* 9(2):91-102
- Palella FJJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD (1998) Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *The New England Journal of Medicine* 26:853-880

- Pearl L, Blundell T (1984) The active site of aspartic proteinases. *FEBS Lett* 174(1):96-101
- Pei X, Wang Q, Meng L, Li J, Yang Z, Yin X, Yang L, Chen S, Wu J (2015) Chaperones-assisted soluble expression and maturation of recombinant Co-type nitrile hydratase in *Escherichia coli* to avoid the need for a low induction temperature. *J Biotechnol* 203:9-16
- Pereira KS, Schmidt FL, Barbosa RL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA (2010) Transmission of chagas disease (American trypanosomiasis) by food. *Adv Food Nutr Res* 59:63-85
- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos LA (2009) Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot* 72(2):441-6
- Perez-Mazliah D, Albareda MC, Alvarez MG, Lococo B, Berocchi GL, Petti M, Viotti RJ, Laucella SA (2012) Allopurinol reduces antigen-specific and polyclonal activation of human T cells. *Front Immunol* 3:295
- Perez-Molina JA (2014) Management of *Trypanosoma cruzi* coinfection in HIV-positive individuals outside endemic areas. *Curr Opin Infect Dis* 27(1):9-15
- Perez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, Lopez-Velez R (2015) Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 15(11):1347-56
- Perteguer MJ, Gomez-Puertas P, Canavate C, Dagger F, Garate T, Valdivieso E (2013) Ddi1-like protein from *Leishmania major* is an active aspartyl proteinase. *Cell Stress Chaperones* 18(2):171-81
- Peterson JS, Guhj F (2010) Geographic distribution of Chagas disease. In: Telleria M, Tibayrent M (eds) *American trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research*. London, Elsevier, p 83-114
- Petrey D, Honig B (2005) Protein structure prediction: inroads to biology. *Mol Cell* 20(6):811-9
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25(13):1605-12
- Phillips MI, Schmidt-Ott KM (1999) The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News Physiol Sci* 14:271-274
- Pinazo MJ, Gascon J (2015) The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Trop* 151:16-20
- Pinho RT, Beltramini LM, Alves CR, De-Simone SG (2009) *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of aspartyl proteases. *Exp Parasitol* 122(2):128-33
- Pinto GS, Zanolla AF, Tovo CV, Gottschall CB, Buss C (2016) Nutritional status and food intake of HCV/HIV coinfecting patients. *Nutr Hosp* 33(5):576
- Pittella JE (2009) Central nervous system involvement in Chagas disease: a hundred-year-old history. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103(10):973-8
- Podlisny MB, Citron M, Amarante P, Sherrington R, Xia W, Zhang J, Diehl T, Levesque G, Fraser P, Haass C, Koo EH, Seubert P, St Gorge-Hyslop P, Teplow DB, Selkoe DJ (1997) Presenilin proteins undergo heterogeneous endoproteolysis between Thr291 and Ala299 and occur as stable N- and C-terminal fragments in normal and Alzheimer brain tissue. *Neurobiol Dis* 3(4):325-37
- Ponting CP, Hutton M, Nyborg A, Baker M, Jansen K, Golde TE (2002) Identification of a novel family of presenilin homologues. *Hum Mol Genet* 11(9):1037-44
- Povelones ML (2014) Beyond replication: division and segregation of mitochondrial DNA in kinetoplasts. *Mol Biochem Parasitol* 196(1):53-60
- Powers JC, Harley AD, Myers DV (1977) *In Acid Proteases, Structure, Function, and Biology* Plenum Press, New York
- Pozio E, Morales MA (2005) The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends Parasitol* 21(2):58-63

- Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V (1963) Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol* 7:95-9
- Rassi A, A. O., Luquetti A, Rassi Jr SG, Rassi CG, Rassi AG (1992) Chagas' disease-clinical features. In: S. Wendel ZB, M. E. Camargo, and A. Rassi (ed.) (ed) Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. Cartgraf Editora Ltd. Sao Paulo, Brazil., p 81-101
- Rassi J A, de Rezende JM, Luquetti AO, Rassi Jr A (2017) Clinical phases and forms of Chagas disease. In: Telleria JaT, M. (ed) American Trypanosomiasis Chagas Disease Science Direct, , p 653-686
- Rassi Jr A, Rassi A, Little WC (2000) Chagas' heart disease. *Clin Cardiol* 23:883-889
- Ratovitski T, Slunt HH, Thinakaran G, Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR (1997) Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin. *J Biol Chem* 272(39):24536-41
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A (2014a) Using the MEROPS Database for Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors and Substrates. *Curr Protoc Bioinformatics* 48:1 25 1-33
- Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A (2014b) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 42(Database issue):D503-9
- Rezende JM (1959) Forma digestiva da moléstia de Chagas. *Revista Goiana de Medicina*:193-227
- Rinas U, Bailey JE (1992) Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 37(5):609-14
- Rosamond J, Allsop A (2000) Harnessing the power of the genome in the search for new antibiotics. *Science* 287(5460):1973-6
- Ross PD, Subramanian S (1981) Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry* 20(11):3096-102
- Rostkowski M, Olsson MH, Sondergaard CR, Jensen JH (2011) Graphical analysis of pH-dependent properties of proteins predicted using PROPKA. *BMC Struct Biol* 11:6 d
- Rudner DZ, Fawcett P, Losick R (1999) A family of membrane-embedded metalloproteases involved in regulated proteolysis of membrane-associated transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(26):14765-70
- Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234(3):779-815
- Salvador F, Molina I, Sulleiro E, Burgos J, Curran A, Van den Eynde E, Villar del Saz S, Navarro J, Crespo M, Ocana I, Ribera E, Falco V, Pahissa A (2013) Tropical diseases screening in immigrant patients with human immunodeficiency virus infection in Spain. *Am J Trop Med Hyg* 88(6):1196-202
- Sangenito LS, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos ALS (2016a) Nelfinavir and lopinavir impair *Trypanosoma cruzi* trypomastigote infection in mammalian host cells and show anti-amastigote activity. *Int J Antimicrob Agents* 48(6):703-711
- Sangenito LS, Goncalves DS, Seabra SH, d'Avila-Levy CM, Santos AL, Branquinha MH (2016b) HIV aspartic peptidase inhibitors are effective drugs against the trypomastigote form of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents* 48(4):440-4
- Sangenito LS, Gonçalves KC, Abi-Chacra EA, Sodre CL, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos AL. (2012) Multiple effects of pepstatin A on *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *Parasitol Res* 110(6):2533-40
- Sangenito LS, Menna-Barreto RF, CM DA-L, Santos AL, Branquinha MH (2014) Decoding the anti-*Trypanosoma cruzi* action of HIV peptidase inhibitors using epimastigotes as a model. *PLoS One* 9(12):e113957
- Santos AL, Braga-Silva LA (2013) Aspartic protease inhibitors: effective drugs against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mini Rev Med Chem* 13(1):155-62

- Santos LO, et al. (2013) Aspartic peptidases of human pathogenic trypanosomatids: perspectives and trends for chemotherapy. *Curr Med Chem* 20(25):3116-33
- Santos LO, Marinho FA, Altoe EF, Vitorio BS, Alves CR, Britto C, Motta MC, Branquinha MH, Santos AL, d'Avila-Levy CM (2009) HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. *PLoS One* 4(3):e4918
- Sartori AM, Ibrahim K, Nunes Westphalen EV, Braz LM, Oliveira OC, Gakiya E, Lopes MH, Shikanai-Yasuda MA (2007) Manifestations of Chagas disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. *Ann Trop Med Parasitol* 101(1):31-50
- Sato C, Takagi S, Tomita T, Iwatsubo T (2008) The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the gamma-secretase. *J Neurosci* 28(24):6264-71
- Sato T, Nyborg AC, Iwata N, Diehl TS, Saido TC, Golde TE, Wolfe MS (2006) Signal peptide peptidase: biochemical properties and modulation by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Biochemistry* 45(28):8649-56
- Schein CH (1989) Production of Soluble Recombinant Protein in Bacteria. *Bio/Technology* 7:1141-1149
- Schlieker C, Bukau B, Mogk A (2002) Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol* 96(1):13-21
- Schmunis GA (2007) Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1:75-85
- Schofield CJ, Galvao C (2009) Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110(2-3):88-100
- Selkoe D, Kopan R (2003) Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annu Rev Neurosci* 26:565-97
- Service RF (2000) Structural genomics. Protein data justice for all. *Science* 288(5468):939-41
- Seyed Hosseini Fin NA, Barshan-Tashnizi M, Sajjadi SM, Asgari S, Mohajerani N, Mirzahoseini H (2019) The effects of overexpression of cytoplasmic chaperones on secretory production of hirudin-PA in *E. coli*. *Protein Expr Purif* 157:42-49
- Shapiro TA, Englund PT (1995) The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* 49:117-43
- Sherrington R, et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375(6534):754-60
- Shikanai-Yasuda MA, Lopes MH, Tolezano JE, Umezawa E, Amato Neto V, Barreto AC, Higaki Y, Moreira AA, Funayama G, Barone AA (1990) [Acute Chagas' disease: transmission routes, clinical aspects and response to specific therapy in diagnosed cases in an urban center]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 32(1):16-27
- Shintani T, Ichishima E (1994) Primary structure of aspergillopepsin I deduced from nucleotide sequence of the gene and aspartic acid-76 is an essential active site of the enzyme for trypsinogen activation. *Biochim Biophys Acta* 1204(2):257-64
- Shintani T, Kobayashi M, Ichishima E (1996) Characterization of the S1 subsite specificity of aspergillopepsin I by site-directed mutagenesis. *J Biochem* 120(5):974-81
- Shoichet BK, McGovern SL, Wei B, Irwin JJ (2002) Lead discovery using molecular docking. *Curr Opin Chem Biol* 6(4):439-46
- Silva A, Almeida B, Sampaio-Marques B, Reis MI, Ohlmeier S, Rodrigues S, Vale Ad, Ludovico P (2011) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a specific substrate of yeast metacaspase. *Biochim Biophys Acta* 1813(12):2044-9
- Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK (2015) Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact* 14:41

- Sirkis R, Gerst JE, Fass D (2006) Ddi1, a eukaryotic protein with the retroviral protease fold. *J Mol Biol* 364(3):376-87
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B (1996) DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 83(2):141-52
- Speed MA, Wang DI, King J (1996) Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition. *Nat Biotechnol* 14(10):1283-7
- Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41(1):207-34
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 185:60-89
- Sun T, Zhang R, Wang J, Li X, Guo X (2013) Computer-aided diagnosis for early-stage lung cancer based on longitudinal and balanced data. *PLoS One* 8(5):e63559
- Takenaka S, Lim L, Fukami T, Yokota S, Doi M (2019) Isolation and characterization of an aspartic protease able to hydrolyze and decolorize heme proteins from *Aspergillus glaucus*. *J Sci Food Agric* 99(4):2042-2047
- Tanzi RE, Bertram L (2005) Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 120(4):545-55
- Teixeira SM, de Paiva RM, Kangussu-Marcolino MM, Darocha WD (2012) Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. *Genet Mol Biol* 35(1):1-17
- Telleria J, Tibayrenc M (2017) American Trypanosomiasis. *Chagas Disease: One Hundred Years of Research*. Elsevier Inc
- Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L, Kim G, Ratovisky T, Davenport F, Nordstedt C, Seeger M, Hardy J, Levey AI, Gandy SE, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS (1996) Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives *in vivo*. *Neuron* 17(1):181-90
- Tibayrenc M, Ayala FJ (2002) The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol* 18(9):405-10
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ (1990) A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(7):2414-8
- Toso MA, Vial UF, Galanti N (2011) [Oral transmission of Chagas' disease]. *Rev Med Chil* 139(2):258-66
- Trudel N, Garg R, Messier N, Sundar S, Ouellette M, Tremblay MJ (2008) Intracellular survival of *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis is significantly reduced by HIV-1 protease inhibitors. *J Infect Dis* 198(9):1292-9 doi:10.1086/592280
- Tsiatsiani L, Timmerman E, De Bock PJ, Vercammen D, Stael S, van de Cotte B, Staes A, Goethals M, Beunens T, Van Damme P, Gevaert K, Van Breusegem F (2013) The *Arabidopsis* metacaspase9 degradome. *Plant Cell* 25(8):2831-47
- Valderrama-Rincon JD, Fisher AC, Merritt JH, Fan YN, Reading CA, Chibba K, Heiss C, Azadi M, DeLisa MP (2012) An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* 8(5):434-6
- Valdivieso E, Dagger F, Rascon A (2007) *Leishmania mexicana*: identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. *Exp Parasitol* 116(1):77-82
- Valdivieso E, Rangel A, Moreno J, Saugar JM, Canavate C, Alvar J, Dagger F (2010) Effects of HIV aspartyl-proteinase inhibitors on *Leishmania* sp. *Exp Parasitol* 126(4):557-63
- Vallejo LF, Rinas U (2004) Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact* 3(1):11

- Vassar R (2001) The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 17(2):157-70
- Veiga-Santos P, Li K, Lameira L, de Carvalho TM, Huang G, Galizzi M, Shang N, Li Q, Gonzales-Pocanowska D, Hernandez-Rodrigues V, Benaim G, Guo RT, Urbina JÁ, Docampo R, de Souza W, Oldfield E (2015) SQ109, a new drug lead for Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 59(4):1950-61
- Ventura S (2005) Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility. *Microb Cell Fact* 4(1):11
- Ventura S, Zurdo J, Narayanan S, Parreno M, Mangues R, Reif B, Chiti F, Giannoni E, Dobson CM, Aviles FX, Serrano L (2004) Short amino acid stretches can mediate amyloid formation in globular proteins: the Src homology 3 (SH3) case. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19):7258-63
- Villaverde A, Carrio MM (2003) Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol Lett* 25(17):1385-95
- Vincentelli R, Cimino A, Geerlof A, Kubo A, Satou Y, Cambillau C (2011) High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli*. *Methods* 55(1):65-72
- Virreira M, Truyens C, Alonso-Vega C, Brutus L, Jijena J, Torrico F, Carlier Y, Svoboda M (2007) Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. *Am J Trop Med Hyg* 77(1):102-6
- Voss M, Schroder B, Fluhrer R (2013) Mechanism, specificity, and physiology of signal peptide peptidase (SPP) and SPP-like proteases. *Biochim Biophys Acta* 1828(12):2828-39
- Vriend G (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* 8(1):52-6, 29
- Vuignier K, Schappler J, Veuthey JL, Carrupt PA, Martel S (2010) Drug-protein binding: a critical review of analytical tools. *Anal Bioanal Chem* 398(1):53-66
- Wal P, Wal A, Rai AK, Dixit A (2011) Aliskiren: An orally active renin inhibitor. *J Pharm Bioallied Sci* 3(2):189-93
- Wang J, Behr D, Nyborg AC, Shearman MS, Golde TE, Goate A (2006) C-terminal PAL motif of presenilin and presenilin homologues required for normal active site conformation. *J Neurochem* 96(1):218-27
- Wang J, Brunkan AL, Hecimovic S, Walker E, Goate A (2004) Conserved "PAL" sequence in presenilins is essential for gamma-secretase activity, but not required for formation or stabilization of gamma-secretase complexes. *Neurobiol Dis* 15(3):654-66
- Weatherly DB, Boehlke C, Tarleton RL (2009) Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. *BMC Genomics* 10:255 doi:10.1186/1471-2164-10-255
- Webb B, Sali A (2017) Protein Structure Modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol* 1654:39-54
- Weihofen A, Binns K, Lemberg MK, Ashman K, Martoglio B (2002) Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science* 296(5576):2215-8
- Weihofen A, Lemberg MK, Friedmann E, Rueeger H, Schmitz A, Paganetti P, Rovelli G, Maroglio B (2003) Targeting presenilin-type aspartic protease signal peptide peptidase with gamma-secretase inhibitors. *J Biol Chem* 278(19):16528-33
- White RE, Dickinson JR, Semple CA, Powell DJ, Berry C (2011a) The retroviral proteinase active site and the N-terminus of Ddi1 are required for repression of protein secretion. *FEBS Lett* 585(1):139-42
- White RE, Powell DJ, Berry C (2011b) HIV proteinase inhibitors target the Ddi1-like protein of *Leishmania* parasites. *FASEB J* 25(5):1729-36
- Wlodawer A, Erickson JW (1993) Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu Rev Biochem* 62:543-85

- Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398(6727):513-7
- Xavier SC, Roque AL, Bilac D, de Araujo VA, da Costa Neto SF, Lorosa ES, da Silva LF, Jansen AM (2014) Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 8(5):e2878
- Xiao R, et al. (2010) The high-throughput protein sample production platform of the Northeast Structural Genomics Consortium. *J Struct Biol* 172(1):21-33
- Yurchenco PD, Schittny JC (1990) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* 4(6):1577-90
- Zanier K, Charbonnier S, Sidi AO, McEwen AG, Ferrario MG, Poussin-Courmontage P, Cura V, Brimer N, Babh KO, Ansari T, Muller I, Stote RH, Cavarelli J, Vande Pol S, Trave G (2013) Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *Science* 339(6120):694-8
- Zavodszky MI, Rohatgi A, Van Voorst JR, Yan H, Kuhn LA (2009) Scoring ligand similarity in structure-based virtual screening. *J Mol Recognit* 22(4):280-92
- Zelenski NG, Rawson RB, Brown MS, Goldstein JL (1999) Membrane topology of S2P, a protein required for intramembranous cleavage of sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 274(31):21973-80
- Zhang Y, Skolnick J (2005) TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res* 33(7):2302-9
- Zhang Z, Nadeu P, Song W, Donoviel D, Yuan M, Berstein A, Yanker BA (2000) Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol* 2(7):463-5 doi:10.1038/35017108
- Zingales B (2018) *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop* 184:38-52
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG (2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(7):1051-4
- Zingales B, Milles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo MA, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12(2):240-53


9.Anexo I

RESEARCH NOTE

Open Access



Docking simulation between HIV peptidase inhibitors and *Trypanosoma cruzi* aspartyl peptidase

Vanessa V. S. Castilho^{1†}, Keyla C. S. Gonçalves^{2†}, Karina M. Rebello², Luiz P. R. Baptista¹, Leandro S. Sangenito³, Helena L. C. Santos², Marta H. Branquinho³, André L. S. Santos³, Rubem F. S. Menna-Barreto⁴, Ana C. Guimarães^{1‡} and Claudia M. d'Avila-Levy^{2,5‡*} 

Abstract

Objective: The low investment in research, diagnosis and treatment are factors that contribute to the continuity of Chagas' disease as a neglected tropical diseases (NTDs). In this context, the repositioning of drugs represents a useful strategy, in the search for new chemotherapeutic approaches for NTDs. HIV aspartic peptidase inhibitors (HIV IPs) are good candidates for drug repurposing. Here, we modeled the three dimensional structure of an aspartyl peptidase of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease, aligned it to the HIV aspartyl peptidase and performed docking binding assays with the HIV PIs.

Results: The 3D structure confirmed the presence of acid aspartic residues, which are critical to enzyme activity. The docking experiment revealed that HIV IPs bind to the active site of the enzyme, being ritonavir and lopinavir the ones with greater affinity. Benznidazole presented the worst binding affinity, this drug is currently used in Chagas' disease treatment and was included as negative control. These results together with previous data on the trypanocidal effect of the HIV PIs support the hypothesis that a *T. cruzi* aspartyl peptidase can be the intracellular target of these inhibitors. However, the direct demonstration of the inhibition of *T. cruzi* aspartyl peptidase activity by HIV PIs is still a goal to be persuaded.

Keywords: Aspartic peptidase, Chagas' disease, Chemotherapy, Neglected tropical diseases, Drug-repurposing

Introduction

Chagas disease, caused by the kinetoplastid parasite *Trypanosoma cruzi*, affects 8 million people worldwide and about 10,000 people die of complications linked to the disease [1]. The classical contamination route involves a triatomine vector bite, usually associated with poor habitation conditions in Latin America. However, human immigration associated with blood transfusions contributed to the spread of the disease to

North America, Europe and some Western Pacific countries. This change in epidemiological scenario led to an increased report of co-infected patients with Chagas disease and acquired immune deficiency syndrome (AIDS) [2–4]. Even though more than a century has passed since the discovery of Chagas disease, the drug repertoire is still based on benznidazole and nifurtimox, which are compounds with severe side effects, questionable specificity and efficacy [5, 6]. Although some promising drug candidates are under development, such as ravuconazole, posaconazole and fexinidazole [7–9], the questionable economic return of investing in drug development for a disease mainly associated with poverty discourages pharmaceutical companies to search for new chemotherapeutics against this parasitic illness [5].

*Correspondence: davila.levy@ioc.fiocruz.br

[†]Vanessa V. S. Castilho and Keyla C. S. Gonçalves contributed equally to this work

[‡]Ana C. Guimarães and Claudia M. d'Avila-Levy share senior authorship

²Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



In this context, drug-repurposing strategy has the potential to facilitate an effective chemotherapeutic approach [10, 11]. The marked improvement in the life expectancy of AIDS sufferers after the incorporation of HIV aspartic peptidase inhibitors (HIV IPs) into the drug cocktail, the so-called highly active anti-retroviral therapy (HAART), was due to reduction in viremia, recovery of the immune response and a direct action on opportunistic pathogens [reviewed in 3]. The last effect has been extensively demonstrated in *Trypanosoma cruzi* by our research group [3, 12–14] and others [15], although the mode of action and intracellular target of the compounds are still unknown and have been a matter of extensive research [3, 14, 16, 17]. Here, we identified in the genome of *T. cruzi*, CL-Brener strain, a homologue of the HIV retroviral peptidase and selected a crystalized protein for generating a three dimensional model, which was aligned with HIV aspartyl peptidase. Then, we performed docking experiments between the modeled 3D protein and HIV PIs. We have also included pepstatin A and benznidazole as a reference for positive and negative controls, respectively, since the former is a classical aspartyl peptidase inhibitor [18] and the latter a classical drug used in Chagas' disease treatment with unrelated mechanism of action and binding site [5].

Main text

Methods

Comparative modeling

The crystal structures of the retroviral aspartic peptidase domain of DNA-damage inducible proteins (DDI-1 like) from *T. cruzi* were not available in the Protein Data Bank (PDB) and a comparative modeling was performed to predict their 3D structures. The amino acid sequences of these target proteins of *T. cruzi* (strain CL brener; entries Tc00.1047053510155.40 and Tc00.1047053511585.40 from TriTrypdb) were submitted to BLASTp search through the PDB to retrieve similar proteins with available 3D structure. The crystal structures selected as templates were the retroviral peptidase-like domains of the DDI-1 like proteins from *Homo sapiens* (PDB ID 4RGH, sequence identity 43% for Tc00.1047053510155.40 and 44% for Tc00.1047053511585.40) and *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID 4Z2Z, sequence identity 41% for both *T. cruzi* sequences). The comparative modeling was carried out using the selected templates and the automodel module from MODELLER 9v16 [19]. The two final homodimeric models of aspartyl peptidase domains (presenting the residues 227–353/354) of the target proteins of *T. cruzi* were selected based on the DOPE scoring function. These models were called TcRP-A and TcRP-B for the retroviral aspartic peptidase domain of Tc00.1047053510155.40 and Tc00.1047053511585.40,

respectively. An energy minimization using the Amber ff14SB force field through UCSF CHIMERA interface [20] was performed to improve the overall structure geometry of the both TcRP-A and TcRP-B models. The stereochemical quality of the two refined models was evaluated using the ERRAT and VERIFY 3D from SAVES server (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>) and MOLPROBITY (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>).

A multiple sequence alignment was performed using the ClustalW through Multiple Sequence Viewer of Maestro (Schrodinger Suite) in order to evaluate the sequence identity and similarity between the aspartyl peptidase domain of DDI-1 like proteins from *T. cruzi* and the HIV-1 peptidase. The superposition of the 3D structures of the refined models and the HIV-1 peptidase (PDB ID 3OXC) and the root mean square deviation (RMSD) between them were obtained with the “super” command in Pymol v1.8.2.1 (<http://www.pymol.org/>). Further alignments and comparisons with these structures were carried out with the TM-align algorithm (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/>) [21].

Molecular docking

In order to predict the inhibitory potential and binding modes of HIV-PIs towards the aspartyl peptidase domain of DDI-1 like protein of *T. cruzi*, molecular docking assays were performed with the constructed TcRP-A and TcRP-B models. Besides that, pepstatin A, a classical aspartyl peptidase inhibitor [18], was included as a positive control, while benznidazole was used as a negative control, since it has an unrelated mode of action. These ligands were retrieved in the sdf format from PubChem and prepared by the ligand preparation module (LigPrep) of Maestro. As an outcome, ionization states at a pH of 3.5 and 5.0 and tautomers were generated, the specified chiral centers were retained, and the resulted molecules were energetically minimized using the OPLS-2005 force field.

Both *T. cruzi* protein models were prepared using the protein preparation wizard of Maestro, in which hydrogen atoms were added, and protonation states were determined at pH 3.5 with PROPKA. Grids were generated around the potential active site of the two prepared protein models using the Receptor Grid Generation module of Glide, also from Maestro. The grid box was set to have 35Å of edge with coordinates $x = -220.53$, $y = 32.3$, and $z = 16.96$ for TcRP-A and $x = 66.35$, $y = -8.35$, and $z = 13.47$ for TcRP-B, both coordinates were determined using the Asp248A, Asp248B and Arg279B (one of the potential substrate binding residues) as centroids. Following ligand and protein preparation, as well as grid generation, docking simulations were performed with the extra precision (XP) protocol from Glide (GlideXP)

(version 6.7) [22]. The potential inhibitors were docked in the potential active site of TcRP-A and TcRP-B domains. The inhibitors were ranked based on their docking scores.

In a similar manner, the HIV protein (PDB ID 3OXC) was prepared with protein preparation wizard at pH 5.0, once the optimal pH range described for HIV-1 peptidase activity is 4–6 in contrast to eukaryotic aspartyl peptidases, which have, in general, optimal pH range of 2–4 [23]. The grid box was centered on the crystal structure of inhibitor saquinavir complexed with the studied HIV protein ($x=5.04$, $y=-2.74$, and $z=14.8$) and had an edge of 35 Å. Besides the redocking of saquinavir inhibitor with XP protocol from Glide, all other well know HIV inhibitors were also docked, and benznidazole compound was used as negative control.

Results and discussion

To perform structural analysis and molecular docking studies, two 3D structures of the aspartyl peptidase domain of DDI-1 like proteins from *T. cruzi* were constructed through comparative modeling. For this purpose, the homodimeric retroviral aspartyl peptidase domains of DDI-1 like proteins from humans (PDB ID 4RGG) and yeast (PDB ID 4Z2Z) were used as templates. The models TcRP-A and TcRP-B were selected by considering their DOPE scores of $-29,695.480$ and $-29,901.357$, the lowest among the set of models generated for Tc00.1047053510155.40 and Tc00.1047053511585.40, respectively. The Ramachandran plot of the two final refined models indicated that 96.4% and 96% of the amino acids for TcRP-A and TcRP-B, respectively, are in favored regions, and 99.2% (in both cases) are in allowed regions (data not shown). The Errat overall quality factor for TcRP-A was 90.783 and 87.037 for TcRP-B. The Verify 3D server estimated that 95.31 and 97.66% of the residues of TcRP-A and TcRP-B, respectively, had an averaged 3D-1D score ≥ 0.2 . These results indicate that the two refined models have good quality and are reliable for carrying out further computational analysis.

The presence of a retroviral aspartyl peptidase domain in the DDI-1 like proteins of *T. cruzi* suggests the structural similarity between the same domains in proteins of different organisms. In order to visualize these similarities, a comparison between the primary, secondary and 3D structures of the HIV-1 peptidase domain (PDB ID: 3OXC) and the generated models were performed (Fig. 1). The sequence alignment of TcRP-A/B and HIV-1 peptidase showed an overall identity of 12% and a similarity of 28% (Fig. 1a). Despite the low identity, the superimposition of the 3D structures confirms the similarity between these domains with an RMSD of

2.67 Å for TcRP-A and 2.98 Å for TcRP-B in relation to HIV-1 peptidase (Fig. 1b). The sequence-order independent structure comparisons using the TM-align emphasize these structural similarities with a TM-score value of ~ 0.71 for both models towards HIV-1 peptidase, indicating that these domains have the same fold. The potential active site of the retroviral aspartyl peptidase domain of *T. cruzi* (TcRP-B model) is shown in Fig. 1c. The models for the retroviral aspartyl peptidase domain were generated as homodimers with the active sites containing residues from both subunits A and B such as the catalytic aspartic peptidases (Asp238A and B). Besides other active site residues, the potential substrate-binding loop (residues Ala274-Gly280) described for retroviral aspartyl peptidase domain of yeast [24] are also indicated in Fig. 1c.

After the design and validation of the 3D models, we performed molecular docking simulations aiming to predict inhibitory potential (docking scores) and the intermolecular interactions of the HIV aspartic peptidase inhibitors towards the active sites of the two modeled retroviral aspartyl peptidase domains (TcRP-A and TcRP-B) of the DDI-1 like proteins from *T. cruzi*. The ligands were classified based on their docking scores, as shown in Table 1, and only the lowest values for each compound were considered in this evaluation. As expected, pepstatin A, a well-described and potent aspartyl peptidase inhibitor [18], had the lowest docking scores in comparison with the other ligands (except ritonavir for TcRP-B). In both modeled domains, pepstatin A interacts through hydrogen bonding with Gln252B and the catalytic residues Asp238A and B (Fig. 2A, D). Besides that, in the case of TcRP-A, pepstatin makes a hydrogen bond with Arg279A, Arg253A and B, and Gly250A, while with TcRP-B, only one hydrogen bond with Asp312A is observed. Considering the HIV-PIs, ritonavir and lopinavir had lower docking scores to TcRPA and B (Table 1), it is conceivable that they have the potential to inhibit the activity of both domains. As observed for the positive control, these inhibitors form hydrogen bonds with the catalytic aspartates (Fig. 2B, C, E, F). On the other hand, atazanavir and benznidazole were the worst ranked, presenting higher docking scores due mainly to the poor interactions observed (Fig. 2G–J). These two compounds probably have no inhibitory activity or binding on the aspartyl peptidase domains of DDI-1 like protein from *T. cruzi*.

The structures of HIV and *T. cruzi* aspartyl peptidases present remarkable 3D similarities, to verify if the molecular docking outcomes are also paralleled, docking experiments were carried out using HIV peptidase. Although the docking scores of ligands in different proteins cannot be directly compared, the use of positive

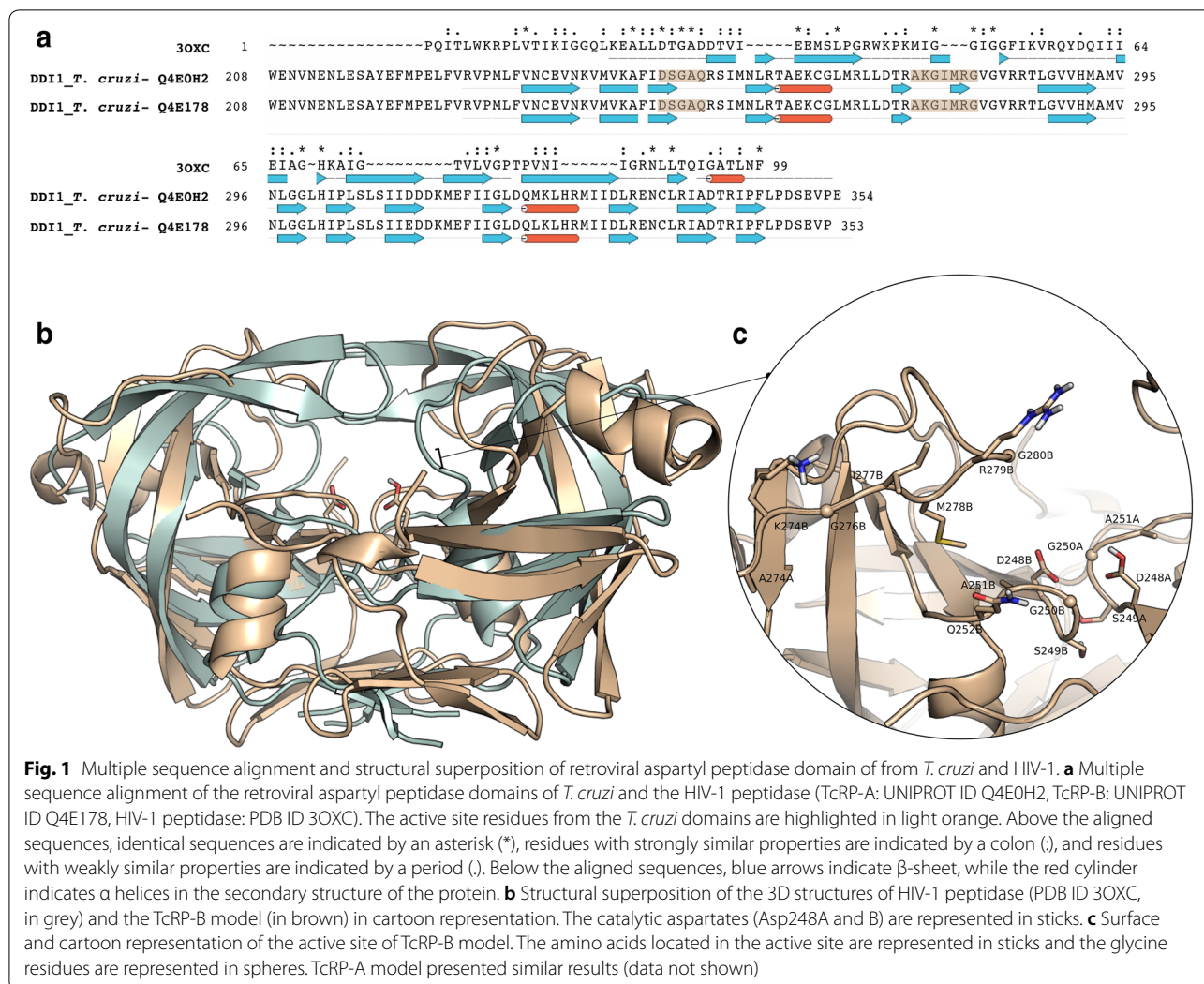
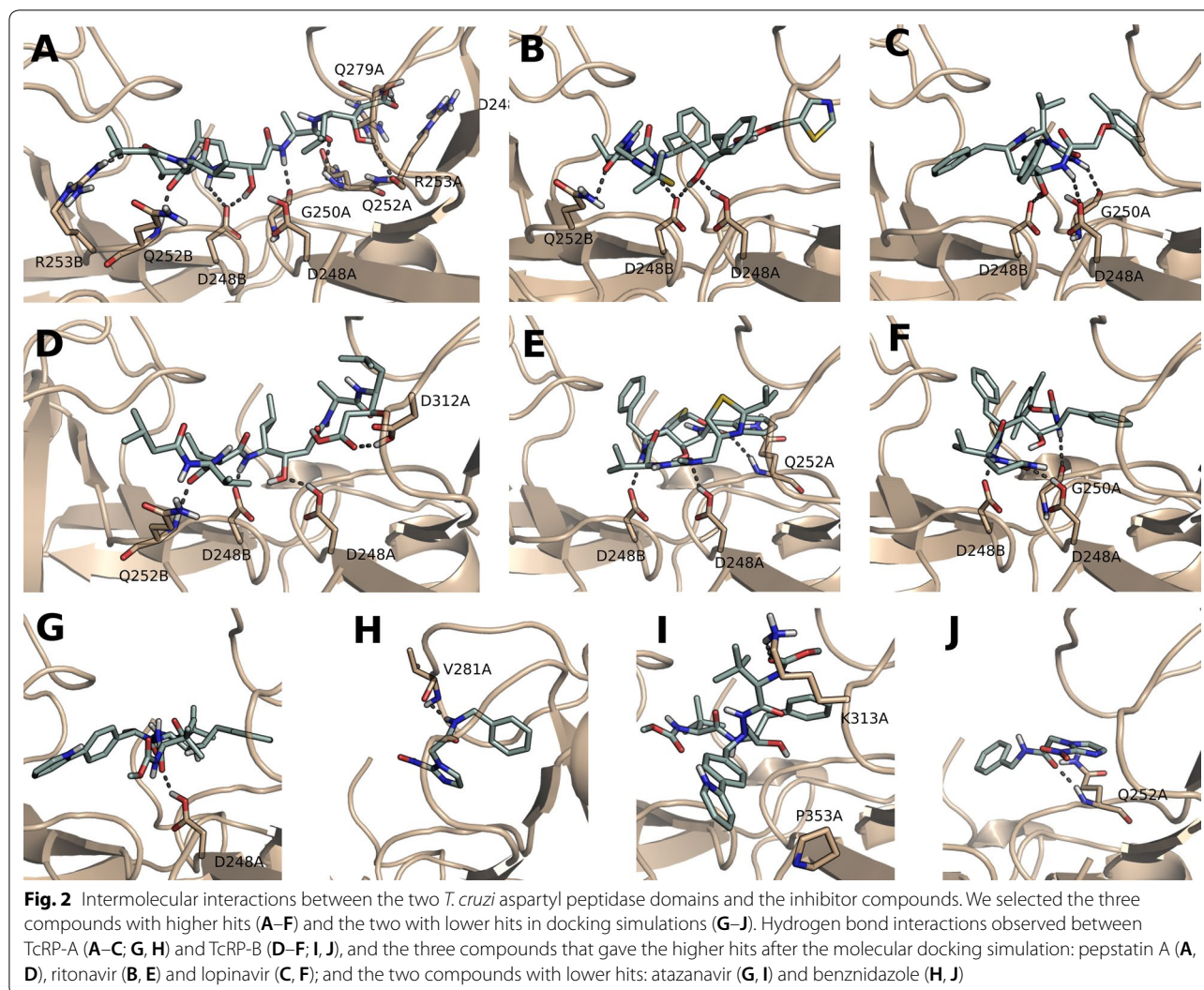


Table 1 Molecular docking simulations between the 3D-modelled DDI1-like proteins from *T. cruzi* and HIV-PIs

TcRP-A		TcRP-B		HIV-1 peptidase	
Compounds	DS	Compounds	DS	Compounds	DS
1. Pepstatin A	-9.526	1. Ritonavir	-8.244	1. Saquinavir	-12.086
2. Ritonavir	-7.667	2. Pepstatin A	-7.898	2. Atazanavir	-12.073
3. Lopinavir	-7.157	3. Lopinavir	-7.869	3. Nelfinavir	-10.810
4. Saquinavir	-6.557	4. Nelfinavir	-6.624	4. Tipranavir	-10.573
5. Indinavir	-6.527	5. Darunavir	-6.072	5. Lopinavir	-10.369
6. Tipranavir	-6.318	6. Saquinavir	-5.213	6. Ritonavir	-9.907
7. Amprenavir	-6.115	7. Amprenavir	-4.824	7. Indinavir	-9.171
8. Nelfinavir	-6.076	8. Indinavir	-4.781	8. Darunavir	-8.874
9. Darunavir	-5.729	9. Tipranavir	-4.673	9. Amprenavir	-8.764
10. Benznidazole	-4.147	10. Atazanavir	-4.5	10. Pepstatin A	-8.388
11. Atazanavir	-1.664	11. Benznidazole	-3.662	11. Benznidazole	-5.343

For comparison purposes, HIV aspartyl peptidase was also analyzed. Pepstatin A (positive control) and benznidazole (negative control) TcRP-A and TcRP-B are 3D models of *T. cruzi* DDI1-like proteins, Tc00.1047053510155.40 and Tc00.1047053511585.40, respectively DS docking score



and negative controls allows the comparison of binding modes and intermolecular interactions. Therefore, we used benznidazole again as a negative control and all the known HIV aspartyl peptidase inhibitors as positive controls, including pepstatin A, which is also described in the literature as an inhibitor of the HIV enzyme [25]. As expected, benznidazole had the worst docking score, followed by pepstatin A. The top scored compounds were saquinavir (originally complexed in the studied HIV protein structure, presenting an RMSD of 1.03 Å in relation to the docking pose), atazanavir and nelfinavir. This result is in contrast to the *T. cruzi* protein that had pepstatin A, ritonavir and lopinavir as the better scored compounds (Table 1 and Additional file 1: Fig. S1). This contrast is expected since there was no rational design towards *T. cruzi* molecule. When comparing the predicted binding modes of these top scored inhibitors, similar key interactions can be observed in HIV and *T. cruzi* proteins,

mainly with backbone and side chains of aspartates (including the catalytic ones) and glycines present in both active sites: Asp130B, Asp129B, Asp29A, Asp25A, Gly27A and Gly148B from HIV and Asp248A, Asp248B, Asp312A and Gly250A from *T. cruzi* (compare Fig. 2 and Additional file 1: Fig. S1). Therefore, the docking results predicted similar binding mechanisms, suggesting the binding of HIV PIs to *T. cruzi* DDI-1 protein in vitro.

DDI-1 gene product of *T. cruzi*, which shares homology to HIV aspartyl peptidase, is not biochemically characterized and has no crystallography structure resolved yet. In HIV and several fungi, HIV PIs target is an acidic aspartyl peptidase [26]. Curiously, although the intracellular target in trypanosomatids is still unknown, HIV PIs have a strong trypanocidal effect [3, 13–17], and have also a strong leishmanicidal activity [reviewed in 26]. The HIV PIs are capable of inhibiting the enzymatic cleavage of cathepsin D fluorogenic peptide substrates by crude

extracts of either *T. cruzi* or *Leishmania* spp. [12, 14, 27]. To evaluate the structure–function relationship and the possible binding of HIV PIs to *T. cruzi* aspartyl peptidase, we realized homology modeling and molecular docking studies of the catalytic domain of the DDI-1 like protein from *T. cruzi*. The 3D model generated exhibited structural similarities with the proteins from the A2 aspartyl peptidase family, suggesting that the retroviral domain of the DDI-1 like must be functional. Molecular docking revealed that eight out of nine HIV IPs tested presented binding affinity similar to the positive control. The intracellular target of HIV IPs in *T. cruzi* is still unknown and multifactorial effects exerted by these inhibitors may be responsible for disturbance in parasite homeostasis that culminates in cell death. Recently, we have demonstrated on *Leishmania amazonensis* that one of the possible mechanisms of action of HIV IPs is related to lipids metabolism disturbance [27, 28]. Therefore, studies aiming to demonstrate the direct binding of HIV IPs in vitro to the DDI-1 like protein from *T. cruzi* can provide further information on the intracellular target of these inhibitors.

Limitations

An important step towards the determination of the intracellular target of the HIV PIs in *T. cruzi* would be the direct demonstration of the binding or the aspartyl peptidase activity inhibition by these compounds towards the purified enzyme. Up to now, our attempts to generate active recombinant *T. cruzi* DDI-1-like aspartyl peptidase in *Escherichia coli* BL-21 or to purify the enzyme from *T. cruzi* crude extracts through pepstatin-A affinity chromatography were unsuccessful.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Intermolecular interactions obtained from the molecular docking pose of the assayed compounds and HIV aspartyl peptidase. We selected three compounds with the highest hits from the molecular docking simulation: saquinavir, atazanavir, and neftinavir (A–C). In A, the picture on the square represents the superposition of co-crystal (green) and redocked saquinavir structures (orange).

Abbreviations

AIDS: acquired immune deficiency syndrome; DDI-1 like: DNA-damage inducible proteins; HAART: highly active anti-retroviral therapy; HIV IPs: HIV aspartyl peptidase inhibitors; LigPrep: ligand preparation module; NTDs: neglected tropical diseases; PDB: Protein Data Bank; RMSD: root mean square deviation.

Authors' contributions

Conceived the experiments: MHB, ALS, RFSB, ACG, CMD; Performed the experiments: KCSG, VVSC, KMR, LPRB, LSS; Analyzed the data: KCSG, VVSC, LPRB, HLCS, MHB, ALS, RFSB, ACG, CMD; Wrote the manuscript: KCSG, VVSC, LPRB, HLCS, MHB, ALS, RFSB, ACG, CMD. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. ² Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. ³ Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes (LEAMER), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴ Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. ⁵ Present Address: de Duve Institute, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

Acknowledgements

The authors are grateful to the research team led by Dr. Jaime M Santana (Universidade de Brasília) for the extensive efforts on the cloning and expression of *T. cruzi* aspartyl peptidase, namely: Flavia N. Motta, Isabela M. Dourado and Carla N. de Araújo. The research team led by Dr. Philip Noel Suffys (Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz) for the efforts on peptidase expression conditions variation and peptidase purification, namely Dr. Harrison Magdinier Gomes, Raquel L. F. Teixeira and Dr. Márcia Quinhones Pires Lopes. We are also grateful to Dr. Laurent Dardenne (Laboratório Nacional de Computação Científica) for kindly allowing access to the software.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

Data are presented in the main manuscript.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). The funding bodies had no role in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 27 September 2018 Accepted: 9 November 2018

Published online: 21 November 2018

References

- Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin N Am*. 2012;26:275–91.
- Almeida EA, Ramos Júnior AN, Correia D, Shikanai-Yasuda MA. Co-infection *Trypanosoma cruzi*/HIV: systematic review (1980–2010). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44:762–70.
- Santos AL, d'Ávila-Levy CM, Kneipp LF, Sodré CL, Sengenito LS, Branquinho MH. The widespread anti-protozoal action of HIV aspartic peptidase inhibitors: focus on *Plasmodium* spp., *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi*. *Curr Top Med Chem*. 2017;17:1303–17.
- Bern C. Chagas disease in the immunosuppressed host. *Curr Opin Infect Dis*. 2012;25:450–7.
- Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108:962–7.
- Salomon CJ. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *J Pharm Sci*. 2012;101:888–94.
- Torrelee E, Bourdin Trunz B, Tweats D, Kaiser M, Brun R, Mazué G, Bray MA, Pecoul B. Fexinidazole—a new oral nitroimidazole drug candidate

- entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e923.
8. Urbina JA. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(Suppl 1):311–8.
 9. Bahia MT, De Andrade IM, Martins TA, Do Nascimento AF, Diniz LF, Caldas IS, Talvani A, Trunz BB, Torreele E, Ribeiro I. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1870.
 10. Ekins S, Williams AJ, Krasowski MD, Freundlich JS. *In silico* repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discov Today*. 2011;16:298–310.
 11. Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Branquinha MH, Dos Santos AL, d'Avila-Levy CM. Why calpain inhibitors are interesting leading compounds to search for new therapeutic options to treat leishmaniasis? *Parasitology*. 2017;144:117–23.
 12. Sangenito LS, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos ALS. Nelfinavir and lopinavir impair *Trypanosoma cruzi* trypomastigote infection in mammalian host cells and show anti-amastigote activity. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48:703–11.
 13. Sangenito LS, Gonçalves DS, Seabra SH, d'Avila-Levy CM, Santos AL, Branquinha MH. HIV aspartic peptidase inhibitors are effective drugs against the trypomastigote form of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48:440–4.
 14. Sangenito LS, Menna-Barreto RF, Avila-Levy CM D, Santos AL, Branquinha MH. Decoding the anti-*Trypanosoma cruzi* action of HIV peptidase inhibitors using epimastigotes as a model. *PLoS ONE*. 2014;9:e113957.
 15. Bellera CL, Balcazar DE, Vanrell MC, Casassa AF, Palestro PH, Gavernet L, Labriola CA, Gálvez J, Bruno-Blanch LE, Romano PS, Carrillo C, Talevi A. Computer-guided drug repurposing: identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir. *Eur J Med Chem*. 2015;93:338–48.
 16. Sangenito LS, de Guedes AA, Gonçalves DS, Seabra SH, d'Avila-Levy CM, Santos ALS, Branquinha MH. Deciphering the effects of nelfinavir and lopinavir on epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Int*. 2017;66:529–36.
 17. Sangenito LS, Menna-Barreto RFS, Oliveira AC, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos ALS. Primary evidence of the mechanisms of action of HIV aspartyl peptidase inhibitors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;52:185–94.
 18. Umezawa H, Aoyagi T, Morishima H, Matsuzaki M, Hamada M. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. *J Antibiot (Tokyo)*. 1970;23:259–62.
 19. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. 1993;234:779–815.
 20. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004;25:1605–12.
 21. Zhang Y, Skolnick J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:2302–9.
 22. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, Sanschagrin PC, Mainz DT. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem*. 2006;49:6177–96.
 23. Ido E, Han HP, Kezdy FJ, Tang J. Kinetic studies of human immunodeficiency virus type 1 protease and its active-site hydrogen bond mutant A28S. *J Biol Chem*. 1991;266:24359–66.
 24. Feng X, Shenker S, Svoboda M, Kožiček M, Konvalinka J, Gehring K. Structural studies of the yeast DNA damage-inducible protein Ddi1 reveal domain architecture of this eukaryotic protein family. *Sci Rep*. 2016;6:33671.
 25. Tyagi SC. Inhibitors of human immunodeficiency virus-1 protease. *Biochem Cell Biol*. 1992;70:309–15.
 26. Santos ALS. HIV aspartyl protease inhibitors as promising compounds against *Candida albicans*. *World J Biol Chem*. 2010;1:21–30.
 27. Santos LO, Vitória BS, Branquinha MH, Pedrosa e Silva CM, Santos AL, Avila-Levy CM. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68:348–53.
 28. Rebello KM, Andrade-Neto VV, Zuma AA, Motta MCM, Gomes CRB, de Souza MVN, Atella GC, Branquinha MH, Santos ALS, Torres-Santos EC, d'Avila-Levy CM. Lopinavir, an HIV-1 peptidase inhibitor, induces alteration on the lipid metabolism of *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Parasitology*. 2018;145:1304–10.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

