

Ministério da Saúde

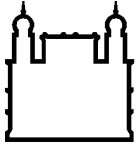
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Complexo gama-secretase em Trypanosoma cruzi : bases para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos específicos e novos alvos quimioterapêuticos

Carolina Conceição Bottino Gruszkowski

RIO DE JANEIRO
2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Carolina Conceição Bottino Gruszkowski

Complexo gama-secretase em *Trypanosoma cruzi*: bases para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos específicos e novos alvos quimioterapêuticos

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Salvatore Giovanni de Simone

RIO DE JANEIRO

2012

ii

G892

Gruszkowski, Carolina Conceição Bottino.

Complexo gama-secretase em *Trypanosoma cruzi*: bases para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos específicos e novos alvos quimioterapêuticos / Carolina Conceição Bottino Gruszkowski. – Rio de Janeiro, 2012.

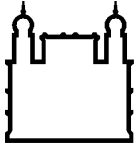
xiv, 62 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2012.

Bibliografia: f. 54-62

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Complexo gama-secretase.
3. Quimioterapia. 4. Diagnóstico. I.Título.

CDD 616.936 3



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Carolina Conceição Bottino Gruszkowski

Complexo gama-secretase em *Trypanosoma cruzi*: bases para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos específicos e novos alvos quimioterapêuticos

ORIENTADOR: Prof. Dr. Salvatore Giovanni de Simone

Aprovada em: 16 / 03 / 2012

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Rosa Teixeira Pinho (IOC – FIOCRUZ) - **Presidente**
Prof. Dr. Saulo Cabral Bourguignon (IB - UFF)
Prof. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes (UECE)
Prof. Dra. Raquel Elisa da Silva Lopez (Farmanguinhos/FIOCRUZ) - suplente
Prof. Dra. Elvira Maria S. C. Bou Habib (Instituto de Microbiologia – UFRJ) - suplente

Rio de Janeiro, 16 de março de 2012.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Complexo gama-secretase em *Trypanosoma cruzi*: bases para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos específicos e novos alvos quimioterapêuticos

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carolina Conceição Bottino Gruszkowski

Os métodos de diagnóstico usados hoje para a Doença de Chagas, embora simples e de baixo custo, podem apresentar baixas sensibilidade e especificidade ou reações cruzadas com outros patógenos. Da mesma forma, os medicamentos usados no tratamento apresentam severos efeitos colaterais. Dentre os vários alvos metabólicos sugeridos, as proteases têm sido apontadas como moléculas candidatas devido às suas particularidades. Recentemente o nosso grupo identificou duas aspartil proteases em *T. cruzi*: uma solúvel (Cruzipsina-II) e outra membranar (Cruzipsina-I); entretanto, suas funções biológicas permaneceram desconhecidas. Os nossos resultados demonstram, pela 1ª vez, a existência de um complexo proteolítico membranar em *T. cruzi* com propriedades similares ao complexo γ -secretase de outras células eucarióticas. Usando ferramentas de bioinformática localizamos em banco de dados as seqüências primárias de 3 das 4 proteínas do complexo (presenilina, nicastrina e Aph-1). Esta informação foi importante para caracterizarmos através de síntese paralela de peptídeos os epitopos B lineares das 3 proteínas usando soros de pacientes. A presenilina apresentou 10 epitopos majoritários, a nicastrina, 5 e a Aph-1, 10. Alguns epitopos foram selecionados por vários critérios e anticorpos anti-peptídeos obtidos em coelhos. O soro anti-peptídeo PRE-2 de presenilina identificou por *immunoblotting* a banda de 48 kDa na fração CZP-I como sendo presenilina, enquanto o soro anti-peptídeo NIC-1 de nicastrina apresentou também uma marcação na mesma posição. A análise por microscopia confocal em epimastigotas localizou as proteínas predominantemente nas regiões anterior e mediana das células. Além disso, as marcações mostraram-se mais fortes em células permeabilizadas, sugerindo a co-localização de ambas as proteínas nas membranas internas da célula. Um teste de ELISA empregando 4 peptídeos sintéticos da presenilina e nicastrina de *T. cruzi* apresentou sensibilidade e especificidade de 71,59% e 70,53%, respectivamente. Utilizando a extração diferencial com detergente e análise por EGPA-SDS após cromatografia de afinidade, confirmamos na cepa CL Brener de *T. cruzi* o perfil de bandas presentes na cepa Y, de 240, 56, 48 e 34 kDa na fração CZP-I (detergente) e 56, 52, 37 e 34 kDa na fração CZP-II (solúvel). Ensaio enzimáticos usando o inibidor L-685,458 e moduladores alostéricos DAPT e Composto XXI/E da presenilina humana sugeriram que aparentemente o sítio catalítico da presenilina de *T. cruzi* possui uma constituição semelhante ao da presenilina humana, enquanto diferenças significativas puderam ser observadas no sítio alostérico. O inibidor de sítio ativo L-685,458 foi capaz de inibir 100% da atividade enzimática em 5 μ M, enquanto os moduladores DAPT e Composto XXI/E não apresentaram uma inibição significativa. Portanto, os nossos estudos sugerem que devido às suas funções enzimáticas e localização celular a presenilina do *T. cruzi* é um bom alvo quimioterapêutico e imunológico.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Gamma-secretase complex in *Trypanosoma cruzi*: basis for the development of new specific diagnostic tests and new chemotherapeutic targets

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carolina Conceição Bottino Gruszkowski

The diagnostic methods used today for Chagas disease, although simple and unexpensive, may present low sensitivity and specificity or cross-reactions with other pathogens. Likewise, drugs used nowadays to treat Chagas disease show severe side effects. Among the various metabolic targets suggested, proteases have been identified as candidate molecules due to its particularities. Recently our group identified two aspartyl proteases in *T. cruzi*: a soluble (Cruzipsin-II) and a membrane-bound (Cruzipsin-I); however, their biological functions remained unknown. Our results demonstrate for the 1st time, the existence of a membrane proteolytic complex in *T. cruzi* with similar properties to the γ -secretase complex of other eukaryotic cells. Using bioinformatics tools, the primary sequences of three of four complex proteins (presenilin, nicastrin and Aph-1) were localized at a protein database. This information was important for parallel synthesis of peptides and the identification of linear epitopes of proteins using sera from eight patients. Presenilin presented 10 major epitopes, nicastrin, 5 and Aph-1, 10. Some epitopes were selected by different criteria and anti-peptide sera were obtained in rabbits. Serum anti-peptide PRE-2 of presenilin identified by immunoblotting a 48 kDa band in fraction CZP-I as presenilin, while the anti-peptide NIC-1 of nicastrin also presented a marking in the same position. Analysis by confocal microscopy of epimastigotes localized the proteins mainly at anterior and middle portions of the cells. In addition, the markings were found to be stronger in permeabilized cells, suggesting co-localization of both proteins in the inner membranes of the cell. An ELISA employing four synthetic peptides for *T. cruzi* presenilin and nicastrin presented sensitivity of 71.59% and specificity and 70.53%. Using differential detergent extraction and analysis by SDS-PAGE after affinity chromatography confirmed that the profile bands present in the strain CL Brener were like those of strain Y: 240, 56, 48 and 34 kDa in fraction CZP-I (detergent), and 56, 52, 37 and 34 kDa in CZP-II fraction (soluble). Enzyme assays using the inhibitor L-685,458 and allosteric modulators DAPT and Compound XXI/E of human presenilin apparently suggested that the catalytic site of *T. cruzi* presenilin has a constitution similar to the human presenilin, while significant differences were observed in the allosteric site. The active site inhibitor L-685,458 was able to inhibit 100% of enzyme activity at 5 μ M, while the modulators DAPT and Compound XXI/E showed no significant inhibition. Therefore, our studies suggest that due to their enzymatic functions and cellular localization the presenilin of *T. cruzi* is a good target for chemotherapeutic and for immune system.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sido meu “refúgio, fortaleza e socorro bem presente na tribulação”.

À minha família e amigos queridos, pela força, compreensão e carinho durante toda a minha vida e também durante a realização do meu Mestrado.

Ao Dr. Salvatore Giovanni de Simone, por ter me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa e pela orientação neste trabalho.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite para avaliarem este trabalho.

Ao Dr. Saulo C. Bourguignon, pelo parecer sobre a dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (LBPP), que diretamente participaram da elaboração deste trabalho e demonstraram apoio e carinho incondicionais: Dra. Adriana Degrossoli, Dra. Bruna Carvalho, Dra. Ana Carolina Sodero, MSc. André Luiz Souza, Luiz André Pinto, Paloma Napoleão, Bianca Carvalho e Alexandre Saísse.

Aos Drs. José Coura e José Borges, do Laboratório de Doenças Parasitárias (IOC/FIOCRUZ), por cederem os soros de pacientes chagásicos.

À Dra. Ana Ventura, do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense (UFF), pela colaboração na microscopia confocal.

À Dra. Suzana Côrte-Real e à Vanessa Diniz, pela colaboração na Plataforma de Microscopia Eletrônica da FIOCRUZ.

Aos demais amigos do LBPP, que mesmo não participando diretamente deste trabalho, tiveram uma presença enorme na minha vida nos últimos meses, e sempre terão: Marilúcia Pina, Maria Isabel Correia, Antônia Lúcia dos Santos, Marcella Zeitune, Thais Guimarães, Amanda Mello, Mário Senger, Patrícia Rodrigues e Michelle Xavier.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram da conclusão de mais esta etapa em minha vida, muito obrigada!

*“Entrega o teu caminho ao Senhor; confia Nele,
e Ele tudo fará.”*

(Salmo 37:5)

LISTA DE FIGURAS

1.1: <i>Triatoma infestans</i> , um dos vetores da Doença de Chagas	1
1.2: Movimentos migratórios provenientes da América Latina que tem favorecido a disseminação da Doença de Chagas nas últimas décadas	3
1.3: Diagnóstico da Doença de Chagas	4
1.4: Medicamentos disponíveis para o tratamento da Doença de Chagas	5
1.5: Inibidores de proteases utilizados atualmente como medicamentos	7
1.6: Estrutura química do Tipranavir, inibidor de uma aspártico protease do HIV-1, usado no tratamento da AIDS	8
1.7: Representação esquemática dos componentes do complexo γ -secretase	10
1.8: Representação esquemática das presenilinas humanas	11
1.9: Modelo de interação do complexo γ -secretase com um substrato hipotético	12
1.10: Modelo estrutural do complexo γ -secretase maduro	13
1.11: Sinalização envolvendo a proteína precursora amilóide (APP)	14
1.12: Estrutura da presenilina 1 (PS1) humana	15
3.1: Estrutura química dos inibidores do complexo γ -secretase utilizados neste trabalho...	20
5.1: Efeito de inibidores do complexo γ -secretase sobre a atividade da fração CZP-I.....	26
5.2: Alinhamento das sequências de presenilinas conhecidas de <i>C. elegans</i> , <i>A. thaliana</i> e humana com a sequência homóloga presente no genoma de <i>T. cruzi</i>	29
5.3: Alinhamento das sequências de nicastrinas conhecidas de <i>A. thaliana</i> e humana com a sequência homóloga presente no genoma de <i>T. cruzi</i>	31
5.4: Alinhamento da sequência de Aph-1b humana conhecida com a sequência homóloga presente no genoma de <i>T. cruzi</i>	32
5.5: Perfis de hidropaticidade das proteínas presenilina (A), nicastrina (B) e Aph-1 (C) de <i>T. cruzi</i>	34
5.6: Localização dos epitopos da presenilina de <i>T. cruzi</i> , próximos ao centro ativo.....	35
5.7: Reatividade dos peptídeos sintéticos produzidos a partir da sequência da presenilina de <i>T. cruzi</i> pela técnica de <i>Spot Synthesis</i> frente a um <i>pool</i> (n=8) de soros de pacientes chagásicos por quimiluminescência.	36
5.8: Reatividade dos peptídeos sintéticos produzidos a partir da sequência da nicastrina de <i>T. cruzi</i> pela técnica de <i>Spot Synthesis</i> frente a um <i>pool</i> (n=8) de soros de pacientes chagásicos por quimiluminescência.	37

5.9: Reatividade dos peptídeos sintéticos produzidos a partir da sequência da Aph-1 de <i>T. cruzi</i> pela técnica de <i>Spot Synthesis</i> frente a um <i>pool</i> (n=8) de soros de pacientes chagásicos por quimiluminescência.	38
5.10: Reatividade dos soros de coelho anti-peptídeos de nicastrina (NIC-1 e NIC-2) e presenilina (PRE-1 e PRE-2) avaliados por ELISA (A) e <i>Cellu-spot</i> (B).....	39
5.11 Perfis eletroforéticos das frações detergente (CZP-I) e solúvel (CZP-II) obtidas após cromatografia em coluna de pepstatina-agarose (gel de 10% corado com prata).	40
5.12: Análise por <i>immunoblotting</i> das frações CZP-I (detergente) e CZP-II (solúvel) resolvidas por SDS-PAGE.....	41
5.13: Imunofluorescência confocal usando soros de coelho anti-nicastrina (epitopo NIC-1) e anti-presenilina (epitopo PRE-2) e epimastigotas de <i>T. cruzi</i> não permeabilizados.....	42
5.14: Imunofluorescência confocal usando soros de coelho anti-nicastrina (epitopo NIC-1) e anti-presenilina (epitopo PRE-2) e epimastigotas de <i>T. cruzi</i> permeabilizados (0,5% Tween 20).....	43
5.15: Valores de DO obtidos individualmente com cada um dos soros testados nas diferentes configurações dos testes de ELISA	44
5.16: Especificidade e sensibilidade dos testes de ELISA avaliados através das curvas ROC	45

LISTA DE TABELAS

5.1: Proteínas homólogas de <i>Trypanosoma cruzi</i> anotadas no banco de dados Uniprot [http://www.uniprot.org/] como presenilina	28
5.2: Proteínas homólogas de <i>Trypanosoma cruzi</i> anotadas no banco de dados Uniprot [http://www.uniprot.org/] como nicastrina	30
5.3: Proteínas homólogas de <i>Trypanosoma cruzi</i> anotadas no banco de dados Uniprot [http://www.uniprot.org/] como Aph-1	32
5.4: Propriedades físico-químicas dos peptídeos sintetizados neste trabalho	39
5.5: Resultados obtidos nos testes de ELISA com os peptídeos selecionados das proteínas nicastrina (NIC-1 e 2) e presenilina (PRE-1 e 2) de <i>T. cruzi</i> pela técnica de <i>Spot Synthesis</i>	44
5.6: Valores de corte (“ <i>cut-offs</i> ”) estabelecidos através da técnica da curva ROC para cada sistema de ELISA-peptídeo testado, com os respectivos valores de sensibilidade e especificidade	45

LISTA DE ABREVIACOES

- AICD – Domínio Intracelular Amilóide
- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Humana
- Ala – alanina
- APP – Proteína Precursora Amilóide
- Asp - aspartato
- BSA – Albumina de Soro Bovino
- CEUA – Comit de tica no Uso de Animais
- CHAPS – 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonato
- CONEP – Comit Nacional de tica em Pesquisa
- Cys – cisteína
- CZP-I – Cruzipsina I
- CZP-II – Cruzipsina II
- DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindol
- DAPT – N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
- DMSO – dimetil sulfido
- DNA – cido desoxirribonucléico
- DO – densidade ptica
- DP – desvio padrão
- ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio de imunoabsorbncia ligado a enzima)
- EUA – Estados Unidos da América
- FIOCRUZ – Fundao Oswaldo Cruz
- Gly – glicina
- HEMORIO – Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti
- HI – hemaglutinao indireta
- HIV – vírus da imunodeficiência humana
- IFI – imunofluorescência indireta
- IgG – imunoglobulina G
- iNOS – xido nítrico-sintase induzível
- IOC – Instituto Oswaldo Cruz
- IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada
- Leu – leucina
- LIT – *Liver Infusion Triptose* (infusão de fígado e triptose)

NIC – nicastrina

NO – óxido nítrico

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS – *phosphate buffered saline* (tampão salina-fosfato)

PCR – reação em cadeia da polimerase

PDB – *Protein Data Bank*

Phe – fenilalanina

Pro – prolina

PS – presenilina

ROC – *receiver-operator characteristics* (características de receptor-operador)

SDS – dodecil sulfato de sódio

TA – temperatura ambiente

TBS – *Tris buffered saline* (tampão Tris-salina)

Tyr – tirosina

Val – valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A DOENÇA DE CHAGAS	1
<i>1.1.1. Agente etiológico e formas de contágio</i>	1
<i>1.1.2. Formas clínicas e sintomatologia</i>	2
<i>1.1.3. Distribuição geográfica</i>	2
<i>1.1.4. Diagnóstico da Doença de Chagas</i>	3
<i>1.1.5. Tratamento</i>	4
1.2. PROTEASES E SUA IMPORTÂNCIA NA PARASITOLOGIA	5
<i>1.2.1. Tipos de proteases e sua importância</i>	5
<i>1.2.2. Importância das proteases na Parasitologia</i>	7
<i>1.2.3. Proteases do Trypanosoma cruzi</i>	8
1.2.3.1. Cruzipaína	8
1.2.3.2. Oligopeptidase B e Tc80	9
1.2.3.3. gp63 e o proteassoma	9
1.2.3.4. Asparticoproteases	9
1.3. PRESENILINAS E O COMPLEXO γ-SECRETASE	10
<i>1.3.1. Caracterização do complexo γ-secretase</i>	10
1.3.1.1. Presenilina	10
1.3.1.2. Demais componentes do complexo γ -secretase: Nicastrina, Aph-1 e Pen-2	12
<i>1.3.2. Funções associadas ao complexo γ-secretase</i>	13
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. OBJETIVO GERAL	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. METODOLOGIA	18
4.1. SOROS HUMANOS	18
4.2. CULTIVO DE MICROORGANISMOS E EXTRAÇÃO DO COMPLEXO γ -SECRETASE DE <i>T. CRUZI</i>	18
4.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E EFEITO DOS INIBIDORES L-685,458 ((1S-BENZYL-4R-[1-(1S-CARBAMOYL-2-PHENETHYLCARBAMOYL)-1S-3-METHYLBUTYLCARBAMOYL]-2R-	

HYDROXY-5-PHENYLPENTYL}CARBAMIC ACID <i>TERT</i> -BUTYL ESTER)); DAPT (N-[N-(3,5-DIFLUOROPHENACETYL)-L-ALANYL]-S-PHENYLGLYCINE T-BUTYL ESTER) E COMPOSTO XXI/E ((S,S)-2-[2-(3,5-DIFLUOROPHENYL)- ACETYLAMINO]-N-(1-METHYL-2-OXO-5-PHENYL-2,3-DIHYDRO-1H- BENZO[E][1,4]DIAZEPIN-3-YL)-PROPIONAMIDE)).....	19
4.4. ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	20
4.5. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS CELULÓSICAS.....	21
4.6. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM SOLUÇÃO	21
4.7. PRODUÇÃO DE ANTI-SOROS MONOESPECÍFICOS	21
4.8. SDS-PAGE E <i>WESTERN BLOTTING</i>	22
4.9. MICROSCOPIA CONFOCAL	22
4.10. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	23
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4.12. NORMAS ÉTICAS	24
5. RESULTADOS	25
5.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA E EFEITO DE INIBIDORES.....	25
5.2. ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	27
5.3. IDENTIFICAÇÃO DOS EPITOPOS B-LINEARES DAS PROTEÍNAS DO COMPLEXO γ -SECRETASE DO <i>T. CRUZI</i>	35
5.4. PRODUÇÃO E ESPECIFICIDADE DOS ANTI-SOROS MONOESPECÍFICOS.....	39
5.5. SDS-PAGE E <i>WESTERN BLOTTING</i>	40
5.6. LOCALIZAÇÃO CELULAR DO COMPLEXO γ -SECRETASE EM EPIMASTIGOTAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL	41
5.7. DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA DOENÇA DE CHAGAS POR ELISA	44
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. A DOENÇA DE CHAGAS

1.1.1. Agente etiológico e formas de contágio

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, protozoário pertencente à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida [1,2,3]. Foi descrita em 1909 por Carlos Chagas [4], que também identificou seus vetores e reservatórios silvestres [3].

A forma clássica de contágio tanto de humanos quanto de outros mamíferos é através do inseto vetor popularmente conhecido como “barbeiro”. Este nome comum é usado para designar insetos hematófagos pertencentes às ordens Hemiptera ou Reduviidae, que liberam as formas infectantes do *T. cruzi* nas fezes durante a picada. Existem mais de 100 espécies de triatomíneos com potencial para atuarem como vetores da Doença de Chagas, sendo um dos mais importantes no Brasil o *Triatoma infestans* (Fig. 1.1) [3].



Figura 1.1: *Triatoma infestans*, um dos vetores da Doença de Chagas [5].

Outras formas de contágio incluem a transmissão oral – pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas com o parasita –, transmissão vertical e por transfusão de sangue ou transplantes de órgãos contaminados [3].

1.1.2. Formas clínicas e sintomatologia

As manifestações clínicas observadas nos pacientes chagásicos podem variar muito de acordo com a localização geográfica. Isto é devido ao fato de que o *Trypanosoma cruzi* apresenta diversas cepas, com variações em seu tropismo, infectividade e susceptibilidade ao tratamento [6]. Outro fator que pode agravar a doença é o estado imunológico do paciente. Indivíduos imunossuprimidas devido à co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), transplantes e/ou a alguns tipos de quimioterapia supressora podem ter recidivas nas quais o parasita volta a circular no sangue, tornando os sintomas mais severos [7].

A fase aguda da Doença de Chagas se inicia logo após a infecção e geralmente dura algumas semanas, durante as quais as formas tripomastigotas podem ser encontradas no sangue circulante. Os sintomas podem ser brandos, incluindo febre e inchaço no local de inoculação, ou mesmo inexistentes. Em alguns casos, pode ocorrer uma forma fulminante com acometimento cardíaco e/ou cerebral que pode evoluir para óbito se não tratada [7].

Na maioria dos casos, após a fase aguda a doença evolui para uma forma crônica, na qual o paciente pode permanecer assintomático por muitos anos. O principal órgão acometido nesta fase é o coração, especialmente em pacientes com idades entre 20 e 59 anos; pode ocorrer hipertrofia, anormalidades no ritmo, diminuição da eficiência de bombeamento, congestão pulmonar e/ou morte súbita. Outras complicações podem ocorrer no sistema digestório, com dilatação do esôfago e/ou cólon e perda de suas funções [3,6,7].

1.1.3. Distribuição geográfica

A Doença de Chagas é considerada endêmica na América Latina, especialmente nas áreas rurais. Estima-se que mais de 10 milhões de pessoas estão infectadas e que ocorram cerca de 15 mil mortes por ano [3].

Os movimentos migratórios das últimas décadas têm aumentado o número de casos da doença em regiões não endêmicas, especialmente na América do Norte e Europa (Fig. 1.2). Sem vetores naturais, as principais formas de transmissão nestes países ocorrem com transfusões, transplantes e por transmissão vertical. Lidar com tais pacientes vem trazendo

novos desafios econômicos, sociais, políticos e de saúde pública para os países envolvidos [6].

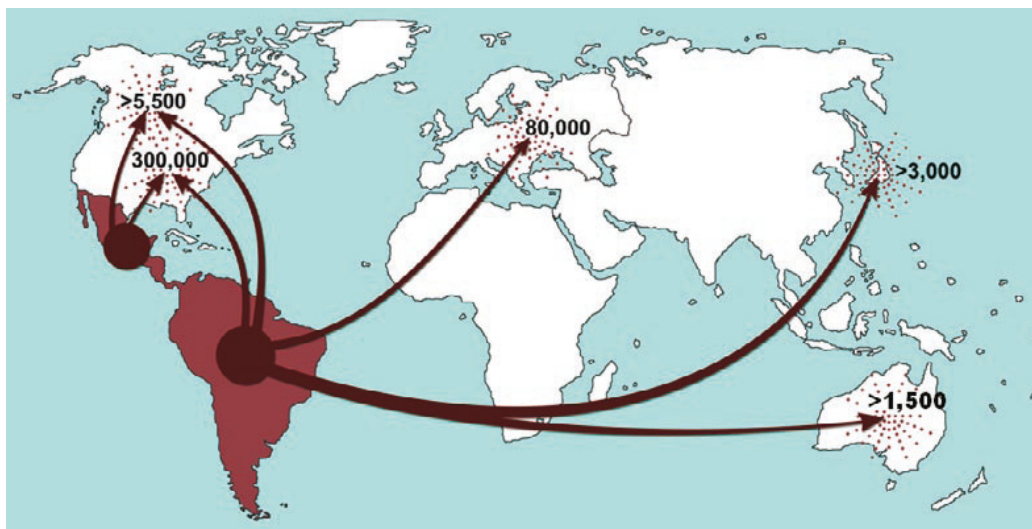


Figura 1.2: Movimentos migratórios provenientes da América Latina que tem favorecido a disseminação da Doença de Chagas nas últimas décadas. Os números indicam a quantidade de casos de Doença de Chagas estimados em países não endêmicos [6].

1.1.4. Diagnóstico da Doença de Chagas

Durante a fase aguda da doença, o diagnóstico baseia-se principalmente em métodos parasitológicos, através da visualização das formas tripomastigotas diretamente em amostras de sangue do paciente. As técnicas de rotina incluem o esfregaço sanguíneo ou a técnica da gota espessa, coradas com Giemsa (Fig 1.3 A). Estes testes apresentam alta especificidade para o *T. cruzi* [8,9]. Caso o resultado seja negativo, podem ser usadas técnicas de concentração – microhematócrito ou a técnica de Strout. Nesses casos, a sensibilidade do teste pode chegar a 90% [9].

Na fase crônica há um acentuado declínio do número de parasitas circulantes no sangue, dificultando o diagnóstico parasitológico. Sendo assim, métodos de diagnóstico sorológico são as opções mais indicadas nesta fase, os quais se baseiam na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro dos pacientes [9,10]. As técnicas mais usadas incluem ELISA, hemaglutinação indireta (HI), imunofluorescência indireta (IFI), *western blot* e testes rápidos (tais como a imunocromatografia) (Fig 1.3 B) [8,9,10].

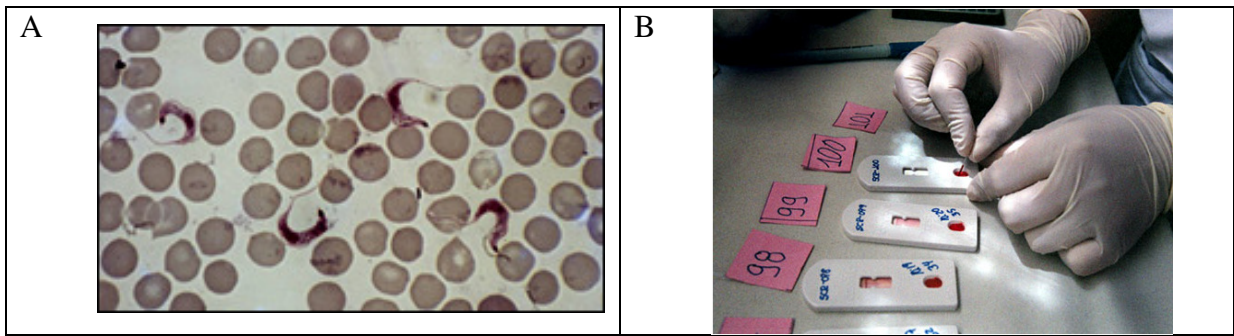


Figura 1.3: Diagnóstico da Doença de Chagas. A: Técnica de esfregaço sanguíneo corado com Giemsa, utilizada no diagnóstico da Doença de Chagas durante a fase aguda. Na foto é possível visualizar as formas tripomastigotas do *T. cruzi* (células flageladas) em meio às hemácias (células arredondadas) [8]. B: Diagnóstico imunocromatográfico utilizado no diagnóstico da Doença de Chagas durante a fase crônica [11].

Embora estes métodos sejam bastante simples e de baixo custo, muitas vezes eles podem apresentar baixas sensibilidade e especificidade ou ainda reações cruzadas com anticorpos contra outros patógenos (especialmente *Leishmania* spp). Isso acontece principalmente porque os testes usados de rotina são baseados, em sua maioria, em antígenos produzidos com extratos completos ou semi-purificados de epimastigotas do *T. cruzi* (a forma não infectiva) [9,10].

Para tentar solucionar estes problemas, muitos novos testes vem sendo desenvolvidos nos últimos anos. Estes baseiam-se na detecção do DNA do parasita pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou em técnicas sorológicas (por exemplo, ELISA) com antígenos recombinantes e/ou peptídeos sintéticos [8,10]. Muitos destes ensaios vem apresentando bom desempenho experimental, porém a maioria deles ainda não está disponível comercialmente, apenas no nível de pesquisa [8,9].

Outro ponto que deve ser levado em consideração nos programas de combate à Doença de Chagas é facilitar o acesso ao diagnóstico, especialmente nas áreas endêmicas. Muitas vezes nestes locais não há disponibilidade de infra-estrutura ou pessoal treinado para a realização dos testes, dificultando o diagnóstico dos pacientes onde ele se faz mais necessário [11].

1.1.5. Tratamento

Existem hoje 2 medicamentos disponíveis para o tratamento da Doença de Chagas: o nifurtimox (Fig 1.4 A) e o benznidazol (Fig 1.4 B). O primeiro age através da redução do seu grupamento nitro, que por fim acaba produzindo metabólitos reativos de oxigênio extremamente tóxicos – tais como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Já o benznidazol atua através de um estresse redutivo, que envolve a modificação covalente de macromoléculas (lipídeos, proteínas e DNA) [12,13].

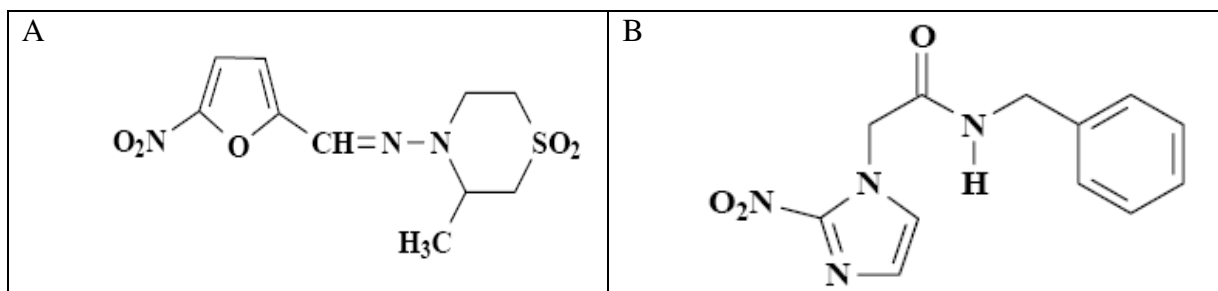


Figura 1.4: Medicamentos disponíveis para o tratamento da Doença de Chagas. A: Estrutura química do nifurtimox. B: Estrutura química do benznidazol [14].

Embora sejam as únicas opções de tratamento disponíveis a mais de 40 anos, estes medicamentos estão muito longe do ideal [3,15]. Dentre os problemas apresentados estão os severos efeitos colaterais; a pouca eficácia na fase crônica da doença; a possibilidade do surgimento de resistência entre as diversas cepas do parasita e a inexistência de versões pediátricas [2,3,12,13,15].

Visto que o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes é de extrema importância, a pesquisa de novos alvos quimioterapêuticos tem evoluído muito. Estes incluem as vias de biossíntese de glutatona e/ou tripanotona – enzimas importantes na defesa do parasita contra stress oxidativo; indução de alterações na cadeia respiratória do parasita; inibição do transporte de purina ou das enzimas participantes na síntese de nucleotídeos, do metabolismo de esteróis ou de proteases chave no metabolismo celular [13,16].

1.2. PROTEASES E SUA IMPORTÂNCIA NA PARASITOLOGIA

1.2.1. Tipos de proteases e sua importância

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas [17]. Na classificação enzimática recomendada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as proteases são incluídas no grupo **EC 3.4** (hidrolases que atuam sobre ligações peptídicas), sendo também chamadas peptidases [18].

As proteases podem ser classificadas de acordo com alguns critérios. O primeiro deles diz respeito à posição na qual a clivagem ocorre numa cadeia polipeptídica. Quando a enzima atua sobre as porções amino ou carboxiterminal do substrato, diz-se que é uma *exopeptidase*. Já quando ela atua internamente, quebrando ligações peptídicas no meio da cadeia, diz-se que é uma *endopeptidase* [16].

Há ainda uma classificação quanto ao mecanismo de clivagem, ou seja, quais aminoácidos ou espécies químicas estão presentes no sítio ativo da protease. Embora alguns autores façam tal divisão em 4 grupos, a classificação mais recente conta com 5 classes de proteases: *serino*, *cisteíno*, *treonino*, *metalo* e *aspártico proteases* e além de outras cujos mecanismos de catálise são desconhecidos [16,19,20,21].

As serino proteases são a classe de proteases mais versátil, além de serem as mais abundantes nos vertebrados. Já as cisteíno proteases constituem a classe mais abundante nos protozoários parasitas [19,21]. Juntamente com as treonino proteases, elas quebram a ligação peptídica mediante um ataque nucleofílico, com a formação de uma ligação covalente transitória com o substrato [16,20]. As metalo proteases também são muito abundantes em mamíferos, nos quais podem atuar principalmente no remodelamento e degradação da matriz extracelular e sobre citocinas, receptores de fatores de crescimento e moléculas de adesão [21]. Seu mecanismo de ação, bem como o das aspártico proteases, consiste num ataque nucleofílico sobre o substrato realizado com a participação de uma molécula de água [16,20].

Com o avanço dos estudos no campo das proteases, muito tem sido esclarecido a respeito de seus mecanismos e sua participação em diversas condições clínicas, tais como coagulopatias, processos inflamatórios, câncer e doenças degenerativas e infecciosas. Desta forma, novos tratamentos e vacinas vêm sendo e ainda podem ser desenvolvidos [16,20].

Os estudos no campo do desenvolvimento de inibidores de proteases vêm avançando muito nos últimos anos, em especial graças a incrementos nas áreas da biologia estrutural, síntese e abordagens computacionais [21]. De um modo geral, a estratégia mais comum na criação de um inibidor consiste em encontrar uma molécula de baixo peso molecular que se ligue ao sítio ativo da enzima em questão. Outras abordagens podem envolver exossítios ou modulações alostéricas das enzimas, ou ainda modificações estruturais em moléculas de ocorrência natural, de forma a aumentar sua especificidade [20]. Alguns inibidores de proteases disponíveis no mercado hoje podem ser vistos na figura 1.5.

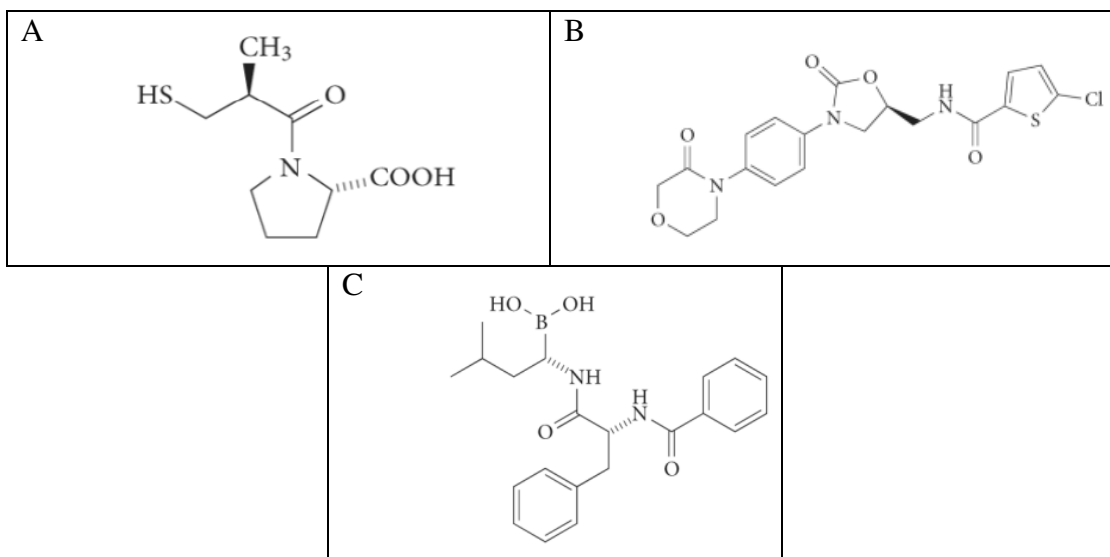


Figura 1.5: Inibidores de proteases atualmente usados como medicamentos. A: Estrutura química do Captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (metalo protease), usado no tratamento de hipertensão; B: estrutura química do Rivaroxaban (Xarelto; Bayer), inibidor do Fator Xa (serino protease), usado no tratamento de coagulopatias; C: estrutura química do Bortezomib (Velcade; Millennium), inibidor de proteassoma (treonino protease), usado no tratamento de câncer [20].

1.2.2. Importância das proteases na Parasitologia

As proteases são muito importantes no ciclo de vida de qualquer organismo, uma vez que atuam desde em funções metabólicas basais até outras funções altamente específicas [16]. Elas podem estar presentes na manutenção e disseminação de uma infecção, na nutrição e na reprodução do parasita ou até mesmo em mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro. Em algumas espécies, estas proteases atuam como fatores de virulência [22,23,24] e em alguns sistemas tem sido validadas como alvos quimioterapêuticos [19,22,24].

Um exemplo é o desenvolvimento de inibidores específicos para a aspártico protease envolvida na maturação de novas partículas virais do HIV [20,21], como o Tipranavir (Fig. 1.6). Da mesma forma, contra o *T. cruzi*, a molécula K777 está em fase de testes pré-clínicos. Esta atua sobre a cruzipaína, a principal cisteíno protease do parasita [19,23]. Embora seja discutível, inibidores irreversíveis tem sido considerados bons fármacos no tratamento de doenças infecciosas e parasitárias, por apresentarem atividade antiparasitária em doses geralmente inócuas ao hospedeiro. Além disso, podem ser mais baratos, já que permitem esquemas de tratamento mais curtos e as rotas de síntese são bastante diversas [19,20].

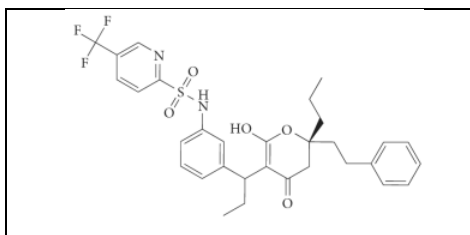


Figura 1.6: Estrutura química do Tipranavir, inibidor de uma aspártico protease do HIV-1, usado no tratamento da AIDS [20].

Sendo moléculas tão importantes da biologia dos parasitas, não é surpreendente constatar que o sistema imune de alguns hospedeiros – principalmente vertebrados – apresente defesas inatas direcionadas às proteases, como a produção de inibidores de sítio ativo ou através das α_2 -macroglobulinas. Estas últimas constituem um sistema de defesa de amplo espectro, englobando as proteases de organismos invasores e direcionando-as a um sistema de “limpeza” via endocitose [22].

Além disso, pode haver ainda a produção de anticorpos específicos contra determinadas proteases, capazes de neutralizá-las ou promover a ativação do sistema imune contra o parasita [23]. A cruzipaína, por exemplo, uma cisteíno protease do *T. cruzi*, é um antígeno altamente imunogênico deste parasita, sendo reconhecido com muita intensidade por soros de pacientes chagásicos [24].

1.2.3. Proteases de *Trypanosoma cruzi*

De acordo com a base de dados de proteases MEROPS [26], as classes das metalo proteases e das cisteíno proteases são as mais abundantes no genoma do *Trypanosoma cruzi*, com mais de 150 anotações realizadas. Serino, treonino e aspártico proteases também estão presentes, porém em menor quantidade [25]. Dentre as proteases mais importantes do parasita, estão as citadas abaixo:

1.2.3.1. Cruzipaína

A cruzipaína, também chamada cruzaína, é uma cisteíno protease de maior atividade descrita neste protozoário [16,23,24]. É expressa em todos os estágios do ciclo, porém em maior quantidade nas formas epimastigotas. Nestas, ela pode ser encontrada no interior dos lisossomos; nos tripomastigotas, a presença da enzima é restrita ao bolso flagelar, enquanto que nas formas amastigotas é expressa na superfície celular [24].

Suas funções são bastante variadas e incluem participação na digestão de nutrientes, infecção das células do hospedeiro vertebrado, renovação de proteínas durante processos de diferenciação celular e escape do sistema imune promovendo clivagem de anticorpos [16,24]. Também já foi descrita sua atuação facilitando a dispersão da infecção durante a fase aguda. A cruzipaina atua induzindo a ativação de macrófagos por uma via alternativa (induzindo um perfil de resposta imune Th2, com a produção das citocinas IL-4, 5, 6 e 10). Desta forma, há um aumento da atividade da arginase-I e uma inibição da óxido nítrico sintase induzível (iNOS), o que diminui a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos e facilita a sobrevivência do parasita [23].

1.2.3.2. Oligopeptidase B e Tc80

Estas duas enzimas são serino proteases presentes na forma tripomastigota: a primeira no citoplasma e a segunda sendo secretada [16]. A oligopeptidase B tem um papel importante na invasão de células não-fagocíticas, induzindo uma onda de Ca^{2+} intracelular tanto no parasita quanto na célula do hospedeiro [16,19,24].

Já a Tc80, também chamada prolil oligopeptidase, facilita a adesão e a penetração nos tecidos do hospedeiro, uma vez que esta, quando secretada pelo parasita nos tecidos infectados, é capaz de digerir colágeno I e IV e fibronectina presentes na matriz extracelular [16,19,24].

1.2.3.3. gp63 e o proteassoma

A gp63 é um exemplo de metaloprotease semelhante à encontrada nos parasitas do gênero *Leishmania*. Ela é expressa na superfície celular e acredita-se que possa estar envolvida na modulação da infecção nos mamíferos [19,24].

O proteassoma por sua vez é um complexo proteolítico que inclui uma atividade treonino protease e é essencial para o controle do ciclo celular, bem como para a renovação de proteínas durante processos de diferenciação celular [16,24].

1.2.3.4. Aspártico proteases

Durante muito tempo acreditou-se que não havia esta classe de proteases em *Trypanosoma cruzi*. Porém um trabalho realizado em 2009 por nosso grupo demonstrou pela

primeira vez a presença de 2 atividades de aspártico protease em epimastigotas de *T. cruzi*: uma associada às membranas e outra solúvel [26]. A primeira foi denominada **Cruzipsina I (CZP-I)** e a segunda **Cruzipsina II (CZP-II)**, em correspondência a enzimas similares encontradas em *Plasmodium falciparum* [27]. Nesse estudo, já havia indícios de que a Cruzipsina I possuía características similares às presenilinas, como a presença de um Asp no centro ativo, alta hidrofobicidade e associação à membrana. Portanto, parte deste estudo foi centrado na caracterização desta enzima do complexo γ -secretase.

1.3. PRESENILINAS E O COMPLEXO γ -SECRETASE

1.3.1. Caracterização do complexo γ -secretase

O complexo γ -secretase é um complexo multimérico transmembranar já identificado em várias espécies de animais e plantas [28]. É composto de 4 sub-unidades protéicas: **presenilina (PS)**, **nicastrina (NIC)**, **Aph-1** e **Pen-2** [28,29,30,31,32,33] (Fig 1.7).

1.3.1.1. Presenilina

A presenilina é uma aspártico protease que exerce a função catalítica do complexo [28,30,31]. Ela já foi identificada em diversas espécies de animais (mamíferos, anfíbios, peixes, moscas e vermes) e plantas [28].

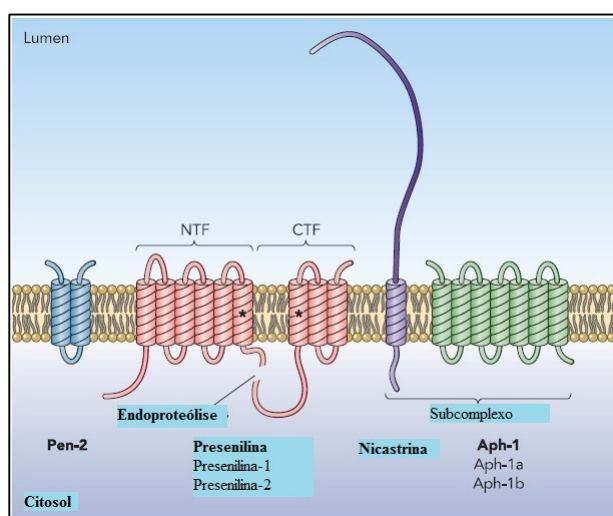


Figura 1.7: Representação esquemática dos componentes do complexo γ -secretase. A porção catalítica do complexo (presenilina; em rosa) torna-se ativa ao sofrer uma endoproteólise, gerando um fragmento N-terminal (NTF) e um fragmento C-terminal (CTF). As demais subunidades do complexo incluem as proteínas nicastrina (roxo), Pen-2 (azul) e Aph-1 (verde). Em humanos, a presenilina pode apresentar-se nos subtipos 1 ou 2, enquanto que a proteína Aph-1 pode apresentar-se nos subtipos a ou b [adaptado de 33].

Em humanos, a forma 1 da presenilina (PS1) é uma proteína altamente hidrofóbica de aproximadamente 45 kDa. Ela torna-se ativa mediante endoproteólise entre os aminoácidos Met₂₉₈ e Ala₂₉₉, produzindo um fragmento N-terminal (cerca de 28 kDa) e outro fragmento C-terminal (cerca de 18 kDa) [28,31,32,33,34]. Não há descrições de modificações pós-traducionais (glicosilação, sulfatação ou fosforilação) [34].

Sua organização transmembranar foi um assunto controverso durante algum tempo, tendo sido propostos modelos de 7 a 10 regiões transmembranares [28]. O modelo mais aceito hoje apresenta 9 domínios transmembranares, sendo a região N-terminal citosólica e a porção c-terminal luminal [32,33].

As presenilinas são incluídas no clã AD das asparticoproteases. Este grupo inclui as endopeptidases de membrana cujo sítio ativo é intramembranar [25]. Em PS1, o sítio ativo é composto por 2 resíduos: Asp^{257 e 385}, localizados nos segmentos transmembranares 6 e 7, respectivamente [28,35,36]. A localização do sítio ativo foi determinada após experimentos de mutação sítio-dirigida no gene, nos quais se verificou que substituições nestes resíduos eliminaram a endoproteólise da proteína e inibiram a atividade γ -secretase [35].

Juntamente com as peptidases sinal, as presenilinas são incluídas na família A22 das aspártico proteases [25]. Nesta família, 3 domínios são altamente conservados (Fig. 1.8): o resíduo Asp do sítio ativo presente no fragmento N-terminal da proteína é precedido por um resíduo de Tyr. No fragmento C-terminal, o sítio ativo é composto pela sequência Gly-X-Gly-Asp-Phe, no qual a letra X pode representar os resíduos Leu ou Phe. O 3º domínio, chamado PALP, está presente na porção transmembrana 9 e é composto pela sequência Pro-Ala-Leu-Pro. Acredita-se que este tenha função na estabilização e formação do complexo γ -secretase [25,33,37].

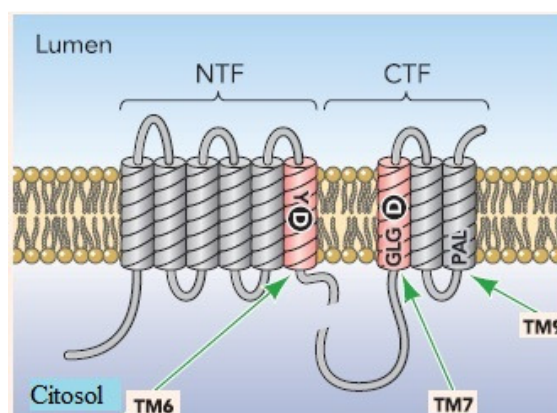


Figura 1.8: Representação esquemática das presenilinas humanas. Os resíduos de Asp destacados nos círculos pretos compõem o sítio ativo da enzima, posicionado nas porções transmembrana 6 e 7 (destacados em rosa). É possível ver os domínios YD, GLGDP e PALP altamente conservados na família A22 das aspártico proteases (NTF = fragmento N-terminal; CTF = fragmento C-terminal) [adaptado de 33].

1.3.1.2. Demais componentes do complexo γ -secretase: Nicastrina, Aph-1 e Pen-2

A nicastrina é uma proteína altamente glicosilada em sua forma madura, cujo peso molecular chega a aproximadamente 130 kDa (Fig. 1.7). Possui apenas 1 domínio transmembranar, ficando quase totalmente exposta na superfície exterior da membrana celular [31, 32, 33]. A principal função atribuída a esta proteína é o reconhecimento e a seleção dos substratos que serão clivados pela presenilina (Fig. 1.9) [32,33]. Também acredita-se que ela tenha função na estabilização da presenilina e na formação e maturação do complexo como um todo [29,38].

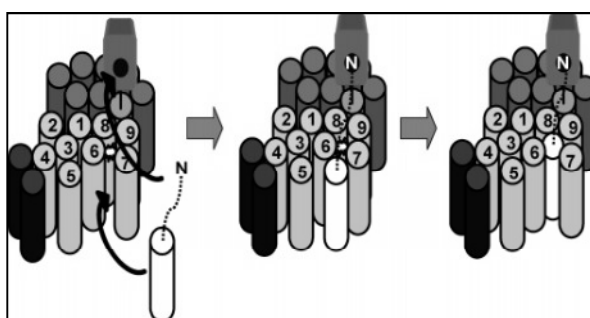


Figura 1.9: Modelo de interação do complexo γ -secretase com um substrato hipotético (representado pela barra branca). Inicialmente, há uma interação entre a porção N-terminal do substrato com o domínio extracelular da nicastrina. Num segundo momento, há a interação entre o substrato e o sítio ativo da presenilina, seguida do processo de proteólise [32].

A proteína Aph-1 também é altamente hidrofóbica, cujos modelos estruturais preveem a existência de 7 domínios transmembranares (Fig. 1.7) [28,32,33]. Seu peso molecular é estimado em cerca de 30 kDa [31]. A principal função atribuída a ela é a de servir de base para a formação do complexo como um todo, estabilizando os demais componentes [29,31].

Por fim, a proteína Pen-2 apresenta 2 domínios transmembranares e ambas as extremidades luminais. Seu peso molecular é estimado em cerca de 12 kDa [28,31,32,33]. Sua função é promover a endoproteólise da presenilina, com sua consequente ativação [39].

O complexo γ -secretase é expresso em quase todos os tecidos dos mamíferos, com níveis bastante elevados no cérebro e neurônios [28,34]. Nas células, sua principal localização é no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. [35,36]. No entanto, ele também pode ser encontrado em outros compartimentos membranares, tais como na mitocôndria, membrana celular, envelope nuclear e lisossomos [36,42].

Diversos trabalhos tentaram determinar a proporção em que cada proteína está presente no complexo maduro. No entanto, existem muitas informações conflitantes a respeito do peso

molecular do complexo como um todo, dificultando tal estimativa [29]. A proposta mais aceita hoje é que as proteínas presenilina, nicastrina, Aph-1 e Pen-2 estejam presentes na proporção 1:1:1:1, fazendo com que o peso molecular mínimo do complexo seja de 230 a 250 kDa [32,33,40].

A formação do complexo começa com a formação de um subcomplexo entre Aph-1 e Nicastrina ainda no retículo endoplasmático. Em seguida, a presenilina ainda inativa (não clivada) interage com a nicastrina através de sua porção C-terminal e é estabilizada. Por fim, Pen-2 interage com a presenilina (via domínio transmembrana 4) e o complexo é transportado para o complexo de Golgi. Nesta organela há a maturação final do complexo, com a endoproteólise da presenilina e a glicosilação da nicastrina [28,32,33,41]. Um modelo estrutural do complexo é mostrado na figura 1.10.

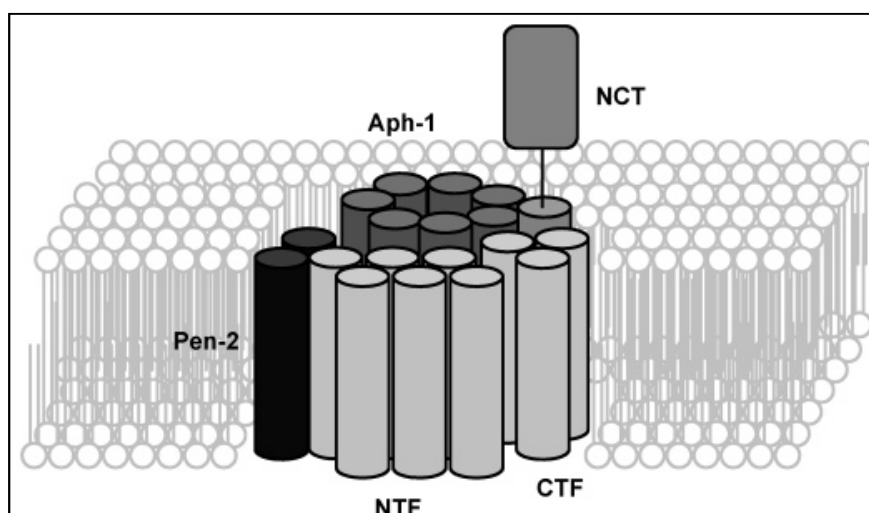


Figura 1.10: Modelo estrutural do complexo γ -secretase maduro. Há indícios de que as porções transmembrana 1 e 8 da presenilina estejam próximas, interagindo por pontes dissulfeto. Ela também interage com o subcomplexo Aph-1/nicastrina por sua porção C-terminal e com Pen-2 por seu domínio transmembrana 4 (NCT = nicastrina; NTF = fragmento N-terminal da presenilina; CTF = fragmento C-terminal da presenilina) [32,41].

1.3.2. Funções associadas ao complexo γ -secretase

As presenilinas, peptidases sinal e enzimas chamadas “*presenilin-like*” são aspártico proteases de atividade proteolítica bastante peculiar. Juntamente com as proteases-sítio 2 (metalo proteases) e as enzimas rombóides (serino proteases), elas fazem a chamada proteólise intramembranar regulada. Isso significa que seus substratos são clivados em seus domínios transmembrana, liberando um fragmento no exterior da célula e outro no espaço citoplasmático [33,40].

Dependendo do substrato e/ou da via de sinalização em questão, ambos os fragmentos gerados podem ter função específica. Em outros, apenas um deles é importante – geralmente a

porção liberada dentro da célula. Esta é translocada para o núcleo, onde interage com o DNA da célula e atua como fator de transcrição [31,33].

O caso mais conhecido é o envolvimento do complexo γ -secretase com o mal de Alzheimer, cujo mecanismo é demonstrado na figura 1.11. Nas células cerebrais de pessoas normais, a proteína precursora amilóide (APP) é clivada primeiramente pelas enzimas α ou β -secretase, liberando um fragmento extracelular e um que permanece inserido na membrana (de 83 ou 99 aminoácidos, respectivamente). Este passa por uma 2ª clivagem pela presenilina do complexo γ -secretase, produzindo um fragmento extracelular (peptídeo β -amilóide, que geralmente possui 40 aminoácidos) e um intracelular (domínio intracelular amilóide – AICD). O AICD é translocado para o núcleo onde age como fator de transcrição, diminuindo a susceptibilidade celular à apoptose [28].

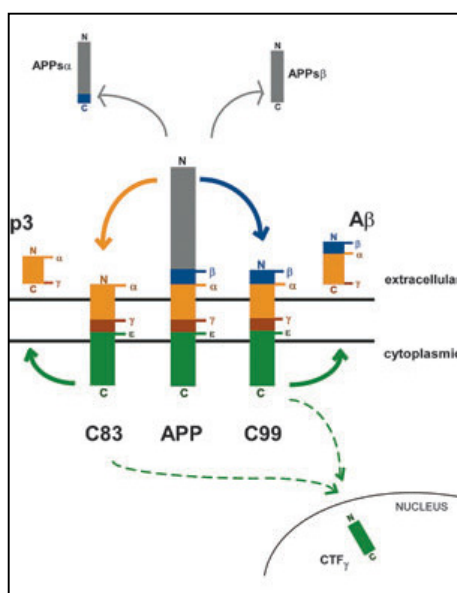


Figura 1.11: Sinalização envolvendo a proteína precursora amilóide (APP). O mecanismo é explicado com maiores detalhes no texto (APP = proteína precursora amilóide; Ab = peptídeo β -amilóide; C83 e C99 = peptídeos gerados pela clivagem da APP pela α ou β -secretase, respectivamente) [28].

Em pacientes com o mal de Alzheimer, há o depósito de placas e fibrilas de peptídeos β -amilóides, causando morte neuronal [32]. Há casos em que os sintomas começam a aparecer de forma muito precoce, em pacientes com cerca de 40 a 50 anos. Estas apresentam uma forma da doença associada a mutações na presenilina, que passam a processar a proteína precursora amilóide (APP) de forma aberrante. Ao invés de gerar o peptídeo β -amilóide com os usuais 40 aminoácidos, há um aumento na proporção de peptídeos com 42 aminoácidos. Estes tem maior propensão a formar os agregados que causam morte neuronal [28,32,33,34,40].

Cerca de 160 mutações em PS1 e 10 em PS2 já foram associadas a esta forma do mal de Alzheimer (Fig 1.12) [28,33]. Outro efeito prejudicial é a sobrecarga de Ca^{2+} no retículo endoplasmático, que acaba afetando vias de sinalização e tendo um efeito pró-apoptótico [28,33,36].

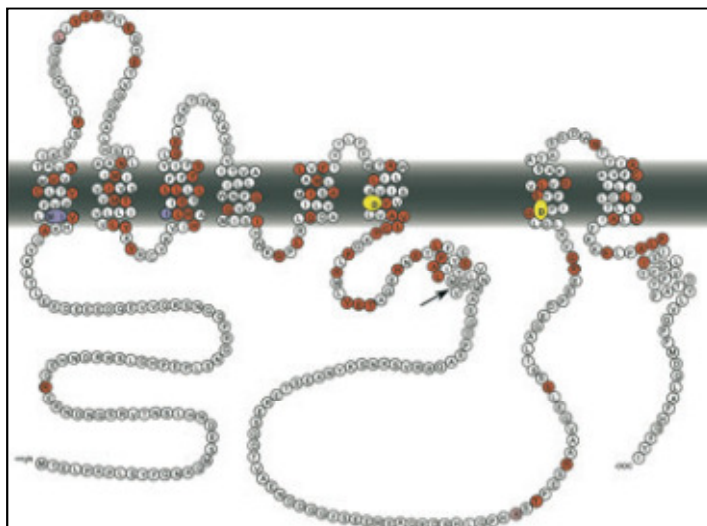


Figura 1.12: Estrutura da presenilina 1 (PS1) humana. Os resíduos destacados em amarelo correspondem ao sítio ativo da enzima. Resíduos marcados em vermelho, rosa e roxo são posições onde já foram descritas mutações associadas à forma precoce do mal de Alzheimer [28].

Outros substratos também são processados pelo complexo γ -secretase. Estes incluem a proteína Notch (um importante sinalizador durante processos de diferenciação celular no desenvolvimento de organismos multicelulares), o receptor de tirosina quinase ErbB-4, E e N-caderinas (envolvidas na adesão celular), CD43 e 44 (moléculas sinalizadoras do sistema imunológico), entre muitos outros [28-33,40].

2. JUSTIFICATIVA

Embora se conheça bastante do envolvimento do complexo γ -secretase com a transdução de sinal em humanos e outros eucariotos, muito pouco se conhece em organismos unicelulares e parasitos, como o *Trypanosoma cruzi*. Sendo assim, se faz necessária a caracterização deste complexo e de sua porção enzimática (presenilina), para entender sua função na interação parasito-hospedeiro.

Uma vez que trabalhos desenvolvidos por nosso grupo (ainda não publicados) demonstraram que existem diferenças estruturais e enzimáticas importantes entre as presenilinas de *T. cruzi*, humanas e de outros tripanosomatídeos (ex: *Leishmania amazonensis*), há ainda a possibilidade de se utilizar as informações deste complexo para desenhar novos alvos diagnósticos e quimioterápicos para a Doença de Chagas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- ✓ Caracterizar o complexo γ -secretase de *Trypanosoma cruzi*, sua porção enzimática (presenilina-símile) e validá-los como possíveis alvos terapêuticos e/ou para diagnóstico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar através de estudos bioquímicos e estruturais-imunológicos os componentes do complexo γ -secretase de *Trypanosoma cruzi*;
- ✓ Caracterizar os epitopos B-lineares das proteínas pertencentes ao complexo γ -secretase do *T. cruzi*;
- ✓ Obter anti-soros específicos para estudos de co-localização celular das proteínas pertencentes ao complexo γ -secretase do *T. cruzi*;
- ✓ Caracterizar a associação da Cruzipsina I (presenilina-símile) com o complexo γ -secretase por técnicas bioquímicas pós-purificação parcial;
- ✓ Avaliar a capacidade bloqueadora *in vitro* de inibidores peptideomiméticos anti-presenilina, procurando validar a enzima como um alvo quimioterapêutico;
- ✓ Validar alguns epitopos B-lineares das proteínas pertencentes ao complexo γ -secretase do *T. cruzi* como alvos de diagnóstico específico.

4. METODOLOGIA

4.1. SOROS HUMANOS

Os soros de pacientes chagásicos foram coletados pelo Laboratório de Doenças Parasitárias (IOC/FIOCRUZ) nos estados de Minas Gerais, Piauí e Mato Grosso do Sul no período de abril/2007 a julho/2010. Os pacientes eram de ambos os sexos, com idades entre 14 e 84 anos (média de 54 anos) e com Doença de Chagas confirmada tanto por exames clínicos quanto laboratoriais (IFI; ELISA convencional; ELISA recombinante; xenodiagnóstico e PCR).

Soros humanos de doadores negativos para Doença de Chagas foram obtidos no banco de soros do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos (IOC/FIOCRUZ), cedidos pelo HEMORIO.

4.2. CULTIVO DE MICROORGANISMOS E EXTRAÇÃO DO COMPLEXO γ -SECRETASE DE *T. CRUZI*

Epimastigotas de *T. cruzi* cepa CL Brener (10^{11} células) foram cultivados em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os parasitas em fase log (4º dia) foram concentrados por centrifugação (5000g, 4°C, 30 minutos), lavados por 3 vezes em PBS pH 7,2 (5000g, 4°C, 30 minutos), ressuspensos em tampão acetato 0,1M pH 3,5 e submetidos a 6 ciclos de congelamento e descongelamento (“freeze-thawing”). Um primeiro fracionamento foi realizado por ultracentrifugação (100.000g, 4°C, 1h), após o qual o sobrenadante foi recolhido (fração solúvel). O pellet foi ressuspensão e extraído por 1h a 4°C em tampão acetato

0,1M pH 3,5 contendo 1% CHAPS sob vigorosa agitação e submetido a nova ultracentrifugação (100.000g, 4°C, 1h), após a qual o sobrenadante também foi recolhido (fração detergente).

Ambas as frações (detergente e solúvel) foram submetidas a cromatografia de afinidade em coluna de pepstatina A-agarose. Foram utilizados o tampão acetato 0,1M pH 3,5 como tampão de equilíbrio (acrescido de 0,1% de CHAPS para a fração detergente) e o tampão Tris.HCl pH 8,6 como tampão de eluição (acrescido de 0,1% de CHAPS para a fração detergente). A eluição das proteínas foi monitorada por absorbância a 280nm e as amostras protéicas obtidas das frações detergente e solúvel foram denominadas Cruzipsina-I (CZP-I) e Cruzipsina-II (CZP-II), respectivamente [26]. A concentração de proteína nas amostras foi estimada pela técnica de Lowry [43] usando o kit DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, USA), tendo a albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA E EFEITO DOS INIBIDORES L-685,458 ((1S-BENZYL-4R-[1-(1S-CARBAMOYL-2-PHENETHYLCARBAMOYL)-1S-3-METHYLBUTYLCARBAMOYL]-2R-HYDROXY-5-PHENYLPENTYL}CARBAMIC ACID *TERT*-BUTYL ESTER)); DAPT (N-[N-(3,5-DIFLUOROPHENACETYL)-L-ALANYL]-S-PHENYLGLYCINE T-BUTYL ESTER) E COMPOSTO XXI/E ((S,S)-2-[2-(3,5-DIFLUOROPHENYL)-ACETYLAMINO]-N-(1-METHYL-2-OXO-5-PHENYL-2,3-DIHYDRO-1H-BENZO[E][1,4]DIAZEPIN-3-YL)-PROPIONAMIDE))

A atividade enzimática da Cruzipsina-I (presenilina-símile) foi medida na fração detergente em tampão acetato 0,1M pH 3,5 acrescido de 0,1% de CHAPS a 25°C. A reação foi iniciada com a adição do substrato [Phe-Ala-Ala-Phe(4NO₂)-Phe-Val-Leu-O₄MP ; (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)] (0,1mM) à enzima (2,5 µg) e a absorbância do substrato não consumido foi lida a 300nm após 30 e 60 minutos de reação. Todas as reações foram realizadas em duplicata e controles apropriados foram realizados em paralelo nas mesmas condições sem inibidor.

Os ensaios de inibição enzimática foram realizados conforme descrito [26]. Os inibidores utilizados foram L-685,458 (1S-Benzyl-4R-[1-(1S-carbamoyl-2-phenethylcarbamoyl)-1S-3-methylbutylcarbamoyl]-2R-hydroxy-5-phenylpentyl}carbamic Acid *tert*-butyl Ester) (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha), DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e Composto XXI, E ((S,S)-2-[2-(3,5-Difluorophenyl)-acetylamino]-N-(1-methyl-2-oxo-5-phenyl-2,3-dihydro-1H-

benzo[e][1,4]diazepin-3-yl)-propionamide)) (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha), todos já descritos como sendo inibidores do complexo γ -secretase em diferentes sistemas celulares de mamíferos [44,45,46] (Fig. 3.1). Estes foram dissolvidos em DMSO e utilizados nas concentrações finais de 2, 5 e 10 μ M. A enzima foi pré-incubada durante 15 min com cada um dos inibidores nas diferentes concentrações e em seguida as reações foram conduzidas conforme descrito acima.

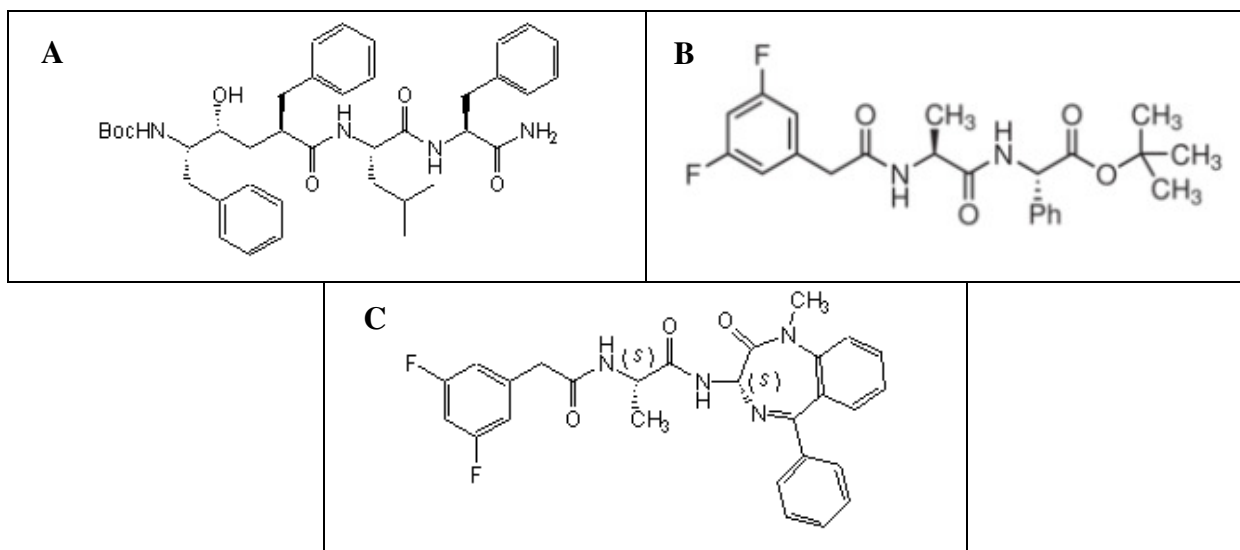


Figura 3.1: Estrutura química dos inibidores do complexo γ -secretase utilizados neste trabalho. A: L-685,458 ((1S-Benzyl-4R-[1-(1S-carbamoyl-2-phenethylcarbamoyl)-1S-3-methylbutylcarbamoyl]-2R-hydroxy-5-phenylpentyl)carbamic Acid *tert*-butyl Ester) [47]; B: DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine *t*-butyl ester) [48]; C: Composto XXI/E ((S,S)-2-[2-(3,5-Difluorophenyl)-acetylamino]-N-(1-methyl-2-oxo-5-phenyl-2,3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3-yl)-propionamide)) [49].

4.4. ANÁLISES *IN SILICO*

A busca pelas sequências das proteínas formadoras do complexo γ -secretase em *T. cruzi* foi realizada através de homologias com sequências de proteínas já identificadas e anotadas em outros organismos no banco de dados Uniprot [<http://www.uniprot.org/>]. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o servidor Tcoffee [<http://tcoffee.vital-it.ch/cgi-bin/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>].

Gráficos de hidropaticidade de cada proteína foram obtidos com a ferramenta ProtScale [<http://web.expasy.org/protscale/>]. A predição da estrutura secundária das proteínas foi realizada através dos servidores PSIPRED [<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>] e CDM [<http://gor.bb.iastate.edu/cdm/>]. A predição de estrutura terciária foi realizada pelo servidor LOMETS [<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/LOMETS/>].

Alguns parâmetros físico-químicos referentes aos peptídeos utilizados neste trabalho (massa molecular, pI teórico e hidropaticidade estimada) foram calculados com a ferramenta ProtParam [<http://web.expasy.org/protparam/>].

4.5. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM MEMBRANAS CELULÓSICAS

A caracterização dos determinantes antigênicos (epitopos B) das proteínas componentes do complexo γ -secretase identificadas em *T. cruzi* foi realizada através da técnica de *Spot Synthesis* [50]. Bibliotecas de peptídeos sintéticos foram obtidas em membrana celulósica (Intavis, Koeln, Alemanha) funcionalizadas com polietilenoglicol (PEG), utilizando o equipamento Spot Synthesis (modelo ASP-222, Intavis, Koeln, Alemanha) e a estratégia F-moc de acordo com procedimento padronizado fornecido pelo fabricante. O plano de distribuição dos aminoácidos, assim como a determinação dos protocolos foi definido pelo programa de computação Multipeps [51]. A identificação das menores sequências peptídicas que caracterizam os determinantes antigênicos específicos foi realizada utilizando soros de pacientes chagásicos através de *immunoblotting*, conforme descrito [52]. A quantificação do sinal emitido foi realizada com o *software* TotalLab TL100 (nonlinear dynamics, Newcastle, Inglaterra).

4.6. SÍNTESE DE PEPTÍDEOS EM SOLUÇÃO

Algumas das sequências dos epitopos B-lineares definidas para cada proteína foram utilizadas na síntese de peptídeos pela metodologia de síntese em fase sólida, utilizando a estratégia F-moc [53], com o auxílio de um sintetizador automático - modelo PSSM8 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Para uso nos ensaios seguintes, cada um dos peptídeos foi sintetizado em 2 lotes: um contendo Cys na região C-terminal e outro conjugado a biotina através da região C-terminal, conforme descrito [54].

4.7. PRODUÇÃO DE ANTI-SOROS MONOESPECÍFICOS

Os peptídeos contendo Cys na região C-terminal foram conjugados covalentemente à proteína BSA usando o kit *Maleimide activated kit* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para a obtenção dos anti-soros, 4 coelhos (3 machos e 1 fêmea da raça Nova Zelândia, com peso médio de 2,6 Kg) foram inoculados (1 com cada peptídeo) por 4 vezes de acordo com procedimento padrão [55]. Foram utilizados 50 μ g de

peptídeo conjugado a BSA em cada inoculação, dissolvidos em 500 μ L de PBS pH 7,2. Na 1^a dose, foram adicionados à mistura inoculada 500 μ L de adjuvante completo de Freund e nas demais doses foi utilizado igual volume de adjuvante incompleto de Freund. A sangria dos animais foi realizada pela veia marginal da orelha e a reatividade dos soros foi avaliada por ELISA e pela técnica de *Cellu-Spot*.

4.8. SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING PARA IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO COMPLEXO γ -SECRETASE

Para caracterizar alguns componentes do complexo γ -secretase em *T. cruzi*, foram realizados ensaios imunológicos com as frações protéicas isoladas de epimastigotas usando os soros anti-peptídeos produzidos em coelhos (vide seção 4.7).

As frações protéicas isoladas após a cromatografia de afinidade foram concentradas usando filtros Microcon 30 (Millipore, Billerica, USA) de acordo com as instruções do fabricante e resolvidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% em condições de redução [56]. Para aferição do peso molecular aparente das proteínas, um gel foi corado com prata usando o kit *Silver Stain Plus Kit* (Bio-Rad, Hercules, USA).

A transferência das proteínas para membranas de nitrocelulose (“*western blotting*”) a partir de um segundo gel foi realizada num sistema semi-seco (*Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell*, Bio-Rad, Hercules, USA) a 15V por 20 minutos. Em seguida, os sítios de ligação livres das membranas foram bloqueadas (1h) em solução de caseína (3%) em tampão TBS contendo 0,5% de Tween 20, incubadas com soro primário (1:50) *overnight* a 4°C e com soro secundário anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (1h) (Abcam, Cambridge, UK) diluído 1:5000.

A revelação da reação antígeno-anticorpo foi realizada por quimioluminescência (substrato Tropix CDPStar Ready-to-use With Nitro-block II, Applied Biosystems, Grand Island, USA) e as imagens capturadas num sistema MF-ChemiBIS (DNR, Jerusalém, Israel).

4.9. MICROSCOPIA CONFOCAL PARA LOCALIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO COMPLEXO γ -SECRETASE EM EPIMASTIGOTAS DE *T. cruzi*

Ensaios de imunofluorescência em microscopia confocal foram realizados visando localizar alguns componentes do complexo γ -secretase em epimastigotas de *T. cruzi*, usando os soros anti-peptídeos produzidos em coelhos (vide seção 4.7).

Epimastigotas de *T. cruzi* cepa CL Brener em fase log foram lavados por 2 vezes em PBS pH 7,4 (1500g, 10 minutos, 25°C) e fixados em PBS pH 7,4 contendo 4% de formaldeído por 10 minutos a temperatura ambiente. Após 2 novas lavagens em PBS pH 7,4 (10 minutos), a concentração de células foi ajustada para $4,5 \times 10^6$ células/mL. 10µL de suspensão foram depositados em lâminas para imunofluorescência, secadas em estufa (37°C *overnight*), acondicionadas em papel filtro e conservadas a -20°C até o momento de sua utilização.

Para a realização da microscopia confocal, as lâminas foram descongeladas a temperatura ambiente e em seguida lavadas com PBS pH 7,4. Os sítios livres foram bloqueados (caseína 1% em PBS, 15 minutos, 37°C) e as lâminas incubadas com soros primário (1:25, 30 min, 37°C) e secundário (1:500, 30 min, 37°C) anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa 488 (Invitrogen, Grand Island, USA) ambos em câmara úmida. Por fim, as lâminas foram montadas com DAPI e glicerina tamponada pH 9,0 e fotografadas ao microscópio confocal modelo TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

Para a realização da microscopia com células permeabilizadas, foi realizada uma incubação em tampão PBS contendo 0,5% de Tween 20 por 5 minutos após a primeira lavagem. Neste caso, as soluções de bloqueio e de diluição dos anticorpos primário e secundário continham 0,5% de Tween 20.

4.10. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Testes de ELISA diagnóstico para Doença de Chagas foram desenvolvidos utilizando sequências de peptídeos selecionadas a partir das proteínas do complexo γ -secretase de *T. cruzi*.

Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante da placa revestida com estreptavidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e peptídeos acoplados à biotina (ver item 4.6). Foram avaliados 4 peptídeos pertencentes a 2 proteínas diferentes do complexo, numa concentração de 2 µg/mL ou com uma mistura dos 4 peptídeos (0,5 µg/mL de cada).

Soros de pacientes chagásicos e de doadores negativos para Doença de Chagas foram diluídos (1:50) em PBS contendo 0,5% de Tween 20, assim como o anticorpo secundário (1:14.000) anti-IgG humano conjugado a peroxidase (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha). A absorbância do substrato (ABTS Peroxidase Substrate, KPL, Maryland, USA) foi lida a 405 nm. Os valores de corte dos testes (“*cut-off*”) foram determinados usando a metodologia da curva ROC [57], de forma a obter simultaneamente os melhores valores de sensibilidade e especificidade.

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas (médias, desvios padrão, variâncias, testes t e curvas ROC) foram realizadas com o *software* SigmaPlot 10.0 (Systat Software Inc., Chicago, USA).

4.12. NORMAS ÉTICAS

Este trabalho contou com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ P-0279-P06/0264-05) e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP (CAAE-0005.011.0000-07)-FIOCRUZ.

5. RESULTADOS

5.1. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO CZP-I NA PRESENÇA DE INIBIDORES ESPECÍFICOS DE PRESENILINA

Para caracterizar a atividade enzimática da fração CZP-I (presenilina-símile) foram realizados ensaios usando um substrato peptídico específico para aspártico proteases e 3 inibidores do complexo γ -secretase de mamíferos: L-685,458 ((1S-Benzyl-4R-[1-(1S-carbamoyl-2-phenethylcarbamoyl)-1S-3-methylbutylcarbamoyl]-2R-hydroxy-5-phenylpentyl}carbamic Acid *tert*-butyl Ester)); DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine *t*-butyl ester) e Composto XXI/E ((S,S)-2-[2-(3,5-Difluorophenyl)-acetylamino]-N-(1-methyl-2-oxo-5-phenyl-2,3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3-yl)-propionamide)).

A análise do perfil cinético indica que a substância L-685,458 foi a única capaz de inibir a atividade de CZP-I em concentrações a partir de 5 μ M (Fig. 5.1 A). O composto XXI/E não mostrou atividade inibitória significativa sobre a fração CZP-I em nenhuma das concentrações testadas (Fig. 5.1 B). Além disso, o efeito do DAPT não foi consistente, uma vez que em pequenas concentrações (2 μ M) ele apresentou um efeito inibitório sobre a atividade da fração, porém em concentrações maiores (10 μ M) foi observado o efeito inverso (Fig. 5.1 C).

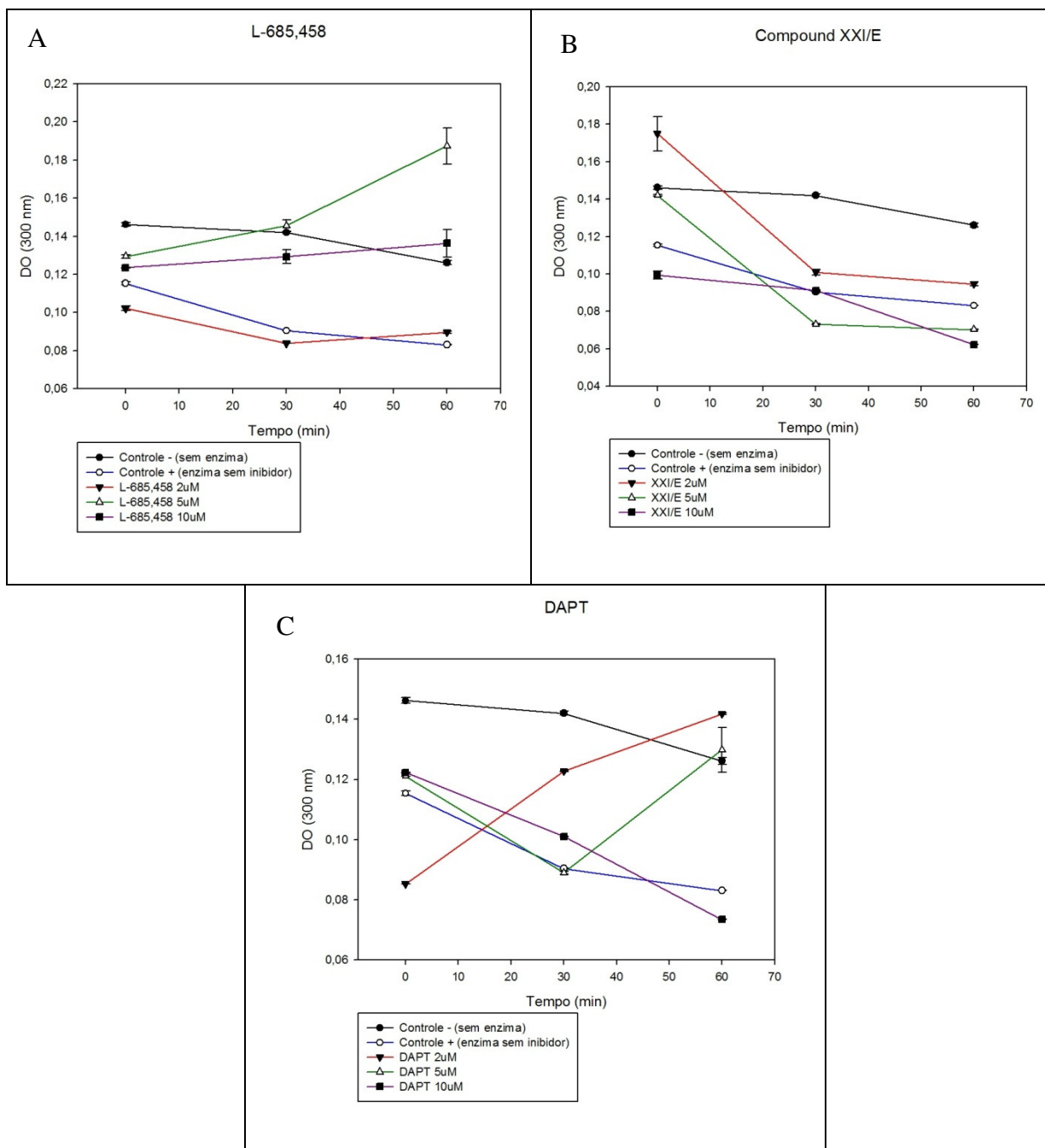


Figura 5.1: Efeito de inibidores do complexo γ -secretase sobre a atividade da fração CZP-I. A: L-685,458 ((1S-Benzyl-4R-[1-(1S-carbamoyl-2-phenethylcarbamoyl)-1S-3-methylbutylcarbamoyl]-2R-hydroxy-5-phenylpentyl}carbamic Acid *tert*-butyl Ester)); B: Compound XXI/E ((S,S)-2-[2-(3,5-Difluorophenyl)-acetylamino]-N-(1-methyl-2-oxo-5-phenyl-2,3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3-yl)-propionamide)); C: DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). As barras verticais representam a variância das duplicatas para cada ponto.

5.2. ANÁLISES *IN SILICO* DAS SEQUÊNCIAS PROTEÍCAS DOS COMPONENTES DO COMPLEXO γ -SECRETASE DO *T. cruzi*

A busca no banco de dados Uniprot retornou a presença de 3 proteínas do complexo γ -secretase em *T. cruzi*: **presenilina**, **nicastrina** e **Aph-1**, cujas informações estão sumarizadas nas tabelas 5.1, 5.2 e 5.3. Não foi encontrada nenhuma proteína homóloga a Pen-2 no banco de dados do *T. cruzi*. Os alinhamentos das sequências das proteínas realizadas através do servidor Tcoffee são mostrados nas figuras 5.2, 5.3 e 5.4

No alinhamento das proteínas presenilinas, é possível observar que existem regiões altamente conservadas, tais como o sítio ativo, o domínio PALP e a maior parte das regiões transmembrana (Fig. 5.2). Já no alinhamento das proteínas nicastrinas, o domínio transmembrana pode ser considerado como uma região de baixa similaridade (Fig. 5.3). Por fim, no alinhamento das proteínas Aph-1, é possível notar que a maioria das regiões transmembrana (com exceção de uma) são bastante conservadas (Fig. 5.4).

Tabela 5.1: Proteínas homólogas de *Trypanosoma cruzi* anotadas no banco de dados Uniprot [<http://www.uniprot.org/>] como presenilina.

Presenilina					
Espécie	Nome da proteína encontrada	Código de acesso	Nº de aminoácidos	Peso molecular estimado (kDa)	Homologia com a presenilina de <i>T. cruzi</i>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Presenilin-like aspartic peptidase, putative	Q4CMV5	372	41,627	-
<i>Homo sapiens</i>	Presenilin-1	P49768	467	52,668	32%
	Presenilin-2	P49810	448	50,140	31%
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Presenilin hop-1	O02100	358	39,865	27%
	Presenilin sel-12	P52166	444	50,034	28%
	Presenilin spe-4	Q01608	465	51,830	39%
<i>Drosophila melanogaster</i>	Presenilin homolog	O02194	541	59,304	28%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Presenilin-like protein At1g08700	O64668	453	49,308	36%
	Presenilin-like protein At2g29900	Q9SIK7	397	44,012	35%

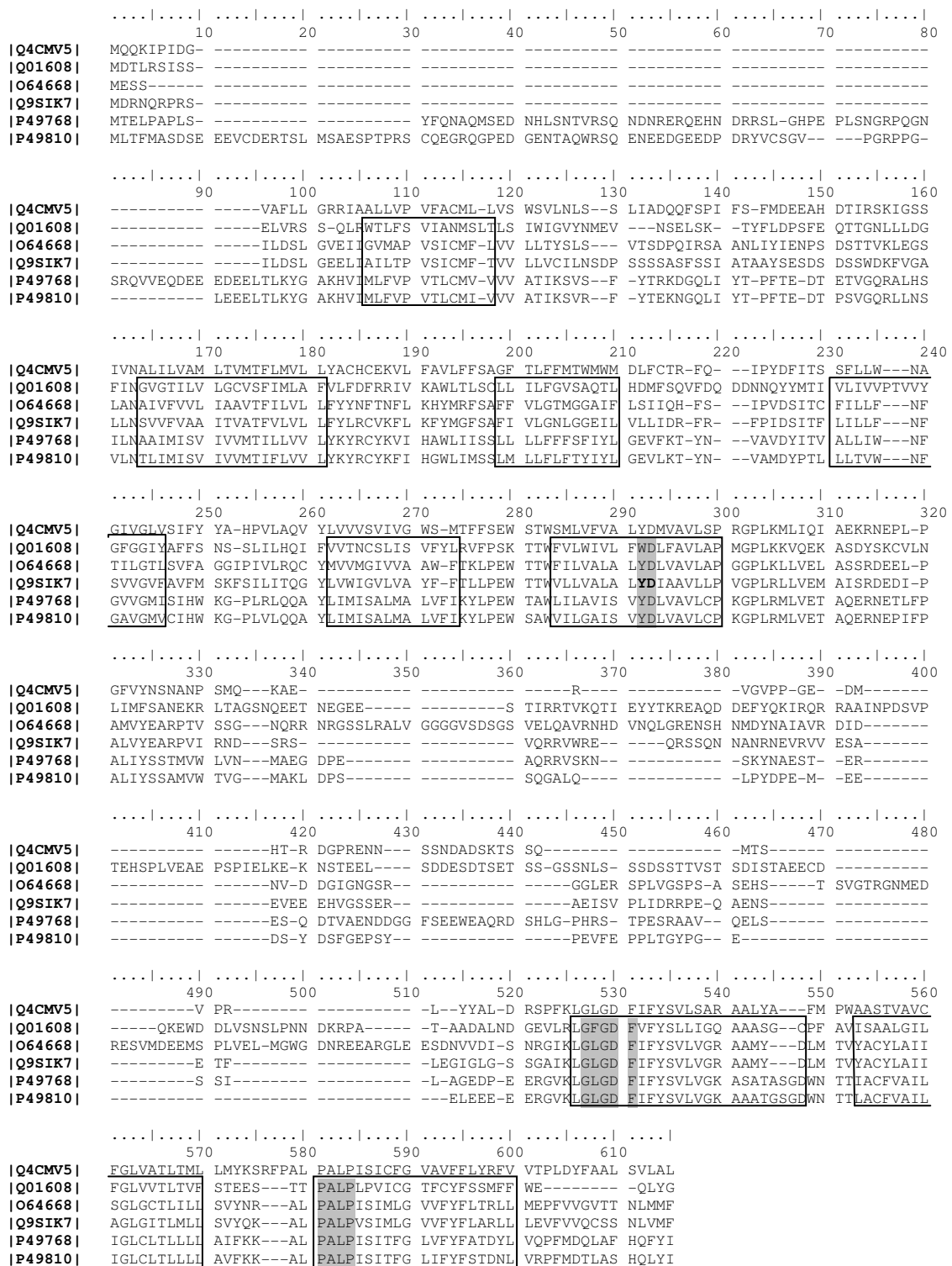


Figura 5.2: Alinhamento das seqüências de presenilinas conhecidas de *C. elegans*, *A. thaliana* e humana com a seqüência homóloga presente no genoma de *T. cruzi*. As regiões marcadas nos retângulos representam as regiões transmembrana das proteínas exceto a de *T. cruzi*. Em cinza, estão marcadas as regiões conservadas características da família A22 das aspártico proteases (sítio ativo e domínio PALP). Os números a esquerda representam os códigos de acesso da base de dados Uniprot.

Tabela 5.2: Proteínas homólogas de *Trypanosoma cruzi* anotadas no banco de dados Uniprot [<http://www.uniprot.org/>] como nicastrina.

<i>Nicastrina</i>					
Espécie	Nome da proteína encontrada	Código de acesso	Nº de aminoácidos	Peso molecular estimado (kDa)	Porcentagem de homologia com a nicastrina de <i>T. cruzi</i>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Putative uncharacterized protein	Q4DEM3	728	79,777	-
<i>Homo sapiens</i>	Nicastrin	Q92542	709	78,411	27%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nicastrin	Q8GUM5	676	73,007	24%

```

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      10      20      30      40      50      60      70      80
|Q4DEM3| MLRRRMVCMG G-----CPR GPTWTSI-F VLWIAAWLMT CGATAERGFSGDIPPAPHDA AYAAYFRNYP IVR-----
|Q92542| MATA----G GGSGADPGSR GLLRLLSFCV LLAG---LCR -----GNSVERK IYIPLNKTAP CVRLLNATHQ
|Q8GUM5| MAM-----GLIRLLSIAF TLVLLSILPL HLSLADEITS IESVPDLQKL MYVAV-DGFP CVRLLNLSGE

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      90     100     110     120     130     140     150     160
|Q4DEM3| -----PCI MKAVFMAVKS DDQSNNVAV RGC SIADNAV ----APHGL LLLHATEVAQ ASMDGCEDNA PSLQDIIRGL
|Q92542| IGCQSSISGD TGVIHVVEKE EDL-----QWVL TDGNPPYVM LL-ESKHF-- -----TR DLMEKLGKR-
|Q8GUM5| IGC SN--PGI NKVVAPIIKL KDV-----KDLV ----QPHTI LV-T-----A DEMEDFFTRV

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     170     180     190     200     210     220     230     240
|Q4DEM3| SIPDVFSSG IGLVLSTRDK DDYEEGGREN RVKINTQYDM TCFLAAVQHY NAVANKHTQG LMPPIITAVAF SDDNRCCRFS
|Q92542| -----TSR IAGLAVS--- -----KDLV ----QPHTI LV-T-----A DEMEDFFTRV
|Q8GUM5| S-TDLSFASK IGGVLVESG- -----SNFQQKLGKF SPDKR-----

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     250     260     270     280     290     300     310     320
|Q4DEM3| GDRRSGEELL LPREVRSVYD FV-----ILYFPSAAT SSSGPANSDW TALMNAAGFN RIHW-AEGRR -----YPQN
|Q92542| -----CPNDGFGVYS NSYGPEFAHC REIQWNSLGN GLAYEDFSFP IFLLEENET KVIKQCYQDH NLSQNGSAPT
|Q8GUM5| -----FPQAQFSPYE NV-----EYKWNASAS SIMWRNYNFP VYLLSESGIS AVHE-ILSKK KMKHGTYTSD

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     330     340     350     360     370     380     390     400
|Q4DEM3| VLETRNGMSL AELLSSPTRV RSCLE----GSPSPS CVPLSGWTWV TSTADMRWEW NETSLNFEKK T-RKGAVALL
|Q92542| FPL--CAMQL FSHMHAIVST ATCMRRSSIQ STFSINPEIV CDPLSDYNVW SMLKPINT-- ----T-GTL KPDDRVRVAA
|Q8GUM5| VAEF--NMVM ETTKAGTHNS EAELQ----EGT CLPLGGYSVW SSLPPIVSV-- ----S-SSN N-RKPVVLTV

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     410     420     430     440     450     460     470     480
|Q4DEM3| VASTAVSLVQ DATPGADCPA SAIVATLSVL EALRRVGGDD --SRDVYAFF FPGEHVGSVG SARFISDATM LECVHAGLSN
|Q92542| TRLDSSRSFFW NVAPGAESAV ASFVTQLAAA EALQKAPDVT TLPRNVMFVF FQGETFDYIG SSRMVDYMEK GKF-----
|Q8GUM5| ASMDTASFPR DKSPGADSPI SGLVALLGAV DALSRVDGIS NLKKQLVFLV LTGETWGYLG SRRFLHELDL HSDAVAGLSN

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     490     500     510     520     530     540     550     560
|Q4DEM3| CTALAYKEKL NFFTVDVFNAI DTFLVVDQVA YQDA---P-L YYHVDSRVGK TGSAQQKAE L--EMEKS- ----VRRAS
|Q92542| -----PVQLENV DSFVELGQVA LRTSL--E-L WMHTDPVSQK NESVRNQVED LLATLEKSGA GVPVILRRP
|Q8GUM5| -----TSI ETVLEIGSVG KGLSGGINTF FAHKT---R VSSVTNMTLD ALKIAQDSL A SKNIKILSAD

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     570     580     590     600     610     620     630     640
|Q4DEM3| TTRLPYSPIT TLLDLLPAVM AGEKVFLTLT RYNTTFANPD VFTVVDKTAE HSAL-----R PASVAEAA
|Q92542| NQ--SQPLPPS SLQRF LRARN -I--SGV VLA DHSGAFHNKY YQSIYDTAEN INVSYPEWLS PEEDLNFTVD TAKALADVAT
|Q8GUM5| TA--NPGIPPS SLMAFMRKNP QT--SAVVLE DFDTFVKNKF YHSHLDDL SN ---I-----NSSSVVAAAS

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     650     660     670     680     690     700     710     720
|Q4DEM3| VMLRVLLPPT QNAAETPPVT ----SVNRS L VEQLWGCFT E NLQCKFLSA- PNDVAEFMAP DYS-VGEMAN SR-----
|Q92542| VLGRALYELA GGTNFSDTVQ ----ADPQTV TRLLYGF L I K ANNSWFQSIL RQDLRSYLGD GPL-QHYIAV SS-----
|Q8GUM5| VVARTLYILA SDNKDTSNSA LGSIHVNASF VEELLTCLL- --ACEPGLS- CNLVKDYISP TNTCPGNYAG VILGEPSSKP

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     730     740     750     760     770     780     790     800
|Q4DEM3| -----ITDT---QA AIEAALH-----
|Q92542| -----PTNT---TYVVQYALAN LTGTVVNLTR EQCQDPSKVP SENKDLYEYS
|Q8GUM5| YLGYVGDVSR FLWNFLADKT SVQRGNTTSV CSRGVCSKTD EVCIKAESN-----

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     810     820     830     840     850     860     870     880
|Q4DEM3| -----RIGWTDVA RSPAVPK-SL RIPH--GDWG ATWEQDRDWM RLHNSRYEL HVMSFWRGNI GARSTMVGSD
|Q92542| WVQGPLHSNE TDRLPRCVRS TARLARALSP AFEL--SQWS ST-----EYST WTESRWK-DI RARIFLIASK
|Q8GUM5| -----KEGTCVVS TTRVVPAYST RLKYNDGAWT ILPQNSSDSM GM---VDPV WTESNWD-TL RVHVTYVQHS

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     890     900     910     920     930
|Q4DEM3| TVALIFLMLS IATIS----LTLCIHV -----CVR K
|Q92542| ELI LITLTVG F-----G ILIFSLIVTY CINAKADVLF IAPREPGA VS Y
|Q8GUM5| AYI NAVLVAG ITVTTLAYIG ILAAKSIITK A-----LQK D

```

Figura 5.3: Alinhamento das sequências de nicastrinas conhecidas de *A. thaliana* e humana com a sequência homóloga presente no genoma de *T. cruzi*. A região marcada no retângulo representa as regiões transmembrana das proteínas exceto a de *T. cruzi*. Os números a esquerda representam os códigos de acesso da base de dados Uniprot.

Tabela 5.3: Proteínas homólogas de *Trypanosoma cruzi* anotadas no banco de dados Uniprot [<http://www.uniprot.org/>] como Aph-1.

Aph-1					
Espécie	Nome da proteína encontrada	Código de acesso	Nº de aminoácidos	Peso molecular estimado (kDa)	Porcentagem de homologia com a Aph-1 de <i>T. cruzi</i>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Putative uncharacterized protein	Q4E0K9	396	43,749	-
<i>Homo sapiens</i>	Gamma-secretase subunit APH-1b	Q8WW43	257	28,460	22%

```

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      10      20      30      40      50      60      70      80
|Q4E0K9| MHLTGMLGCG LLLYAPLLIA SFAAIATHPQ LLLLALSVVL VALVGPFIISG VLYLVMKPV- -----A LLPLLLLDV
|Q8WW43| MTAAVFFGCA FIAFGPALAL YVFTIATEPL RIIFLIAGAF FWLVSLLISS LVWFMARVII DNKDGPTQKY LLIFGAFVSV

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
      90     100     110     120     130     140     150     160
|Q4E0K9| TVTEFLRWVL LFTLYRVESV TRSYGQLLVA SPMRFALVSA AVCGGFGTIS -VLRGAGTLF DSTQRMTFYT RGTAYDLNV
|Q8WW43| YIQEMFRFAY KLLKKASEG LKSINPGETA PSMR--LLAY VSGLGFGIMS GVFSFVNILS DSLGPGTVGI HGDSP-----

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     170     180     190     200     210     220     230     240
|Q4E0K9| CPRLPLLMHS TLOAFLLLLC QVAWAVMTCQ AVTALQKQQ POKAWRRLLL FYRVNTSKKK LPAVDELEPL RGSPTQINV
|Q8WW43| ---QFFIYS AFMTLVITLL HFWGIVFED GC----- EKKKWGILLI V-----

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     250     260     270     280     290     300     310     320
|Q4E0K9| ETTPQOKKRE EAPPLVTHIS EDEEHRVCP REWVDNTEQR EKEGDGDGEE RGEFVCFIKT PQVAMKDDGG SQPLLPREQ
|Q8WW43| -----LLTHLL V-----

.....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....| .....|
     330     340     350     360     370     380     390     400
|Q4E0K9| EETQLPEPTL LRSKPLLAVA SLLAPFLHL LFAMFSLFNS GAYNKATQKE VPRRGCVISL PLQASVTAIS LLWMA--GII
|Q8WW43| ----SAQTF IISYYG---I NLSAFIILV LMGTWAFLLA GFSRSLK-- -----LC LLCQDKNLL

.....|.....
|Q4E0K9| HVERARAAC
|Q8WW43| YNQRS---R

```

Figura 5.4: Alinhamento da sequência de Aph-1b humana conhecida com a sequência homóloga presente no genoma de *T. cruzi*. As regiões marcadas nos retângulos representam as regiões transmembrana da proteína humana. Os números a esquerda representam os códigos de acesso da base de dados Uniprot.

Com o objetivo de obter mais informações que ajudassem na predição da estrutura das proteínas identificadas na base de dados do *T. cruzi*, foram feitos gráficos de hidropaticidade das 3 proteínas (códigos de acesso da base de dados Uniprot: Q4CMV5, Q4DEM3 e Q4E0K9) usando a ferramenta ProtScale, disponível *online* (vide seção 4.4) (Figs. 5.5 A, B e C). Nesta metodologia, são atribuídos valores positivos ou negativos para as regiões protéicas. Valores negativos representam regiões hidrofílicas; valores positivos (especialmente acima de

1.0) representam regiões hidrofóbicas e, conseqüentemente, com maior probabilidade de serem transmembrana.

É possível observar no gráfico da presenilina (Fig. 5.5 A) a presença de 9 regiões altamente hidrofóbicas, incluindo duas contendo os resíduos de Asp preditos como componentes do sítio ativo da enzima. No gráfico da nicastrina (Fig. 5.5 B) nota-se a presença de uma região altamente hidrofóbica próxima a região C-terminal da proteína. Por fim, o gráfico montado com a seqüência correspondente a Aph-1 indica a presença de 7 regiões hidrofóbicas.

A predição da estrutura terciária da presenilina do *T. cruzi* foi realizada pelo servidor LOMETS. Como apenas o fragmento C-terminal da presenilina humana está disponível na base de dados PDB (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do> ; PDB ID: 2kr6), este foi usado como molde para a predição da estrutura tridimensional da porção homóloga da enzima do *T. cruzi* (resíduos 226 a 372). É possível observar a presença de uma grande região sem estrutura secundária definida (“coil”), homóloga ao loop citosólico presente entre as regiões transmembrana 6 e 7 da presenilina humana. Além disso, há a formação de algumas estruturas em α -hélice e ausência de estruturas em folha- β (Fig. 5.6).

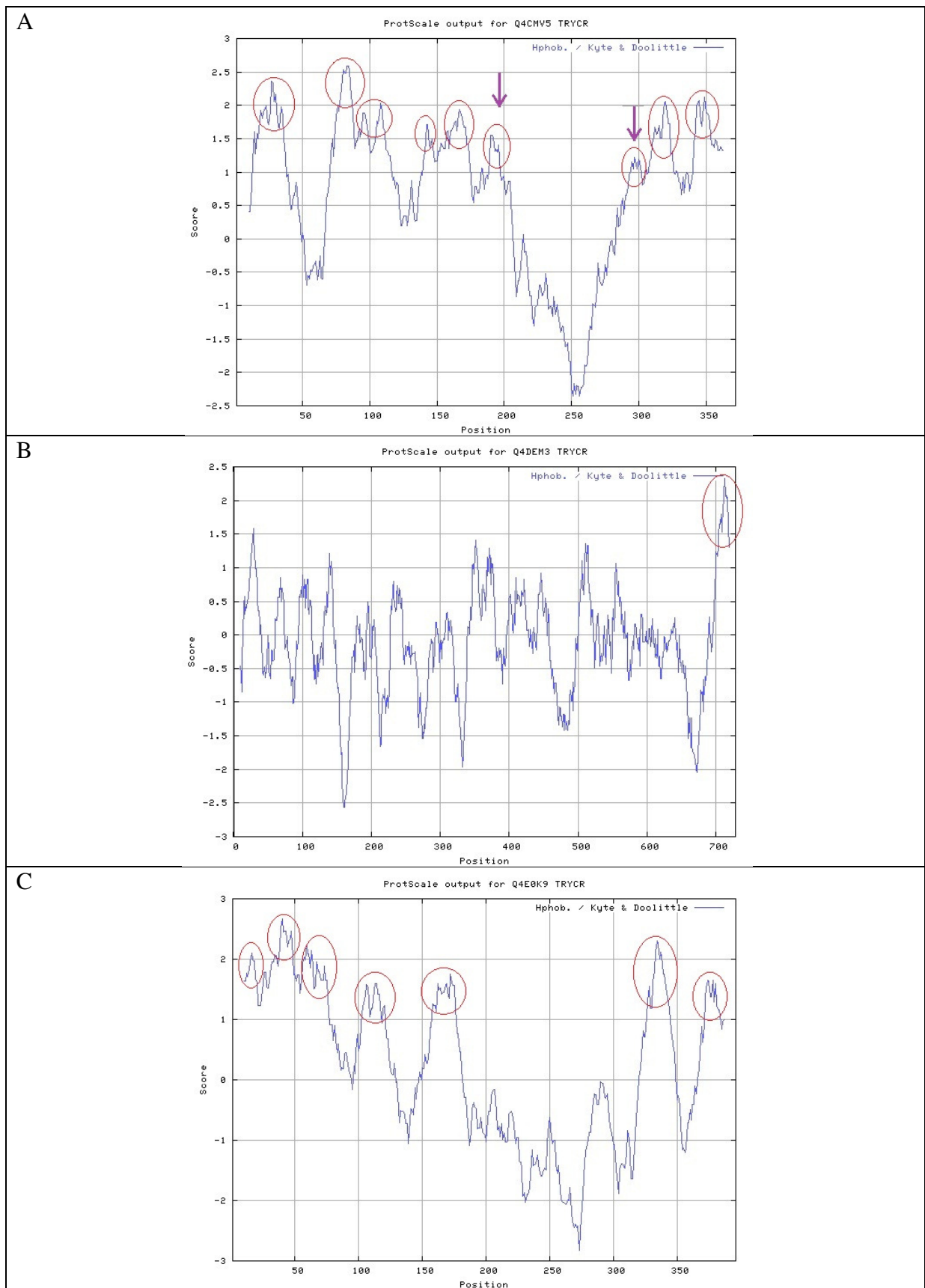


Figura 5.5: Perfis de hidropaticidade das proteínas presenilina (A), nicastrina (B) e Aph-1 (C) de *T. cruzi*. As circunferências em vermelho destacam regiões altamente hidrofóbicas que possuem propensão a serem regiões transmembrana. As setas em (A) indicam a posição dos resíduos de Asp que compõem o sítio ativo da enzima presenilina.

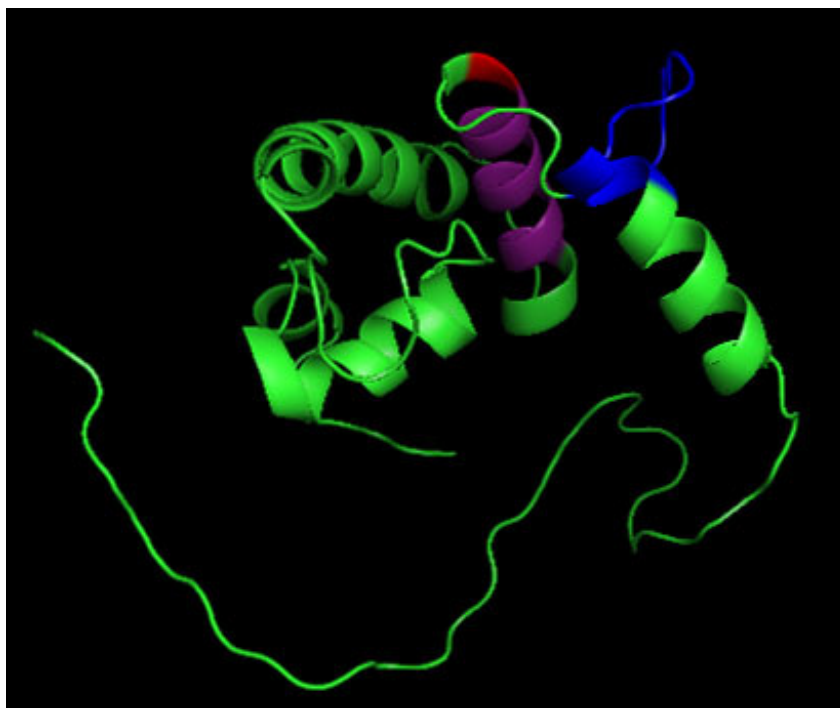


Figura 5.6: Localização dos epítopos da presenilina de *T. cruzi*, próximos ao centro ativo. A estrutura 3D da porção c-terminal (resíduos 226 a 372) foi gerada usando o servidor LOMETS. Em vermelho, destaca-se o resíduo de Asp do domínio **GLGDF** que compõe o centro ativo. Em roxo e azul estão marcados os epítopos identificados neste estudo pelo microarranjo de peptídeos (PRE-1 e PRE-2, respectivamente; vide Tab. 5.4).

5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS EPÍTOPOS B-LINEARES DAS PROTEÍNAS DO COMPLEXO γ -SECRETASE DO *T. CRUZI*

A caracterização dos determinantes antigênicos (epítopos B) das 3 proteínas do complexo γ -secretase identificadas em *T. cruzi* (presenilina, nicastrina e Aph-1) foi realizada através da técnica de *Spot-Synthesis*, usando uma biblioteca de 73 peptídeos para presenilina, 146 para nicastrina e 78 para Aph-1b e um *pool* (n=8) de soros de pacientes chagásicos previamente caracterizados por diferentes metodologias. Estes estudos identificaram 10, 5 e 10 epítopos nas proteínas presenilina, nicastrina e Aph-1b, respectivamente (Figs. 5.7, 5.8 e 5.9).

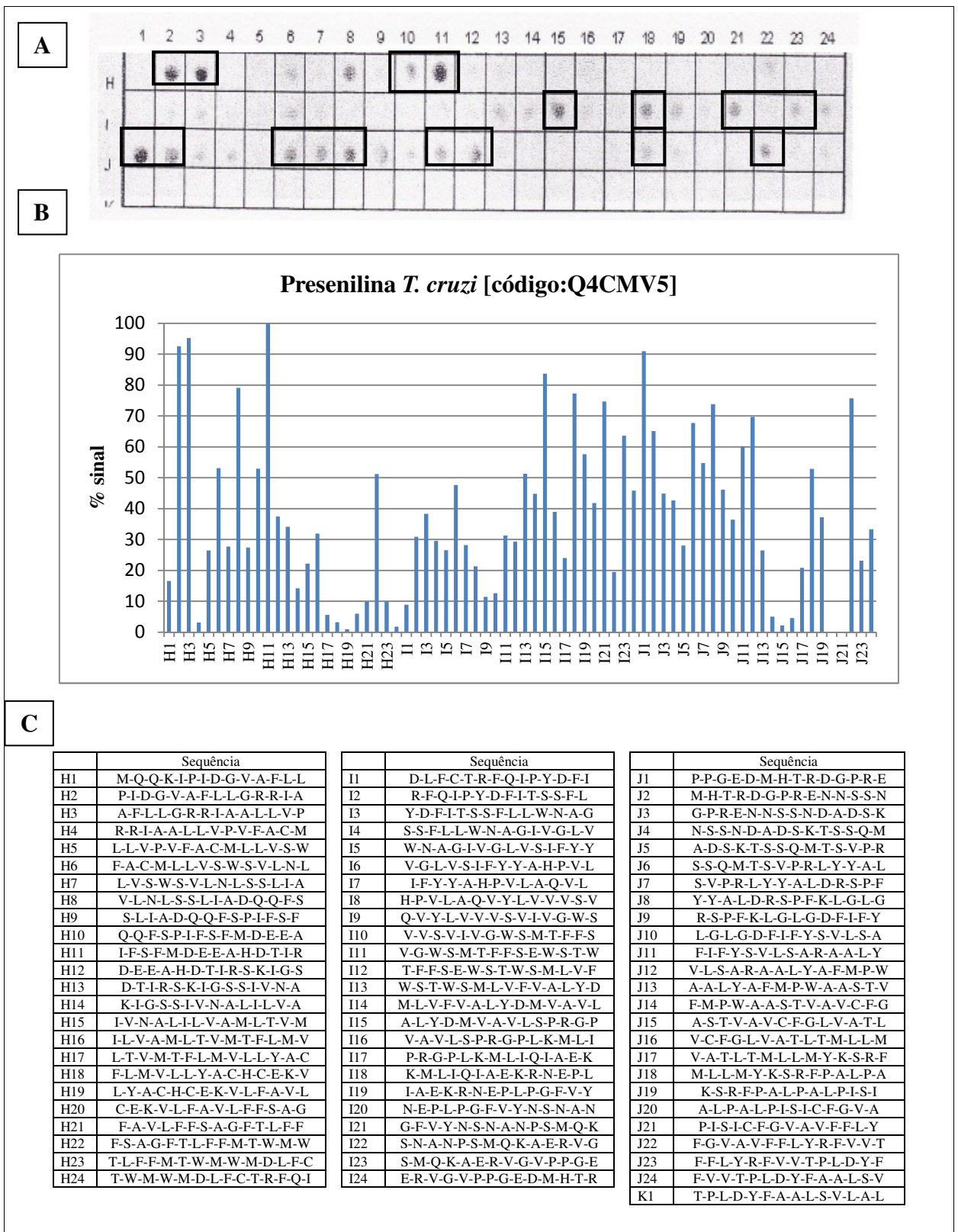


Figura 5.7: Reatividade dos peptídeos sintéticos produzidos a partir da sequência da presenilina de *T. cruzi* pela técnica de *Spot Synthesis* frente a um *pool* (n=8) de soros de pacientes chagásicos por quimiluminescência. A: membrana revelada. As sequências consideradas antigênicas estão marcadas nos retângulos; B: gráfico da intensidade de sinal dos spots produzidos. Foram consideradas antigênicas as sequências com reatividades acima de 50%; C: sequências dos peptídeos sintetizados na membrana.

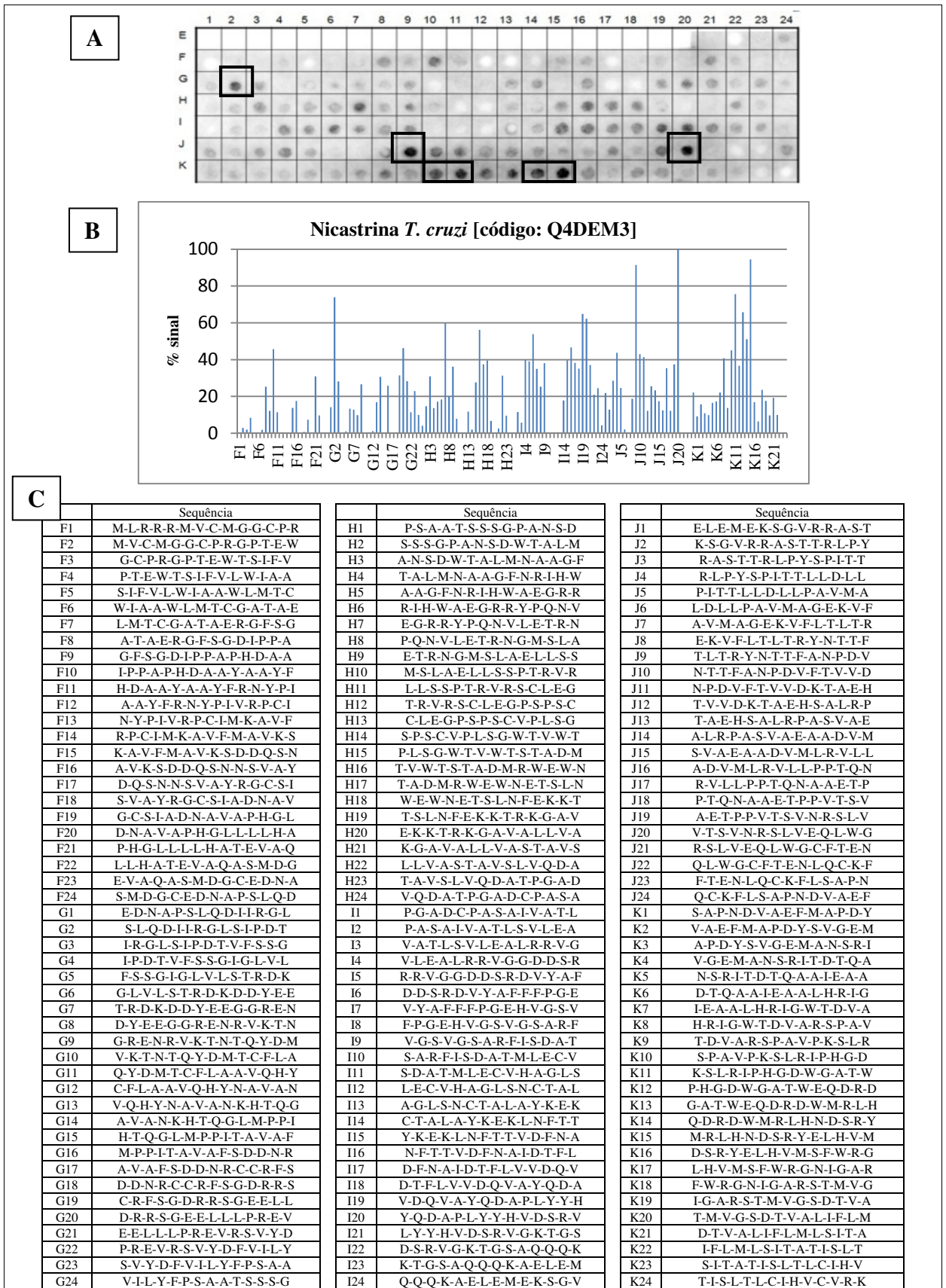


Figura 5.8: Reatividade dos peptídeos sintéticos produzidos a partir da sequência da nicastrina de *T. cruzi* pela técnica de *Spot Synthesis* frente a um pool (n=8) de soros de pacientes chagásicos por quimiluminescência. A: membrana revelada. As sequências consideradas antigênicas estão marcadas nos retângulos; B: gráfico da intensidade de sinal dos spots produzidos. Foram consideradas antigênicas as sequências com reatividades acima de 70%; C: sequências dos peptídeos sintetizados na membrana.

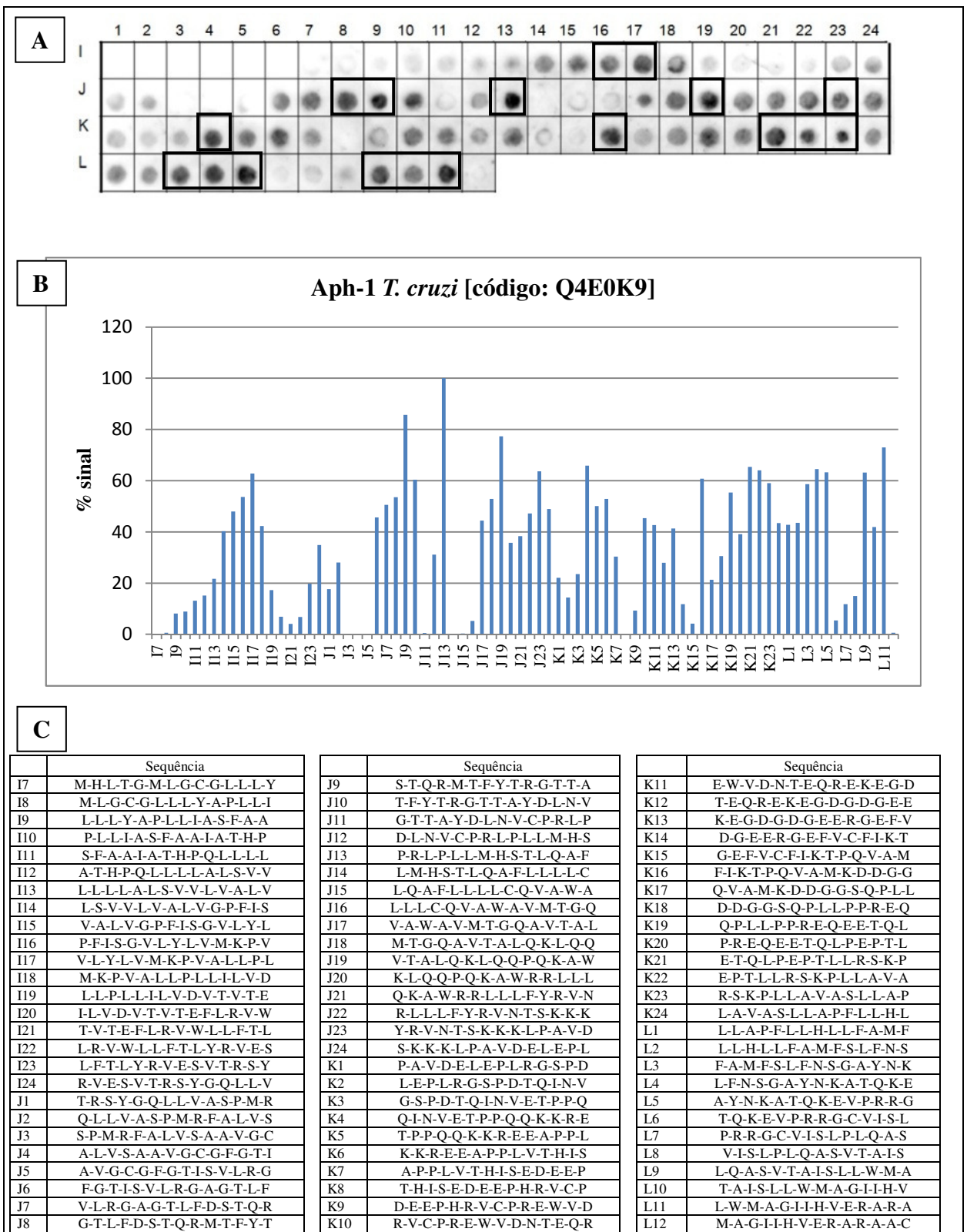


Figura 5.9: Reatividade dos peptídeos sintéticos produzidos a partir da sequência da Aph-1 de *T. cruzi* pela técnica de *Spot Synthesis* frente a um *pool* (n=8) de soros de pacientes chagásicos por quimiluminescência. A: membrana revelada. As sequências consideradas antigênicas estão marcadas nos retângulos; B: gráfico da intensidade de sinal dos spots produzidos. Foram consideradas antigênicas as sequências com reatividades acima de 50%; C: sequências dos peptídeos sintetizados na membrana.

5.4. PRODUÇÃO E ESPECIFICIDADE DOS ANTI-SOROS MONOESPECÍFICOS

Juntando as informações da técnica de *Spot Synthesis* com outros parâmetros físico-químicos – tais como estrutura secundária, peso molecular e carga líquida – foram selecionados 4 epítopos para síntese em fase sólida (2 de presenilina e 2 de nicastrina) (Tab. 5.4).

Tabela 5.4: Propriedades físico-químicas dos peptídeos sintetizados neste trabalho

Código do peptídeo	Proteína original	Sequência	Peso molecular estimado (Da)	Carga líquida estimada em pH 7,0	Grau de hidropaticidade
NIC-1	Nicastrina	SLQDIIRGLSIPDT	1527.7	- 1,1	0.129
NIC-2	Nicastrina	KSLRIPHGDWGATW	1623.8	1,2	-0.764
PRE-1	Presenilina	FIFYSVLSAR	1202.4	0,9	1.250
PRE-2	Presenilina	SVPRLYYALDRSP	1536.7	0,9	-0.485

Após a inoculação em coelhos, a reatividade dos soros produzidos frente aos peptídeos foi avaliada por ELISA e pela técnica de *Cellu-spot*. Dos 4 coelhos imunizados, os soros de 3 foram capazes de reconhecer os respectivos peptídeos inoculados, enquanto que 1 não apresentou reatividade frente ao respectivo peptídeo (Fig 5.10).

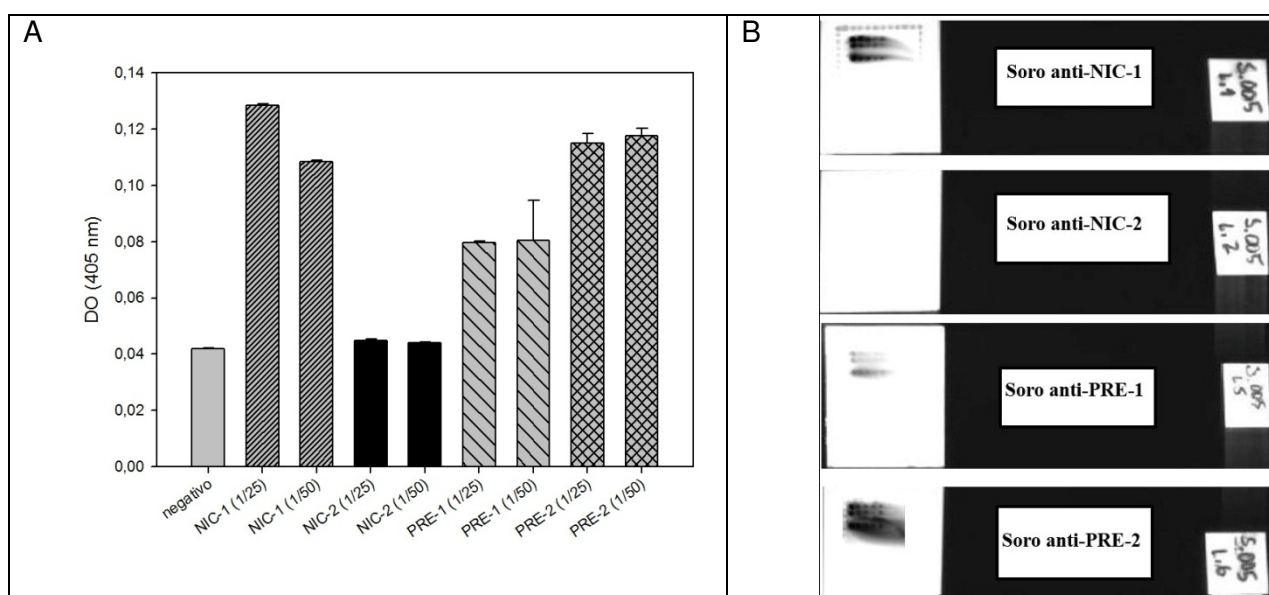


Figura 5.10: Reatividade dos soros de coelho anti-peptídeos de nicastrina (NIC-1 e NIC-2) e presenilina (PRE-1 e PRE-2) avaliados por ELISA (A) e *Cellu-spot* (B). As barras verticais (A) representam a média \pm DP das duplicatas de cada diluição. Cada lâmina do *Cellu-spot* (B) contém os peptídeos (NIC-1, NIC-2, PRE-1 ou PRE-2) aderidos à membrana celulósica incubados com o respectivo anti-soro (1ª e 2ª linhas: respectivo peptídeo; 3ª linha: controle positivo BSA).

5.5. SDS-PAGE E WESTERN BLOTTING

A análise por eletroforese (SDS-PAGE) sob condições de redução da fração detergente (CZP-I) evidenciou a presença de 4 bandas majoritárias, de peso molecular aproximado de 240, 56, 48 e 34 kDa. Na fração solúvel (CZP-II) foram evidentes também 4 bandas majoritárias, porém de pesos moleculares aparentes de 56, 52, 37 e 34 kDa (Fig. 5.11).

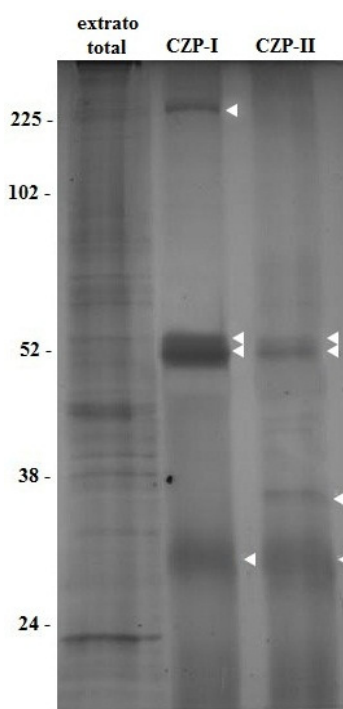


Figura 5.11: Perfis eletroforéticos das frações detergente (CZP-I) e solúvel (CZP-II) obtidas após cromatografia em coluna de pepstatina-agarose (gel de 10% corado com prata). As setas indicam as bandas evidenciadas em cada fração protéica.

A análise por *immunoblotting* com o soro anti-peptídeo de presenilina produzido revelou a marcação de uma única banda de peso molecular aproximado de 48 kDa na fração CZP-I. Quando o soro anti-peptídeo de nicastrina foi utilizado, a banda de 48 kDa foi fracamente marcada. Não foram reveladas bandas na fração CZP-II com nenhum dos 2 soros utilizados (Fig. 5.12).

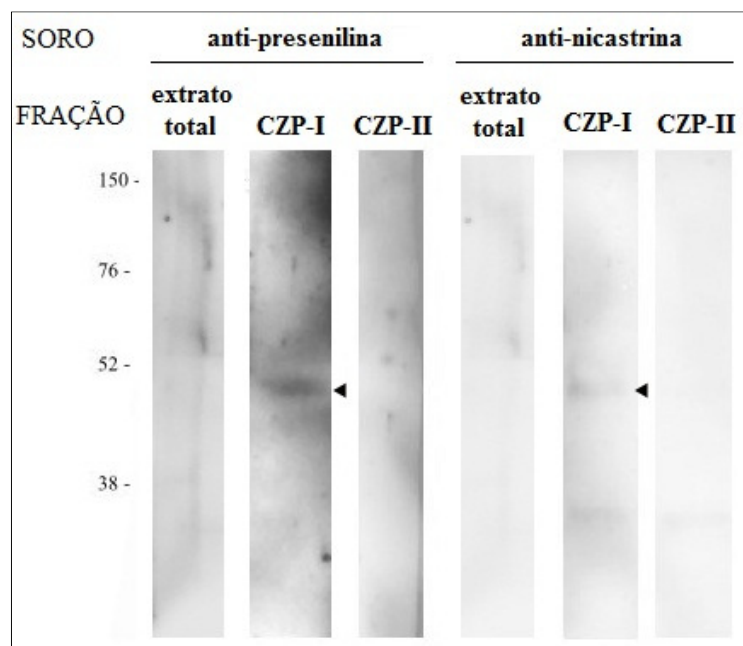


Figura 5.12: Análise por *immunoblotting* das frações CZP-I (detergente) e CZP-II (solúvel) resolvidas por SDS-PAGE. As setas indicam as bandas reconhecidas pelos anti-soros (anti-presenilina = anti-peptídeo PRE-2 e anti-nicastrina = anti-peptídeo NIC-1) em cada fração protéica.

5.6. LOCALIZAÇÃO CELULAR DO COMPLEXO γ -SECRETASE EM EPIMASTIGOTAS POR MICROSCOPIA CONFOCAL

A localização celular do complexo γ -secretase em epimastigotas de *T. cruzi* foi realizada por microscopia confocal usando os soros anti-peptídeo PRE-2 de presenilina e anti-peptídeo NIC-1 de nicastrina. Em células aderidas sobre lâminas é possível notar pontos fluorescentes de reação antígeno-anticorpo mais intensos na porção anterior da célula (próximo a bolsa flagelar e na porção mediana (próxima ao núcleo), sendo coincidentes com ambos os soros (Fig. 5.13).

Usando células permeabilizadas (0,5% Tween 20) pode ser evidenciado o mesmo padrão de marcação fluorescente com ambos os soros, porém de maior intensidade (Fig. 5.14). Estes resultados sugerem que uma maior acessibilidade dos anticorpos aos seus antígenos é obtida usando células permeabilizadas, fato que está de acordo com sua associação com membranas.

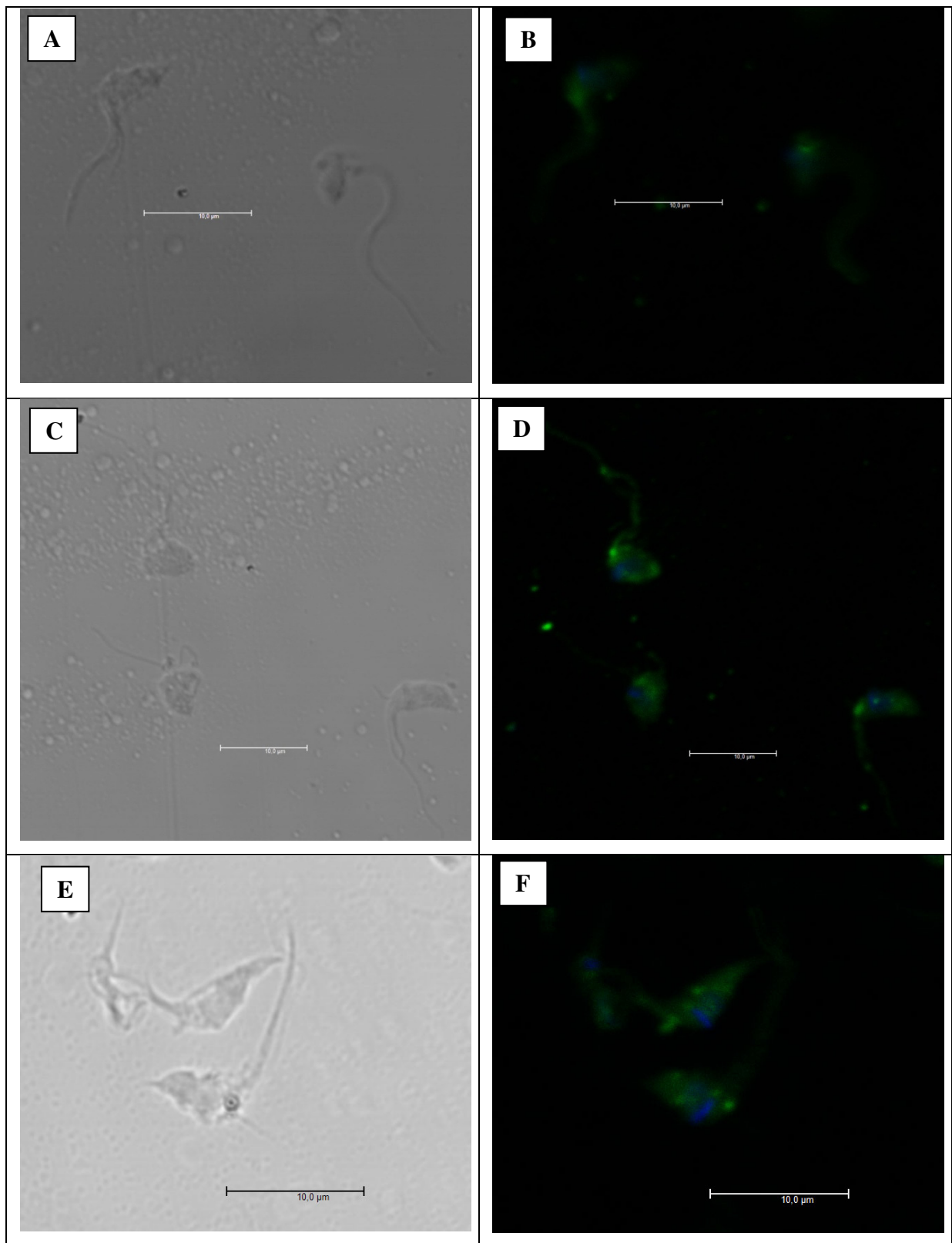


Figura 5.13: Imunofluorescência confocal usando soros de coelho anti-nicastrina (epitopo NIC-1) e anti-presenilina (epitopo PRE-2) e epimastigotas de *T. cruzi* não permeabilizados. A, C e E: células observadas em contraste de fase. B: controle negativo (soro de coelho não imunizado); C: soro anti-presenilina; F: soro anti-nicastrina. As marcações positivas são mostradas em verde e as organelas ricas em ácidos nucléicos (núcleo e cinetoplasto) são mostradas em azul (coradas com DAPI). Barras = 10µm. Aumento de 630x.

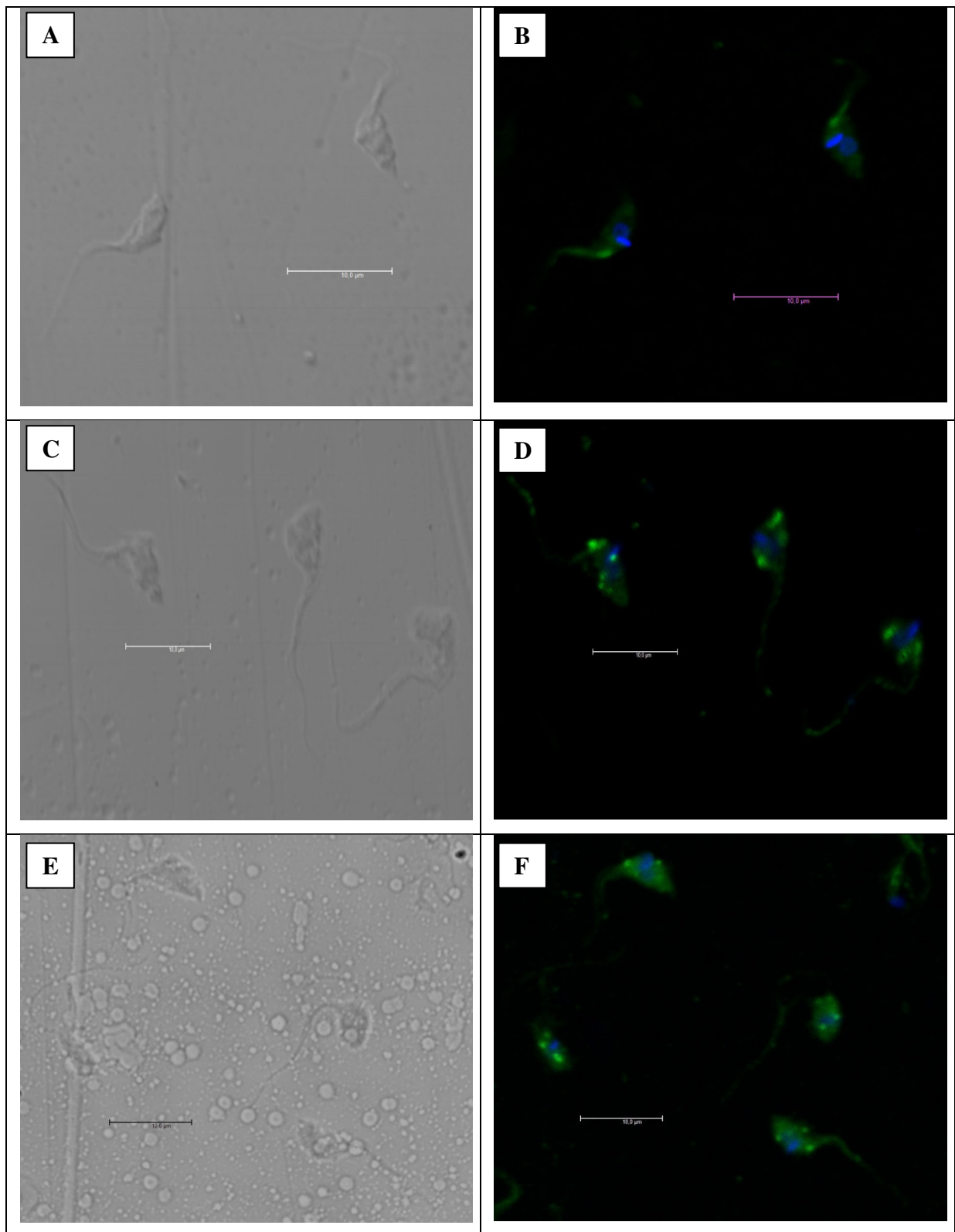


Figura 5.14: Imunofluorescência confocal usando soros de coelho anti-nicastrina (epitopo NIC-1) e anti-presenilina (epitopo PRE-2) e epimastigotas de *T. cruzi* permeabilizados (0,5% Tween 20). A, C e E: células observadas em contraste de fase. B: controle negativo (soro de coelho não imunizado); C: soro anti-presenilina; F: soro anti-nicastrina. As marcações positivas são mostradas em verde e as organelas ricas em ácidos nucleicos (núcleo e cinetoplasto) são mostradas em azul (coradas com DAPI). Barras = 10µm. Aumento de 630x.

5.7. DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA DOENÇA DE CHAGAS POR ELISA

Os peptídeos PRE-1 e 2 de presenilina e NIC-1 e 2 de nicastrina de *T. cruzi* foram biotinizados e imobilizados em placas de 96 poços revestidas com estreptavidina e sua reatividade frente a soros humanos foi avaliada pela técnica de ELISA. Os resultados obtidos usando-se 88 soros humanos positivos e 95 soros humanos negativos (vide seção 4.1) previamente selecionados por outras diferentes metodologias estão apresentados na Figura 5.15 e na Tabela 5.5.

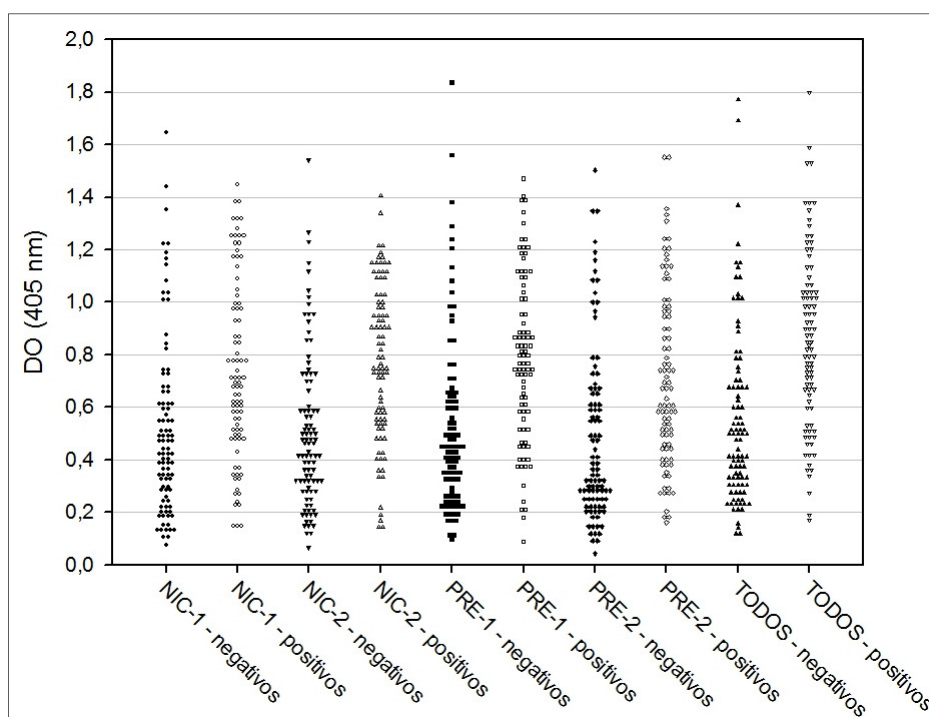


Figura 5.15: Valores de DO obtidos individualmente com cada um dos soros testados nas diferentes configurações dos testes de ELISA. Foram usados os peptídeos de nicastrina (NIC-1 ou 2) e presenilina (PRE-1 ou 2) de *T. cruzi*, independentemente ou em conjunto.

Tabela 5.5: Resultados obtidos nos testes de ELISA com os peptídeos selecionados das proteínas nicastrina (NIC-1 e 2) e presenilina (PRE-1 e 2) de *T. cruzi* pela técnica de Spot Synthesis.

Peptídeo	DO dos soros positivos a 405 nm	DO dos soros negativos a 405 nm
NIC-1	0,743 ± 0,34	0,515 ± 0,33
NIC-2	0,775 ± 0,30	0,512 ± 0,30
PRE-1	0,789 ± 0,32	0,522 ± 0,33
PRE-2	0,712 ± 0,34	0,487 ± 0,33
4 peptídeos juntos	0,858 ± 0,34	0,554 ± 0,33

OBS: Os valores representam a média ± DP das duplicatas dos soros testados. Nos cinco sistemas, a diferença da DO entre os grupos positivos e negativos foi considerada significativa ($p < 0,01$)

A análise dos resultados realizada pela técnica da curva ROC mostrou que os testes apresentaram desempenhos parecidos, sendo o melhor resultado obtido quando os 4 peptídeos foram usados simultaneamente (Fig. 5.16). Foram estabelecidos pontos de corte (“*cut-offs*”) para cada teste de forma a obter simultaneamente os valores mais altos de sensibilidade e especificidade, cujos resultados são mostrados na Tabela 5.6.

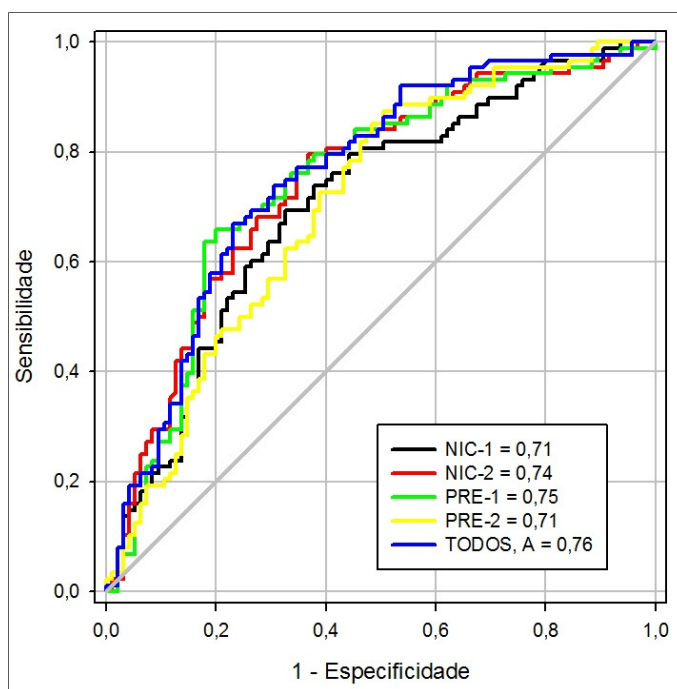


Figura 5.16: Especificidade e sensibilidade dos testes de ELISA avaliados através das curvas ROC. A análise estatística construída para as 5 configurações de ELISA realizadas (cada peptídeo independente e com os 4 juntos), conjuntamente com o cálculo da área sob cada curva indicaram que a associação dos 4 peptídeos apresentou um melhor desempenho.

Tabela 5.6: Valores de corte (“*cut-offs*”) estabelecidos através da técnica da curva ROC para cada sistema de ELISA-peptídeo testado, com os respectivos valores de sensibilidade e especificidade.

Peptídeo	<i>Cut-off</i>	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
NIC-1	0,556	68,18	67,37
NIC-2	0,5811	69,32	68,42
PRE-1	0,6163	70,45	71,58
PRE-2	0,5525	63,64	64,21
4 peptídeos juntos	0,6678	71,59	70,53

6. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados apresentados, este trabalho demonstra, pela 1ª vez, a existência de um complexo proteolítico em *Trypanosoma cruzi* similar ao complexo γ -secretase.

Um trabalho anterior de Pinho e colaboradores [26] já havia demonstrado a existência de duas atividades de aspartil-proteases em epimastigotas de *T. cruzi* cepa Y. Neste trabalho foram utilizados epimastigotas da cepa CL Brener, a única cepa do *T. cruzi* cujo genoma já foi sequenciado [58]. Isto permitiu a realização dos estudos de homologias de sequências, seleção de epitopos, produção de antisoros específicos e o desenvolvimento de testes diagnósticos baseados nas proteínas do complexo.

Nos ensaios de atividade enzimática realizados tanto na ausência quanto na presença de inibidores do complexo γ -secretase, verificou-se que a substância L-685,458 ((1S-Benzyl-4R-[1-(1S-carbamoyl-2-phenethylcarbamoyl)-1S-3-methylbutylcarbamoyl]-2R-hydroxy-5-phenylpentyl}carbamic Acid *tert*-butyl Ester)) foi capaz de inibir totalmente a atividade da enzima CZP-I em concentrações a partir de 5 μ M. Sabe-se que esta substância inibe a atividade do complexo ligando-se ao sítio ativo da presenilina e mimetizando o estado de transição dos substratos normalmente processados por esta enzima [45]. Estes resultados sugerem que aspártico protease presente na fração membranaar do *T. cruzi* (CZP-I) é uma enzima pertencente à classe das presenilinas, apresentando seu sítio ativo e seu mecanismo de catálise bastante conservados.

Esta conservação estrutural também pode ser notada na comparação das sequências da presenilina-símile do *T. cruzi* com as demais sequências de presenilinas depositadas no banco de dados Uniprot. Embora em alguns casos as porcentagens de homologia tenham sido

baixas, nota-se a presença dos domínios característicos (sítio ativo e domínio PALP) conservados na família A22 das aspártico proteases [25,33,37]. Também foi demonstrada a existência de 9 regiões altamente hidrofóbicas no gráfico de hidropaticidade, refletindo uma provável conservação da estrutura transmembranar vista nas demais presenilinas [32,33].

Por outro lado, o composto XXI/E ((S,S)-2-[2-(3,5-Difluorophenyl)-acetyl-amino]-N-(1-methyl-2-oxo-5-phenyl-2,3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3-yl)-propionamide)) não induziu inibição em nenhuma das concentrações testadas, enquanto que o DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) não apresentou resultados consistentes, sendo também considerado incapaz de inibir a atividade da fração CZP-I nas concentrações testadas. Ambos são descritos como sendo moduladores alostéricos negativos, ou seja, estes ligam-se à presenilina num sítio diferente do sítio ativo, ainda não determinado [59].

No caso de a presenilina do *T. cruzi* ser escolhida como alvo quimioterapêutico, algumas considerações devem ser feitas em vista dos resultados apresentados. Um fármaco desenhado de modo a ligar-se ao sítio ativo desta enzima seria pouco viável. Poderiam surgir efeitos colaterais causados pela inibição cruzada da enzima humana, em virtude da provável conservação estrutural e funcional entre esta e a enzima do *T. cruzi*, como sugerido neste trabalho. Por outro lado, a inconsistência na atividade inibitória dos compostos DAPT e XXI/E sugere a existência de sítios moduladores alostéricos na enzima do parasita diferentes daqueles presentes na enzima humana. Embora os resultados destes testes de atividade enzimática ainda sejam preliminares, eles apontam para o fato de que fármacos que priorizem uma modulação alostérica negativa da presenilina de *T. cruzi* podem vir a ser uma alternativa viável na quimioterapia da Doença de Chagas.

Analisando modelos estruturais de complexos antígeno-anticorpo, Rubinstein e colaboradores [60] verificaram que epitopos B costumam estar presentes com mais frequência em regiões com aminoácidos polares ou carregados e sem estrutura secundária definida. A identificação de epitopos B lineares através da técnica de *Spot Synthesis* revelou a presença de 10 epitopos na proteína presenilina, 5 na nicastrina e 10 na Aph-1 do *T. cruzi*. Levando em consideração as características físico-químicas que favorecessem a produção de anticorpos, foram selecionados 4 epitopos para síntese em solução, sendo 2 da proteína presenilina e outros 2 da proteína nicastrina do *T. cruzi*.

Embora o epitopo NIC-2 apresentasse características físico-químicas bastante favoráveis à indução da produção de anticorpos (exemplo: carga líquida negativa em pH 7,0 e estrutura secundária em *coil*), o anti-soro produzido a partir da imunização com este foi a única mal sucedida, provavelmente devido às características genéticas específicas do animal usado ou

mesmo pelo fato de ter sido usado um coelho. Caso outro modelo animal tivesse sido utilizado (ex: camundongo), a imunização poderia ter sido bem sucedida. Por outro lado, os 3 outros anti-soros produzidos foram capazes de reconhecer o respectivo peptídeo em ensaios de Elisa e *Cellu-Spot*.

O perfil eletroforético demonstrado para as frações CZP-I (detergente) e CZP-II (solúvel) de epimastigotas de *T. cruzi* cepa CL Brener foi bastante similar ao obtido por Pinho e colaboradores [26], utilizando epimastigotas de *T. cruzi* cepa Y. A exceção foi uma banda de 240 kDa obtida na fração CZP-I, que pode representar um precipitado de proteínas que não entraram adequadamente no gel.

O *immunoblotting* com o soro anti-peptídeo de presenilina produziu a marcação de uma única banda na amostra CZP-I, de peso molecular aproximado de 48 kDa, bem próximo ao esperado (aproximadamente 41 kDa). Não foram marcadas bandas de pesos moleculares correspondentes aos fragmentos N- e C-terminais caso a enzima sofresse uma endoproteólise, tal como acontece com a enzima humana [28,31,32,33,34]. Isto sugere que em *T. cruzi* a enzima pode estar em sua forma ativa mesmo sem tal processamento.

Por outro lado, o *immunoblotting* com o soro anti-peptídeo de nicastrina marcou fracamente uma banda de peso molecular aproximado de 48 kDa, bem abaixo do esperado (cerca de 79 kDa). Uma vez que o gel corado com prata não revelou a existência de bandas de peso molecular em torno de 79 kDa, estes resultados sugerem que a nicastrina de *T. cruzi* pode estar sofrendo algum processo de clivagem pós-traducional ou mesmo algum tipo de degradação durante o processo de extração. Também observou-se que nenhum dos dois soros marcou bandas de proteínas na fração CZP-II (solúvel), demonstrando que a composição protéica de ambas as frações é diferente, embora o perfil eletroforético seja similar.

Diversos trabalhos mostram a localização preferencial do complexo γ -secretase no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, assim como em outros compartimentos membranares, tais como na mitocôndria, membrana celular, envelope nuclear e lisossomos [35,36,42]. Tal localização seria consistente com as atividades atribuídas ao complexo, tanto de processamento de proteínas transmembranares como de participação na via secretória [31,33]. Nas formas epimastigotas do *T. cruzi* (bem como em outros tripanossomatídeos), a via secretória envolve o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e a região da bolsa flagelar, estando estas duas últimas estruturas sempre próximas [61,62]. Igualmente próximo à bolsa flagelar e ao corpo basal está o cinetoplasto, uma região característica da mitocôndria de tripanossomatídeos rica em kDNA [62].

Os ensaios de localização celular das proteínas presenilina e nicastrina em epimastigotas de *T. cruzi* utilizando os soros anti-peptídeos em microscopia confocal mostram uma

coincidência das regiões marcadas, mais evidentes em células permeabilizadas (0,5% Tween 20). Tais resultados sugerem a co-localização de ambas as proteínas formando um complexo que pode ainda contar com a proteína Aph-1. Também reforçam a ideia da localização membranar do complexo, pois em células com membranas permeabilizadas há maior disponibilidade de sítios para interação antígeno-anticorpo.

Devido à localização dos pontos de marcação nas imagens concentrar-se nas porções anterior e central da célula (próximo ao núcleo), é sugestivo que o complexo γ -secretase esteja presente em *T. cruzi* associado ao retículo endoplasmático, ao complexo de Golgi, ao bolso flagelar e/ou à mitocôndria. Tal localização seria coincidente às de outros sistemas celulares [35,36,42], porém só será confirmada com estudos de imunocitoquímica em microscopia eletrônica de transmissão (já iniciados). Também sugere o envolvimento do complexo em processos da via secretória do *T. cruzi*, embora sejam necessários maiores estudos para verificar esta teoria.

Métodos sorológicos são hoje as opções mais indicadas para o diagnóstico da Doença de Chagas na fase crônica. Estes incluem ELISA, hemaglutinação indireta (HI), imunofluorescência indireta (IFI), *western blot* e testes rápidos (tais como a imunocromatografia) [8,9,10]. Embora sejam simples e de baixo custo, muitas vezes eles podem apresentar baixas sensibilidade e especificidade ou ainda reações cruzadas com anticorpos contra outros patógenos (especialmente *Leishmania* spp.) [9,10].

Visando melhorar o desempenho dos testes de ELISA, uma alternativa tem sido o uso de peptídeos sintéticos. As vantagens deste tipo de teste incluem a possibilidade de síntese do antígeno em larga escala e a facilidade de sua padronização [10,63,64]. Vários trabalhos já demonstraram a aplicabilidade de peptídeos sintéticos em testes de ELISA diagnósticos para a Doença de Chagas [63,64,65]. Peralta e colaboradores [63], usando 2 peptídeos sintetizados a partir de unidades repetitivas de antígenos de tripomastigotas, conseguiram produzir testes com mais de 98% de especificidade e sensibilidades de 93,8% e 91,6%. Quando ambos os peptídeos eram usados simultaneamente, a sensibilidade do teste aumentou para 99,4%.

Houghton e colaboradores [64] produziram um tripeptídeo multiepitopo usando as mesmas sequências do trabalho de Peralta e colaboradores [63] mais uma identificada em uma proteína ribossomal do *T. cruzi*. Neste caso, o teste apresentou sensibilidade de 99,6% e especificidade de 99,33%. O mesmo tripeptídeo foi utilizado em outro trabalho para avaliar o sucesso do tratamento de pacientes chagásicos, com sucesso [64].

Nos trabalhos supracitados, a quantidade de peptídeo usada em cada poço das placas variava de 10ng a 1 μ g, enquanto que os soros eram diluídos em proporções de 1/50 ou 1/20.

Neste trabalho, a quantidade total de peptídeo aplicada em cada poço da placa foi de 200ng e os soros diluídos na proporção de 1/50, acompanhando o descrito na literatura [63,64,65].

Um passo muito importante durante o desenvolvimento de um teste diagnóstico é a determinação do valor de corte (“*cut-off*”), uma vez que ele afeta diretamente a acurácia do teste em questão. Quanto mais baixo for o valor estabelecido, maior será a sensibilidade do teste. No entanto, este aumento será acompanhado de um decréscimo na especificidade do teste. O inverso ocorre quando o valor de corte é fixado alto demais [66].

O cálculo do valor de corte (“*cut-off*”) ideal para cada teste foi feito usando a metodologia da curva ROC. Ela vem sendo descrita como a técnica ideal para este tipo de cálculo, uma vez que permite a análise simultânea dos valores de sensibilidade e especificidade obtidos com um teste para uma faixa de valores de *cut-off* estabelecidos. Além disso, permite a comparação do desempenho entre vários testes independente do espaço amostral, aplicando a comparação das áreas sob a curva [54].

Muitas vezes, a escolha do ponto de corte é feita de modo a obter simultaneamente os maiores valores de sensibilidade e especificidade [57], como foi feito neste trabalho. Porém isto nem sempre é adequado. No caso de estudos epidemiológicos, nos quais é importante saber a real distribuição de uma doença numa população, costuma-se preferir testes mais sensíveis. Já em casos onde um diagnóstico falso positivo pode trazer muitos prejuízos ao pacientes, é mais indicado privilegiar a especificidade [10,57].

Neste trabalho, após a análise das áreas sob as curvas ROC geradas nos 5 perfis de testes diferentes, pode-se concluir que o melhor desempenho foi obtido quando os 4 peptídeos foram usados simultaneamente, uma vez que nesta configuração foram obtidos os maiores valores de sensibilidade e especificidade simultaneamente. Tal resultado coincide com o obtido por Peralta e colaboradores [63]. Neste trabalho, os valores de sensibilidade e especificidade obtidos foram de 71,59% e 70,53% respectivamente, abaixo daqueles obtidos nos trabalhos citados anteriormente [63,64]. Houghton e colaboradores [63] descrevem que o uso de um peptídeo multiepitopo melhora a eficiência do teste, comparado ao uso dos mesmos epitopos peptídicos apenas misturados. Este desenho de teste diminui a competição dos antígenos pela fase sólida e melhora sua apresentação.

Desta forma, a utilização das proteínas do complexo γ -secretase ou de peptídeos com sequências baseadas nestas proteínas pode vir a ser uma alternativa viável para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas. Os ensaios de *Spot Synthesis* demonstram que estas proteínas possuem vários sítios imunogênicos; no entanto a forma de apresentação de antígenos peptídicos adotada neste trabalho produziu parâmetros de sensibilidade e especificidade abaixo do esperado. Uma forma diferente de apresentação de antígenos no teste

(exemplo: num peptídeo multiepitopo, tal como descrito por Houghton e colaboradores [63]) pode melhorar sua eficiência, porém mais estudos serão necessários para verificar esta teoria.

Esta dissertação irá gerar 3 artigos a serem publicados, dos quais 2 já se encontram em fase de preparação: um primeiro sobre os estudos estruturais e imunológicos dos componentes do complexo γ -secretase em epimastigotas de *T. cruzi* e um segundo com os resultados obtidos nos ensaios de ELISA para o diagnóstico da Doença de Chagas utilizando os peptídeos sintetizados durante este trabalho.

7. CONCLUSÕES

Em vista dos resultados apresentados neste trabalho, conclui-se que:

- ✓ Pela 1ª vez é demonstrada a existência de um complexo proteolítico em *T. cruzi* similar ao complexo γ -secretase;
- ✓ Moduladores alostéricos negativos de complexo γ -secretase (DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) e composto XXI/E ((S,S)-2-[2-(3,5-Difluorophenyl)-acetylamino]-N-(1-methyl-2-oxo-5-phenyl-2,3-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-3-yl)-propionamide)) não foram ativos contra a presenilina-símile de *T. cruzi*, enquanto que um inibidor de sítio ativo (L-685,458 (1S-Benzyl-4R-[1-(1S-carbamoyl-2-phenethylcarbamoyl)-1S-3-methylbutylcarbamoyl]-2R-hydroxy-5-phenylpentyl}carbamic Acid *tert*-butyl Ester)) parece bloquear totalmente a atividade da enzima na concentração de 5 μ M, sugerindo uma conservação estrutural no sítio ativo da enzima do parasita;
- ✓ Caso a presenilina do *T. cruzi* seja escolhida como alvo quimioterapêutico, a alternativa mais viável seria o desenho de fármacos que tenham como alvo sítios moduladores alostéricos negativos. Substâncias que inibam a enzima ligando-se a seu sítio ativo podem gerar efeitos colaterais causados pela inibição cruzada da enzima humana, em virtude da provável conservação estrutural e funcional entre as enzimas humana e do *T. cruzi*;
- ✓ As proteínas presenilina, nicastrina e Aph-1 de *T. cruzi* apresentam 10, 5 e 10 epítopos B-lineares respectivamente através da técnica de *Spot Synthesis*;

- ✓ O *immunoblotting* com soros anti-peptídeos de presenilina e nicastrina demonstrou que a presenilina-símile de *T. cruzi* apresenta peso molecular aparente de 48 kDa, enquanto que a nicastrina pode estar sofrendo algum processo de proteólise ou degradação durante a extração, uma vez que seu peso molecular aparente (48 kDa) ficou bastante abaixo do calculado;
- ✓ As proteínas presenilina e nicastrina localizaram-se predominantemente nas porções anterior (próximo a bolsa flagelar) e mediana (próximo ao núcleo) de epimastigotas de *T. cruzi* em estudos de imunofluorescência confocal;
- ✓ Um teste diagnóstico por ELISA usando 2 peptídeos de presenilina juntamente com 2 peptídeos de nicastrina de *T. cruzi* apresentou sensibilidade de 71,59% e especificidade de 70,53%;
- ✓ A utilização das proteínas do complexo γ -secretase ou de peptídeos com sequências baseadas nestas proteínas pode vir a ser uma alternativa viável para o diagnóstico sorológico da Doença de Chagas, pois foi demonstrado que estas proteínas possuem vários sítios imunogênicos. No entanto, a forma de apresentação de antígenos do teste precisa ser melhorada, de forma a elevar seus parâmetros de sensibilidade e especificidade.

REFERÊNCIAS

1. De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis* 2002; 1(1):3-23.
2. Weir E. Chagas disease: hidden affliction and visible neglect. *CMAJ* 2006; 174(8):1096.
3. Clayton J. Chagas Disease 101. *Nature* 2010; 465(7301):S4-S5.
4. Chagas CRJ das. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909;1(2):159-218.
5. Lewinsohn R [homepage na internet]. Do caldo de cana ao suco de açaí (Parte I) [acesso em 19 dez 2011]. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/abril2005/ju283pag02.html .
6. Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010;465(7301):S6-S7.
7. CDC [homepage na internet]. American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease) [acesso em 19 dez 2011]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/disease.html> .

8. WHO [homepage na internet]. Chagas disease (American trypanosomiasis) [acesso em 19 dez 2011]. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/index.html.
9. Gomes YM, Lorena VMB, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104 Suppl (June):115-21.
10. da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti a O. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. Trends Parasitol 2001; 17(6):286-91.
11. MSF [homepage na internet]. Chagas: Main Challenges [acesso em 20 dez 2011]. Disponível em: <http://www.chagas-rompe-el-silencio.com/mainchallenges.html> .
12. Guedes PMM, Urbina JA, Lana M, Afonso LCC, Veloso VM, Tafuri WL, Machado-Coelho GLL, Chiari E, Bahia MT. Activity of the New Triazole Derivative Albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in Dog Hosts. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(11):4286–4292.
13. Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúdez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp Biochem Physiol 2007; 146(4):601-620.
14. Oliveira RB, Passos APF, Alves RO, Romanha AJ, Prado MAF, Souza Filho JD, Alves RJ. *In Vitro* Evaluation of the Activity of Aromatic Nitrocompounds against *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(1):141-144.
15. Clayton J. Chagas disease: pushing through the pipeline. Nature 2010; 465(7301):S12-5.
16. Klemba M, Goldberg DE. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. Annu Rev Biochem 2002; 71:275-305.

17. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book"). 2^a ed. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1997.
18. IUBMB [homepage na internet]. Enzyme Nomenclature: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse [acesso em 27 dez 2011]. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.
19. McKerrow JH, Rosenthal PJ, Swenerton R, Doyle P. Development of protease inhibitors for protozoan infections. *Curr Opin Infect Dis* 2008, 21(6): 668-672.
20. Drag M, Salvesen G. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2010, 9(9): 690-701.
21. Castro HC, Abreu PA, Geraldo RB, Martins RCA, dos Santos R, Loureiro NIV, Cabral LM, Rodrigues CR. Looking at the proteases from a simple perspective. *J Mol Recognit* 2011, 24: 165-181.
22. Armstrong PB. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiol* 2006, 211: 263-281.
23. McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M. Proteases in Parasitic Diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006; 1:497-536.
24. Cazzulo JJ. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: Potential Targets for the Chemotherapy of Chagas Disease. *Curr Top Med Chem* 2002, 2: 1261-1271.
25. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 2010, 38: D227-D233.
26. Pinho RT, Beltramini LM, Alves CR, De-Simone SG. *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of aspartyl proteases. *Exp Par* 2009, 122(2):128-33.

27. Klemba M, Goldberg DE. Characterization of plasmepsin V, a membrane-bound aspartic protease homolog in the endoplasmic reticulum of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2005;143(2):183-91.
28. Brunkan AL, Goate AM. Presenilin function and gamma-secretase activity. *J Neurochem* 2005; 93(4):769-92.
29. Schroeter EH, Ilagan MXG, Brunkan AL, Hecimovic S, Li Y-ming, Xu M, Lewis HD, Saxena MT, De Strooper B, Coonrod A, Tomita T, Iwatsubo T, Moore CL, Goate A, Wolfe MS, Shearman M, Kopan R. A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(22):13075-80.
30. Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ. γ -secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(11): 6382-6387.
31. De Strooper B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active γ -Secretase Complex. *Neuron*. 2003;38:9-12.
32. Wolfe MS. The γ -secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble. *Biochem* 2006;45(26):7931–7939.
33. Wakabayashi T, Strooper BD. Presenilins : Members of the γ -Secretase Quartets, But Part-Time Soloists Too. *Physiology (Bethesda)* 2011;23:194-204.
34. Podlisny MB, Citron M, Amarante P, Sherrington R, Xia W, Zhang J, Diehl T, Levesque G, Fraser P, Haass C, Koo EHM, Seubert P, St. George-Hyslop P, Teplow DB, Selkoe DJ. 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* 1997;3(4):325-37.
35. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 1999;398(6727):513-7.

36. Cowburn RF, Popescu BO, Ankarcrona M, Dehvari N, Cedazo-Minguez A. Presenilin-mediated signal transduction. *Physiol Behav* 2007;92(1-2):93-7.
37. Schröder B, Saftig P. Molecular insights into mechanisms of intramembrane proteolysis through signal peptide peptidase (SPP). *Biochemical J* 2010;427(3):e1-3.
38. Edbauer D, Winkler E, Haass C, Steiner H. Presenilin and nicastrin regulate each other and determine amyloid β -peptide production via complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(13): 8666-8671.
39. Ahn K, Shelton CC, Tian Y, Zhang X, Gilchrist ML, Sisodia SS, Li YM. Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(50):21435-40.
40. Wolfe MS. Structure, mechanism and inhibition of γ -secretase and presenilin-like proteases. *Biol Chem* 2010;391:839-847.
41. Kornilova AY, Kim J, Laudon H, Wolfe MS. Deducing the transmembrane domain organization of presenilin-1 in γ -secretase by cysteine disulfide crosslinking. *Biochem* 2008;45(24):7598-7604.
42. Hansson CA, Frykman S, Farmery MR, Tjernberg LO, Nilsberth C, Pursglove SE, Ito A, Winblad B, Cowburn RF, Thyberg J, Ankarcrona M. Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria. *Journal Biol Chem* 2004;279(49):51654-60.
43. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265–275.
44. Seiffert D, Bradley JD, Rominger CM, Rominger DH, Yang F, Meredith JE, Wang Q, Roach AH, Thompson LA, Spitz SM, Higaki JN, Prakash SR, Combs AP, Copeland RA, Arneric SP, Hartig PR, Robertson DW, Cordell B, Stern AM, Olson RE, Zaczek R. Presenilin-1 and -2 are molecular targets for gamma-secretase inhibitors. *J Biol Chem* 2000;275(44):34086-91.

45. Shearman MS, Beher D, Clarke EE, Lewis HD, Harrison T, Hunt P, Nadin A, Smith AL, Stevenson G, Castro JL. L-685 ,458, an Aspartyl Protease Transition State Mimic, Is a Potent Inhibitor of Amyloid-Protein Precursor γ -Secretase Activity. *Biochem* 2000;39(30):8698-8704.
46. Dovey HF, John V, Anderson JP, Chen LZ, de Saint Andrieu P, Fang LY, Freedman SB, Folmer B, Goldbach E, Holsztynska EJ, Hu KL, Johnson-Wood KL, Kennedy SL, Kholodenko D, Knops JE, Latimer LH, Lee M, Liao Z, Lieberburg IM, Motter RN, Mutter LC, Nietz J, Quinn KP, Sacchi KL, Seubert PA, Shopp GM, Thorsett ED, Tung JS, Wu J, Yang S, Yin CT, Schenk DB, May PC, Altstiel LD, Bender MH, Boggs LN, Britton TC, Clemens JC, Czilli DL, Dieckman-McGinty DK, Droste JJ, Fuson KS, Gitter BD, Hyslop PA, Johnstone EM, Li WY, Little SP, Mabry TE, Miller FD, Ni B, Nissen JS, Porter WJ, Potts BD, Reel JK, Stephenson D, Su Y, Shipley LA, Whitesitt CA, Yin T, Audia JE. Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. *J Neurochem* 2001;76(1):173-81.
47. EMD Chemicals [homepage na internet]. InSolution™ γ -Secretase Inhibitor X [acesso em 04 fev 2012]. Disponível em: http://www.emdchemicals.com/life-science-research/insolution-gamma-secretase-inhibitor-x/EMD_BIO-565771/p_uuid?WT_oss=565771&WT_oss_r=1 .
48. Sigma-Aldrich [homepage na internet]. DAPT [acesso em 04 fev 2012]. Disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=pt&N4=D5942|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNOIBRAND_KEY&F=SPEC .
49. EMD Chemicals [homepage na internet]. γ -Secretase Inhibitor XXI, Compound E [acesso em 04 fev 2012]. Disponível em: http://www.emdchemicals.com/life-science-research/gamma-secretase-inhibitor-xxi-compound-e/EMD_BIO-565790/p_lyeb.s1LUxgAAAEWxWEfVhTm?WFSimpleSearch_NameOrID=compound+XXI%2FE&BackButtonText=search+results .
50. Frank R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods* 2002;267(1):13-26.

51. Molina F, Laune D, Golgat C, Pau B, Granier C. Improved performances of spot multiple peptide synthesis. *Peptide Res* 1996;9(3):151-5.
52. Hujer AM, Bethel CR, Bonomo RA. Antibody mapping of the linear epitopes of CMY-2 and SHV-1 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(10):3980-8.
53. Wiese UH, Emson PC, Sheppard RC. Production and characterization of an anti-peptide antibody specific for the growth-associated protein, GAP-43. *Brain Res* 1991;554(1-2):145-52.
54. Eid M, Evin G, Castro B, Menard J, Corvol P. New renin inhibitors homologous with pepstatin. *Biochem J.* 1981;197(2):465-71.
55. Atabani SF. Combined B cell and T cell epitopes. 2001. *In: Westwood OMR, Hay FC. Epitope mapping: A practical approach. New York: Oxford University Press: 91-102.*
56. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
57. Martinez EZ, Louzada-Neto F, Pereira B. A curva ROC para testes diagnósticos. *Cad Saude Col* 2003;11(1):7-31.
58. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A-N, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B. The genome sequence of

- Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. Science 2005;309(5733):409-15.
59. Morohashi Y, Kan T, Tominari Y, Fuwa H, Okamura Y, Watanabe N, Sato C, Natsugari H, Fukuyama T, Iwatsubo T, Tomita T. C-terminal fragment of presenilin is the molecular target of a dipeptidic gamma-secretase-specific inhibitor DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). J Biol Chem 2006;281(21):14670-6.
60. Rubinstein ND, Mayrose I, Halperin D, Yekutieli D, Gershoni JM, Pupko T. Computational characterization of B-cell epitopes. Mol Immunol 2008;45(12):3477-89.
61. McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD. Secretory Pathway of Trypanosomatid Parasites. Microbiol Mol Biol Rev 2002;66(1):122-154.
62. De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104:89-100.
63. Peralta JM, Teixeira MG, Shreffler WG, Pereira JB, Burns JM, Sleath PR, Reed SG. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. J Clin Microbiol 1994;32(4):971-4.
64. Houghton RL, Benson DR, Reynolds LD, McNeill PD, Sleath PR, Lodes MJ, Skeiky YAW, Leiby DA, Badaro R, Reed S. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. J Infect Dis 1999;179(5):1226-34.
65. Houghton RL, Benson DR, Reynolds L, McNeill P, Sleath P, Lodes M, Skeiky YAW, Leiby DA, Badaro R, Krettli AU, Reed S. Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. J Infect Dis 2000;181(1):325-30.

66. Gall D, Nielsen K. Comparison of some methods for determining cutoff values for serological assays: a retrospective study using the fluorescence polarization assay. *J Immunoassay* 2001;22(2):85-98.