UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
ANE CAROLINE MOREIRA DUARTE

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA METACASPASE-3 DE *Trypanosoma cruzi*

MOGI DAS CRUZES, SP
2025

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

ANE CAROLINE MOREIRA DUARTE

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA METACASPASE-3 DE *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.
Área de concentração: Bioengenharia, Biotecnologia e Biomateriais.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Ferreira Marcondes Machado

MOGI DAS CRUZES, SP

2025

FINANCIAMENTO



Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

D812o

Duarte, Ane Caroline Moreira
Obtenção e caracterização bioquímica da metacaspase-3 de Trypanosoma cruzi / Ane Caroline Moreira Duarte. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
114 f. : il.
Inclui bibliografia

Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
Orientação: Prof. Dr. Mauricio Ferreira Marcondes Machado.

1. Metacaspase 2. Trypasonoma cruzi 3. Cisteína proteases 4. Cinética enzimática 6. Doenças de chagas I. Machado, Mauricio Ferreira Marcondes II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 616.9363

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quinze horas do dia quatorze de fevereiro de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada "OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA METACASPASE-3 DE TRYPANOSOMA CRUZI" para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **Ana Caroline Moreira Duarte.** Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 50 (cinquenta), a saber: 26 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores: Mauricio Ferreira Marcondes Machado, e Wagner Alves de Souza Júdice, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Edgar Julian Paredes Gamero, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A sessão pública da defesa de dissertação foi aberta pelo senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovada (aprovado(a)/reprovado(a)) por Unanimidade (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 14 de fevereiro de 2025.

Comissão Examinadora	Julgamento
Prof. Dr. Edgar Julian Paredes Gamero	Aprovado (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Wagner Alves de Souza Júdice	Aprovado (aprovado(a)/reprovado(a))
Prof. Dr. Mauricio Ferreira Marcondes Machado	Aprovado (aprovado(a)/reprovado(a))

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com a concessão da bolsa de mestrado processo nº 88887.828189/2023-00, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

Além disso, contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 22/06394-0. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a Deus, que em sua infinita bondade tem guiado e iluminado a minha jornada.

Ao meu namorado, Lucas Ortiz, minha gratidão pelo companheirismo, suporte incondicional e por todos os momentos compartilhados de aprendizado, crescimento e felicidade ao longo desse processo. À Inês e Aleks Santana, minha profunda gratidão por me ensinarem sobre fé, resiliência e generosidade, além do apoio essencial que me trouxe até aqui.

Dedico a Gildeon e Rita Duarte. Obrigada pelo incentivo, compreensão, fé e união que foram pilares fundamentais nessa trajetória. De modo mais que especial, dedico aos meus irmãos Mateus, Marcos e Marcio Duarte, de quem tanto me orgulho e espelho. Nossa caminhada, mesmo com os desafios, me mostrou o valor de ter com quem contar, algo que considero um dos maiores privilégios da vida.

Aos meus sobrinhos Lorenzo, Valentina, Antônia, Rebecca, Manuella e Lucca Duarte, vocês são meus maiores presentes. Obrigada por me inspirarem a ser sempre uma "tia Carol" melhor.

Dedico ao meu orientador Professor Doutor Mauricio Machado. Agradeço pela introdução ao mundo da pesquisa científica, por mostrar o caminho das pedras e me guiar por ele com paciência e maestria. Obrigada por ensinar que mesmo a frustração pode trazer boas lições e tornar um cientista mais capaz. Tal como maré calma nunca fez bom marinheiro, a pesquisa nos ensinas até mesmo com resultados “negativos”, trazendo sempre novos questionamentos e hipóteses.

Ao Professor Doutor Wagner Júdice, agradeço não apenas pelos ensinamentos científicos, mas também pelos valiosos conselhos sobre a vida. Seu legado está presente em todos que tiveram o privilégio de aprender com você. Ao Professor Doutor Marcelo Marcondes, meu agradecimento pelo suporte e pela generosidade com seu tempo e conhecimento.

Aos amigos que estiveram ao meu lado, meu carinho e gratidão. Em especial, agradeço ao meu grande amigo Robson Massaria, que por muitas vezes foi o sol em dias escuros, nossa parceria nos trouxe até aqui e vai nos levar por muitos lugares! Agradeço também à Vinicius Oliveira, Franciny Yuko, Laura Maffeis, Vitória Caroline e Karoline Kemmerich, pelos aprendizados e pelos bons momentos compartilhados. Desejo a todos vocês o melhor que a vida pode oferecer.

Aos parceiros de bancada João Pedro Martins e Mariana Trujilho, agradeço imensamente pela parceria, por todos os desafios compartilhados e vencidos. Me orgulho muito de vocês e estarei sempre torcendo pelo sucesso, onde quer a vida os leve!

À Beatriz Vieira e Emilly Rolim, obrigada pela oportunidade de aprender e ensinar com vocês. À Agnes Kobayashi, Julie Arantes, Izabella Miranda, Vanessa Oliveira e Lívia Oliveira, minha gratidão pela amizade que, mesmo atravessando diferentes fases da vida, segue forte e atemporal.

Agradeço gradeço a Taíz Reis Duarte pela mãe científica que me foi, pela amizade e para além disso, por trazer de volta o brilho nos olhos de um dos meus e por se tornar agora, uma de nós.

Por fim, agradeço ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade de Mogi das Cruzes - UMC, em especial, ao Professor Doutor Fabiano Menegidio e a Professora Doutora Tatiane Faustino de Moraes por todo suporte e parceria.

RESUMO

As metacaspases são uma classe de proteases encontradas em organismos como plantas, fungos e protozoários. No contexto do parasita *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, dois genes de metacaspase foram identificados: TcMCA-3 e TcMCA-5. O genoma haploide de *T. cruzi* contém aproximadamente 16 cópias da metacaspase-3 de *Trypanosoma cruzi* (TcMCA-Ic). O presente trabalho investiga a TcMCA-Ic, destacando seu autoprocessamento proteolítico e as condições que afetam sua atividade enzimática. O primeiro capítulo demonstra que a TcMCA-Ic sofre mais de um evento de autoprocessamento dependente de cálcio, gerando múltiplas isoformas, o que sugere um mecanismo regulatório importante para sua função. Análises de expressão e purificação confirmaram a integridade da proteína e confirmaram a influência essencial do cálcio no autoprocessamento. No segundo capítulo, foram estabelecidas as condições ideais de temperatura, pH e concentração iônica para a atividade da TcMCA-Ic, evidenciando que a enzima é otimizada a 25°C e pH 8,5. Além disso, níveis adequados de cálcio aumentam a atividade enzimática, enquanto concentrações excessivas podem induzir autodegradação. Dados de fluorescência intrínseca revelaram uma constante de dissociação de interação ao cálcio, associada a alterações conformacionais irreversíveis na estrutura da proteína. Futuras investigações se concentrarão em caracterizar a especificidade de clivagem da TcMCA-Ic.

Palavras-chave: metacaspase; *Trypanosoma cruzi*; clonagem; interação com cálcio; cinética enzimática; substrato.

ABSTRACT

Metacaspases are a class of proteases found in organisms such as plants, fungi, and protozoa. In the context of the parasite *Trypanosoma cruzi*, responsible for Chagas disease, two metacaspase genes have been identified: TcMCA-3 and TcMCA-5. The haploid genome of *T. cruzi* contains approximately 16 copies of the *Trypanosoma cruzi* metacaspase-3 (TcMCA-Ic). This study investigates TcMCA-Ic, focusing on its proteolytic autoprocessing and the conditions that affect its enzymatic activity. The first chapter demonstrates that TcMCA-Ic undergoes multiple calcium-dependent autoprocessing events, generating several isoforms, suggesting an important regulatory mechanism for its function. Expression and purification analyses confirmed the protein's integrity and emphasized the essential role of calcium in autoprocessing. In the second chapter, the optimal conditions of temperature, pH, and ionic concentration for TcMCA-Ic activity were established, revealing that the enzyme is optimized at 25°C and pH 8.5. Moreover, appropriate calcium levels enhance enzymatic activity, whereas excessive concentrations may induce self-degradation. Intrinsic fluorescence data revealed a dissociation constant for calcium interaction, associated with irreversible conformational changes in the protein's structure. Future investigations will focus on characterizing the cleavage specificity of TcMCA-Ic.

Keywords: metacaspase; *Trypanosoma cruzi*; cloning; calcium interaction; enzyme kinetics; substrate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.....12
Figura 2 - Microscopia óptica das formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* 13
Figura 3 - Interação entre os subsítios de uma protease e seu substrato peptídico....18
Figura 4 - Estrutura e mecanismo de ativação das metacaspases.....21
Figura 5 - Comparação entre caspases e metacaspases.....22

CAPÍTULO 1

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da triagem de temperatura de anelamento dos primers (em **A**) e do produto da amplificação por PCR otimizada com anelamento a 62ºC (em **B**) 45
Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do vetor pET28(a)+, antes e após digestão com DpnI.....46
Figura 3 - Esquema representando a ação da T5 exonuclease na reação TEDA 47
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação dos plasmídeos obtidos em colônias de *E. coli* DH5α.....48
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose a 1% do produto da amplificação dos plasmídeos obtidos em colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS 49
Figura 6 - SDS-PAGE da análise do ensaio de expressão da proteína TcMCA-Ic recombinante 50
Figura 7 – Mapa do plasmídeo, pET28(a)+, com a inserção do gene da TcMCA-Ic....51
Figura 8 – Cromatograma de purificação da TcMCA-Ic em coluna de resina de afinidade Ni^{2+} -Sepharose.....52
Figura 9 - SDS-PAGE da análise das frações eluídas no cromatograma de purificação da proteína TcMCA-Ic.....53
Figura 10 - SDS-PAGE da análise do ensaio de *dessalting* da proteína TcMCA-Ic....53
Figura 11 - *Western blotting* da proteína TcMCA-Ic, a partir da incubação com diferentes concentrações de anticorpo.....54
Figura 12 - SDS-PAGE do ensaio para avaliar perfil de autoprocessamento proteolítico da TcMCA-Ic.....55

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Estabilidade térmica da TcMCA-Ic.....67
Figura 2 - Efeito da concentração de cálcio ($CaCl_2$) na atividade catalítica da TcMCA-Ic.....68
Figura 3 - Efeito da concentração de sódio (NaCl) sobre a atividade catalítica da TcMCA-Ic.....70
Figura 4 - Determinação do pH Ótimo para a TcMCA-Ic.....71
Figura 5 - Efeito do cálcio na fluorescência intrínseca da TcMCA-Ic.....72
Figura 6 - Perfil de fluorescência da TcMCA-Ic quando excitada em 280 nm em comparação com a adição progressiva de EGTA.....74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados para a amplificação do gene da TcMCA-Ic e do vetor pET28(a)+ 27
Tabela 2 – Condições de PCR para triagem de temperatura de anelamento dos primers de TcMCA-Ic.....27
Tabela 3 – Condições de PCR otimizadas para amplificação do gene da TcMCA-Ic..28
Tabela 4 – Condições de PCR para Amplificação do Plasmídeo pET28(a)+ e Geração de Extremidades Homólogas para TEDA.....28
Tabela 5 – Etapas e condições de preparo das células competentes de *Escherichia coli* DH5α E BL21(DE3)pLysS.....30
Tabela 6 – Condições de PCR para triagem de colônias de *E. coli* DH5α contendo plasmídeo clonado da TcMCA-Ic.....31
Tabela 7- Diluições da solução padrão de BSA.....38
Tabela 8- Esquema de diluição seriada das amostras.....38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 8

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS 8
1.2 O PARASITA: *Trypanosoma cruzi* 11
1.3 TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS E A PRODUÇÃO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA BIOLOGIA SINTÉTICA 14
1.4 PROTEASES 17
1.5 CISTEÍNO PROTEASES 18
1.6 METACASPASES 19

2. OBJETIVOS 24

3. METODOLOGIA 25

3.1 OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA E SÍNTESE DO GENE 25
3.2 DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS PRIMERS 25
3.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA TcMCA-Ic 26
3.4 AMPLIFICAÇÃO E PREPARO DO PLASMÍDEO pET28(a)+ PARA CLONAGEM TEDA 27
3.5 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES 28
3.6 MONTAGEM DE DNA UTILIZANDO T5 EXONUCLEASE DNA ASSEMBLY 29
3.7 TRANSFORMAÇÃO E CONFIRMAÇÃO 29
3.8 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL POR MINIPREP PELO MÉTODO DE LISE ALCALINA 30
3.9 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS DE *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)pLysS COM O PRODUTO DA MINIPREP 31
3.10 EXPERIMENTO DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA 31
3.11. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) 32
3.12 LISE CELULAR 33
3.13 PURIFICAÇÃO E DESSALTING 33
3.14 *WESTERN BLOTTING*: CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA 34
3.15 AVALIAÇÃO DO AUTO PROCESSAMENTO DA TcMCA-Ic SOB A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO 34
3.16 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD 35
3.17 INTRODUÇÃO AOS ENSAIOS CINÉTICOS 36
3.17.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DA TcMCA-Ic 37
3.17.2 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO PARA A ATIVIDADE DA TcMCA-Ic 37
3.17.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO SOBRE A ATIVIDADE DA TcMCA-Ic 38
3.17.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓDIO SOBRE A ATIVIDADE DA TcMCA-Ic 38
3.17.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CÁLCIO NA FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA DA TcMCA-Ic 38

4. CAPÍTULO 1 40

OBTENÇÃO DA METACASPASE-3 RECOMBINANTE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO CÁLCIO NO SEU AUTOPROCESSAMENTO PROTEOLÍTICO 41
1 INTRODUÇÃO 42
2 MATERIAIS E MÉTODOS 43
2.1 Obtenção e Síntese do Gene TcMCA-Ic 43
2.2 Amplificação e Clonagem do Gene 43
2.3 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante 44
2.4 Análise do Autoprocessamento 44
2.5 Confirmação da Expressão por *Western Blotting* 44
3. Resultados e Discussões 45
4 Conclusão 58
2 5. CAPÍTULO 2 59
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA METACASPASE-3 DE *TRYPANOSOMA CRUZI* 60
1 INTRODUÇÃO 61
2 MATERIAIS E MÉTODOS 62
2.1 Determinação da Concentração de Proteína 62
2.2 Ensaios Cinéticos 63
2.3 Efeito da Temperatura 63
2.4 Determinação do pH Ótimo 64
2.5 Efeito da Concentração de cálcio na atividade da TcMCA-Ic 64
2.6 Efeito da Concentração de NaCl na atividade da TcMCA-Ic 65
2.7 Efeito da Concentração de $CaCl_2$ na fluorescência Intrínseca da TcMCA-Ic 65
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES 66
3.1 Determinação da Concentração de Proteína 66
3.2 Avaliação do efeito da concentração de $CaCl_2$ sobre a atividade da TcMCA-Ic 68
3.3 Avaliação do efeito da concentração de sódio sobre a atividade da TcMCA-Ic 69
3.4 Determinação do pH Ótimo 70
3.5 Avaliação do efeito do cálcio na fluorescência intrínseca da TcMCA-Ic 71

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas (DC), também conhecida como tripanossomíase americana, é uma das doenças tropicais de populações negligenciadas que impacta milhões de pessoas, principalmente em áreas de vulnerabilidade social na América Latina (OMS, 2015). Descrita oficialmente em 1909 por Carlos Chagas, a doença é responsável por impactos significativos na saúde pública, com cerca de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, além de causar aproximadamente 14 mil mortes anuais, com uma incidência de cerca de 30 mil novos casos por ano na América Latina (SANTÉ, 2015; DIAS *et al*., 2016a). A expansão da doença para regiões não endêmicas, como Europa e Estados Unidos, é atribuída ao aumento da migração, o que reforça a necessidade de políticas globais de saúde para controle e prevenção (GUHL; RAMÍREZ, 2021).

A DC apresenta uma fase aguda inicial, que costuma apresentar sintomas leves, e uma fase crônica, que pode se apresentar de forma indeterminada ou determinada. Sem tratamento adequado, cerca de 30% a 50% dos pacientes desenvolvem formas graves da doença, como a cardiopatia crônica chagásica (DIAS *et al*., 2016b).

Na fase aguda da doença, ocorre uma alta parasitemia, o que significa que há uma quantidade significativa de parasitas circulando no sangue do mamífero hospedeiro. Durante esse estágio, a ausência de sintomas é rara, porém muitos pacientes adultos apresentam poucos ou leves por um curto período. A elevação da temperatura corporal, calafrios, cefaleia que abrange toda a cabeça e dores musculares são os mais frequentes dos sintomas (DIAS *et al*., 2016b; PINTO *et al*., 2009, 2008). Em casos mais graves, podem ocorrer manifestações como o sinal de Romaña, caracterizado por edema palpebral unilateral, ou o chagoma de inoculação, que é uma lesão localizada na área de entrada do parasita, podendo também originar acometimento cardíaco agudo caracterizado por miocardite aguda e miopericardite (PINTO *et al*., 2008, 2010).

O tempo de incubação da Doença de Chagas difere conforme o modo de transmissão. Quando a infecção ocorre por meio da picada de vetores, esse período

pode variar entre 4 e 15 dias. Em contrapartida, na transmissão oral, a incubação pode durar de 3 a 21 dias. Para casos de transmissão por transfusões de sangue ou transplantes, o tempo de incubação pode se estender de 30 a 40 dias. Já nas situações de transmissão acidental, os sintomas podem aparecer em um intervalo de cerca de 20 dias (SANTÉ, 2015). O diagnóstico da fase aguda tem início com uma anamnese indicativa para a suspeita etiológica, seguida de uma abordagem diagnóstica combinada, que inclui tanto métodos parasitológicos diretos quanto indiretos. Enquanto os exames parasitológicos, como a hemoscopia e a gota espessa, são essenciais para a detecção do parasita no sangue, os testes sorológicos complementam o diagnóstico, evidenciando a resposta imune do hospedeiro. A interpretação conjunta desses resultados, considerando o contexto clínico e epidemiológico, é fundamental para confirmar o diagnóstico e diferenciar a infecção aguda de outras condições (DIAS *et al*., 2016b; BRASIL, 2023b).

O tratamento antiparasitário com o uso de medicamentos nessa fase é fundamental para erradicar o parasita e evitar a progressão para a fase crônica. No Brasil, o tratamento de escolha baseia-se na utilização de benznidazol, devido à sua disponibilidade, melhor tolerabilidade e eficácia. O nifurtimox, embora ainda não possua registro no país e seja adquirido pelo Ministério da Saúde por meio de doação da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), com respaldo no 5º parágrafo do Art. 8º da Lei 9.782, de 26 de janeiro de 1999, serve como alternativa quando há intolerância ao benznidazol. Ambos os fármacos podem causar efeitos colaterais, os quais requerem monitoramento durante o tratamento (DIAS *et al*., 2015; BRASIL, 2018).

Embora o tratamento da DC esteja disponível, ele ainda é subutilizado. Apenas cerca de 7% das pessoas infectadas são diagnosticadas, e menos de 1% recebe o tratamento etiológico adequado (COSTA CHAVES *et al*., 2017). Na fase crônica da doença, a forma crônica indeterminada (FCI) é caracterizada por indivíduos que permanecem assintomáticos ao longo da vida, apesar de estarem infectados. A forma cardíaca, por sua vez, afeta o músculo cardíaco e é responsável pela maior parte das mortes relacionadas à doença. Já a forma digestiva, presente em torno de 10% a 15% dos casos, compromete o esôfago e o intestino grosso, resultando em aumento das estruturas e comprometimento severo da motilidade. Apesar desse estágio ser caracterizado em função da região que acomete, pode ser também observada sua

manifestação de forma mista (REZENDE; MOREIRA, 2004; BONNEY *et al*., 2019; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

A forma crônica indeterminada da doença de Chagas (FCI) caracteriza-se pela ausência de manifestações clínicas e pela detecção isolada de anticorpos contra o *Trypanosoma cruzi*. Apesar de seu caráter benigno a curto e médio prazos, o acompanhamento clínico regular, incluindo eletrocardiogramas anuais, é fundamental para identificar a possível progressão para as formas cardíacas ou digestivas. Devido ao risco de transmissão, indivíduos com FCI devem evitar doação de sangue e órgãos (DIAS *et al*., 2016a; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

A forma cardíaca da doença de Chagas é a manifestação clínica mais grave, associada a alterações que podem levar à insuficiência cardíaca, arritmias e morte súbita. O eletrocardiograma é o exame inicial para o diagnóstico diferencial, podendo ser complementado por outros métodos como Holter 24 horas e ecocardiograma (DIAS *et al*., 2016b).

A forma digestiva, caracterizada por megaesôfago e megacólon, manifesta-se com sintomas como disfagia e constipação. O diagnóstico é confirmado por exames de imagem, como radiografias contrastadas (BONNEY *et al*., 2019; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

O tratamento etiológico na fase crônica é indicado em casos selecionados, principalmente para indivíduos com FCI e formas cardíacas leves a moderadas. O benznidazol é também o fármaco de escolha, embora o nifurtimox possa ser utilizado. O acompanhamento clínico é essencial devido aos potenciais efeitos adversos dos medicamentos, principalmente quando se trata de casos com reativação em imunodeprimidos. Nesses casos os medicamentos alopurinol e antifúngicos azólicos podem ser alternativas viáveis para suprimir a parasitemia (DIAS *et al*., 2016b).

Em resumo, a doença de Chagas apresenta diferentes formas clínicas, com prognóstico variável. A FCI é a mais comum e benigna, enquanto as formas cardíaca e digestiva podem levar a complicações graves. O diagnóstico precoce e o acompanhamento regular são fundamentais para um melhor prognóstico (DIAS *et al*., 2016b).

Pensando em um monitoramento mais preciso da progressão dos casos e na adoção de medidas de controle mais eficazes, o Brasil instituiu em 2020 a notificação compulsória da doença de Chagas crônica (DCC). Esse foi um passo crucial para o

controle da doença, especialmente considerando suas formas clínicas variadas. A notificação compulsória favorece a integração entre os diferentes níveis de gestão do Sistema Único de Saúde (SUS), coordenando ações de vigilância, prevenção e controle da doença, sendo fundamental para o enfrentamento da doença de Chagas no Brasil, aprimorando a qualidade do acompanhamento dos pacientes e possibilitando estratégias mais eficazes (BRASIL, 2023a).

1.2 O PARASITA: *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi*, parasita causador da DC, possui um ciclo de vida complexo que envolve hospedeiros vertebrados, como mamíferos, e invertebrados, principalmente os insetos vetores conhecidos como triatomíneos (DIAS *et al*., 2016a). A transmissão pode ocorrer por várias vias, como a vetorial, oral, vertical (de mãe para filho), transfusional e por acidentes laboratoriais (COURA, 2015).

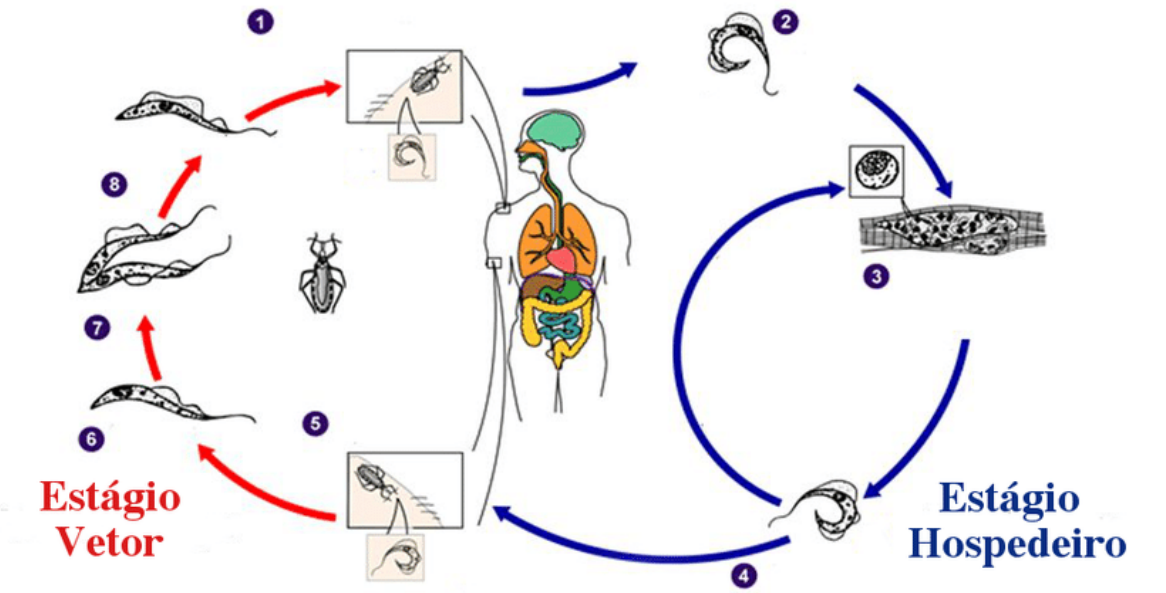
A transmissão da DC no Brasil ocorre com mais frequência por via vetorial, quando as fezes do barbeiro, contaminadas com o parasita, entram em contato com a pele lesionada pela picada. A via oral, por sua vez, envolve a ingestão de alimentos contaminados, permitindo que o parasita infecte diretamente as células da boca e do trato digestivo, e é considerada a segunda forma mais frequente de infecção no país (COURA; DIAS, 2009; DIAS *et al*., 2016a).

O ciclo do *Trypanosoma cruzi* no barbeiro, um inseto da família *Triatominae*, envolve várias etapas de desenvolvimento. Quando o barbeiro se alimenta do sangue de um hospedeiro infectado, ele ingere as formas tripomastigotas sanguíneas do parasita. No estômago do inseto, essas formas se transformam em epimastigotas, que se multiplicam ativamente por divisão binária. Em seguida, no intestino final do barbeiro, as epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes. Essas formas são eliminadas junto com as fezes do inseto durante a próxima refeição sanguínea, completando o ciclo de transmissão para um novo hospedeiro quando as fezes contaminadas entram em contato com a pele ou mucosas (BARRETT *et al*., 2003).

No ciclo do parasita no hospedeiro vertebrado, a infecção se inicia quando, uma vez no corpo, os parasitas invadem células locais, onde perdem o flagelo e se diferenciam em amastigotas, iniciando sua replicação intracelular. Após a

multiplicação, os amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas flageladas, que rompem as células hospedeiras e entram na circulação sanguínea, onde podem infectar outras células e tecidos, perpetuando o ciclo (BARRETT *et al*., 2003; COURA; DIAS, 2009).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*



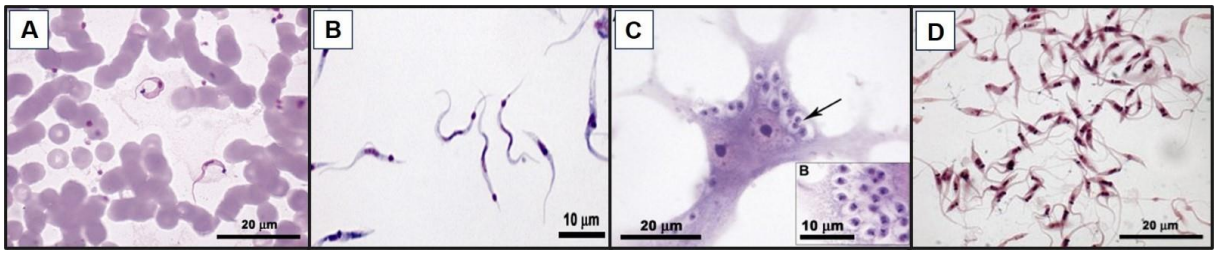
Fonte: - Adaptado de (CDC, 2019)
Legenda: 1. Repasto do inseto vetor: O triatomíneo (barbeiro) se alimenta de sangue de mamíferos, excretando tripomastigotas metacíclicos nas fezes, que invadem o hospedeiro através da pele lesionada ou mucosas. 2. Invasão celular: Os tripomastigotas metacíclicos, altamente infecciosos, penetram nas células próximas ao local de invasão. 3. Transformação e multiplicação: Dentro das células hospedeiras, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, a forma replicativa, onde se multiplicam por fissão binária. 4. Liberação e reinfecção: Após várias divisões, as amastigotas se convertem novamente em tripomastigotas, que rompem as células, entrando na corrente sanguínea. Estes podem infectar novas células ou 5. serem ingeridos por outro triatomíneo durante o repasto. 6. Transformação no inseto: Dentro do intestino médio do triatomíneo, os tripomastigotas se transformam em epimastigotas. 7. Multiplicação no vetor: Os epimastigotas se multiplicam no intestino médio do inseto. 8. Diferenciação final: No reto do triatomíneo, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, completando o ciclo de vida do *T. cruzi*.

Ao longo do ciclo de vida, o parasita assume diferentes morfologias em resposta aos ambientes que encontra, tanto no inseto vetor (barbeiro) quanto no hospedeiro mamífero. Essas formas evolutivas são classificadas com base na posição do cinetoplasto (o DNA mitocondrial condensado, localizado próximo ao flagelo) em relação ao núcleo, além da forma e comprimento do flagelo (LANA; TAFURI, 2011).

A forma tripomastigota, alongada e flagelada, é a forma infectante do *Trypanosoma cruzi.* Com cinetoplasto posterior e flagelo livre anterior, ela circula no sangue e nos tecidos do hospedeiro vertebrado, e é encontrada no trato digestivo do barbeiro. A forma amastigota, arredondada e intracelular, é adaptada à vida parasitária dentro das células do hospedeiro vertebrado. Sem flagelo visível, ela se multiplica por divisão binária no citoplasma celular. Caracterizada por um cinetoplasto anterior e flagelo parcialmente aderido ao corpo, a forma epimastigota é encontrada no trato digestivo do inseto vetor. Essa forma é essencial para a multiplicação do parasita no hospedeiro invertebrado e para a produção das formas infectantes (CARVALHO, 2017).

Essas diferentes morfologias permitem ao *Trypanosoma cruzi* adaptar-se a ambientes extracelulares e intracelulares, mantendo seu ciclo de vida heteroxênico e garantindo sua capacidade de infecção e transmissão entre hospedeiros vertebrados e invertebrados (BONNEY *et al*., 2019).

Figura 2 - Microscopia óptica das formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de (CARVALHO, 2017).
Legenda: A. Formas tripomastigotas sanguineas do *Trypanosoma cruzi*. B. Formas tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese in vitro) C. Formas amastigotas intracelulares D. Formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*.

1.3 TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS E A PRODUÇÃO DE FÁRMACOS ATRAVÉS DA BIOLOGIA SINTÉTICA

O tratamento atual é limitado a dois medicamentos principais, o benznidazol e o nifurtimox, ambos eficazes principalmente na fase aguda da infecção. No entanto, esses fármacos apresentam diversas limitações, como efeitos colaterais graves e eficácia reduzida na fase crônica da doença, caracterizada por complicações cardíacas e gastrointestinais (CHRISTOPHER, 2017; DIAS *et al*., 2009). Além disso, a resistência dos parasitas aos tratamentos convencionais, especialmente em algumas regiões geográficas, tem se mostrado um desafio significativo para a terapêutica eficaz, refletindo a necessidade urgente de novos tratamentos (NWAKA; HUDSON, 2006; SOEIRO; CASTRO, 2009).

Nesse contexto, o desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes, com menos efeitos colaterais e com uma ação mais abrangente, é uma necessidade urgente. No Brasil, o benznidazol é a droga disponível gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS), mas o nifurtimox, apesar de ter sido um marco na terapia da doença, apresenta custos elevados e limitações no acesso (NASCIMENTO, 2019).

A Fiocruz, por meio do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos), firmou, em 2023, um acordo com a Bayer AG para registrar o Nifurtimox junto a Anvisa e obter as certificações pertinentes à autorização de comercialização do medicamento em seu nome, visando ampliar o acesso a essa alternativa terapêutica para pacientes do SUS (FIOCRUZ, 2023).

Os mecanismos de ação do benznidazol e do nifurtimox envolvem a formação de radicais livres e metabólitos eletrofílicos, que interagem com macromoléculas do *T. cruzi*, como proteínas e DNA. No caso do benznidazol, a formação de ligações covalentes com biomoléculas parasitárias é fundamental para seu efeito tripanocida. Já o nifurtimox utiliza o processo conhecido como ciclo redox, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) que contribuem para a morte do parasita (FILARDI; BRENER, 1987; NWAKA; HUDSON, 2006)

A inovação no desenvolvimento de fármacos para a doença de Chagas é essencial para superar as limitações das terapias atuais, especialmente devido à emergência de cepas de parasitas resistentes e à insuficiência do repertório de medicamentos disponíveis. A descoberta e desenvolvimento de novos compostos envolve uma abordagem multidisciplinar, integrando áreas como química medicinal,

biologia molecular, bioinformática e farmacologia. Historicamente, as estratégias basearam-se em métodos empíricos, como triagens randômicas utilizando culturas de células (*in vitro*) ou modelos animais (*in vivo*), mas a evolução científica e tecnológica deu origem ao planejamento racional de fármacos, centrado na interação entre moléculas bioativas e seus alvos biológicos (KOLA, 2008; GUIMARÃES *et al*., 2009).

Avanços como o sequenciamento do genoma de *Trypanosoma cruzi* possibilitaram a identificação de alvos moleculares específicos, ausentes em humanos, ampliando o potencial para a descoberta de inibidores seletivos. Além disso, a aplicação de estratégias como o planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD - *structure-based drug design*) e na estrutura do ligante (LBDD - *ligand-based drug design*) tem promovido a identificação e otimização de compostos promissores (DUSCHAK; COUTO, 2006; MOREIRA *et al*., 2009).

Apesar do progresso, a pesquisa e o desenvolvimento (P;D) na área de doenças negligenciadas enfrentam barreiras financeiras significativas, devido à baixa atratividade comercial dessas terapias. A escassez de investimentos por parte das grandes indústrias farmacêuticas é particularmente evidente no caso da doença de Chagas, considerada uma das mais negligenciadas. A América Latina, região endêmica da doença, contribui com apenas 5% da produção mundial de medicamentos, evidenciando a necessidade de maior investimento regional e internacional para combater esse problema (ENGELS; SAVIOLI, 2006; KOLA, 2008).

A investigação de alvos moleculares específicos, ausentes em humanos podem contribuir para o desenvolvimento de compostos mais eficazes e menos tóxicos. A metacaspase-3 de *Trypanosoma cruzi* destaca-se como um alvo relevante para investigações no contexto da Doença de Chagas. Este estudo, focado na obtenção e caracterização dessa enzima, insere-se na interface da biologia sintética, engenharia de proteínas e biotecnologia. A biologia sintética, também chamada de engenharia biológica, é uma área interdisciplinar que combina ciências biológicas, química, física, ciência da computação e engenharia para projetar e modificar sistemas biológicos (BREITLING; TAKANO, 2023). Essa abordagem possibilita a construção de sistemas biológicos funcionais e a formulação de novas hipóteses experimentais (BREITLING; TAKANO, 2023).

Com os avanços em tecnologias genômicas e métodos de DNA recombinante, a biologia sintética ampliou as possibilidades de modular e modelar processos

biológicos de maneira precisa. Essa área tem evoluído rapidamente, especialmente na criação de circuitos biológicos genéticos e proteicos (KHALIL; COLLINS, 2010). Ao integrar conceitos de física e engenharia, a biologia sintética tem proporcionado a reprogramação de microrganismos e o desenvolvimento de novas soluções aplicadas à saúde humana, com grande potencial para abordagens terapêuticas (ELOWITZ; LIM, 2010; MUKHERJI; VAN OUDENAARDEN, 2009).

Nos últimos 20 anos, a biologia sintética tem aplicado conceitos da física e engenharia à biologia para entender os sistemas vivos sob uma perspectiva de engenharia (ELOWITZ; LIM, 2010; MUKHERJI; VAN OUDENAARDEN, 2009). Essa integração tem proporcionado a criação de novos componentes biomoleculares, redes e vias que podem ser utilizados para reprogramar organismos. No entanto, problemas de saúde humana, exigem que a biologia sintética seja mais aplicada ao estudo desses organismos e ao desenvolvimento de fármacos. O desenvolvimento de abordagens voltadas para sistemas mamíferos será crucial para novas soluções terapêuticas (KHALIL; COLLINS, 2010).

Neste trabalho, técnicas de biologia sintética, como a clonagem TEDA, foram empregadas para a obtenção da TcMCA-Ic recombinante em elevado grau de pureza, permitindo análises bioquímicas, com implicações diretas na engenharia biomédica. Deste modo, a relevância deste trabalho é evidente na busca por estratégias terapêuticas para a Doença de Chagas. O conhecimento gerado sobre a protease TcMCA-Ic pode, no futuro, orientar o desenvolvimento de inibidores específicos ou novas abordagens terapêuticas baseadas em biotecnologia, alinhando-se aos objetivos de inovação e impacto social característicos da engenharia biomédica.

1.4 PROTEASES

Em pacientes com a forma crônica da DC, o desenvolvimento da doença ocorre predominantemente de maneira intracelular, com o *T. cruzi* em sua forma amastigota. Como resposta, o organismo hospedeiro pode ativar diversos mecanismos contra o parasita, incluindo a morte celular programada (MCP ou PCD, do inglês *programmed cell death*) (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; GASQUES *et al*., 2013).

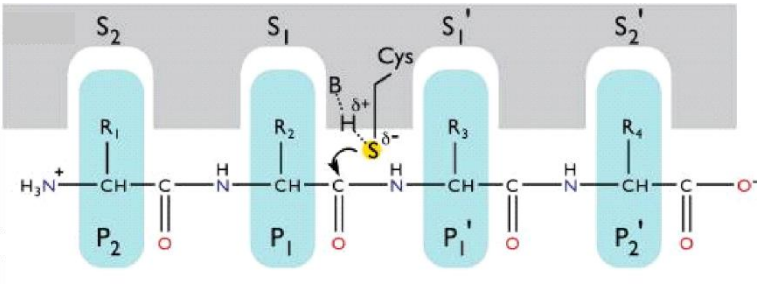
Nos organismos multicelulares, a morte celular programada é um processo essencial para o desenvolvimento, manutenção da homeostase e defesa. Ocorre de maneira ativa e controlada, promovendo a eliminação de células danificadas, envelhecidas ou disfuncionais de forma ordenada (GREEN; LLAMBI, 2015; GALLUZZI *et al*., 2018).

Um dos tipos de morte celular programada, a apoptose, tem as caspases como protease mais estudada de seu mecanismo. As caspases são inicialmente sintetizadas como zimogênios inativos (procaspases), essas enzimas são ativadas em resposta a estímulos apoptóticos, desencadeando uma cascata proteolítica específica. Elas desempenham um papel central no processo de apoptose e sua ativação culmina em alterações morfológicas características, como condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos, que sinalizam para a fagocitose da célula (CHANG, 2000; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Classificadas especificamente como cisteíno-proteases, as caspases fazem parte, de maneira abrangente, da classe das proteases. As proteases, enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, apresentam uma diversidade funcional e alta especificidade em relação à clivagem dos resíduos de aminoácidos presentes em seus substratos (ATKINSON; BABBITT; SAJID, 2019). A especificidade dessas enzimas é determinada por seus sítios ativos, regiões moleculares que reconhecem sequências de aminoácidos específicas nas proteínas-alvo.

A nomenclatura de Schechter e Berger (1967) padronizou a descrição desses sítios, permitindo uma análise detalhada das interações entre protease e substrato. Os resíduos do substrato antes do ponto de clivagem são denominados P_1, P_2, P_3, e assim por diante, enquanto os correspondentes na protease são chamados S_1, S_2, S_3, respectivamente. Para os resíduos após o ponto de clivagem, utilizam-se as denominações P_1', P_2', P_3' e S_1', S_2', S_3', seguindo o mesmo padrão.

Figura 3 - Interação entre os subsítios de uma protease e seu substrato peptídico.



Fonte: Adaptado de (ATKINSON; BABBITT; SAJID, 2019).
Legenda: S: subsítio; P: resíduo de aminoácido peptídico; R: cadeia lateral de aminoácido; S (em círculo amarelo): enxofre catalítico da cisteína e B: base catalítica.

A ligação de um substrato peptídico aos subsítios da peptidase (bolsas do sítio ativo) posiciona o enxofre da cisteína próximo ao carbonil da ligação peptídica a ser clivada. Esse enxofre, altamente nucleofílico devido à presença de uma base química essencial como a histidina, facilita a clivagem da ligação peptídica (ATKINSON; BABBITT; SAJID, 2019);.

O aminoácido nucleofílico presente no sítio ativo das proteases é a principal característica utilizada para classificá-las em seis grupos: serino, cisteíno, metalo, aspartil, glutamato e treonino proteases, de acordo com a classificação MEROPS (RAWLINGS *et al.,* 2018).

1.5 CISTEÍNO PROTEASES

As cisteíno-proteases constituem uma das maiores classes de proteases conhecidas e sua atividade é mediada por uma díade catalítica composta por histidina e cisteína, que, em alguns casos, é estabilizada por um terceiro aminoácido. Essa estrutura molecular permite a hidrólise eficiente de ligações peptídicas (RANI, RACHITA E DATT, 2012; VERMA, DICXIT E PANDEY, 2016).

Em função das estruturas terciárias, as cisteíno-proteases são agrupadas em 14 clãs e diferentes famílias, com base em suas semelhanças estruturais (RAWLINGS *et al*., 2018). Segundo o banco de dados MEROPS, elas pertencem ao clã CD e àfamília C14 (MININA *et al*., 2017), caracterizando-se por uma dobra única de folhas α e β. Além disso, possuem uma subunidade maior (P20) que contém a díade

catalítica histidina/cisteína e uma subunidade menor (P10) (NELSON; COX; HOSKINS, 2022).

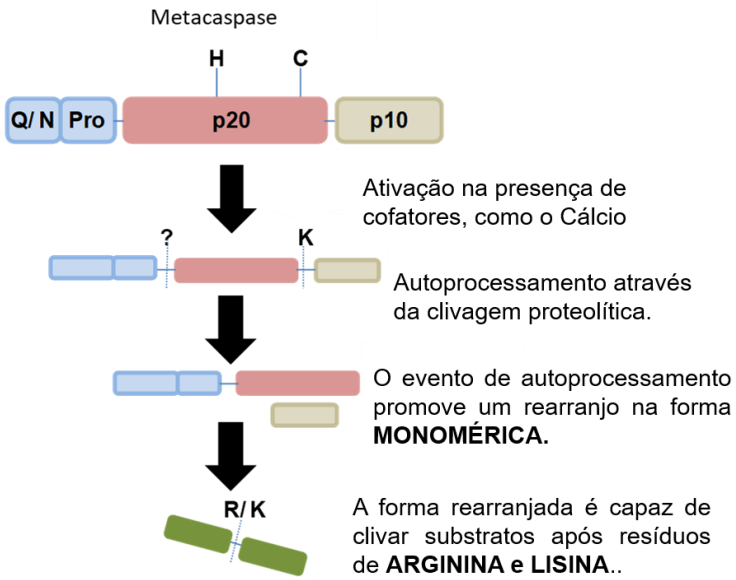
As proteases do clã CD, com papel em diversos processos patológicos, são alvos promissores para terapias. Entre elas, as metacaspases, por suas semelhanças funcionais e estruturais com as caspases, têm sido extensivamente estudadas, indicando um possível papel na morte celular e na regulação do ciclo celular em organismos eucariotos simples (BARCINSKI *et al*., 1992; MADEO; FRÖHLICH; FRÖHLICH, 1997; TSIATSIANI *et al*., 2011).

1.6 METACASPASES

As metacaspases, encontradas em organismos como plantas, fungos e protozoários, compartilham semelhanças estruturais com as caspases de mamíferos (UREN *et al*., 2000; TSIATSIANI *et al*., 2011). No entanto, se diferem por sua especificidade de substrato, clivando preferencialmente após resíduos básicos como arginina ou lisina, em contraste com a preferência das caspases por resíduos de aspartato (MOTTRAM *et al*., 2004; VERCAMMEN *et al*., 2004; GONZALEZ *et al*., 2007; MACHADO *et al*., 2013).

A especificidade das metacaspases por resíduos básicos como arginina e lisina é influenciada pela presença de resíduos de aspartato conservados em seu sítio ativo, que interagem eletrostaticamente com esses resíduos positivamente carregados. Além disso, a atividade catalítica dessas enzimas é dependente de íons de cálcio, que atuam como cofatores essenciais (VERCAMMEN *et al*., 2004; MACHADO *et al*., 2013).

Figura 4: Estrutura e mecanismo de ativação das metacaspases

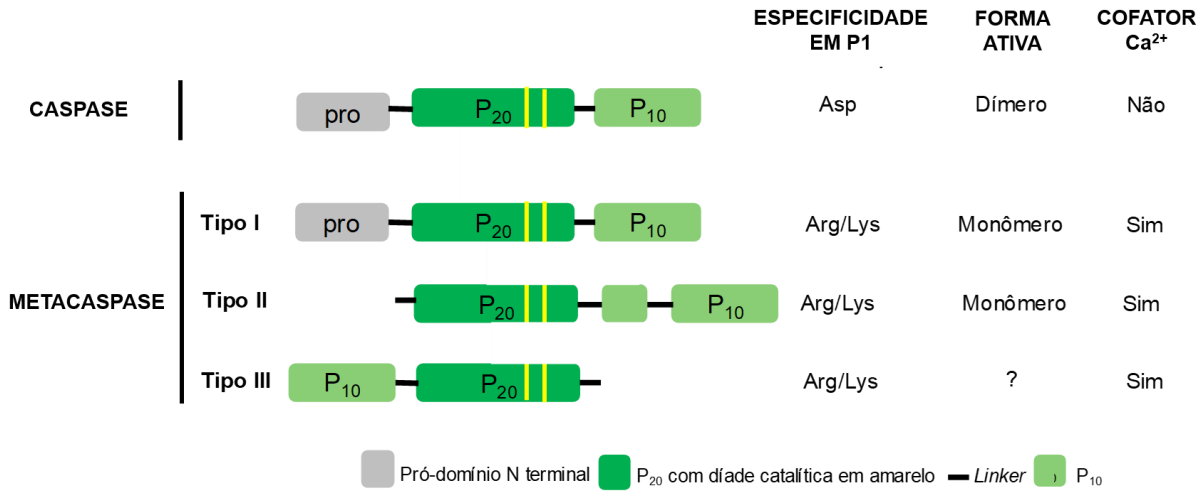


Fonte: Figura adaptada de HILL ; NYSTRÖM (2015, p. 526).
Legenda: Ilustração proposta para o autoprocessamento das metacaspases. Todas as três classes de metacaspases contêm as subunidades P20, que abrigam a díade catalítica His/Cys (H e C), e P10, além de uma região rica em glutamina e asparagina (Q/N) na subunidade P20. A metacaspase I é caracterizada pela presença de um pró-domínio (pro).

Em resumo, as caspases e metacaspases apresentam diferenças significativas em termos de mecanismo de ativação e especificidade de substrato (TSIATSIANI *et al.*, 2011). Enquanto as caspases requerem dimerização e proteínas adaptadoras para sua ativação, as metacaspases atuam de forma mais autônoma (MCLUSKEY; MOTTRAM, 2015).

As metacaspases podem ser classificadas em três tipos com base em suas características estruturais. O tipo I possui um pró-domínio N-terminal distintivo, contendo sequências repetidas de prolina e um domínio de ligação a zinco, sugerindo funções regulatórias. O tipo II, por sua vez, carece desse pró-domínio e apresenta uma estrutura mais simples. Por fim, o tipo III se diferencia dos demais pela inversão das subunidades P20 e P10 (UREN *et al.*, 2000; TSIATSIANI *et al.*, 2011).

Figura 5: Comparação entre caspases e metacaspases



Fonte: Klemenčič ; Funk (2019, p. 2 – com adaptação)

Legenda: Análise da estrutura dos domínios e características das caspases e metacaspases. O pró-domínio no N-terminal (pro), destacado em cinza, está presente tanto nas caspases quanto nas metacaspases do tipo I. A metacaspase do tipo II possui um domínio vinculador entre as subunidades P20 e P10. Já na metacaspase do tipo III, a subunidade menor P10 precede a subunidade maior P20.

O pró-domínio N-terminal presente em metacaspases do tipo I, como metacaspase de *Candida albicans* (CaMCA) e *Saccharomyces cerevisiae* (YCA1), desempenha um papel crucial na regulação de sua atividade enzimática (CAO *et al*., 2009; LEGER *et al*., 2015). Essa região é essencial para a conformação correta da proteína e suas interações com outras moléculas, contribuindo significativamente para a estabilidade estrutural e a função catalítica da metacaspase (VERCAMMEN *et al*., 2004; TSIATSIANI *et al*., 2011). Estudos com as metacaspases-3 e 5 de *Trypanosoma cruzi* (TcMCA-Ic e TcMCA5) demonstraram que a deleção da região N-terminal resulta em uma quase completa perda de atividade enzimática, evidenciando sua importância para o dobramento ou atividade da enzima (LAVARRIÈRE *et al*., 2012).

A identificação de genes codificadores de metacaspases tem se intensificado nos últimos anos, revelando a presença dessas proteases em diversos eucariotos simples. Pelo menos treze organismos eucarióticos inferiores possuem metacaspases com funções biológicas caracterizadas (TSIATSIANI *et al*., 2011). Entre os protozoários, gêneros como *Leishmania* e *Trypanosoma* apresentam metacaspases do tipo I, destacando-se *Leishmania donovani* com metacaspases 1 e 2 (LsMc1 e LsMc2), cruciais para a morte celular induzida por estresse oxidativo (LEE *et al*.,

2007). Em *Leishmania major*, a única metacaspase identificada (LmjMCA) desempenha um papel fundamental na regulação do ciclo celular (ZALILA *et al*., 2011).

A metacaspase YCA1 de *Saccharomyces cerevisiae* exerce múltiplas funções celulares. Além da morte celular programada, ela regula o ciclo celular, remodela agregados proteicos e mantém a proteostase. Outras espécies de fungos, como *Aspergillus spp.*, *Podospora anserina*, *Candida albicans* e *Ustilago maydis*, também possuem metacaspases com funções relacionadas ao estresse e envelhecimento (RICHIE *et al*., 2007; HAMANN *et al*., 2007; CAO *et al*., 2009; MUKHERJEE *et al*., 2017).

O protozoário *Trypanosoma brucei* possui uma família diversificada de cinco metacaspases (TbMCA1-TbMCA5). Enquanto TbMCA2, TbMCA3 e TbMCA5 contêm os resíduos catalíticos essenciais para sua atividade enzimática e são importantes para a forma sanguínea do parasita, TbMCA1 e TbMCA4, específicas dessa forma, são liberadas e processadas por TbMCA3. Essas últimas, no entanto, apresentam substituições em seus sítios catalíticos, tornando-as inativas. Apesar disso, TbMCA4 atua como fator de virulência, interagindo com a membrana e sendo processada pela TbMCA3. A TbMCA2 está localizada em endossomos RAB11-positivos e desempenha um papel crucial no controle do ciclo celular pré-citocinese (MCLUSKEY *et al*., 2012).

Embora as metacaspases tenham sido inicialmente associadas à morte celular programada (Uren *et al*., 2000), estudos em *Trypanosoma brucei* revelaram funções adicionais para essas proteases, especialmente na regulação do ciclo celular. A expressão de MCA2, MCA3 e MCA5 é essencial para a viabilidade da forma sanguínea do parasita, e a redução de seus níveis por RNAi compromete severamente o crescimento e o ciclo celular. Curiosamente, a ausência dessas três metacaspases não afeta significativamente a morte celular induzida por prostaglandina D2, sugerindo que suas funções transcendem a apoptose (HELMS *et al.*, 2006).

Em *Leishmania major*, a metacaspase LmjMCA, também desempenha um papel crucial na regulação do ciclo celular. Sua expressão aumenta durante a fase de crescimento ativo e a proteína se localiza nos fusos mitóticos, indicando uma participação direta na divisão celular. A superexpressão de LmjMCA resulta em

defeitos na segregação do cinetoplasto e ploidia alterada, comprometendo a divisão celular. A impossibilidade de gerar uma linhagem nula para LmjMCA reforça sua importância essencial para a viabilidade celular (AMBIT *et al*., 2008).

Embora o mecanismo exato pelo qual as metacaspases regulam o ciclo celular em protozoários ainda não esteja totalmente elucidado, evidências sugerem um papel importante para sua localização subcelular e nível de expressão. Em *Trypanosoma brucei,* metacaspases colocalizam com o marcador de endossomos RAB11, indicando uma possível função na citocinese (HELMS *et al.*, 2006). Em *Trypanosoma cruzi*, a superexpressão de TcMCA-Ic e TcMCA5 com diferentes domínios C-terminais induz fenótipos distintos, sugerindo que essa região influencia a função da metacaspase e a progressão do ciclo celular (LAVERRIÈRE, 2012).

A regulação do ciclo celular por metacaspases parece ser um fenômeno conservado evolutivamente. Em *Saccharomyces cerevisiae*, a deleção ou a inativação da metacaspase YCA1 resulta em alterações no conteúdo de DNA e na progressão do ciclo celular, particularmente na transição G1/S (LEE *et al*., 2008). Similarmente, em *Trypanosoma cruzi*, a manipulação da metacaspase TcMCA-Ic afeta a progressão do ciclo celular (LAVERRIÈRE, 2012). Além disso, a metacaspase YCA1 de *Saccharomyces cerevisiae* influencia o crescimento celular, especialmente em condições de estresse (LIM *et al*., 2007). A ausência de YCA1 em *S. cerevisiae* compromete a resposta ao ponto de verificação G2/M, indicando um papel crucial dessas proteases na manutenção da integridade do genoma.

Esses resultados indicam que as metacaspases podem regular o ciclo celular de forma independente da morte celular em diversos protozoários, embora o mecanismo molecular preciso ainda não esteja completamente elucidado.

Diante da relevância das metacaspases na biologia dos protozoários e do seu potencial como alvo terapêutico, este estudo propõe uma investigação detalhada da metacaspase-3 de *Trypanosoma cruzi,* de seu autoprocessamento proteolítico e das condições ótimas para atividade enzimática.

A compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a atividade de TcMCA-3 poderá abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias mais eficazes contra a doença de Chagas, uma enfermidade que ainda representa um importante problema de saúde pública, especialmente na América Latina.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho tem por objetivo geral, investigar o autoprocessamento proteolítico da metacaspase-3 de Trypanosoma cruzi, com foco na influência do cálcio nesse processo, além de realizar uma caracterização bioquímica para determinar as condições ideais para a atividade da TcMCA-IcTcMCA-Ic.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar, expressar e purificar a TcMCA-Ic.
- Determinar o perfil de autoprocessamento proteolítico da TcMCA-Ic sob diferentes concentrações de cálcio.
- Realizar ensaios cinéticos para:
- Avaliar o efeito da temperatura sobre a atividade da TcMCA-Ic;
- Determinar o pH ótimo para a atividade da TcMCA-Ic;
- Avaliar o efeito da concentração de cálcio sobre a atividade da TcMCA-Ic;
- Avaliar o efeito da concentração de sódio sobre a atividade da TcMCA-Ic;
- Avaliar o efeito do cálcio na fluorescência intrínseca da TcMCA-Ic.

3. METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DA SEQUÊNCIA E SÍNTESE DO GENE

A obtenção da metacaspase-3 de Trypanosoma cruzi (TcMCA-Ic) iniciou-se com a busca pela sequência nucleotídica completa que compõe essa protease. A sequência de nucleotídeos adotada para o trabalho foi otimizada e sintetizada por *Invitrogen by Thermo Fisher Scientific*. A sequência não otimizada é identificada como "DQ015871", no ENA (*European Nucleotide Archive*), banco de dados da EMBL's (*European Bioinformatics Institute*).

O gene foi construído pela *Thermo Fisher Scientific* a partir de oligo nucleotídeos sintéticos, produtos de PCR. O fragmento gerado foi clonado no vetor pMA-RQ (AmpR), que confere resistência à ampicilina às bactérias transformadas. O DNA plasmidial foi isolado dessas bactérias e sua concentração quantificada por espectrofotometria UV. A sequência do produto foi validada por sequenciamento.

3.2 DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA DOS PRIMERS

As sequências dos iniciadores, projetadas para a etapa de amplificação desse gene, foram definidas com base nas sequências do gene de T. cruzi e do plasmídeo pET28(a)+, com o objetivo de promover a reação TEDA de clonagem.

Tabela 1 – Primers utilizados para a amplificação do gene da TcMCA-Ic e do vetor pET28(a)+

Primer	Sequência
TcMCA-Ic *Forward*	5' CTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGGCTTTGATTTTGGTTGTCTGC 3'
TcMCA-Ic *Reverse*	5' GTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTAGGTTGCAACTGCCGGATCAACT 3'
pET28(a)+ *Forward*	5' CTCGAGCACCACCACCACCACCACT 3'
pET28(a)+ *Reverse*	5' CATATGGCTGCCGCGCGGCAC 3'

Fonte: elaborado pela própria autora.

3.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA TCMCA-IC

A amplificação do gene da metacaspase-3 de Trypanosoma cruzi (TcMCA-Ic) foi a primeira etapa para a sua clonagem, através do método T5 Exonuclease DNA Assembly (TEDA).

Uma triagem dos primers foi realizada para determinar a temperatura de anelamento ideal, garantindo a especificidade e eficiência da amplificação. Para essa etapa, utilizamos a enzima *HS Taq DNA Polymerase* (SINAPSE) e um termociclador com gradiente de temperatura (UNISCIENCE). As condições da reação foram as seguintes:

Tabela 2 – Condições de PCR para triagem de temperatura de anelamento dos primers de TcMCA-Ic.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclo
Denaturação inicial	94	10 min	1
Denaturação	94	30 s	35
Anelamento	60-70 (gradiente)	45 s	35
Extensão	72	1 min	35
Extensão final	72	10 min	1

Fonte: elaborado pela própria autora.

Após a determinação da temperatura de anelamento ideal, a reação de amplificação do gene foi realizada utilizando PCRBIO VeriFi™ Polimerase (PCR *Biosystems*) em termociclador *Miniamp Plus Thermal Cycler* (ThermoFisher Scientific), sob as seguintes condições:

Tabela 3 – Condições de PCR otimizadas para amplificação do gene da TcMCA-Ic

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclo
Denaturação inicial	98	30 s	1
Denaturação	98	20 s	35
Anelamento	62	45 s	35
Extensão	72	2 min	35
Extensão final	72	10 min	1

Fonte: elaborado pela própria autora.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) em tampão TAE (TRIS 80 mM, ácido acético glacial 40 mM, EDTA 2,5 mM,

pH 8.3). Após a eletroforese, o gel foi visualizado sob luz UV utilizando o sistema de imagem ChemiDocTM MP (Bio-Rad).

O fragmento de interesse foi purificado utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e quantificado por espectrofotometria utilizando o *NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer* (ThermoFisher Scientific).

3.4 AMPLIFICAÇÃO E PREPARO DO PLASMÍDEO PET28(A)+ PARA CLONAGEM TEDA

Para amplificar o plasmídeo pET28(a)+ e preparar as extremidades homólogas para a reação TEDA, foram projetados primers específicos (Tabela 1). A reação de PCR foi realizada utilizando 60 ng de DNA molde do plasmídeo pET28(a)+, 25 µmol/L de cada primer e a enzima PCRBIO VeriFi™ Polimerase (PCR Biosystems). As condições de PCR foram as seguintes:

Tabela 4 – Condições de PCR para Amplificação do Plasmídeo pET28(a)+ e Geração de Extremidades Homólogas para TEDA.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclo
Denaturação inicial	98	30 s	1
Denaturação	98	20 s	35
Anelamento	72	2 min	35
Extensão	72	2 min	35
Extensão final	72	10 min	1

Fonte: elaborado pela própria autora.

O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e visualizado em um transiluminador UV. O fragmento de DNA amplificado foi purificado utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Em seguida, o DNA purificado foi digerido com a enzima de restrição DpnI para remover o DNA plasmidial metilado da bactéria hospedeira. A reação de digestão foi realizada utilizando o tampão Tango™ Thermo Fisher Scientific e incubada a 37°C por 3 horas, seguida de inativação da enzima a 82°C por 20 minutos.

3.5 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES

O protocolo de preparação de células competentes foi adaptado dos métodos descritos por Inoue *et al*. (1990) e Hanahan (1983). Duas cepas de *Escherichia coli* foram utilizadas: DH5α e BL21(DE3)pLysS.

Culturas iniciadas a partir de colônias isoladas foram cultivadas em meio LB por 18 horas. Em seguida, alíquotas dessas culturas foram inoculadas em meio Super Optimal Broth (SOB) (triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L contendo 10 mL/L KCL 250 mM e 5 mL/L de MgCl2 2M – pH 7,0 NaOH). Após crescimento exponencial, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em solução ITB fria (CaCl2 15 mM; KCl 250 mM; MnCl2 55mM e PIPES 10 mM – pH 6,7 KOH). Após novas etapas de centrifugação e ressuspensão, Dimetil Sulfóxido (DMSO) foi adicionado para aumentar a permeabilidade celular. Finalmente, as células competentes foram aliquotadas e armazenadas a -80°C.

Tabela 5 – Etapas e condições de preparo das células competentes de *Escherichia coli* DH5α E BL21(DE3)pLysS.

Etapa	Condições	Objetivo
Inóculo Inicial	10-12 colônias em 40 mL SOB, 30-37°C, 150 rpm, 18h	Obtenção de cultura inicial
Pré-cultura	5 ou 2 mL do pré-inóculo em 125 mL SOB, 25°C, 180-200 rpm, 18h	Crescimento exponencial
Coleta e Centrifugação	3200 g, 4°C, 40-50 min	Sedimentação celular
Ressuspensão 1	Solução ITB fria, 1/3 do volume original	Remoção do meio, preparação para choque osmótico
Incubação em Gelo	10 min	Permeabilização da membrana
Centrifugação 2	3200 g, 4°C, 40-50 min	Concentração celular
Ressuspensão 2	Solução ITB fria, 1/12.5 do volume original	Aumento da concentração celular
Adição de DMSO	7% (v/v), 10 min em gelo	Aumento da permeabilidade, proteção celular
Alíquota e Congelamento	Alíquotas de 50-200 µL, congelamento ultra rápido (N_2 líquido) e armazenamento -80°C	Armazenamento

Fonte: elaborado pela própria autora.

3.6 MONTAGEM DE DNA UTILIZANDO T5 EXONUCLEASE DNA ASSEMBLY

Adaptamos o protocolo descrito por Xia *et al*. (2019) para realizar a montagem de fragmentos de DNA utilizando a T5 exonuclease. Essa técnica, conhecida como TEDA, conta com a capacidade da enzima em digerir nucleotídeos na extremidade 5' dos fragmentos de DNA, promovendo o anelamento de sequências homólogas e a formação de um plasmídeo recombinante.

Uma solução estoque 5X contendo 0,5 M de Tris, 50 mM de $MgCl_2$, 50 mM de DTT (Ditiotreitol) e PEG 8000 a 0,25 g/mL, com pH ajustado para 7,5 utilizando HCl foi preparada e armazenada a -80°C. Foram adicionadas 10 unidades de T5 *exonuclease* (Thermo Fisher Scientific) a cada mL de solução estoque, ou o ideal para obter uma concentração final de 0,004 a 0,008 unidades por alíquota de 4 µL.

Para cada reação de montagem, foram adicionados 4 µL da solução TEDA 5X, fragmento de vetor linearizado (100 ng) e a quantidade calculada de inserto (conforme Equação 1), completando o volume para 20 µL com água ultrapura. A reação foi incubada a 30°C por 40 minutos.

Equação 1 - Cálculo utilizado para definir a concentração ideal de inserto a ser utilizada na reação TEDA.

$$\text{ng Inserto} = \frac{(\text{ng Vetor x pb Inserto})}{\text{pb Vetor}}$$

Equação para calcular a massa (ng) de inserto a ser utilizada na reação de TEDA, considerando uma concentração fixa de 100 ng/µL do vetor pET28(a)+. Variáveis: pb inserto = tamanho do inserto em pares de base; pb vetor = tamanho do vetor em pares de base.

3.7 TRANSFORMAÇÃO E CONFIRMAÇÃO

A reação TEDA foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5α. A transformação por choque térmico foi realizada utilizando 7 µL da solução reacional em uma alíquota de 100 µL de células competentes *E. coli* DH5α. Após o choque térmico, as células foram incubadas, semeadas em placas de LB e ágar contendo 1 µL/mL de Canamicina a 50 µg/mL e incubadas a 37 °C durante a noite para o crescimento das colônias.

Para confirmar a incorporação do plasmídeo nas colônias transformadas, realizou-se uma PCR utilizando primers específicos da região T7. Brevemente, colônias individuais foram ressuspendidas em água e utilizadas como molde para a reação de PCR, que foi otimizada para amplificar o fragmento de interesse. As condições de PCR foram as seguintes:

Tabela 6 – Condições de PCR para triagem de colônias de *E. coli* DH5α contendo plasmídeo clonado da TcMCA-Ic.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclo
Denaturação inicial	94	30 s	1
Denaturação	94	30 s	35
Anelamento	49	45 s	35
Extensão	72	1 min	35
Extensão final	72	10 min	1

Fonte: elaborado pela própria autora.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e examinado sob luz UV usando o sistema de imagem *ChemiDoc^{TM} MP* (Bio-Rad).

3.8 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL POR MINIPREP PELO MÉTODO DE LISE ALCALINA.

Após a confirmação dos clones positivos, as culturas foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 1 µL/mL de Canamicina a 50 µg/mL e incubadas a 37°C e 180 rpm por 18 horas. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação e o DNA plasmidial foi extraído utilizando o método de lise alcalina, com o kit *Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega). Esse método se baseia na ruptura das células em condições alcalinas, seguida da neutralização do pH para precipitar as proteínas e o DNA cromossomal, enquanto o DNA plasmidial permanece em solução. O DNA plasmidial purificado foi quantificado em um espectrofotômetro *Nanodrop™ NanoDrop One/One^{C} Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific).*

3.9 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS DE *ESCHERICHIA COLI* BL21(DE3)PLYSS COM O PRODUTO DA MINIPREP

O DNA plasmidial purificado foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Para isso, 10 ng do plasmídeo foram adicionados a 100 µL de células competentes e incubados em gelo por 30 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 90 segundos, seguido de um choque térmico em gelo por 2 minutos. Após a recuperação em meio LB a 37°C por 90 minutos, as células foram plaqueadas em meio LB e ágar contendo 1 µL/mL de Canamicina a 50 µg/mL e incubadas a 37°C ao longo da noite.

Para identificar as colônias que de fato foram transformadas com sucesso, foi realizada uma PCR para amplificar o inserto clonado no plasmídeo, seguindo as mesmas condições adotas para triagem das colônias em *E. coli* DH5α. Os produtos dessa PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e examinado sob luz UV usando o sistema de imagem *ChemiDoc™ MP* (Bio-Rad).

3.10 EXPERIMENTO DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA

Colônias de *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS transformadas com o plasmídeo contendo o gene de interesse foram inoculadas em 10 mL de meio LB suplementado com 1 µL/mL de Canamicina a 50 µg/mL e incubadas a 37 °C e 180 rpm por 16-18 horas. Em seguida, 2 mL do pré-inóculo foram transferidos para 600 mL de meio LB estéril contendo 1 µL/mL de Canamicina a 50 µg/mL e cultivados nas mesmas condições até atingir uma densidade óptica (DO 600) de 0,6-0,8. A expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG a uma concentração final de 0,25 mM.

O IPTG se liga à proteína repressora LacI, impedindo-a de se ligar ao operador lac. Isso permite que a RNA polimerase T7 se ligue ao promotor T7 e inicie a transcrição do gene de interesse. Ao contrário da lactose, o IPTG não é metabolizado pelas bactérias, garantindo uma indução constante. Além disso, a concentração de IPTG pode ser ajustada para controlar o nível de expressão da proteína.

Após a adição do indutor, a temperatura de cultivo foi reduzida para 20 °C para favorecer o dobramento correto da proteína. Temperaturas mais baixas permitem que

as proteínas se dobrem mais lentamente, aumentando a chance de obter a conformação nativa correta, além de reduzir a formação de agregados insolúveis de proteínas mal dobradas, denominados corpos de inclusão.

Após 18 horas de indução, as células foram coletadas por centrifugação. A análise da expressão da proteína foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%.

3.11. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

O gel de corrida, com 15% de acrilamida, foi preparado em placas de vidro utilizando espaçadores de 1,5 mm. As soluções de acrilamida 30%, bis-acrilamida 0,8%, SDS 10%, TEMED 0,12% e persulfato de amônio 100 mg/mL foram agregadas ao tampão Tris/HCl 1,0 M, pH 8,8, e polimerizadas. O gel de empilhamento, com 4% de acrilamida, foi preparado de forma similar, utilizando tampão Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8. As amostras previamente incorporadas ao tampão de amostra (TRIS/HCl 60 mM, SDS 2% (p/v), glicerol 6% (v/v), azul de bromofenol 10% e β-mercaptoetanol a 3% (v/v), em pH 6,8) e aquecidas a 100 °C por 10 minutos, foram carregadas nos poços do gel.

O tampão de amostra desempenha um papel fundamental na eletroforese em gel SDS-PAGE, garantindo que as proteínas sejam desnaturadas, linearizadas e uniformemente carregadas através do SDS, um detergente aniônico que se liga às proteínas, conferindo-lhes uma carga negativa proporcional à sua massa. Essa carga negativa neutraliza as cargas nativas das proteínas, garantindo que todas migrem em direção ao polo positivo do gel, independentemente de sua carga original. Isso permite a separação precisa das proteínas com base em seu peso molecular.

A eletroforese foi realizada em um sistema de eletroforese vertical, utilizando tampão de corrida (TRIS/HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1% - pH 8,3), sob uma corrente constante de 120 V por aproximadamente 1 hora e 40 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com *Comassie Brilliant Blue* R-250 por 45 minutos, descorado com solução de metanol/ácido acético e documentado no equipamento *ChemiDoc™ MP Imaging System* (Bio-Rad).

3.12 LISE CELULAR

A expressão previamente preparada foi submetida a centrifugação a 10.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi congelado a -20 °C com tampão de lise (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, glicerol 5% (v/v), 0,01% Triton X-100 (v/v), pH 8,0).

No dia seguinte, o material foi lizado mecanicamente por meio de sonicação (10 ciclos de 40 segundos a 50 Hz), seguido de incubação com 2 mg/mL de lisozima (Sigma) por 1 hora no gelo. Posteriormente, foram adicionados 1 M de $MgCl_2$ e 1 U/mL de DNase, incubando por 1 hora à temperatura ambiente em agitador. O material foi finalmente centrifugado a 13.000 rpm para remover detritos insolúveis, e o sobrenadante foi filtrado por um filtro de poros de 0,45 µm.

3.13 PURIFICAÇÃO E DESSALTING

A purificação da proteína foi conduzida por cromatografia de afinidade em níquel. Um volume de aproximadamente 11 mL do sobrenadante da lise celular foi carregado em uma coluna *HisTrap*™ HP previamente equilibrada com 5 volumes de tampão de partida (Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5). A proteína de interesse, que possuía uma cauda de histidina em sua extremidade N-terminal, foi retida na coluna.

A eluição foi realizada com um gradiente de imidazol (50 mM, 100 mM, 200 mM e 300 mM). A purificação foi monitorada por espectrofotometria a 280 nm e as frações contendo a proteína pura foram coletadas.

Após a cromatografia de afinidade, uma cromatografia de exclusão molecular foi realizada utilizando uma coluna *HiTrap*™ 26/10 *Desalting* de 5 mL (GE *Healthcare*) para remoção do sal imidazol por troca de tampão. O fluxo foi de 5 mL/min, monitorando a eluição por espectrofotometria a 280 nm, com o material coletado em alíquotas de 1 mL.

As proteínas obtidas foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 15% para análise de pureza.

3.14 *WESTERN BLOTTING*: CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA

Para validar a expressão das proteínas obtidas, foi empregada a técnica de *Western blotting* utilizando o anticorpo anti-6x His-Tag (MA1-21315-HRP, Thermo Fisher Scientific). Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Bio-Rad) utilizando um sistema de transferência Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). O seguinte protocolo foi utilizado para a transferência: voltagem máxima de 25V, corrente constante de 2,5A e tempo de transferência de 10 minutos, conforme as recomendações do fabricante.

A membrana foi submetida a um bloqueio com solução PBS (Na2HPO4 10 mM, NaCl 150 mM - pH 7,4) contendo 5% de albumina bovina sérica (BSA) e 0,01% de Tween20, sob agitação constante por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-6x His Tag, diluído em PBS (1x) com 5% de BSA e 0,01% de Tween 20, nas seguintes diluições: 1:1.000 (1 µg/mL), 1:10.000 (0,1 µg/mL), 1:20.000 (0,05 µg/mL) e 1:30.000 (0,033 µg/mL). A incubação ocorreu a 4 °C por aproximadamente 18 horas.

Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada por 10 minutos (3x) com tampão PBS contendo 0,01% de Tween 20 para remover o anticorpo não ligado. A detecção da proteína de interesse foi realizada por quimiluminescência, utilizando o kit *SuperSignal West Pico* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. A emissão de quimiluminescência foi capturada utilizando um sistema de imagem ChemiDoc™ MP (Bio-Rad).

3.15 AVALIAÇÃO DO AUTO PROCESSAMENTO DA TCMCA-IC SOB A INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO

Para investigar o processamento da enzima TcMCA-Ic em resposta a diferentes concentrações de cálcio, a proteína foi incubada a 25°C em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo 150 mM NaCl e 5 mM DTT. Foram testadas as seguintes concentrações de cálcio: 0 mM (controle negativo), 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM. Como controle adicional, foi incluída uma amostra com 5 mM de EDTA (agente quelante de íons). No tempo zero, após 24 e 48 horas de incubação, alíquotas foram coletadas e as proteínas foram denaturadas em tampão de amostra (Tris/HCl

60 mM, SDS 2% (p/v), glicerol 6% (v/v), azul de bromofenol 0,1% e β-mercaptoetanol 3% (v/v), pH 6,8) a 100ºC por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à análise por eletroforese em gel SDS-PAGE a 15%.

3.16 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD

O método de Bradford é uma técnica colorimétrica amplamente utilizada para quantificar a concentração de proteínas em amostras. Esse método se baseia na interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 e os resíduos de aminoácidos básicos das proteínas, principalmente arginina, histidina e lisina. Essa interação induz uma mudança conformacional no corante, resultando em um deslocamento do máximo de absorção de 465 nm para 595 nm. A intensidade da cor desenvolvida é diretamente proporcional à concentração de proteína presente na amostra.

Para a realização do experimento, o reagente de Bradford foi preparado dissolvendo 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 em 50 mL de etanol 95%, seguido pela adição de 100 mL de ácido fosfórico 85%. O volume foi completado para 1 L com água destilada. Após filtração em papel *Whatman* nº 1, o reagente foi armazenado em frasco âmbar à temperatura ambiente.

Uma curva padrão foi construída utilizando diferentes concentrações de albumina bovina sérica (BSA) como padrão. A BSA, uma proteína com massa molecular conhecida e estrutura estável, permite estabelecer uma relação direta entre a absorbância e a concentração de proteína. As diferentes concentrações de BSA foram adicionadas a uma microplaca de 96 poços, conforme a Tabela 1. Após a adição do reagente de Bradford e um período de 5 minutos de incubação, a absorbância a 595nm de cada poço foi medida em um espectrofotômetro. A curva padrão foi então construída plotando a absorbância em função da concentração de BSA.

Tabela 7- Diluições da solução padrão de BSA.

POÇOS DA PLACA	Volume de BSA a 100 µg/ml (µL)	Volume de H_2O (µL)
A	0 µL DE SOLUÇÃO DE ALBUMINA	20 µL DE H_2O DESTILADA
B	2 µL DE SOLUÇÃO DE ALBUMINA	18 µL DE H_2O DESTILADA
C	4 µL DE SOLUÇÃO DE ALBUMINA	16 µL DE H_2O DESTILADA
D	6 µL DE SOLUÇÃO DE ALBUMINA	14 µL DE H_2O DESTILADA
E	8 µL DE SOLUÇÃO DE ALBUMINA	12 µL DE H_2O DESTILADA
F	10 µL DE SOLUÇÃO DE ALBUMINA	10 µL DE H_2O DESTILADA
G	12 µL DE SOLUÇÃO DE ALBUMINA	8 µL DE H_2O DESTILADA
H	14 µL DE SOLUÇÃO DE ALBUMINA	6 µL DE H_2O DESTILADA

Fonte: elaborado pela própria autora.

As amostras de proteína foram diluídas em tampão Tris 20 mM, pH 8,5, e adicionadas à microplaca. Após a adição do reagente de Bradford e o período de 5 minutos de incubação, a absorbância das amostras foi medida, também em 595nm. A concentração de proteína nas amostras foi determinada comparando suas absorbâncias com a curva padrão.

Para realizar diluições seriadas das amostras, foi utilizada uma microplaca de 96 poços, conforme a Tabela 8. Os poços na primeira linha da microplaca continham a amostra original, e as colunas subsequentes continham diluições seriadas da amostra, em triplicata.

Tabela 8- Esquema de diluição seriada das amostras.

POÇOS DA PLACA	1ª TcMCA 1	1ª TcMCA 2	1ª TcMCA 3
A	1:1	1:1	1:1
B	1:2	1:2	1:2
C	1:4	1:4	1:4
D	1:8	1:8	1:8
E	1:16	1:16	1:16
F	1:32	1:32	1:32
G	1:64	1:64	1:64
H	BRANCO	BRANCO	BRANCO

Fonte: elaborado pela própria autora.

3.17 INTRODUÇÃO AOS ENSAIOS CINÉTICOS

Os experimentos a seguir tiveram como objetivo investigar os efeitos de diversos fatores, como temperatura, pH, concentração de cálcio e sódio, sobre a atividade catalítica da enzima TcMCA-Ic. A atividade enzimática foi monitorada através de ensaios cinéticos, nos quais a hidrólise de um substrato de referência

(AbzKARSSAQ-EDDnp) foi acompanhada por espectrofluorimetria em espectrofluorofotometro SHIMADZU RF-6000 com os comprimentos de onda de excitação e emissão ajustados em 320 e 420nm.

3.17.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE DA TcMCA-Ic

Para avaliar a influência da temperatura na atividade da TcMCA-Ic, foram realizadas reações em uma faixa de temperatura entre 25°C e 40°C. Em cada temperatura, a enzima foi incubada na presença de DTT (5 mM), $CaCl_2$ (0,5 mM), NaCl (25 mM) e substrato (5 µM). A atividade residual da enzima foi monitorada em intervalos de tempo regulares (0, 5, 10, 15 e 20 minutos) para avaliar a estabilidade térmica da enzima.

3.17.2 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO PARA A ATIVIDADE DA TcMCA-Ic

Foi realizada uma titulação enzimática com quantidades crescentes de substrato, mantendo as demais condições reacionais constantes, para determinar as constantes cinéticas da enzima TcMCA-Ic. Para este experimento, utilizou-se um meio reacional contendo tampão (MES 25 mM, TRIS 75 mM, ácido acético 25 mM e glicina 25 mM), 5 mM de DTT, 0,5 mM de $CaCl_2$ e pH variando de 5 a 10, a 25°C.

O tampão foi escolhido por sua capacidade de manter o pH estável em uma ampla faixa, garantindo assim condições ótimas para a atividade enzimática em diferentes valores de pH. A força iônica do meio reacional foi mantida constante através da composição do tampão, o que é fundamental para evitar efeitos não específicos da força iônica sobre a atividade enzimática.

O método utilizado foi o de progressão de reação, onde o substrato foi adicionado em pequenas alíquotas ao meio reacional e a atividade enzimática foi monitorada em tempo real. A cada adição de substrato, uma nova leitura foi realizada, permitindo a construção de curvas de velocidade. Este procedimento foi repetido para diferentes valores de pH, permitindo a construção de perfis de pH para a atividade enzimática. Os parâmetros kcat/KM foram determinados e os dados cinéticos foram analisados por regressão não linear usando o programa Grafit5.

3.17.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CÁLCIO SOBRE A ATIVIDADE DA TcMCA-Ic

A influência da concentração de cálcio na atividade da TcMCA-Ic foi investigada variando a concentração deste íon entre 0,1 mM e 10 mM. As reações foram realizadas a 25°C, na presença de DTT (5 mM). A atividade enzimática foi determinada em função da concentração de substrato, que variou de 0 a 22 μM.

3.17.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓDIO SOBRE A ATIVIDADE DA TcMCA-Ic

Para avaliar o efeito do íon sódio na atividade enzimática, foram realizados ensaios variando a concentração de NaCl entre 5 mM e 200 mM. As demais condições experimentais foram mantidas constantes (25°C, 5 mM DTT, 0,5 mM $CaCl_2$). A atividade enzimática foi determinada em função da concentração de substrato, que variou de 0 a 22 μM.

3.17.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CÁLCIO NA FLUORESCÊNCIA INTRÍNSECA DA TcMCA-Ic

As alterações estruturais na TcMCA-Ic foram investigadas por meio da monitoração da fluorescência intrínseca em um tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, contendo 25 mM NaCl. A proteína foi incubada com diferentes concentrações de $CaCl_2$ (0,1 μM a 10 mM). Os espectros de emissão foram coletados na faixa de 300 a 500 nm, a 25 °C, utilizando um comprimento de onda de excitação fixo de 280 nm (com largura de fenda de 5 nm tanto para excitação quanto para emissão). Os dados obtidos foram analisados utilizando a equação "*Ligand Binding – 1 site*" que descreve a ligação a um sítio.

Equação 2 - "*Ligand Binding – 1 site*"

$$y = \frac{[\mathrm{L}].\mathrm{Cap}}{K_d + [\mathrm{L}]}$$

Nesta equação, y representa a quantidade de ligante ligado ao receptor, expressa como radioatividade, absorbância, fluorescência ou outra medida proporcional. A capacidade de ligação máxima (Cap) corresponde à quantidade máxima de ligante que pode se ligar ao receptor, expressa nas mesmas unidades de y. A constante de dissociação (Kd) representa a afinidade do ligante pelo receptor, indicando a concentração de ligante livre na qual metade dos receptores está ocupada. A concentração do ligante livre [L] é a concentração de ligante não ligado ao receptor e corresponde ao eixo x do gráfico

4. CAPÍTULO 1

Este capítulo aborda a metodologia empregada na obtenção da TcMCA-Ic recombinante, incluindo a amplificação do gene, a clonagem em vetor pET28(a)+ através do protocolo TEDA, a expressão em sistemas de *Escherichia coli,* purificação por cromatografia de afinidade e exclusão molecular, identificação da proteína por *western blotting* e por fim, a investigação da influência do cálcio no autoprocessamento proteolítico da TcMCA-Ic.

OBTENÇÃO DA METACASPASE-3 RECOMBINANTE DE *Trypanosoma cruzi* E ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO CÁLCIO NO SEU AUTOPROCESSAMENTO PROTEOLÍTICO

[a] Duarte, A.C.M.; [a] Costa, J.P.M.S.; [a] Trujilho, M.N.R.; [a] Santos, T.R., [b]Marcondes, M.F. and [a,*]Machado, M.F.M.

[a] Centro Interdisciplinar de Investigações Bioquímicas da Universidade de Mogi das Cruzes, Avenida Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza, 200, 08780-991, Mogi das Cruzes, Brasil

[b] Departamento de Biofísica, Universidade Federal São Paulo, Rua Pedro de Toledo, 669, 7° andar, 04039-032, São Paulo, Brasil

***Autor correspondente**

Maurício Ferreira Marcondes Machado, Ph.D.

Mail address: mauriciomachado@umc.br

Centro Interdisciplinar de Investigações Bioquímicas

Universidade de Mogi das Cruzes

Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza, 200 - 08780-991 - Mogi das Cruzes, Brasil.

RESUMO

A metacaspase-3 de *Trypanosoma cruzi* (TcMCA-Ic) sofre autoprocessamento proteolítico *in vitro*, dependente de cálcio. Neste estudo, demonstramos que a TcMCA-Ic recombinante é clivada em múltiplos fragmentos em resposta à presença de cálcio, sugerindo um mecanismo de ativação enzimática regulado por íons. A análise por *western blotting* revelou um padrão de autoprocessamento dinâmico, com a presença de um evento instantâneo e outro lento. Nossos resultados, juntamente com estudos anteriores sobre outras metacaspases, indicam que o autoprocessamento proteolítico é uma característica comum e crucial para a função dessas enzimas. Futuras investigações devem explorar a caracterização bioquímica, para definir condições ideais para sua atividade enzimática e investigar sua especificidade de substrato através de peptídeos de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET).

1 INTRODUÇÃO

A apoptose, um processo fundamental para o desenvolvimento e manutenção da homeostase em organismos multicelulares, é executada por uma família de proteases conhecidas como caspases. Essas enzimas, ao clivar proteínas específicas após resíduos de aspartato, desencadeiam uma cascata de eventos que culminam na morte celular programada. Embora as caspases sejam amplamente estudadas em metazoários, em organismos eucariotos mais simples, como protozoários e fungos, funções análogas são desempenhadas por proteases relacionadas, as metacaspases (HILL *et al*., 2015; NELSON; COX; HOSKINS, 2022).

As metacaspases são divididas em três tipos, com base em suas características estruturais e funcionais. A diversidade estrutural dessas enzimas reflete a adaptação evolutiva a diferentes funções biológicas. Enquanto as caspases clivam proteínas após resíduos de aspartato, as metacaspases apresentam uma preferência por resíduos de arginina ou lisina, evidenciando sua divergência evolutiva (VERCAMMEN *et al*., 2007; RAWLINGS *et al*., 2018).

Nos tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, as metacaspases desempenham papéis cruciais na regulação do ciclo celular e na resposta a estresses celulares. Estudos anteriores demonstraram que a

metacaspase-3 de *T. cruzi* (TcMCA-Ic) e a metacaspase-2 de *T. brucei* (TbMCA2) estão envolvidas na modulação da transição entre fases do ciclo celular e na promoção da sobrevivência celular em condições adversas (MOSS *et al*., 2012). Curiosamente, a atividade dessas enzimas parece ser regulada por um mecanismo conservado de auto proteólise dependente de cálcio, que resulta na geração de múltiplos fragmentos proteolíticos (UREN *et al*., 2000; MCLUSKEY *et al*., 2012).

O autoprocessamento proteolítico mediado por cálcio é um mecanismo fundamental para a regulação das metacaspases. A TcMCA-Ic, por exemplo, tem sido associada à regulação do ciclo celular de *T. cruzi*, prendendo os epimastigotas na transição G1/S e promovendo a sobrevivência durante a fase estacionária (KOSEC *et al*., 2006; LAVERRIE`RE *et al*., 2012). De forma similar, a TbMCA2 de *T. brucei* apresenta dependência de cálcio para aumentar sua atividade hidrolítica, sugerindo que o cálcio atua como um modulador chave no controle da atividade dessas enzimas (MOSS *et al*., 2012).

Compreender os mecanismos moleculares que regulam a atividade da TcMCA-Ic é crucial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a Doença de Chagas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção e Síntese do Gene TcMCA-Ic

A sequência completa do gene da metacaspase-3 de *Trypanosoma cruzi* (TcMCA-Ic) foi obtida do banco de dados ENA (DQ015871) e sintetizada pela *Thermo Fisher Scientific*. O gene foi clonado no vetor pMA-RQ (AmpR) e a sequência validada por sequenciamento.

2.2 Amplificação e Clonagem do Gene

Primers específicos foram projetados para amplificar o gene TcMCA-Ic e o vetor pET28(a)+ por PCR. As condições de PCR foram otimizadas, com anelamento a 62°C. O produto amplificado foi clonado em células *Escherichia coli* DH5α, e a transformação foi confirmada por PCR.

A técnica de T5 Exonuclease DNA Assembly (TEDA) foi empregada para clonar de forma eficiente o gene TcMCA-Ic no vetor pET28(a)+. Primers específicos foram projetados para gerar extremidades homólogas nos fragmentos de PCR do inserto TcMCA-Ic e do vetor linearizado pET28(a)+. Na reação de montagem, a enzima T5 exonuclease digeriu as extremidades 5' dos fragmentos, promovendo o anelamento eficiente das sequências complementares e a formação do plasmídeo recombinante.

2.3 Expressão e Purificação da Proteína Recombinante

O plasmídeo com o gene da TcMCA-Ic foi transformado em *E. coli* BL21(DE3)pLysS e a expressão da proteína foi induzida com isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG) a 0,25 mM. Após a indução, a proteína recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade em níquel, seguida de cromatografia por exclusão molecular. A pureza da proteína foi verificada por SDS-PAGE.

2.4 Análise do Autoprocessamento

A TcMCA-Ic purificada foi incubada em tampão Tris-HCl (20 mM, pH 8,5) com diferentes concentrações de cálcio (0-20 mM) para avaliar sua atividade auto proteolítica. Amostras foram coletadas no tempo zero, após 12, 24 e 48 horas, e analisadas por SDS-PAGE para identificar fragmentos proteolíticos.

2.5 Confirmação da Expressão por *Western Blotting*

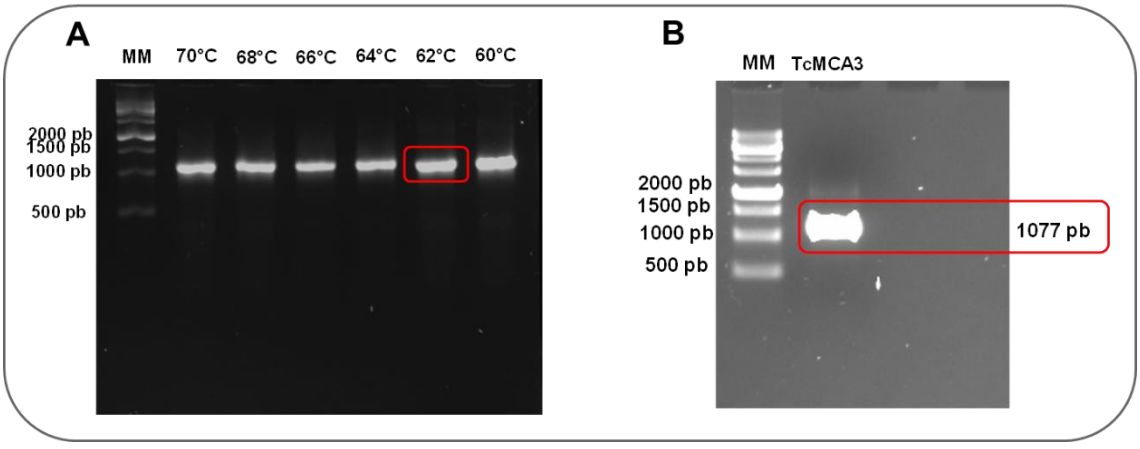
A presença da proteína foi confirmada por *western blotting*, utilizando anticorpo anti-6x His Tag em diferentes concentrações. A detecção foi realizada por quimiluminescência, e os resultados foram documentados por sistema de imagem *ChemiDoc™ MP* (Bio-Rad).

3. Resultados e Discussões

Considerando que o processo para obtenção da TcMCA-Ic teve início com a triagem de temperatura de anelamento dos primers para a amplificação do gene, é possível afirmar que essa triagem revelou 62°C como a condição ideal para obter uma amplificação eficiente do inserto. A análise da eletroforese em gel de agarose (1%) mostrou uma banda intensa e nítida de ~1077 pares de bases nessa temperatura. As demais temperaturas testadas resultaram em bandas menos intensas (Figura 1-A), indicando que as condições de anelamento, apesar de favoráveis, não eram ótimas para a amplificação eficiente e específica do fragmento de interesse.

A reprodutibilidade da amplificação do gene da TcMCA-Ic foi confirmada em um segundo experimento, utilizando a temperatura de anelamento otimizada de 62°C. Novamente, observou-se uma banda contendo ~ 1077 pares de bases (Figura 1-B), corroborando os resultados anteriores. A ausência de bandas inespecíficas em ambos os experimentos atesta a alta especificidade dos primers utilizados na amplificação do inserto.

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da triagem de temperatura de anelamento dos primers (em **A**) e do produto da amplificação por PCR otimizada com anelamento a 62ºC (em **B**).

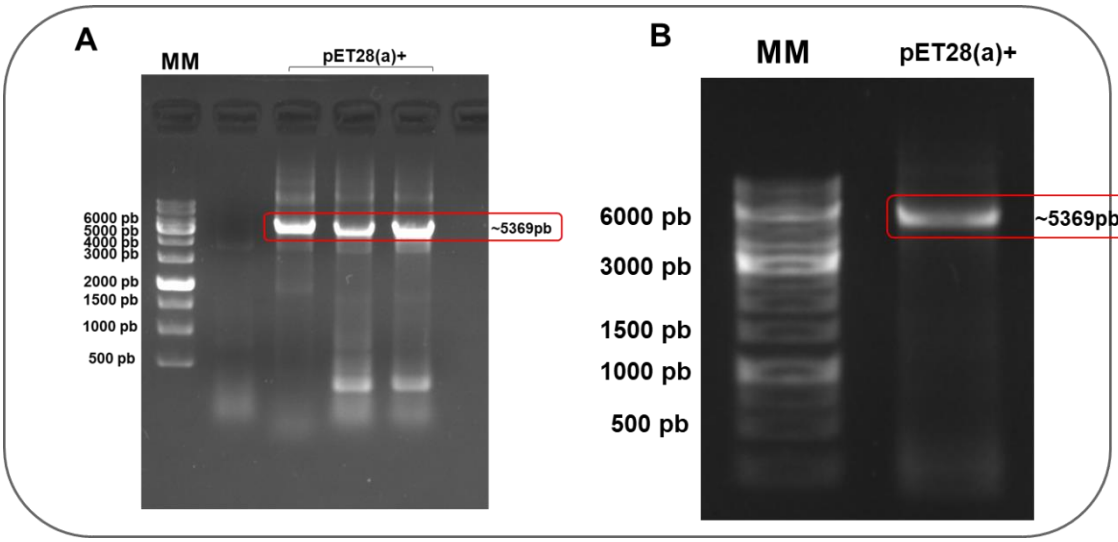


(A) Colunas: (MM) marcador molecular 1kb *ladder;* Produtos da PCR de triagem dos primers, variando temperatura de anelamento; (B) Colunas: (MM) marcador molecular 1kb ladder; TcMCA-Ic amplificada por PCR.

O sucesso na etapa de obtenção do inserto amplificado conduz ao passo de obtenção do vetor pET28(a)+ em condição ideal de trabalho. Deste modo, a amplificação do plasmídeo do vetor por PCR resultou em um fragmento de DNA com

o tamanho esperado, conforme evidenciado pela eletroforese em gel de agarose (1%) (Figura 2-A). O fragmento amplificado na região correspondente a ~5369 pares de bases indica uma amplificação eficiente. A digestão com enzima de restrição DpnI removeu eficientemente o DNA plasmidial metilado, gerando um fragmento linear pronto para a clonagem (Figura 2-B).

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação do vetor pET28(a)+, antes e após digestão com DpnI.



Colunas: (MM) marcador molecular 1kb *ladder;* (A) Produtos da PCR de amplificação do vetor pET28(a)+; (B) Produtos da PCR de amplificação do vetor pET28(a)+, após digestão com DpnI.

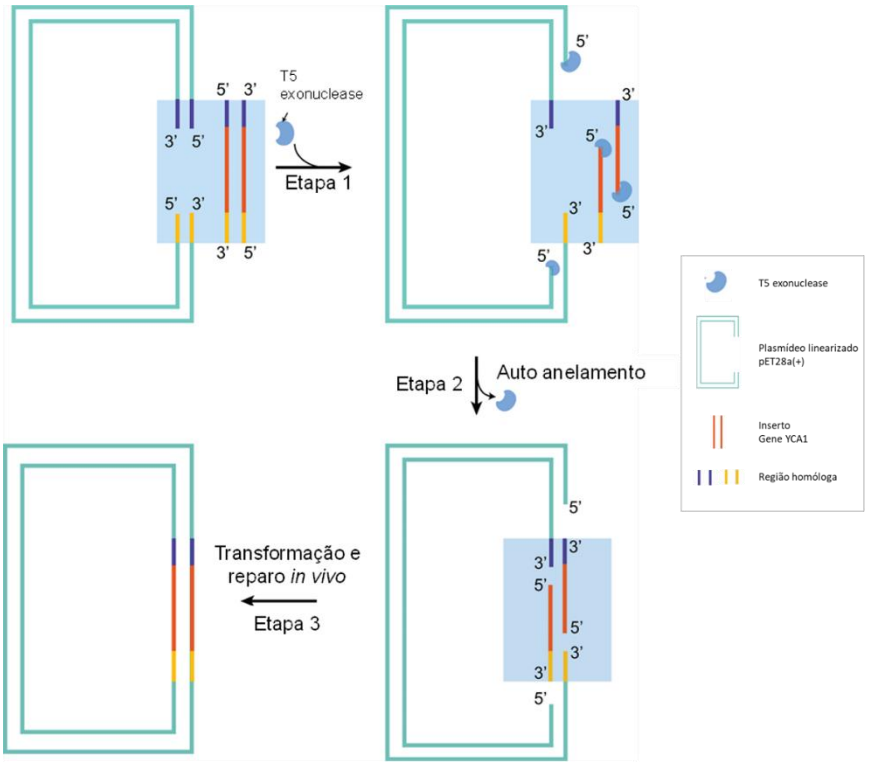
O protocolo de clonagem adotado, surgiu como uma ferramenta promissora para clonagem de genes e mutação sítio-dirigida, oferecendo diversas vantagens em relação a métodos tradicionais. Sua simplicidade, custo-efetividade e eficiência o destacam em comparação com técnicas como a clonagem por restrição e ligação, *Gibson Assembly* e *In-Fusion* (COHEN *et al*., 1973; CHAO; YUAN; ZHAO, 2015; XIA *et al*., 2019).

O TEDA (T5 *exonuclease-dependent assembly*) permite a montagem de fragmentos de DNA com extremidades homólogas curtas e é compatível com diversos vetores. Nessa reação os fragmentos de DNA a serem clonados devem possuir sequências homólogas em suas extremidades. Essas sequências são complementares e permitem que os fragmentos se anelem (XIA *et al*., 2019).

A T5 exonuclease presente na reação digere as extremidades 5' dos fragmentos de DNA, gerando extremidades 3' coesivas. As extremidades 3' coesivas dos fragmentos se hibridizam, formando um fragmento de DNA linear. Esse fragmento

é transformado em células competentes de *E. coli* DH5α e dentro das células bacterianas, a maquinaria de reparo de DNA conta com enzimas como a DNA polimerase e a ligase, que preenchem as lacunas existentes entre os fragmentos e ligam as extremidades, gerando um plasmídeo de DNA circular (XIA *et al*., 2019).

Figura 3 - Esquema representando a ação da T5 exonuclease na reação TEDA

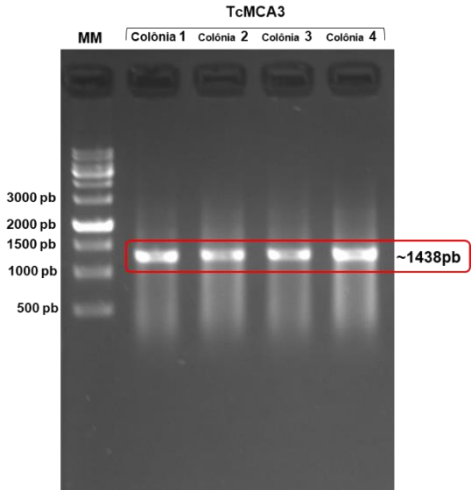


Fonte: Xia *et al*. (2019, p. 2 – com adaptação) Esquema representando a ação da T5 exonuclease na reação TEDA. O semicírculo azul representa a exonuclease T5. O retângulo duplo com uma lacuna representa um plasmídeo linearizado. As linhas verticais duplas representam o DNA inserido (inserto). As linhas com a mesma cor indicam a região homóloga. **Etapa 1**: a exonuclease T5 corta as extremidades 5' do plasmídeo linearizado e do inserto para gerar as extremidades complementares. **Etapa 2:** Os fragmentos se anelam por complementariedade. **Etapa 3:** O DNA é transformado em células E. coli DH5α e as lacunas são reparadas in vivo.

No entanto, como toda técnica, o protocolo TEDA apresenta alguns pontos que carecem de atenção especial. A necessidade de extremidades homólogas e a otimização das condições de reação são fatores que podem influenciar a eficiência da clonagem. Além disso, a possibilidade de recombinação não específica pode gerar produtos indesejados (XIA *et al*., 2019).

Neste trabalho específico, a confirmação da presença do plasmídeo contendo o gene da TcMCA-Ic em células de *E. coli* DH5α transformadas, ocorreu através da triagem de colônias por PCR. A triagem das colônias resultou na imagem da eletroforese em gel de agarose (1%) que apresenta uma banda principal na região esperada (1000-1500 pb). Esse resultado é consistente com a presença do gene da TcMCA-Ic (1077 pb) e a amplificação da região T7 (361 pb) (Figura 4), confirmando a presença do gene clonado no vetor pET28(a)+.

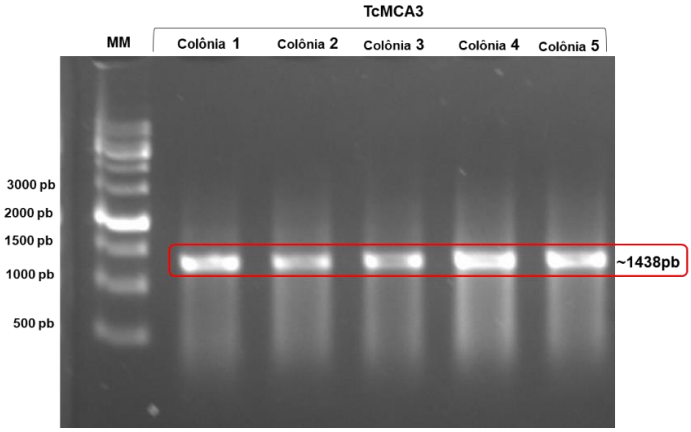
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação dos plasmídeos obtidos em colônias de *E. coli* DH5α.



Colunas: (MM) marcador molecular 1kb *ladder;* PCR de colônia TcMCA-Ic em *E. coli* DH5α.

A partir do DNA plasmidial extraído de células de *E. coli* DH5α transformadas, realizou-se a transformação de células competentes de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. A análise por eletroforese em gel de agarose do produto dessa PCR das colônias transformadas, revelou uma banda de DNA com o tamanho esperado (~1438 pb) (Figura 5), corroborando a inserção bem-sucedida do inserto no plasmídeo.

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose a 1% do produto da amplificação dos plasmídeos obtidos em colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

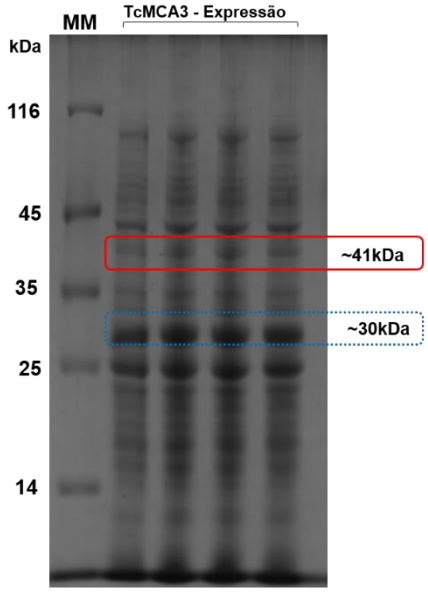


Colunas: (MM) marcador molecular 1kb *ladder;* PCR de colônia TcMCA-Ic em *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

A cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS foi selecionada para a expressão da proteína recombinante TcMCA-Ic devido à sua comprovada eficiência nesse processo. Essa cepa, amplamente utilizada em estudos de expressão heteróloga, possui características que otimizam a produção de proteínas, tais como a presença da T7 RNA polimerase, que garante alta taxa de transcrição e a coexpressão de lisozima, que inibe a atividade basal da polimerase, evitando a formação de proteínas tóxicas. Além disso, a deleção dos genes lon e ompT aumenta a estabilidade da proteína alvo ao reduzir a proteólise intracelular (STUDIER ; MOFFATT, 1986; GOPAL ; KUMAR, 2013).

As colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas com o plasmídeo expressando a TcMCA-Ic foram cultivadas em meio LB e induzidas com 0,25 mM de isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG). A análise por SDS-PAGE das células induzidas revelou uma banda proteica com massa molecular estimada em ~41 kDa, correspondente ao tamanho esperado para a TcMCA-Ic recombinante (Figura 6). A presença dessa banda indica que a proteína foi expressa em sua forma solúvel. No entanto, a detecção de bandas de menor peso molecular sugere a possibilidade de autoprocessamento proteolítico da proteína.

Figura 6 - SDS-PAGE da análise do ensaio de expressão da proteína TcMCA-Ic recombinante.

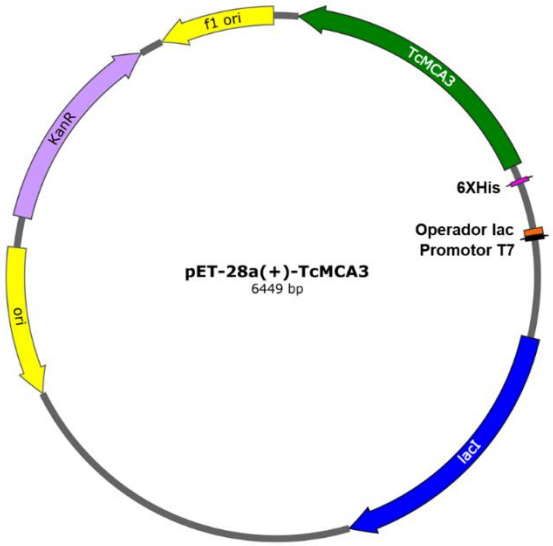


Colunas: (MM) Marcador molecular *Unstained Protein Marker;* TcMCA-Ic expressa. Retângulo com linha continua em vermelho destaca as bandas referentes a isoforma não processada. Retângulo em azul com linha pontilhada, destaca a isoforma processada.

O sucesso da expressão heteróloga desta proteína deve-se em grande parte à escolha do IPTG como indutor. Essa escolha foi fundamentada na estrutura do vetor de expressão pET28(a)+, que contém o operador -lac. O IPTG, um análogo a lactose não degradável pela bactéria, atua como um indutor eficiente, permitindo a transcrição do gene de interesse. A adição do IPTG a uma concentração final de 0,25 mM e a incubação a 20°C por 18 horas proporcionaram condições ótimas para a expressão da proteína.

A Figura 7 ilustra a estrutura do vetor de expressão pET28(a)+, que possui elementos cruciais para a expressão heteróloga de proteínas. Dentre eles, destaca-se o gene de resistência à Canamicina, utilizado para seleção de clones recombinantes e o operador lac, que regula a expressão do gene de interesse sob o controle do promotor T7. A presença de uma região codificadora da sequência de seis histidinas (6xHis) em seu N-terminal facilita a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em níquel. É importante ressaltar que a fusão da proteína alvo com a cauda de histidina resulta em um aumento de sua massa molecular, porém, em geral, não compromete sua estrutura e função (GOPAL; KUMAR, 2013; JIA; JEON, 2016; SHILLING *et al*., 2020).

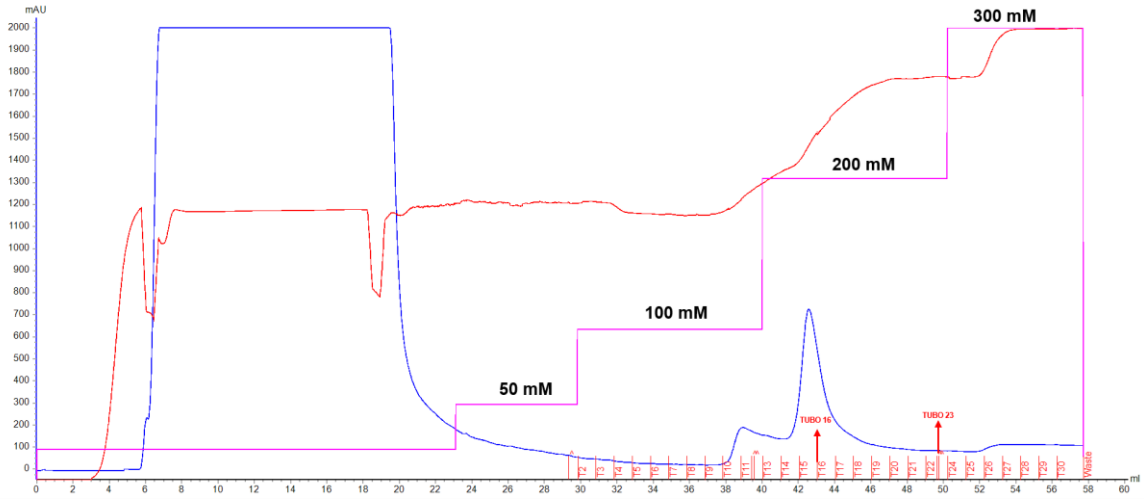
Figura 7 – Mapa do plasmídeo, pET28(a)+, com a inserção do gene da TcMCA-Ic



Mapa do plasmídeo, pET28(a)+ demonstrando KanR (lavanda): Resistência à canamicina; ori, f1 ori (amarelo): Origem de replicação; LacI (azul): Repressor Lac (controla expressão); operador lac (laranja): Liga o repressor Lac; promotor T7(preto): Inicia a transcrição; 6xHis(rosa): Tag para purificação e gene codificador da TcMCA (verde).

A purificação da proteína foi realizada por cromatografia de afinidade em níquel, explorando a presença da cauda de Histidina (6xHis) em sua extremidade N-terminal. A eluição foi otimizada utilizando um gradiente de imidazol, sendo a proteína de interesse eluida em uma concentração de 200 mM, conforme indicado pelo pico de absorbância a 280 nm no cromatograma (Figura 8). O aumento da absorbância a 280 nm nessa região reflete a eluição da proteína, devido à concentração de aminoácidos aromáticos presentes na maioria das proteínas, que apresentam alta absortividade nessa faixa de comprimento de onda (NELSON; COX; HOSKINS, 2022).

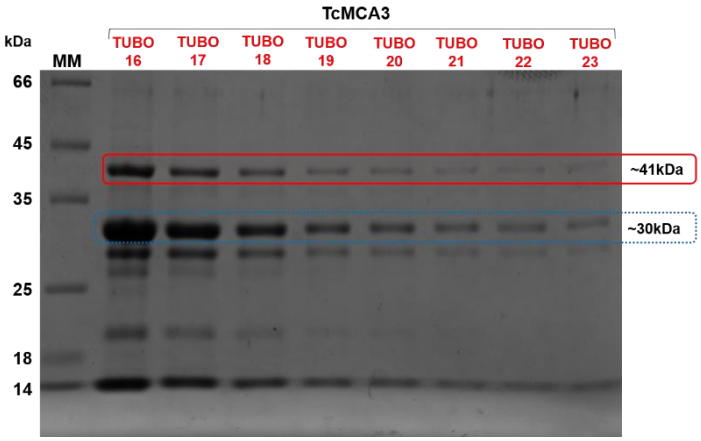
Figura 8 – Cromatograma de purificação da TcMCA-Ic em coluna de resina de afinidade Ni^{2+} - Sepharose.



No cromatograma, a linha vermelha indica a condutividade, enquanto a linha azul representa o perfil de purificação com a absorbância monitorada a 280 nm. A linha rosa delimita os limiares de concentração de imidazol, estabelecidos em 50 mM, 100 mM, 200 mM e 300 mM. As frações eluidas estão identificadas pelos números em vermelho, ilustrando a sequência de tubos coletados.

A análise por SDS-PAGE das frações eluídas, nos tubos 16 a 23, confirmou a eficácia da purificação, revelando uma banda proteica principal com massa molecular estimada em ~41 kDa, consistente com o peso molecular teórico da proteína associada à cauda de Histidina (6xHis) (Figura 9). A eluição e pureza da proteína indicam uma interação forte e específica entre a cauda de Histidina (6xHis) e a resina de níquel, evidenciando a eficácia da estratégia de purificação adotada.

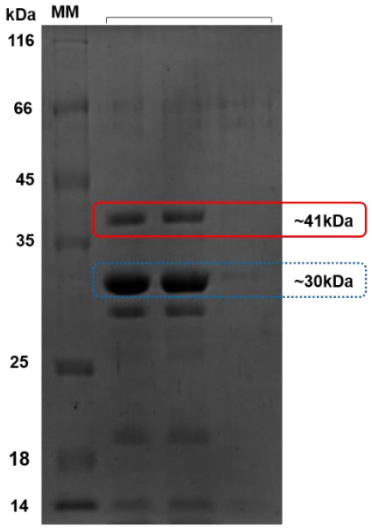
Figura 9 - SDS-PAGE da análise das frações eluídas no cromatograma de purificação da proteína TcMCA-Ic.



Colunas: (MM) marcador molecular *Unstained Protein Marker*. Número das linhas referentes aos tubos coletados na eluição de 200 mM de imidazol (16 a 23). Retângulo com linha continua em vermelho destaca as bandas referentes a isoforma não processada. Retângulo em azul com linha pontilhada, destaca a isoforma processada.

Em sucessão a purificação da proteína por cromatografia de afinidade, a cromatografia de exclusão molecular realizada em coluna HiTrap™ Desalting foi eficaz na remoção do imidazol. A análise por SDS-PAGE das frações coletadas após a dessalinização revelou uma banda proteica principal com massa molecular estimada em ~41 kDa (Figura 10), reafirmando e garantindo consistência aos resultados dos experimentos anteriores.

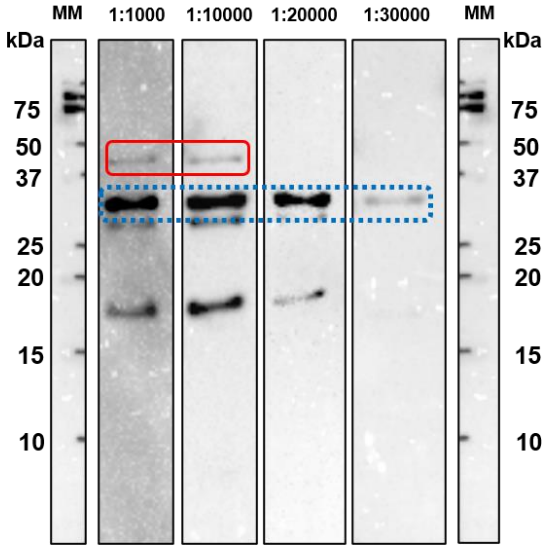
Figura 10 - SDS-PAGE da análise do ensaio de *dessalting* da proteína TcMCA-Ic.



Colunas: (MM) marcador molecular Unstained Protein Marker; Número das linhas que correspondem aos tubos coletados durante a eluição na cromatografia de exclusão molecular. Retângulo com linha continua em vermelho destaca as bandas referentes a isoforma não processada. Retângulo em azul com linha pontilhada, destaca a isoforma processada.

Para confirmar a identidade da proteína e investigar os fragmentos observados em SDS-PAGE, realizou-se um ensaio de w*estern blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-6xHis. Este anticorpo se liga especificamente à cauda de Histidina (6xHis) presente no N-terminal da proteína, permitindo a detecção específica da TcMCA-Ic e seus fragmentos.

Figura 11 - Western blotting da proteína TcMCA-Ic, a partir da incubação com diferentes concentrações de anticorpo.



Colunas: (MM) marcador molecular *Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope*^{TM}; TcMCA-Ic em membrana de ensaio *Western Blotting* com anticorpo 1:1000 (1 µg/mL); 1:10000 (0,1 µg/mL); 1:20000 (0,05 µg/mL) e 1:30000 (0,033 µg/mL). Retângulo com linha continua em vermelho destaca as bandas referentes a isoforma não processada. Retângulo em azul com linha pontilhada, destaca a isoforma processada.

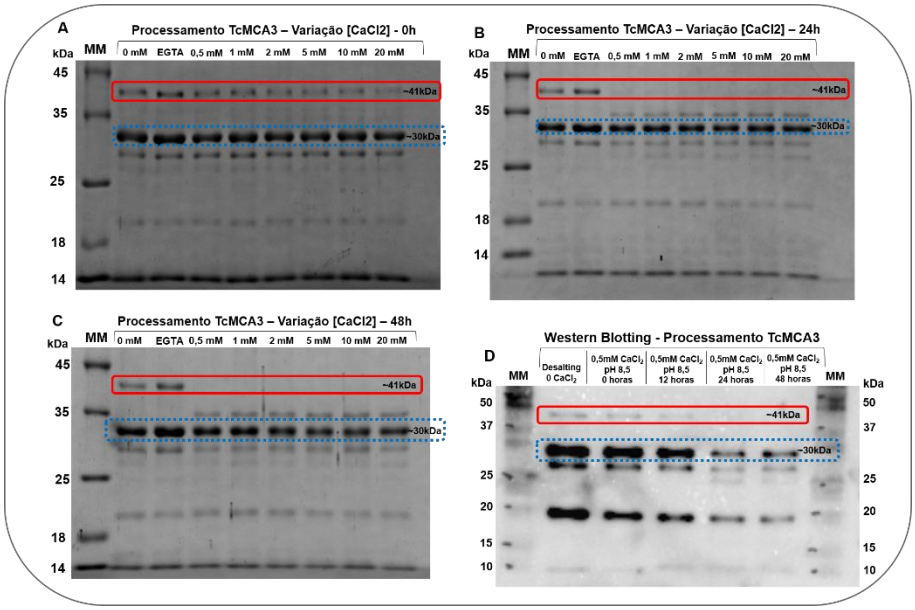
Os ensaios de *western blotting* revelados nas membranas da figura 11, evidenciaram a relevância dos ensaios sob diferentes concentrações de anticorpo, onde sob a diluição de 1:1.000 (1 µg/mL) e 1:10.000 (0,1 µg/mL) os fragmentos revelados se mostraram similares e capazes de entregar as mesmas informações. Diferente disso, as membranas reveladas após a incubação com anticorpo diluído a 1:20.000 (0,05 µg/mL) e 1:30.000 (0,033 µg/mL) implicaram na omissão da banda correspondente a proteína em sua forma íntegra (~41 kDa).

A análise de resultados com base na ausência desse fragmento levaria a uma equívoca interpretação. Entretanto, estudos adicionais a partir dos ensaios incubando em anticorpo mais concentrado, foram capazes de evidenciar porções menos

concentradas da proteína, como a isoforma íntegra que revela a presença do N-terminal e indica processamentos decorrentes da clivagem do C-terminal desta proteína, seguindo o padrão já evidenciado para metacaspase-1 de *Saccharomyces cerevisiae* (YCA1) (DALZOTO *et al*., 2023).

A fim de investigar o perfil de autoprocessamento proteolítico e a influência do íon cálcio nesse processo, foi empregado um experimento onde a enzima esteve sob a presença de diferentes concentrações de $CaCl_2$ e com EGTA, como um controle negativo. Além disso, o perfil de autoprocessamento proteolítico foi confirmado por *western blotting* (Figura 12).

Figura 12 - SDS-PAGE do ensaio para avaliar perfil de processamento autoproteolítico da TcMCA-Ic



(A, B e C): Colunas: (MM) marcador molecular Unstained Protein Marker; TcMCA-Ic coletada nos períodos 0; 24 e 48 horas de incubação, sob a influência de 0mM - 20mM de CaCl2. (D): Membrana de ensaio *Western Blotting* contendo colunas:(MM) marcador molecular *Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope*™; TcMCA-Ic sob a influência de 0,5 mM de CaCl2, pH 8,5 e 0 | 12 | 24 | 48 horas de incubação. Retângulos com linha continua em vermelho destacam as bandas referentes a isoforma não processada. Retângulos em azul com linha pontilhada, destacam a isoforma processada.

No tempo zero e sem influência de cálcio externo, a TcMCA-Ic se apresenta em sua forma íntegra (~41 kDa) e processada (~30 kDa), indicando que sofre um primeiro evento de autoprocessamento rápido. Contudo, após 24 e 48 horas de incubação com cálcio, a isoforma íntegra desapareceu e fragmentos de menor peso molecular surgiram, indicando um segundo evento de autoprocessamento proteolítico,

sendo esse lento e induzido por cálcio externo. Os eventos de clivagem observados carecem de mais estudos, capazes de permitir inferir se a incubação prolongada pode culminar na autodigestão não específica, assim como já observado para TbMCA2 (GILIO *et al*., 2017), ou se todos os fragmentos gerados são funcionais.

Um estudo sobre a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* (TbMCA2) mostrou que essa enzima também sofre autoprocessamento proteolítico, especialmente na presença de cálcio, com clivagens específicas nos resíduos Lys^{55} e Lys^{268}. Esses eventos de clivagem são cruciais para a atividade da enzima, aumentando sua especificidade para substratos (GILIO *et al*., 2017). Similarmente, a TcMCA-Ic parece seguir um padrão em que o cálcio regula sua ativação por meio de autoproteólise, embora os locais exatos de clivagem e os mecanismos implícitos possam diferir entre os organismos.

Curiosamente, estudos anteriores de Laverrière; Cazzulo; Alvarez (2012), não foram capazes de detectar nenhum processamento autoproteolítico por análise de *western blotting* de extratos de células bacterianas, em amostras de TcMCA-Ic recombinantes purificadas ou mesmo nas misturas de reação após os ensaios de atividade, não descartando, entretanto, a possibilidade de processamento sob alguma condição específica, ou processamento de uma fração menor das proteínas, não detectável por *western blotting*.

Essa discrepância pode ser atribuída a variações nas condições experimentais, como a concentração de cálcio, o tempo de incubação e a sensibilidade dos métodos de detecção, especialmente a concentração do anticorpo utilizado no *western blotting*. Esses fatores são críticos para detectar o autoprocessamento proteolítico, sugerindo que as condições específicas empregadas em nossos experimentos permitiram a observação de clivagens que não foram detectadas anteriormente.

Por outro lado, um estudo de De Castro *et al*. (2017) mostrou que a produção da TcMCA-Ic recombinante resultou em duas isoformas estáveis, indicativas de autoprocessamento in vitro e sugerindo clivagem específica apesar da degradação da proteína. De modo complementar, nossos achados demonstram que a TcMCA-Ic sofre um primeiro evento de autoprocessamento rápido sem adição de cálcio externo e um segundo evento lento, induzido por cálcio adicionado.

Esses eventos observados indicam que as estrutura da TcMCA-Ic, em função dos múltiplos processamentos, pode estar sofrendo mais de uma clivagem em sua

região C-terminal, gerando diferentes isoformas da proteína que podem ter funções distintas. Essa capacidade de gerar múltiplos fragmentos proteolíticos, pode ser crucial para a função da TcMCA-Ic em diferentes contextos celulares, incluindo a regulação do ciclo celular, a resposta ao estresse e a diferenciação celular. A atividade da TcMCA-Ic em fases específicas do ciclo celular, como a transição G1/S, e sua capacidade de proteger as células de apoptose durante essa fase, indicam que seu autoprocessamento pode ser um mecanismo regulatório essencial, diretamente influenciado pela concentração de cálcio no meio (LAVERRIÈRE; CAZZULO; ALVAREZ, 2012).

A elucidação do perfil de autoprocessamento da TcMCA-Ic, com ênfase no papel do cálcio, é crucial para desvendar os mecanismos de ativação e regulação dessa enzima. A obtenção da TcMCA-Ic em sua forma ativa, sob condições fisiológicas relevantes, permitirá uma caracterização bioquímica, visando definir as condições ótimas para sua atividade enzimática e explorar sua especificidade de substrato. Analogamente aos estudos com TbMCA2, que revelaram preferência por resíduos básicos na posição P_1 e polares nas posições P_2 e P_3, a utilização de uma série de peptídeos de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) permitirá mapear o sítio ativo da TcMCA-Ic e identificar seus substratos preferenciais (MACHADO *et al*., 2013). A compreensão detalhada do mecanismo de auto processamento e da especificidade de substrato da TcMCA-Ic é fundamental para o desenvolvimento de inibidores específicos, abrindo novas perspectivas para o tratamento da doença de Chagas.

4 Conclusão

A estratégia de clonagem TEDA, empregando a exonuclease T5 para a hibridização de fragmentos de DNA, mostrou-se eficaz na construção do plasmídeo de expressão. A proteína recombinante foi expressa em *E. coli* BL21(DE3)pLysS e purificada com sucesso por cromatografia de afinidade e exclusão molecular. A análise por SDS-PAGE revelou uma banda de aproximadamente 41 kDa, corroborando com o tamanho previsto. A identificação da proteína por *western blotting* confirmou a integridade do N-terminal, sugerindo que os eventos de processamento ocorrem na região C-terminal. Análises adicionais indicaram a presença de múltiplas isoformas da proteína, evidenciando a ocorrência de um primeiro evento de autoprocessamento rápido sem adição de cálcio externo e um segundo evento lento, influenciado pela adição de íons cálcio.

Os resultados obtidos neste estudo ampliam nosso entendimento sobre o processamento e a regulação da TcMCA-Ic. A influência do cálcio no seu autoprocessamento proteolítico reforça a necessidade de uma regulação precisa dessa enzima, semelhante ao que ocorre com a TbMCA2 (GILIO *et al*., 2017) e metacaspases em *L. major* (ZALILA *et al*., 2011), para que desempenhem suas funções biológicas de maneira eficaz. Essas descobertas destacam a importância de considerar as condições experimentais ao estudar o processamento proteolítico das metacaspases e sugerem que futuras investigações devem se concentrar na caracterização bioquímica, visando definir as condições ótimas para sua atividade enzimática e explorar sua especificidade de substrato através de peptídeos de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET).

2 5. CAPÍTULO 2

Este capítulo visa caracterizar a TcMCA-Ic bioquimicamente, portanto foram investigadas as condições ótimas para sua atividade enzimática. Foram definidas condições ótimas de temperatura, pH, concentração de cálcio e sódio ideais para a atividade enzimática da TcMCA-Ic. Os resultados obtidos neste trabalho podem contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares implícitos no processo ativação e atividade da TcMCA-Ic, e futuramente, para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a doença de Chagas.

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA METACASPASE-3 DE *Trypanosoma cruzi*

[a] Duarte, A.C.M.; [a] Costa, J.P.M.S.; [a] Trujilho, M.N.R.; [a] Santos, T.R., [b]Marcondes, M.F. and [a,*]Machado, M.F.M.

[a] Centro Interdisciplinar de Investigações Bioquímicas da Universidade de Mogi das Cruzes, Avenida Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza, 200, 08780-991, Mogi das Cruzes, Brasil

[b] Departamento de Biofísica, Universidade Federal São Paulo, Rua Pedro de Toledo, 669, 7° andar, 04039-032, São Paulo, Brasil

***Autor correspondente**

Maurício Ferreira Marcondes Machado, Ph.D.

Mail address: mauriciomachado@umc.br

Centro Interdisciplinar de Investigações Bioquímicas

Universidade de Mogi das Cruzes

Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza, 200 - 08780-991 - Mogi das Cruzes, Brasil.

Resumo

A doença de Chagas, provocada pelo *Trypanosoma cruzi*, é um importante desafio de saúde pública na América Latina. As metacaspases do parasita, particularmente TcMCA-3, desempenham papéis cruciais na regulação da morte celular programada e na diferenciação celular. O estudo investigou as condições ideais de temperatura, pH, e concentração de cálcio e sódio para a atividade da TcMCA-3, revelando que a enzima apresenta maior estabilidade a 25°C e um pH ótimo de 8,5. A atividade enzimática é altamente dependente da concentração de cálcio, que, em níveis adequados, ativa a enzima, mas em excesso pode levar à auto degradação. A influência de sódio também foi observada, com concentrações moderadas melhorando a eficiência catalítica. Os dados de fluorescência intrínseca sugerem que a ligação de cálcio induz mudanças conformacionais significativas, essenciais para a regulação da atividade enzimática. Futuras pesquisas focarão na especificidade de substrato da TcMCA-3.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, representa um significativo desafio para a saúde pública, especialmente na América Latina. O ciclo de vida complexo do parasita, que envolve hospedeiros vertebrados e insetos vetores triatomíneos, contribui para a persistência da infecção e o desenvolvimento de manifestações clínicas crônicas. (DIAS *et al*., 2016a). A compreensão dos mecanismos moleculares por trás da patogênese da doença de Chagas é fundamental para o desenvolvimento de terapias eficazes e estratégias de controle. Entre os componentes moleculares do parasita que têm atraído atenção estão as metacaspases, um grupo de peptidases que compartilham algumas características com as caspases, mas também apresentam diferenças importantes em termos de especificidade e mecanismos de ativação (VERCAMMEN *et al*., 2007; RAWLINGS *et al*., 2018).

No contexto do parasita *Trypanosoma cruzi*, que causa a doença de Chagas, dois genes de metacaspase, denominados TcMCA-3 e TcMCA-5, foram identificados e estão associados a diversas funções biológicas. O genoma haploide de *T. cruzi* abriga cerca de 16 cópias do gene TcMCA-3, o que sugere uma amplificação

significativa que pode refletir a importância funcional desta metacaspase. Evidências indicam que as metacaspases estão implicadas na morte celular programada (PCD), (PROTO *et al.* 2011), além de desempenharem um papel crítico na progressão do ciclo celular. A metacaspase-3, em particular, demonstra relevância na proteção dos epimastigotas contra a morte celular natural e na diferenciação para a forma infectante de tripomastigotas metacíclicos. Além disso, a regulação adequada da atividade de TcMCA-3 é essencial para a conclusão do ciclo celular dentro do hospedeiro mamífero. Assim, essa metacaspase não apenas facilita a adaptação do parasita ao ambiente intracelular, mas também contribui para sua evasão da resposta imune do hospedeiro, ressaltando sua importância na biologia de *T. cruzi* (LAVERRIÈRE *et al*., 2012).

Estudos presentes no primeiro capítulo desse material, evidenciam sucesso na obtenção da metacaspase-3 de *T. cruzi* e na demonstração da influência do cálcio no autoprocessamento proteolítico da TcMCA-Ic. Em sequência a esses resultados, apresenta-se esse segundo capítulo, concentrado em demonstrar as condições ótimas de temperatura, pH, concentração de cálcio e sódio ideais para a atividade enzimática da TcMCA-Ic.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Determinação da Concentração de Proteína

A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford, utilizando o corante *Coomassie Brilliant Blue* G-250. Para a quantificação, foi realizada uma curva padrão em microplaca de 96 poços, empregando concentrações conhecidas e crescentes de albumina bovina sérica (BSA). Após a construção da curva, a amostra de TcMCA-Ic, cuja concentração era desconhecida, foi submetida a diluições seriadas, realizadas em triplicata. Em seguida, adicionou-se o reagente de Bradford, composto por *Coomassie Brilliant Blue* G-250, etanol a 95% e ácido fosfórico a 85%. A amostra foi incubada por 5 minutos, e a absorbância foi medida a 595 nm utilizando um fotômetro *Multiskan FC Microplate* (Thermo Fisher Scientific). As concentrações

de proteína das amostras, previamente diluídas em tampão Tris 20 mM, pH 8,5, foram determinadas pela comparação com a curva padrão.

2.2 Ensaios Cinéticos

A atividade catalítica da TcMCA-Ic foi avaliada por meio da hidrólise do substrato de referência Abz-KARSSAQ-EDDnp, monitorada por espectrofluorimetria. As medições foram realizadas utilizando um espectrofluorofotômetro SHIMADZU RF-6000, com excitação a 320 nm e emissão a 420 nm.

Uma cubeta com caminho óptico de 1 cm contendo solução (20 mM de Tris-HCl (pH 8,5), 25 mM de NaCl e 0,5 mM de $CaCl_2$) e substrato, foi colocada em um compartimento termostatizado por 5 minutos antes da adição da solução enzimática. A enzima TcMCA-Ic foi previamente incubada com 5 mM de DTT e os ensaios cinéticos realizados a 25 °C, salvo indicação contrária. O progresso da reação foi monitorado continuamente pela fluorescência dos produtos liberados, e a taxa de aumento da fluorescência foi convertida em moles de substrato hidrolisado por segundo, com base em curvas de calibração obtidas a partir de soluções padrão de peptídeo antes e após a hidrólise total mediada pela enzima.

Para a determinação da taxa inicial de reação, a concentração de enzima foi ajustada para hidrolisar menos de 10% do substrato disponível. As concentrações de TcMCA-Ic variaram entre 1 nM e 100 nM, enquanto as concentrações de substrato foram ajustadas para abranger uma faixa de 0,1 × KM a 10 × KM. O efeito do filtro interno foi corrigido com base em uma equação empírica previamente descrita por Araujo *et al.* (2000) e os parâmetros cinéticos (k_{cat}, K_M e k_{cat}/K_M) foram calculados segundo o método de Wilkinson (1961). Todos os dados obtidos foram ajustados a equações utilizando o programa Grafit5 (Erithacus).

2.3 Efeito da Temperatura

A atividade da TcMCA-Ic foi testada em temperaturas de 20°C a 40°C, com a enzima incubada com DTT (5 mM), $CaCl_2$ (0,5 mM), NaCl (25 mM), substrato (5 µM) e solução tampão (Tris 20Mm pH 8,5). A atividade residual foi monitorada em intervalos de tempo regulares (0, 5, 10, 15 e 20 minutos) para avaliar a estabilidade

térmica da enzima e os dados obtidos foram analisados por regressão não linear usando o programa Grafit5 (Erithacus) e a equação 1.

Equação 1 – "IC50 - Fully Range Corrected"

$$y = \frac{100\%}{1+\left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^{s}}$$

Os dados foram ajustados a uma equação de dois parâmetros, na qual o limite é definido entre 0 e 100 e o valor de **y** diminui à medida que **x** aumenta.

2.4 Determinação do pH Ótimo

O pH ótimo foi determinado variando entre 5 e 10, usando um tampão com componentes de força iônica constante (MES 25 mM, TRIS 75 mM, ácido acético 25 mM e glicina 25 mM) a 25°C. A atividade enzimática foi monitorada em tempo real com adição de substrato para construir perfis de pH. A análise dos dados foi realizada por regressão não linear usando o programa Grafit5 (Erithacus) e a equação 2.

Equação 2: "pKa, Double Bell"

$$k=k\,(Limit)\left[1/1+10^{(pK_1-pH)}+10^{(pH-pK_2)}\right]$$

A equação ajusta os dados cuja variação observada depende da ionização de dois grupos funcionais, resultando em uma curva com perfil em forma de sino, considerando que a atividade enzimática é baixa ou nula em condições de pH extremos, tanto em valores baixos quanto elevados. k (Limite) representa a constante de taxa máxima independente do pH. Os parâmetros K_1 e K_2 correspondem, respectivamente, às constantes de dissociação de uma base e de um ácido cataliticamente ativos. Por fim, k é definido como a razão entre k_{cat} e K_M.

2.5 Efeito da Concentração de cálcio na atividade da TcMCA-Ic

A influência do $CaCl_2$ foi avaliada variando sua concentração de 0,1 mM a 10 mM a 25°C, com DTT (5 mM). Os parâmetros cinéticos (k_{cat}, K_M e k_{cat}/K_M) foram calculados segundo o método de Wilkinson (1961) e o ajuste de dados feito através do programa Grafit5 (Erithacus).

2.6 Efeito da Concentração de NaCl na atividade da TcMCA-Ic

A concentração de NaCl foi variada de 5 mM a 200 mM, mantendo a temperatura a 25°C, com DTT (5 mM) e $CaCl_2$ (0,5 mM) constantes. k_{cat}, K_M e k_{cat}/K_M foram calculados através do método de Wilkinson (1961) e os dados foram ajustados no programa Grafit5 (Erithacus).

2.7 Efeito da Concentração de $CaCl_2$ na fluorescência Intrínseca da TcMCA-Ic

A fluorescência intrínseca da TcMCA-Ic foi analisada em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, com 25 mM NaCl, a 22,7 µM de concentração de proteína e $CaCl_2$ variando de 0,1 µM a 10 mM. Os espectros de emissão foram obtidos de 300 a 500 nm com excitação a 280 nm. Os dados foram analisados usando.

As alterações estruturais na TcMCA-Ic foram investigadas por meio da monitoração da fluorescência intrínseca. A proteína foi incubada com diferentes concentrações de $CaCl_2$ (0,1 µM a 10 mM). Os espectros de emissão foram coletados na faixa de 300 a 500 nm, a 25 °C, utilizando um comprimento de onda de excitação fixo de 280 nm (com largura de fenda de 5 nm tanto para excitação quanto para emissão). Os dados obtidos foram analisados utilizando a equação "*Ligand Binding* – 1 site" que descreve a ligação a um sítio.

Equação 3 - "Ligand Binding – 1 site"

$$y = \frac{[L].Cap}{K_d + [L]}$$

Nesta equação, y representa a quantidade de ligante ligado ao receptor, expressa como radioatividade, absorbância, fluorescência ou outra medida proporcional. A capacidade de ligação máxima (Cap) corresponde à quantidade máxima de ligante que pode se ligar ao receptor, expressa nas mesmas unidades de y. A constante de dissociação (K_D) representa a afinidade do ligante pelo receptor, indicando a concentração de ligante livre na qual metade dos receptores está ocupada. A concentração do ligante livre [L] é a concentração de ligante não ligado ao receptor e corresponde ao eixo x do gráfico.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

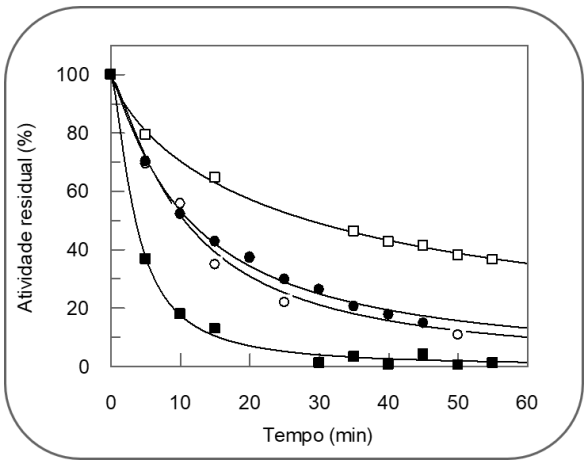
3.1 Determinação da Concentração de Proteína

A quantificação de proteínas nas amostras foi realizada pelo método de Bradford, um ensaio colorimétrico amplamente utilizado e validado (Bradford, 1976). A curva padrão, construída utilizando diferentes concentrações conhecidas de albumina bovina sérica (BSA), apresentou uma relação linear entre a absorbância a 595 nm e a concentração de proteína, conforme esperado. A equação da reta obtida (y = 0,0034x) permitiu a determinação precisa da concentração de 22,7 μM de proteína nas amostras anteriormente desconhecidas.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os achados de Bradford (BRADFORD, 1976), que demonstrou a alta sensibilidade e reprodutibilidade do método. A baixa interferência de componentes não proteicos, como sais e detergentes em baixas concentrações, reforça a confiabilidade dos resultados. A linearidade da curva padrão indica que o método obedece a lei de Lambert-Beer dentro da faixa de concentração analisada, permitindo a quantificação precisa de proteínas (BRADFORD, 1976; DAVIES, 1988).

Após a quantificação das proteínas, foi possível prosseguir com a investigação dos parâmetros cinéticos da TcMCA-Ic. Os ensaios cinéticos realizados neste estudo visaram explorar como diferentes fatores influenciam a atividade catalítica da enzima, para tanto, o primeiro fator avaliado foi o efeito da temperatura.

Figura 1 – Estabilidade térmica da TcMCA



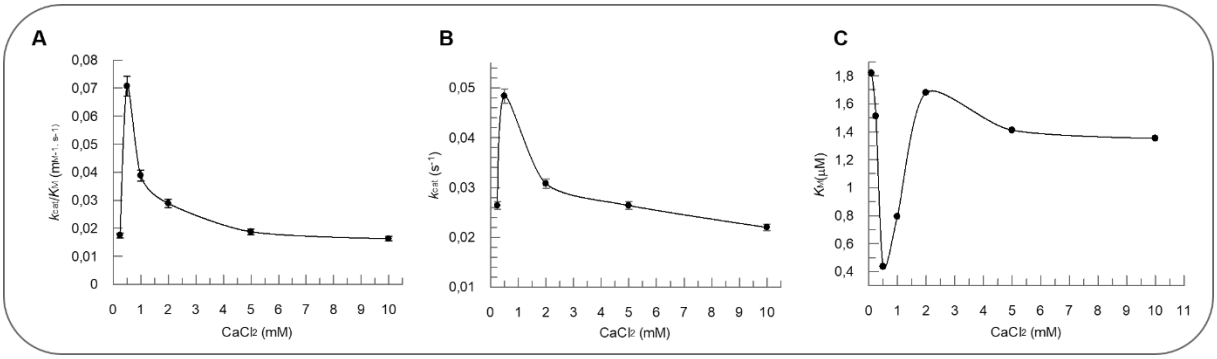
A figura apresenta a variação da atividade enzimática da TcMCA-Ic em função do tempo de incubação a diferentes temperaturas (□ 25°C, ● 30°C, ○ 35°C e ■ 40°C). A atividade enzimática foi determinada em um período de 60 minutos, com intervalos de 5 minutos.

A avaliação da estabilidade térmica da enzima TcMCA-Ic revelou uma correlação direta entre a temperatura e a taxa de desnaturação. Os resultados demonstram que a atividade enzimática decresce com o aumento da temperatura e o prolongamento do tempo de incubação, indicando uma clara termossensibilidade da proteína. A 25°C, observou-se a maior estabilidade enzimática, sugerindo que essa temperatura se aproxima da condição ótima para a manutenção da conformação nativa e da atividade catalítica da TcMCA-Ic. No entanto, temperaturas superiores a 30°C aceleraram o processo de desnaturação, culminando em uma quase completa perda de atividade a 40°C.

A termo sensibilidade observada para TcMCA-Ic indica uma adaptação funcional da enzima ao ambiente fisiológico específico do parasita *Trypanosoma cruzi*, onde variações térmicas podem modular sua atividade. Esse comportamento reflete o impacto direto da desnaturação proteica, uma característica na qual o calor desestabiliza as interações fracas responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional da proteína, alterando sua conformação e levando à perda de função (PRIVALOV, 1997).

3.2 Avaliação do efeito da concentração de $CaCl_2$ sobre a atividade da TcMCA-Ic

Figura 2 - Efeito da concentração de cálcio ($CaCl_2$) na atividade catalítica da TcMCA-Ic



A atividade da TcMCA-Ic foi avaliada em diferentes concentrações de $CaCl_2$. Os parâmetros cinéticos k_{cat}/K_M (A), k_{cat} (B) e K_M (C) foram determinados para avaliar a eficiência catalítica, a velocidade máxima da reação e a afinidade da enzima pelo substrato, respectivamente.

A influência da concentração de cálcio na atividade enzimática da TcMCA-Ic foi avaliada por meio de experimentos cinéticos que permitiram a análise dos parâmetros k_{cat}/K_M, k_{cat} e K_M. Esses parâmetros refletem, respectivamente, a eficiência catalítica, a velocidade da reação (quantidade de moléculas de substrato convertidas em produto por molécula de enzima por unidade de tempo) e a afinidade da enzima pelo substrato. A elevação inicial observada tanto para eficiência catalítica (Figura 2 – A), quanto para velocidade da reação k_{cat} (Figura 2 - B) podem ser explicadas pela ativação da TcMCA-Ic por cálcio. Contudo, à medida em que a concentração de cálcio aumenta além de 1 mM, a eficiência catalítica reduz.

A Figura 2 – C, inicialmente exibe um aumento em K_M, seguido por uma diminuição, e finalmente um novo aumento em concentrações mais altas de cálcio. O aumento inicial indica que, em concentrações abaixo de 0,5 mM $CaCl_2$, a afinidade da TcMCA-Ic pelo substrato é reduzida, possivelmente devido a ajustes conformacionais no sítio ativo. No entanto, à medida em que a concentração de $CaCl_2$ atinge 0,5 mM, o K_M diminui, sugerindo uma recuperação da afinidade enzimática em função da interação do cálcio com resíduos específicos no sítio ativo, promovendo um estado conformacional ideal, facilitando o reconhecimento e a ligação ao substrato.

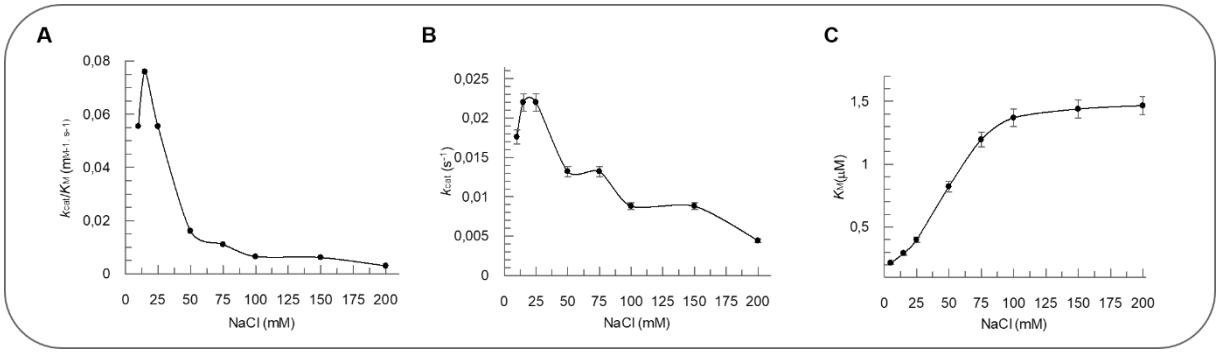
O aumento final observado no K_M em concentrações acima de 1 mM de $CaCl_2$ sugere que, embora o cálcio seja um cofator necessário para a atividade enzimática,

sua presença em níveis excessivos pode levar a um efeito adverso. Nossos resultados demonstram que, assim como ocorre para TbMCA2, a exposição a níveis elevados de cálcio pode levar à auto degradação da TcMCA-Ic, reduzindo sua eficiência catalítica e possivelmente impactando sua função biológica (GILIO *et al*., 2017).

O aumento gradual da atividade da TcMCA-Ic após a adição de cálcio, sugere que esse íon não apenas ativa a enzima, mas também promove uma mudança conformacional que pode ser crucial para o desempenho de sua atividade, diferente da metacaspase-5 de *T. cruzi* (TcMCA5). A TcMCA5 possui maior afinidade a íons metálicos e carrega o cálcio na bactéria, promovendo uma atividade linear a partir do tempo zero e possivelmente permitindo uma regulação mais eficiente e evitando a auto degradação. Esta variação na afinidade pode ser um mecanismo adaptativo que reflete a função diferenciada dessas metacaspases no equilíbrio entre proliferação, morte e diferenciação celular (LAVERRIÈRE; CAZZULO; ALVAREZ, 2012).

3.3 Avaliação do efeito da concentração de sódio sobre a atividade da TcMCA-Ic

Figura 3 - Efeito da concentração de sódio (NaCl) sobre a atividade catalítica da TcMCA-Ic



A influência da força iônica, variada pela concentração de NaCl, sobre a atividade da TcMCA-Ic foi investigada. Os parâmetros cinéticos kcat/KM (A), kcat (B) e KM (C) foram determinados para avaliar a eficiência catalítica, a velocidade máxima da reação e a afinidade da enzima pelo substrato, respectivamente.

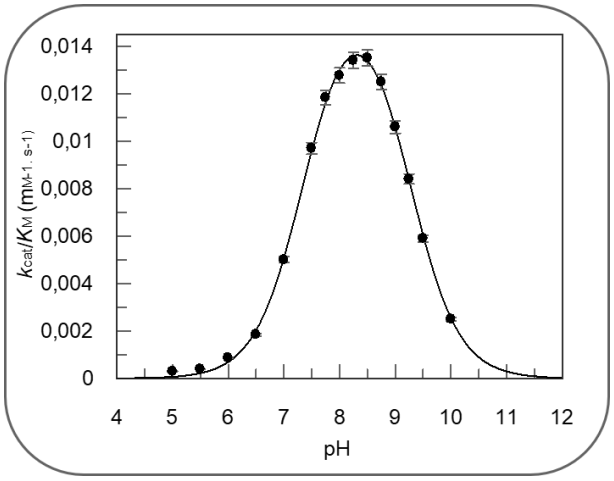
A influência da concentração de sódio na atividade enzimática da TcMCA-Ic foi avaliada com base nos parâmetros cinéticos k_{cat}/K_M, k_{cat} e K_M. Os parâmetros de eficiência catalítica (Figura 3 – A) e velocidade de reação (Figura 3 - B), apresentam um aumento inicial conforme a concentração de sódio se eleva, atingindo um pico entre 15 mM e 25mM de NaCl. Esse comportamento sugere que concentrações moderadas de sódio têm um papel estabilizador na estrutura da enzima, promovendo uma conformação mais eficiente, que otimize as interações intermoleculares

necessárias para a catálise. No entanto, a partir de 25 mM, ocorre uma diminuição na eficiência catalítica, indicando que altas concentrações de sódio podem prejudicar essas interações ao alterar a conformação da enzima ou os estados de ionização dos resíduos catalíticos, reduzindo progressivamente a eficiência da reação.

Os resultados indicam que 25 mM de NaCl representa uma concentração ideal para o trabalho com TcMCA-Ic. Nessa concentração, a eficiência (k_{cat}/K_M) e a velocidade catalítica (k_{cat}) mantêm-se em níveis adequados para otimizar a atividade enzimática sem que haja um comprometimento significativo da afinidade pelo substrato (K_M). Abaixo dessa concentração, o efeito estabilizador do íon parece insuficiente para otimizar a interação entre enzima e substrato. Por outro lado, concentrações mais elevadas que 25 mM, como mostrado no decréscimo progressivo dos parâmetros cinéticos, indicam uma possível saturação da estrutura proteica, afetando sua capacidade catalítica.

3.4 Determinação do pH Ótimo

Figura 4 - Determinação do pH Ótimo para a TcMCA-Ic



A TcMCA-Ic exibe atividade máxima na hidrólise de Abz-KARSSAQ-EDDnp em pH 8,5. A análise do perfil de pH sugere a participação de dois resíduos ionizáveis com pK1 = 7,35 e pK2 = 9,25 na catálise

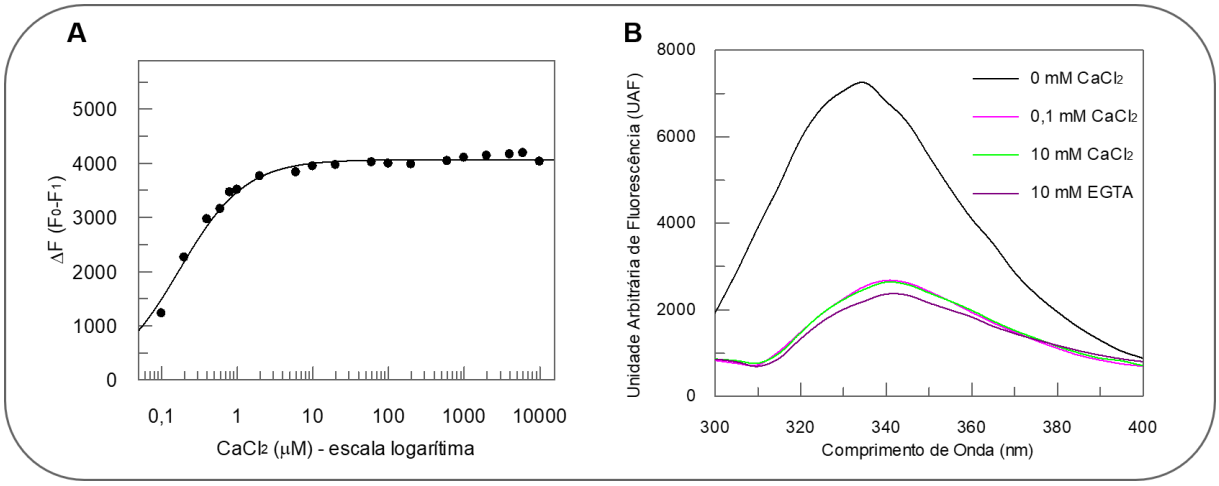
A TcMCA-Ic apresenta um pH ótimo para atividade em torno de 8,5, evidenciando sua preferência por ambientes levemente alcalinos. A análise do perfil de pH indica a participação de dois resíduos ionizáveis com pK_1 em 7,35 e pK_2 em 9,25, que são fundamentais para o mecanismo de catálise.

Estudos anteriores demonstraram que o comportamento das metacaspases, pode ser influenciado por alterações na conformação e ionização dos resíduos de aminoácidos no sítio ativo. O processamento enzimático pode alterar significativamente a acessibilidade do sítio ativo ao substrato, influenciando a eficiência da catálise (GILIO *et al*., 2017). Deste modo a estrutura tridimensional da TcMCA-Ic pode estar sendo afetada pela ionização dos resíduos próximos ao sítio ativo, o que, por sua vez, pode regular a ligação do substrato e consequentemente a catálise.

A influência do pH na atividade da TcMCA-Ic também é corroborada por dados que associam os valores de pK observados com a natureza dos resíduos catalíticos presentes. O pK_1 de 7,35 sugere que um resíduo com características catiônicas, como a histidina, desempenha um papel na ativação da enzima, enquanto o pK_2 de 9,25, pode estar relacionado a um resíduo ácido neutro, possivelmente uma cisteína (GILIO *et al*., 2017). Esta distinção é importante, pois a atividade catalítica é muitas vezes limitada por conformações que dependem do estado de protonação desses resíduos.

3.5 Avaliação do efeito do cálcio na fluorescência intrínseca da TcMCA-Ic

Figura 5 - Efeito do cálcio na fluorescência intrínseca da TcMCA-Ic.



(A) Variação da intensidade de fluorescência (342 nm) em função da concentração de $CaCl_2$ (log) (B) Perfil de fluorescência da TcMCA-Ic quando excitada em 280 nm.

O experimento realizado investigou o efeito da concentração de cálcio sobre a estrutura da TcMCA-Ic, utilizando a fluorescência intrínseca como uma ferramenta

para monitorar mudanças conformacionais. A fluorescência foi excitada em 280 nm, o que destaca principalmente a contribuição dos resíduos de triptofano e tirosina, que são sensíveis às alterações no ambiente local. A emissão foi monitorada em 342nm, um comprimento de onda associado à fluorescência desses resíduos, sendo o triptofano a principal fonte de fluorescência intrínseca em proteínas devido à sua alta eficiência quântica e ao seu elevado coeficiente de extinção molar (GHISAIDOOBE E CHUNG, 2014).

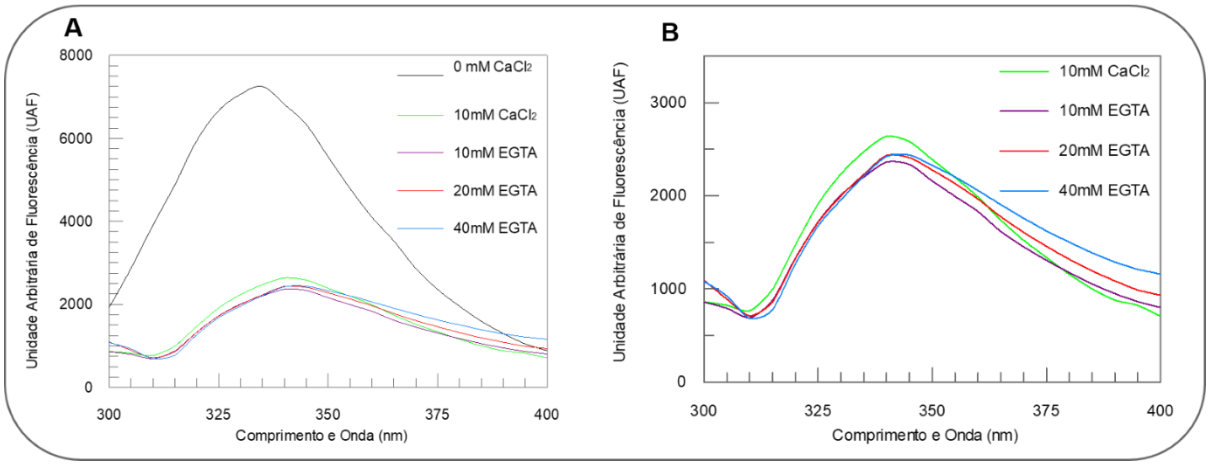
A análise dos dados por meio da equação "*Ligand Binding* – 1 site", que descreve a ligação a um único sítio, permitiu determinar o valor da constante de dissociação (K_D µM). Sendo o valor de K_D inversamente proporcional à afinidade da enzima ao cálcio, o valor obtido de K_D = 0,1725 ± 0,009 µM sugere alta afinidade entre o cálcio e a TcMCA-Ic.

O perfil de fluorescência (Figura 5 - B) mostra que, na ausência de cálcio, a proteína apresenta um pico de emissão, seguido por uma redução progressiva na intensidade da fluorescência. A supressão de fluorescência ocorre com a maior exposição do triptofano ao solvente, uma vez que sua emissão depende da proteção fornecida pela estrutura hidrofóbica da proteína. Sob a influência do cálcio, a proteína sofre mudanças conformacionais que expõem os resíduos fluorescentes, aumentando sua interação com o solvente e, assim, reduzindo a intensidade de emissão. (GROENEVELD *et al*. 2022).

A análise quantitativa baseada na constante de dissociação encontrada, indica que concentrações relativamente baixas de cálcio são suficientes para induzir mudanças conformacionais, potencialmente ligadas à função enzimática ou à regulação estrutural da proteína. Para TbMCA2, foram observados dois sítios de interação com o cálcio, um de alta afinidade, responsável pelo autoprocessamento proteolítico e outro de baixa afinidade, que modula a afinidade por substratos através de modificações alostéricas na estrutura da enzima (MACHADO *et al*., 2013).

Os resultados obtidos indicam que o cálcio tem um papel importante na modulação da estrutura da TcMCA-Ic, com mudanças conformacionais observáveis por fluorescência intrínseca a partir de concentrações de cálcio em torno de 0,1 mM. O efeito das concentrações de cálcio adicionadas não foi completamente revertido pela adição subsequente de 10, 20 e 40 mM do quelante de cálcio EGTA (Figura 6).

Figura 6 - Perfil de fluorescência da TcMCA-Ic quando excitada em 280 nm em comparação com a adição progressiva de EGTA.



(A) Perfil de fluorescência da TcMCA-Ic quando excitada em 280 nm (0 E 10 mM DE $CaCl_2$) em comparação com a adição progressiva de EGTA (10; 20 e 40 mM). **(B)** Perfil de fluorescência da TcMCA-Ic quando excitada em 280 nm (10 mM DE $CaCl_2$) em comparação com a adição progressiva de EGTA (10; 20 e 40 mM).

A adição de EGTA em concentrações progressivas em uma tentativa de reversão do efeito do cálcio sobre a estrutura da TcMCA-Ic, mostra que à medida em que a concentração de EGTA aumenta, há uma leve recuperação da fluorescência. No entanto, mesmo com 40 mM de EGTA, a recuperação total da fluorescência não ocorre, sugerindo que a remoção de cálcio é parcial e que as alterações conformacionais podem ser irreversíveis ou exigem condições mais drásticas para sua completa reversão.

Além disso, há um deslocamento do comprimento máximo de emissão de onda entre as diferentes condições de 0 mM $CaCl_2$, 10 mM $CaCl_2$ e o EGTA adicionado (Figura 6-A), confirmando que a fluorescência intrínseca reflete alterações conformacionais na estrutura da proteína que estão diretamente relacionadas à exposição e interação dos resíduos de triptofano ao ambiente hidrofílico do solvente em resposta a interações com íons metálicos, especificamente o cálcio (CAIRES, COSTA; FERNANDES, 2013), além de suportar a ideia de que a TcMCA-Ic utiliza o cálcio como um cofator essencial, e que as mudanças conformacionais associadas à sua ligação podem ser cruciais para a regulação de sua atividade biológica, regulação estrutural e funcional específica.

4 CONCLUSÃO

Neste capítulo, examinamos as características bioquímicas e cinéticas da metacaspase TcMCA-Ic, destacando a importância de fatores como temperatura, concentração de cálcio, força iônica e pH na sua atividade catalítica. A quantificação de proteínas através do método de Bradford revelou-se eficaz, permitindo determinação da concentração de enzima em condições experimentais controladas.

A estabilidade térmica da TcMCA-Ic mostrou-se otimizada a 25°C, onde a enzima manteve sua conformação e atividade catalítica. O aumento da temperatura acima desse ponto resultou em desnaturação, refletindo a sensibilidade da enzima às variações térmicas, característica crucial em seu ambiente fisiológico no parasita *Trypanosoma cruzi*.

Além disso, a influência da concentração de cálcio foi significativa, demonstrando que, enquanto níveis adequados desse íon promovem a atividade catalítica da TcMCA-Ic, concentrações excessivas podem resultar em auto degradação da enzima. Essa dualidade ressalta a necessidade de um equilíbrio na regulação da atividade enzimática, semelhante ao observado em metacaspases de outros organismos, como *Trypanosoma brucei.*

A análise do efeito do sódio mostrou que concentrações moderadas atuam como estabilizadores, maximizando a eficiência catalítica, enquanto altos níveis resultam em perda de atividade. O pH ótimo em torno de 8,5, aliado à participação de resíduos ionizáveis, sugere que a ionização local no sítio ativo é crucial para a eficácia da catálise.

Por fim, os dados obtidos por fluorescência intrínseca demonstraram que a ligação de íons cálcio a um sítio específico promove alterações conformacionais na TcMCA-Ic. O fato de que a recuperação da fluorescência após a adição de EGTA não foi total, sugere que as alterações conformacionais são irreversíveis.

Futuros estudos devem se concentrar na especificidade de substratos da TcMCA-Ic, utilizando uma série de peptídeos de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET). A compreensão aprofundada sobre a estrutura e função da TcMCA-Ic não apenas enriquece o conhecimento sobre as metacaspases de modo geral, mas também pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra as infecções causadas por *Trypanosoma cruzi*.

REFERÊNCIAS

AMBIT, A.; FASEL, N.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. An essential role for the Leishmania major metacaspase in cell cycle progression. **Cell Death ; Differentiation**, v. 15, n. 1, p. 113-122, 2008.

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

ARAÚJO, M. C.; MELO, R. L.; CESARI, M. H.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; CARMONA, A. K. Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. **Biochemistry**, v. 39, n. 26, p. 8519-8525, 2000.

ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. Classification of the Caspase–Hemoglobinase Fold: Detection of New Families and Implications for the Origin of the Eukaryotic Separins. **Proteins**, v. 46, n.4, p. 355-367, mar. 2002. DOI: 10.1002/prot.10060

ATKINSON, H. J.; BABBITT, P. C.; SAJID, M. The global cysteine peptidase landscape in parasites. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 12, p. 573-581, 2009.

BALAKIREVA, A. V.; ZAMYATNIN, A. A. Cutting out the gaps between proteases and programmed cell death. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 704, 2019.

BARCINSKI, M. A.; SCHECHTMAN, D.; QUINTÃO, L. G.; COSTA, D.; SOARES, L. R.; MOREIRA, M. E.; CHARLAB, R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the infectivity of Leishmania amazonensis by protecting promastigotes from heat-induced death. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 9, p. 3523-3527, 1992.

BARRETT, M. P. *et al*. The trypanosomiases. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, nov. 2003.

BELENGHI, B.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; VERCAMMEN, D.; BRACKENIER, A.; INZÉ, D.; DELLEDONNE, M.; VAN BREUSEGEM, F. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 1352-1358, 2007.

BELL, R. A. V.; MEGENEY, L. A. Evolution of caspase-mediated cell death and differentiation: twins separated at birth. **Cell Death ; Differentiation**, v. 24, n. 8, p. 1359-1368, 2017.

BONNEY, K. M. *et al*. Pathology and pathogenesis of Chagas heart disease. **Annual Review of Pathology:** Mechanisms of Disease, v. 14, p. 421–447, 24 jan. 2019.

BOZHKOV, P. V.; SUAREZ, M. F.; FILONOVA, L. H.; DANIEL, G.; ZAMYATNIN, A. A.; JR, RODRIGUEZ-NIETO, S. Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 102, n. 40, p. 14463–14468, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Análise descritiva: um ano de implementação da notificação de doença de Chagas crônica no Brasil. **Boletim Epidemiológico**, v. 55, nº 8, 2024a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Articulação Estratégica de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Guia de vigilância em saúde**: volume 2. 6. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2023b. 3 v.

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas na Doença de Chagas.

BRENER, Zigman. Trypanosoma cruzi: morfologia e ciclo evolutivo. *In:* DIAS, João Carlos Pinto; COURA, José Rodrigues (org.). **Clínica e terapêutica da Doença de Chagas**: uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997. p. 25-31.

BREITLING, Rainer; TAKANO, Eriko. Editorial overview: Systems and synthetic biology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 71, 2023.

CAO, Y.; HUANG, S.; DAI, B.; ZHU, Z.; LU, H.; DONG, L.; CAO, Y.; WANG, Y.; GAO, P.; CHAI, Y.; JIANG, Y. Candida albicans cells lacking CaMCA1-encoded metacaspase show resistance to oxidative stress-induced death and change in energy metabolism. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 2, p. 183-189, 2009.

CARMONA-GUTIERREZ, D.; FRÖHLICH, K-U.; KROEMER, G.; MADEO, F. Metacaspases are caspases. Doubt no more. **Cell Death Differentiation**, v. 17, p. 377–378, 2010.

CARVALHO, T. U., Estudo Microscopia Óptica, Portal da Doença de Chagas, 2017. Disponível em: . Acesso em: 17 fev de 2024.

CDC - Chagas Disease - Epidemiology ; Risk Factors. Disponível em: . Acesso em: 17 fev de 2024.

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

CHANG, H. Y. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. v. 64, n. 4, p. 821–846, 2000.

SANFORD, Christopher A.; POTTINGER, Paul S.; JONG, Elaine C. (ed.). **The Travel and Tropical Medicine Manual**. 5th. ed. Amsterdan: Elsevier, 2017.

COLL, N. S.; VERCAMMEN, D.; SMIDLER, A.; CLOVER, C.; Van Breusegem, F.; Dangl, J. L.; Epple, P. Arabidopsis type I metacaspases control cell death. **Science**, v. 330, p. 1393-1397, 2010.
COSTA CHAVES, G. *et al*. Estimación de la demanda de medicamentos antichagásicos: una contribución para el acceso en América Latina**. Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 41, p. e45, 14 abr. 2017.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015. DOI: 10.1590/0074-0276140362.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31–40, jul. 2009.

DALZOTO, L. A. M. *et al*. Metacaspase of *Saccharomyces cerevisiae* (ScMCA-Ia) presents different catalytic cysteine in a processed and non-processed form. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 687, p. 149185, 2023. doi: 10.1016/j.bbrc.2023.149185.

CASTRO, E.; REUS, T. L.; DE AGUIAR, A. M.; ÁVILA, A. R.; DE ARRUDA CAMPOS BRASIL DE SOUZA, T. Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in Trypanosoma cruzi. Apoptosis, v. 22, n. 12, p. 1564-1577, 2017.

DIAS, J. C. P*. et al*. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 03-60, dez. 2016a.

DIAS, J. C. P*. et al*. Changes in the paradigm of clinical and therapeutic management of Chagas' disease: progress and perspectives in the pursuit of comprehensive health. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 87–90, jun. 2016b.

DIAS, L., *et al*., Quimioterapia da Doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos, **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 9, 2444-2457, 2009.

DUSCHAK, Vilma G.; COUTO, Alicia S. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. **Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chabén"**, ANLIS-Malbrán, Ministerio de Salud, Buenos Aires, Argentina, 2006.

ELOWITZ, M.; LIM, W. A. Build life to understand it. **Nature**, v. 468, p. 889-890, 2010.

ENGELS, D.; SAVIOLI, L. Reconsidering the underestimated burden caused by neglected tropical diseases. Trends in Parasitology, v. 22, n. 8, p. 363-366, 2006.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of Trypanosoma cruzi strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, 1987.

FARMANGUINHOS/FIOCRUZ. Novo acordo da Fiocruz com a Bayer visa oferecer reforço ao tratamento da Doença de Chagas. Publicado em 04 dez. 2023. Disponível em: https://fiocruz.br/noticia/2023/12/novo-acordo-da-fiocruz-com-bayer-visa-oferecer-reforco-ao-tratamento-da-doenca-de. Acesso em: 27 abr. 2024.

GALLUZZI, L. *et al*. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death ; Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.

GASQUES, Luciano; SERAPHIM, Paulo Alexandre; GALVANINI, Fernando; FAVARETTO, Tamara Francislaine Santana; PAMPHILE, João Alencar. Independência ou morte: a apoptose como mecanismo de defesa. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 17, n. 1, p. 49-53, 2013.

GRIVICICH, I. .; REGNER, A. .; ROCHA, A. B. da . Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GONZALEZ, I. J.; DESPONDS, C.; SCHAFF, C.; MOTTRAM, J. C.; FASEL, N. Leishmania major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 2, p. 161-172, 2007.

GOTTSCHALK, S. *et al*. Metacaspases in pathogenic *Leishmania* species: moving beyond the killing paradigm. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology,** 2021.

GREEN, D. R.; FITZGERALD, P. Just So Stories about the Evolution of Apoptosis. **Current Biology**, v. 26, n. 13, p. R620-R627, 2016.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell death signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 12, p. a006080, 2015.

GREGORY, C. D.; DEVITT, A. The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? **Immunology**, v. 113, n. 1, p. 1-14, 2004.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. da. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007. DOI: 10.32635/2176-9745.RBC.2007v53n3.1801.

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Poverty, migration, and Chagas disease. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 5, 2021.

GUIMARÃES, E. T.; LIMA, M. S.; SANTOS, L. A.; *et al*. Activity of physalins purified from Physalis angulata in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 84-87, 2009.

HAMANN, A.; BRUST, D.; OSIEWACZ, H. D. Deletion of putative apoptosis factors leads to lifespan extension in the fungal ageing model Podospora anserina. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 948-958, 2007.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HELMS, M. J.; AMBIT, A.; APPLETON, P.; TETLEY, L.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Bloodstream form *Trypanosoma brucei* depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes. **Journal of Cell Science,** v. 119, p. 1105-1117, 2006.
HILL, S.M.; NYSTRÖM, T. The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger. **BioEssays**, Estados Unidos, v. 37, n. 5, p. 525-531, fev/2015.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23-28, 1990.

KACZANOWSKI, S.; SAJID, M.; REECE, S. E. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. **Parasites ; Vectors**, v. 4, n. 44, p. 1-8, 2011.

KHALIL, A.; COLLINS, J. Synthetic biology: applications come of age. Nature Reviews Genetics, v. 11, p. 367–379, 2010.

KLEMENČIČ, M.; FUNK, C. Evolution and Structural Diversity of Metacaspases. **J Exp Bot**, Reino Unido, v. 70, n. 7, p. 2039-2047, abr/2019.

KOLA, I. The state of innovation in drug development. **Clinical Pharmacology ; Therapeutics**, v. 83, 2008.

LANA, Marta de; TAFURI, Washington Luiz. *Trypanossoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, David Pereira; MELO, Alan Lane de; LINARDI, Pedro Marcos; VITOR, Ricardo W. Almeida (ed.). **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 85.

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

LEATHERBARROW, R. J. **Grafit Version 5**. Horley, U.K.: Erithacus Software Ltd., 2001.

LEE, N.; GANNAVARAM, S.; SELVAPANDIYAN, A.; DEBRABANT, A. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite Leishmania. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 61, p. 1745-1757, 2007.

LEE, R. E. C.; BRUNETTE, S.; PUENTE, L. G.; MEGENEY, L. A. Metacaspase Yca1 is required for clearance of insoluble protein aggregates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 30, p. 13348-13353, 2010.

LEE, R. E.; PUENTE, L. G.; KAERN, M.; MEGENEY, L. A. A non-death role of the yeast metacaspase: Yca1p alters cell cycle dynamics. **PLoS One**, v. 3, p. e2956, 2008.

LEGER, T.; GARCIA, C.; OUNISSI, M.; LELANDAIS, G.; CAMADRO, J. M. The metacaspase (Mca1p) has a dual role in farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. **Molecular ; Cellular Proteomics**, v. 14, n. 1, p. 93-108, 2015.

LIM, H.-W.; KIM, S.-J.; PARK, E.-H.; LIM, C.-J. Overexpression of a metacaspase gene stimulates cell growth and stress response in *Schizosaccharomyces pombe.* **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 1016-1023, 2007.

MACHADO, M. F.; MARCONDES, M. F.; JULIANO, M. A.; MCLUSKEY, K.; MOTTRAM, J. C.; MOSS, C. X.; JULIANO, L.; OLIVEIRA, V. Substrate specificity and the effect of calcium on *Trypanosoma brucei* metacaspase 2. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 11, p. 2608-1621, 2013.

MACHADO, M. F.; RIOLI, V.; DALIO, F. M.; CASTRO, L. M.; JULIANO, M. A.; TERSARIOL, I. L.; FERRO, E. S.; JULIANO, L.; OLIVEIRA, V. The role of Tyr605 and Ala607 of thimet oligopeptidase and Tyr606 and Gly608 of neurolysin in substrate hydrolysis and inhibitor binding. **Biochemical Journal**, v. 404, p. 279–288, 2007.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; FRÖHLICH, K. U. A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. **Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 3, p. 729-734, 1997.

MCLUSKEY, K.; MOTTRAM, J. C. Comparative structural analysis of the caspase family with other clan cysteine peptidases. **Biochemical Journal**, v. 476, n. pt 2, p. 219-232, 2015.

MCLUSKEY, K.; RUDOLF, J.; PROTO, W. R.; ISAACS, N. W.; COOMBS, G. H.; MOSS, C. X.; MOTTRAM, J. C. Crystal structure of a *Trypanosoma brucei* metacaspase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 19, p. 7469-7474, 2012.

MININA, E. A.; COLL, N. S.; TUOMINEN, H.; BOZHKOV, P. V. Metacaspases versus caspases in development and cell fate regulation. **Cell Death ; Differentiation**, v. 24, n. 8, p. 1314–1325, 2017.

MOREIRA, Diogo Rodrigo Magalhães; LEITE, Ana C. Lima; SANTOS, Ricardo Ribeiro dos; SOARES, Milena B. P. Approaches for the development of new anti-Trypanosoma cruzi agents. **Current Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 212-231, 2009.

MOTTRAM, J.; COOMBS, G.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 375-381, 2004.

MUKHERJEE, D.; GUPTA, S.; SARAN, N.; DATTA, R.; GHOSH, A. Induction of apoptosis-like cell death and clearance of stress-induced intracellular protein aggregates: dual roles for *Ustilago maydis* metacaspase Mca1. **Molecular Microbiology**, v. 106, n. 5, p. 815-831, 2017.

MUKHERJI, S.; VAN OUDENAARDEN, A. Synthetic biology: understanding biological design from synthetic circuits. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, p. 859-871, 2009.

NASCIMENTO, Arthur Marques do. **Avaliação da combinação dos fármacos silibinina e benznidazol na atividade anti - *Trypanosoma cruzi in vitro***. 2019. Monografia (Graduação em Farmácia) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2019

NELSON, David L.; COX, Michael M.; HOSKINS, Aaron A. **Princípios de bioquímica de Lehninger.** v. 1. Porto Alegre: Grupo A, 2022. Livro eletrônico. ISBN 9786558820703

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. Nature Reviews Drug Discovery, v. 5, n. 11, p. 941-955, 2006.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet** (London, England), v. 391, n. 10115, p. 82–94, 6 jan. 2018.

PINTO, A. Y. D. N. *et al*. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 25, n. 1, p. 77–83, jan. 2009.

PINTO, A. Y. DAS N. *et al*. Alterações eletrocardiográficas durante e após tratamento com benzonidazol em fase aguda de doença de Chagas autóctone da Amazônia brasileira. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 67–76, jun. 2010.

PINTO, A. Y. DAS N. *et al*. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira: estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 602–614, dez. 2008.

PROTO, W. R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. *Trypanosoma brucei* metacaspase 4 is a pseudopeptidase and a virulence factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 46, p. 39914-39925, 2011.

RANI, K.; RACHITA, R.; DATT, S. Review on latest overview of proteases. **International Journal of Current Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 12-18, 2012.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; THOMAS, P. D.; HUANG, X.; BATEMAN, A.; FINN, R. D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates, and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, 2018.

REZENDE, J. M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da Doença de Chagas. In: CASTRO, L. P.; COELHO, L. G. V. (org.). **Gastroenterologia**. São Paulo: Medsi, 2004. p. 325–391.

RICHIE, D. L.; MILEY, M. D.; BHABHRA, R.; ROBSON, G. D.; RHODES, J. C.; ASKEW, D. S. The *Aspergillus fumigatus* metacaspases CasA and CasB facilitate growth under conditions of endoplasmic reticulum stress. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 591-604, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. Weekly Epidemiological Record: **Relevé épidémiologique hebdomadaire**, v. 90, n. 06, p. 33–44, 6 fev. 2015.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 157-162, 1967.

SHAPIRO, T. A.; ENGLUND, P. T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 117–143, 1995.

SOEIRO, M. N. C.; CASTRO, S. L. **Expert Opinion**, v. 13, p. 105, 2009.

SUAREZ, M. F.; FILONOVA, L. H.; SMERTENKO, A.; SAVENKOV, E. I.; CLAPHAM, D. H.; VON ARNOLD, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; BOZHKOV, P. V. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. **Current Biology**, v. 14, n. 9, p. 339-340, 2004.

TSIATSIANI, L.; VAN BREUSEGEM, F.; GALLOIS, P.; ZAVIALOV, A.; LAM, E.; BOZHKOV, P. V. Metacaspases. **Cell Death ; Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1279-1288, 2011.

UREN, A. G.; O'ROURKE, K.; ARAVIND, L.; PISABARRO, M. T.; SESHAGIRI, S.; KOONIN, E. V.; DIXIT, V. M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. **Molecular Cell**, v. 6, n. 4, p. 961-967, 2000.

VERCAMMEN, D. *et al*. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of Arabidopsis thaliana cleave substrates after arginine and lysine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45329-45336, 2004.

VERCAMMEN, D.; VAN DE COTTE, B.; DE JAEGER, G.; EECKHOUT, D.; CASTEELS, P.; VANDEPOELE, K.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of

Arabidopsis thaliana cleave substrates after arginine and lysine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45329-45336, 2004.

VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. Cysteine proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 107, p. 1-12, 2016.

WILKINSON, G. N. Statistical estimations in enzyme kinetics. Biochemical Journal, v. 80, n. 2, p. 324-332, 1961.

XIA, Y. *et al*. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 3, p. e15, 2019.

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