



Universidade de Brasília

FACULDADE UnB PLANALTINA

LICENCIATURA EM CIÊNCIAS NATURAIS

Obtenção da proteína metacaspase recombinante de *Trypanosoma cruzi*
pelo sistema de expressão baseado em vetor de baculovírus (BEV)

Ketlin Cristina Mouzinho Santos

Orientador: Vicente de Paulo Martins

Brasília-DF

2020



Universidade de Brasília

FACULDADE UnB PLANALTINA

LICENCIATURA EM CIÊNCIAS NATURAIS

Obtenção da proteína metacaspase recombinante de *Trypanosoma cruzi*
pelo sistema de expressão baseado em vetor de baculovírus (BEV)

AUTORA: Ketlin Cristina Mouzinho Santos

ORIENTADOR: Vicente de Paulo Martins

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Examinadora, como exigência parcial para a obtenção de título de Licenciado do Curso de Ciências Naturais, da Faculdade UnB Planaltina, sob a orientação do Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins.

Brasília-DF

2020

DEDICATÓRIA

“Você é parte de algo muito maior, maior que você, maior que nós. Maior do que a imagem que eles nos moldaram para ver”¹

Bigger - Beyoncé

Dedico este trabalho a Deus, aos meus anjos da guarda (Vicente, Luís, Herick, Anderson e George) pela dedicação, paciência e afeto que tiveram comigo. Dedico a minha família pelo suporte, ao meu amado noivo Edgar, aos meus amigos do laboratório LAMP e aos meus amigos do grupo *Formation*. A todos(as) que acreditaram e me apoiaram nesta jornada. Gratidão.

¹ Ah, you're part of something way bigger, bigger than you, bigger than we. Bigger than the picture they framed us to see. Tradução minha.

Sumário

| | |
|---|-----------|
| Resumo | 5 |
| 1.Introdução | 6 |
| 1.1. Doença de Chagas | 6 |
| 1.2. Epidemiologia | 7 |
| 1.3. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 9 |
| 1.4. Manifestações clínicas..... | 11 |
| 1.5. Diagnóstico | 11 |
| 1.6. Morte celular..... | 12 |
| 1.7. Apoptose | 13 |
| 1.8. Metacaspase | 15 |
| 1.9. Sistema de Expressão baseado em Vetor de Baculovírus (BEV) | 17 |
| 2.Material e métodos | 20 |
| 2.1. Análise in sílico | 20 |
| 2.2. Amplificação do gene <i>TcMCA3</i> | 21 |
| 2.3. Análises de DNA em eletroforese em gel de agarose | 22 |
| 2.4. Clonagem do gene | 23 |
| 2.5. Preparo de células termocompetentes | 23 |
| 2.6. Transformação em células competente..... | 24 |
| 2.7. Seleção de bactérias recombinantes..... | 25 |
| 2.8. Extração de DNA plasmidial | 25 |
| 2.9. Quantificação de DNA plasmidial | 26 |
| 2.10. Sequenciamento | 26 |
| 2.11. Digestão pela enzima de restrição de pGEM-tEASY e pFastBac1-6xHis-AcPH | 26 |
| 2.12. Purificação do DNA por gel de agarose | 27 |
| 2.13. Sub-Clonagem no sistema Bac-to-Bac™ | 27 |
| 3.Resultados e discussão | 31 |
| 3.1. Análise in sílico | 31 |
| 3.2. Reação de polimerização em cadeia (PCR)..... | 32 |
| 3.3. Sequenciamento dos insertos ligados a pGEM-tEASY | 35 |
| 3.4. Sub-clonagem em pGEM-Teasy e pFastBac™ | 36 |
| 3.5. Sub clonagem gênica em baculovírus (bacmídeo) pelo sistema de expressão Bac-to-bac™ do sistema BEV. | 38 |
| 4.Considerações finais | 40 |
| 5.Referências bibliográficas | 40 |

Obtenção da proteína metacaspase recombinante de *Trypanosoma cruzi* pelo sistema de expressão baseado em vetor de baculovírus (BEV)

Ketlin Cristina Mouzinho Santos² • Vicente de Paulo Martins²

Resumo

A Doença de Chagas (DC) é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada. Ela atinge 21 países em situação endêmica na América Latina e também há casos em outros países e continentes. No Brasil, são 1,9 milhão de pessoas infectadas pelo parasito *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da DC. Ele possui um ciclo de vida heteroxênico e várias formas de transmissão. No hospedeiro vertebrado infectado há diferentes respostas contra o parasito. Dentre elas está a apoptose, que pode ser ativada por via extrínseca ou via intrínseca à célula envolvendo uma cascata de caspases, que são proteínas encontradas em metazoários. Diante dessa resposta o *T. cruzi* apresenta mecanismos de evasão às defesas das células hospedeiras. Esses possivelmente incluem a participação de proteínas chamadas metacaspases (MCAs), encontradas em fungos, protozoários e plantas. Na literatura científica não há tantas pesquisas relacionadas à proteína MCA de *T. cruzi*. Entretanto trabalhos evidenciam a existência de cinco genes de MCAs em *Trypanosoma brucei*. Em *T. cruzi* foram encontrados os genes TcMCA3 e TcMCA5. O objetivo do presente trabalho foi a utilização da ferramenta de expressão baseada em vetores de baculovírus (do inglês, baculovirus expression vector, BEV). A obtenção do bacmídeo recombinante com o gene TcMCA3 de *T. cruzi* pelo sistema BEV apresentou bons resultados e trouxe como perspectiva expressá-lo em células de inseto pelo sistema BEV, como também a purificar a proteína resultante para análises em imunodiagnósticos da DC e estudos de evasão à apoptose.

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, metacaspase, baculovírus, imunodiagnóstico, interação parasito-hospedeiro.

✉ Ketlin Cristina Mouzinho Santos
cristinaketlin6@gmail.com

✉ Vicente de Paulo Martins
vpmartins@unb.br

²Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos – LAMP, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

1. Introdução

1.1. Doença de Chagas

Em 1909 foi descoberta a Doença de Chagas (DC) pelo pesquisador e médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas e foi em homenagem a ele que se deu o nome da doença (OPAS 2020). Até o momento, segundo Dias et al. (2016), no Brasil a DC encontra-se em situação endêmica com mais de 1,9 milhão de pessoas infectadas. Nos outros 21 países da América Latina onde a doença também se encontra em situação endêmica o número de pessoas infectadas alcança de 6 a 7 milhões. Sendo assim, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a DC uma doença tropical, emergente e negligenciada.

Devido a essa situação, segundo a Organização pan-americana da saúde (2020), no percurso da história a DC é qualificada como uma doença marginalizada, por ser correlacionada a populações rurais e vulneráveis. Posto isso, há a ocorrência de estigmas sociais em relação à doença, por exemplo, a rejeição social no trabalho, por estar associada a um problema de saúde, e nas prováveis dificuldades ao qual o trabalhador terá com o seu desempenho no emprego. Assim, desperta-se um medo nos trabalhadores em procurar um tratamento de imediato, pois ao longo do tempo leva manifestações clínicas mais graves da doença e suas morbidades podem ocorrer.

A Opas (2020) aponta ainda que essas questões sociais criam obstáculos claros para os agentes da saúde em relação ao avanço da tecnologia da triagem, diagnósticos, tratamento, controles eficazes para combater a doença e a desmistificação das crenças as quais envolvem a Doença de Chagas. Em consideração a esse problema de saúde pública, a inevitabilidade de conscientização e os estigmas sociais circundantes aos profissionais da saúde, a Assembleia Mundial da Saúde de 2019, órgão decisório da OMS, designou o dia 14 de abril como o Dia Mundial da Doença de Chagas, com o objetivo de visibilizar as extensões de saúde, psicossociais e econômicas da DC.

1.2. Epidemiologia

Tais estigmas sociais são atrelados ao histórico da DC no país. No início da década de 1950 a ascensão da pecuária trouxe a degradação ambiental e alterações climáticas, conseqüentemente houve a realocação de animais selvagens, e assim a domiciliação dos triatomíneos, principalmente por *Triatoma infestans*, nas habitações humanas que tinham condições socioeconômicas precárias. Esses triatomíneos são insetos hemípteros hematófagos da subfamília Triatominae, popularmente conhecidos no Brasil como “barbeiros” ou chupões”. Eles são os hospedeiros invertebrados e considerados os vetores da DC (Dias et al. 2016).

Pela vulnerabilidade social, a transmissão vetorial da DC foi crescente em habitações de casa de barro, denominadas como “casa de pau a pique”, “taipa de mão”, “taipa de sopapo” ou “taipa de sebe”, e assim tornaram-se acomodações para os triatomíneos domiciliares (Coura and Dias 2009). Westphalen, Bisugo e Araújo (2012), integram que após medidas de controles ambientais de *T. infestans*, coordenadas pela OPAS no início dos anos 60, por meio da pulverização de inseticidas, a incidência da transmissão diminuiu de forma significativa. Ao longo do tempo, essas campanhas pela América Latina organizadas pela OPAS foram enfraquecendo e perceberam que, como estratégia de extinguir os vetores da DC, deveriam dar prioridade às melhorias socioeconômicas. Essas medidas de controle foram reiteradas após a iniciação de estudos sorológicos, entre a década de 70 e 80, os quais, com levantamentos de dados, constatou-se novamente a prevalência de transmissão vetorial da DC. No entanto, essas medidas trouxeram impactos ambientais em decorrência do inseticida. E com a industrialização e o êxodo rural, foi estimado pela Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), do Ministério da Saúde, o aumento de mais de quatro milhões de pessoas infectadas pelo protozoário *T. cruzi* em áreas endêmicas do Brasil.

Devido a essas problemáticas foram delineadas outras formas de controle vetorial, como catalogar esses triatomíneos a fim de compreender o índice de dispersão e a

infestação domiciliar. Segundo Vinhaes (2013), no Brasil, foram registradas 62 espécies de triatomíneos com caráter intradomiciliar e peridomiciliar. Seis dessas espécies de triatomíneos são predominantes na região brasileira por serem dominantes vetores do protozoário *T. cruzi*. As espécies predominantes mencionadas são: (1) a *Panstrongylus megistus* encontrada em condições ambientais silvestres na região Sul do país, ao passo que detém a capacidade de colonização domiciliar e possui importância vetorial na região sudeste e alguns estados do nordeste (peri e intradomiciliares); (2) a *Triatoma brasiliensis* vetor protagonista de *T. cruzi* na região do nordeste brasileiro, com infestações coloniais peri e intradomiciliares, entretanto dispõe de uma ampla distribuição geográfica; (3) a *Triatoma pseudomaculata* possui um caráter mais peridomiciliar onde está presente em toda a região nordeste e alguns estados do centro sul do Brasil (Goiás, Minas Gerais, Tocantins e Distrito Federal). A *T. pseudomaculata* não possui uma predominância em colonização intradomiciliar, entretanto, ela passa por um acelerado processo sinantrópico; (4) a espécie *Triatoma sordida* é a mais encontrada em todo território brasileiro, porém possui um baixo risco de transmissão vetorial de *T. cruzi* ao homem, por não conseguir adaptar-se ao ambiente intradomiciliar; a espécie (5) *Rhodnius robustus* e a espécie (6) *Rhodnius pictipes* apresentam elevadas taxas de transmissão natural de *T. cruzi* ao homem ou pela contaminação de alimentos com as fezes do triatomíneo. Suas distribuições geográficas concentram-se na região amazônica, a qual é considerada uma região emergente da DC no Brasil.

Diante da diversidade das espécies mencionadas e das práticas de controle, segundo o Ministério da Saúde (2015) observou-se que, no período de 2000 a 2013 houve um crescimento de transmissão oral. Essa se deu principalmente na porção norte do país, incidindo em 68,8% dos casos de DC aguda no Brasil, e observou-se a diminuição da transmissão vetorial, a qual antes era elevada e incidiu-se em 6,36% dos casos, com a prevalência na porção norte do país.

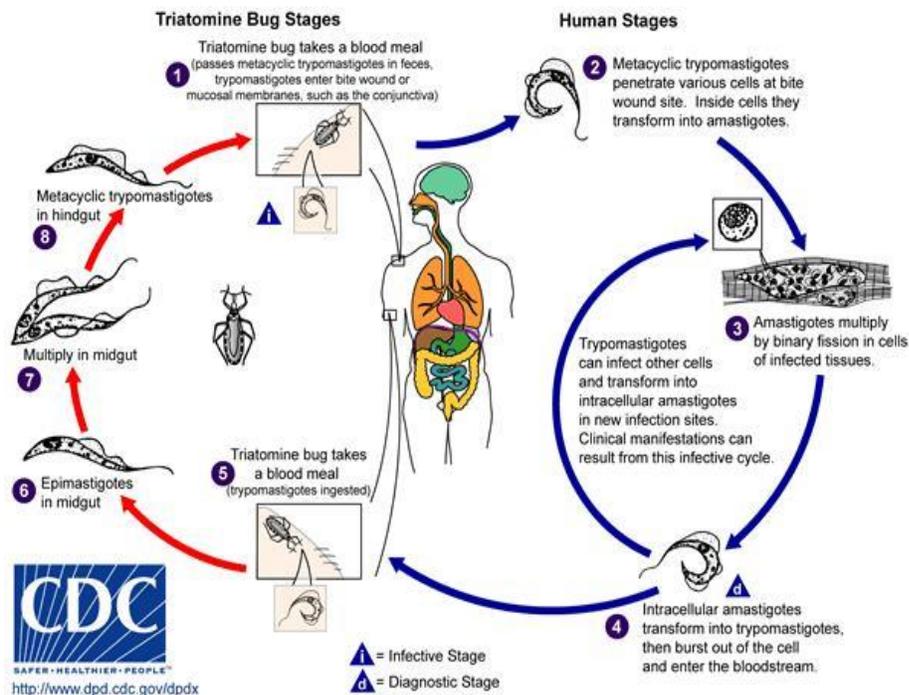
Dessa forma, atualmente, com avanço da urbanização e suas consequências, outras formas de transmissão já existentes começaram a ter maiores incidências de casos em países endêmicos da América Latina. Dentre elas, estão a transmissão vetorial, que abrange cerca de 70% das infecções, a transmissão congênita a qual contempla cerca de 26% das infecções e os 4% restantes são pela transmissão por transfusão sanguínea, por transplante, pelo consumo de alimentos contaminados com as fezes do triatomíneo e em acidentes laboratoriais (Bonney et al. 2018). Ainda, segundo Tanowitz, Weiss e Montgomery (2011) e Opas (2020), este avanço e o aumento do fluxo de pessoas entre a América Latina e em outros países e continentes não endêmicos, a doença se propagou em regiões como os Estados Unidos, na África, Mediterrâneo Oriental, Pacífico Ocidental e a Europa. Nesses, a transmissão da doença não é por insetos triatomíneos, como ocorre na maioria das vezes nas regiões endêmicas, e sim por outras formas não vetoriais.

1.3. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

A DC é causada pelo protozoário parasito *T. cruzi*, pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. O parasito é um organismo monoflagelado no qual há uma mitocôndria modificada, denominada de cinetoplasto. O organismo possui um ciclo de vida heteroxênico, entre barbeiros e hospedeiros vertebrados mamíferos, como humanos e gambás (Lana and Tafuri 2011). O ciclo infectivo no hospedeiro vertebrado é definido por diferenciações morfológicas do parasito, Brener (1997) e Bonney et al. (2018) descrevem que após o repasto sanguíneo, a forma tripomastigota metacíclica do parasito é liberada nas fezes do triatomíneo e essas entrariam em contato com a corrente sanguínea do hospedeiro mamífero. Após a entrada o parasito infecta as células nucleadas e então se diferencia na forma amastigota. Em seguida, o protozoário na forma amastigota se multiplica por divisão binária no citoplasma da célula hospedeira, diferencia-se para a forma tripomastigota e provoca uma lise celular. Assim se libera o parasito diferenciado na forma tripomastigota, o qual pode

infectar células vizinhas, cair na corrente sanguínea e infectar diferentes células de órgãos ou tecidos, deste modo mantendo o ciclo no hospedeiro mamífero. Após um novo repasto de um triatomíneo em um mamífero infectado, as tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas no intestino do inseto. Desses, alguns se dirigem à ampola retal e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, fechando o ciclo heteroxênico, (Fig.1).

Fig.1. Ciclo de vida do *T. cruzi*. No estágio 1 o triatomíneo hematófago infectado se alimenta do hospedeiro vertebrado e simultaneamente libera suas fezes com o parasito em sua forma tripomastigota metacíclica. No estágio 2 através da picada do inseto o parasito entra na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero e infecta as células nucleadas, diferenciando-se em amastigota. No estágio 3 e 4 o protozoário se multiplica por divisão binária no citoplasma da célula hospedeira e então se diferencia em tripomastigota, provocando uma lise celular. Conseqüentemente, o parasito adentra na corrente sanguínea e infecta outras células ou órgãos, mantendo o ciclo no hospedeiro mamífero. No estágio 5 e 6 após o repasto do triatomíneo em um hospedeiro infectado, o parasito em sua forma tripomastigota se diferencia em epimastigota no intestino do inseto vetor. No estágio 7 e 8 o parasito se multiplica e os que chegam na ampola retal do inseto se transformam em tripomastigotas metacíclicas.



Fonte: Centro de Controle e Prevenção de Doenças, CDC

1.4. Manifestações clínicas

No instante que o parasito entra na corrente sanguínea do hospedeiro inicia-se um crescimento em relação à quantidade de tripomastigotas no sistema circulatório (parasitemia). Já em células parasitadas o aumento da carga parasitária pode acarretar na morte do hospedeiro ou, geralmente, este desenvolve uma resposta imune restringindo progressivamente a multiplicação parasitária (Brener 1997).

Em detrimento disso, a doença apresenta segundo Bonney et al. (2018) e Pérez-molina e Molina (2018) três fases: a indeterminada, sendo assintomática, a aguda e a crônica, sendo essas sintomáticas. A fase aguda ocorre, na maioria das vezes, em crianças e é caracterizada inicialmente por febre. Caso ocorra inoculação de fezes contaminadas, nas pálpebras há um edema, denominada “Sinal de Romanã”. Em algumas pessoas infectadas, pode ocorrer o aumento do fígado e do baço, aumento dos gânglios linfáticos, náuseas, vômitos e diarreias eventuais. Sendo que, esses sintomas desaparecem em semanas e conseqüentemente à baixa parasitemia na corrente sanguínea do hospedeiro que ocorre ao longo do tempo. Depois dos sintomas desaparecem, a doença pode persistir latente ou progredir para a fase crônica. Essa é definida pelo alto teor de anticorpos da classe IgG na circulação sanguínea, bem como alterações cardíacas como fadiga, disfunção ventricular, alteração cardíaca congestiva, etc. Nessa fase a doença pode também manifestar sintomas gastrointestinais como megacólon e megaesôfago.

1.5. Diagnóstico

O diagnóstico da DC na fase aguda é comumente por análise microscópica do parasito em sua forma tripomastigota no sangue do paciente infectado. O seu tratamento é por intermédio de medicações como Nifurtimox (Lampit®) e Benzonidazol (Rochagan®), os quais interrompem o ciclo de infecção de *T. cruzi*. Apenas o Benzonidazol (Rochagan®) é regulamentado no Brasil, caso ocorra intolerância do

paciente, poder ser utilizada a droga Nifurtimox (Lampit®) (Opas 2009). Com o declínio da parasitemia, na fase crônica, segundo Pérez-molina e Molina (2018) o diagnóstico direto parasitológico e por PCR (do inglês, *Polymerase chain reaction*) são pouco confiáveis. Portanto, na fase crônica, de modo geral, o diagnóstico se dá através de exames sorológicos para detecção de anticorpos IgG contra os antígenos de *T. cruzi* e eles são baseados em proteínas recombinantes ou proteínas totais do parasito contra anticorpos específicos da classe IgG. Os exames convencionais para o diagnóstico são Imunofluorescência Indireta (IFI), Hemaglutinação indireta (HAI) e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA). Entretanto, não há uma padronização de um único teste convencional para o diagnóstico, a metodologia utilizada é baseada na realização de dois testes sorológicos distintos e, no caso de uma discordância entre eles será necessário um terceiro teste para obter um resultado consistente da infecção no paciente. Essa metodologia é aplicada, pois, necessita-se de uma confirmação clara, principalmente em países onde a *Leishmania spp.* é endêmica, pelo fato de haver reação cruzada entre as respostas imunes contra estes dois gêneros de parasitos, devido à aproximação filogenética entre elas (Matos et al. 2015).

1.6. Morte celular

Em pacientes crônicos da DC, Grivicich, Regner e Rocham (2007) e Gasques *et al.* (2013) elucidam que a infecção ocorre principalmente de maneira intracelular em sua forma amastigota. Conseqüentemente, o organismo hospedeiro pode desencadear respostas contra o parasito, dentre as quais, está a morte celular programada (do inglês, *programmed cell death*, PCD) ou apoptose. Ela é um mecanismo vital para as células dos organismos multicelulares, a qual precisa estar em homeostasia constante para o seu desenvolvimento. Por exemplo, na efetividade do sistema de defesa inato e adaptativo, e para manutenção dos tecidos ao longo da vida. Os processos de morte celular podem ser classificados conforme diferenças em suas características

morfológicas e moleculares. Essas características se relacionam ainda em termos de exposição, ou não, do material celular ao meio extracelular. Eles são classificados em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica, senescência, dentre outras. A exposição de conteúdo celular não envolto por membranas, como na forma de vesículas, tem como consequência a apresentação de padrões moleculares associados a dano (do inglês, *damage-associated molecular patterns*, DAMPs) para células da resposta imune. Dessa forma, diferentes tipos de morte celular podem se dar por provocar inflamação local ou não (“morte suja” X “morte limpa”).

1.7. Apoptose

Dentre as formas de mortes celulares citadas, a melhor conhecida é a apoptose Gasques *et al.* (2013). Segundo Menna-Barreto e de Castro (2015) e Hatice (2015), esse mecanismo é vital para o desenvolvimento e o sistema de defesa inato de um organismo multicelular. Em metazoários, os reguladores fundamentais do processo apoptótico são as caspases, a família proteica Bcl-2, a proteína p53, as IAPS (do inglês, *inhibitors of apoptosis proteins*) e os fatores de necrose tumoral (TNF, do inglês, *tumor necrosis factor*).

Hatice (2015) explicita que as caspases (do inglês, *cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) são as proteínas marcadas por ser as principais efetoras no processo da PCD. Elas são divididas em três categorias: (1) as caspases inflamatórias, que participam do processo inflamatório, ao contrário da apoptose; (2) as caspases iniciadoras apoptóticas abrangem as procaspases que contém os domínios efetores de morte (do inglês, *death effector domain*, DED) ou ativam e fazem o recrutamento das caspases (do inglês, *caspase activation and recruitment domains*, CARDs); e (3) as caspases efetoras executoras apoptóticas, as quais são identificadas por seus pequenos prodomínios. Outro regulador é a proteína p53, sua função elementar é a ativação dos processos da PCD, na qual pode levar a interrupção do ciclo celular ou à apoptose. A

família proteica de Bcl-2 são proteínas que possuem um caráter pró apoptótico e anti apoptótico, por exemplo, os membros Bcl-2 e Bcl-XL atuam como anti apoptóticos e os membros Bax e Bak funcionam como pró apoptóticos. As IAPS são as proteínas supressoras da PCD, elas exercem um comportamento de ligar-se e inibir potencialmente as caspases ativadas. Por fim, a família dos fatores de necrose tumoral (do inglês, *tumor necrosis factor*, TNF), são citocinas pró inflamatórias atuantes em múltiplas funções e são expressas principalmente nas células de defesa, os macrófagos. Uma das proteínas mais estudadas da família TNF é o fator indutor de transcrição NF-kB, a qual dispõe de diferentes vias de ativação, ocasionando a expressão de proteínas propícias à apoptose, por exemplo, as caspases.

Posto isso, segundo Hatice (2015) a morte celular programada por apoptose pode ser ativada por duas vias. A via intrínseca ocorre de maneira intracelular e é desencadeada pelo seu regulador principal, a mitocôndria. Essa via se inicia através da permeabilização da membrana externa mitocondrial devido a estímulos citotóxicos como danos ao DNA, hipóxia, entre outros. Deste modo, são liberados fatores pró apoptóticos no citoplasma como a proteína Bax ou Bak, que ativam uma cascata de caspases e, conseqüentemente, leva à morte celular programada. É importante ressaltar que, a organela mitocondrial exerce um papel importante na modulação da homeostase dos íons Ca^{2+} e no equilíbrio redox celular, logo, após um desequilíbrio do potencial da membrana interna mitocondrial devido aos fatores citotóxicos, esses entram em colapso e ocorre o fenômeno irreversível, a PCD. A via extrínseca é ativada através do reconhecimento de moléculas de superfície da super família dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF) aos ligantes de morte denominados FADD (do inglês, *Fas-associated death domain*) /MORT-1. Eles transduzem seu sinal para o citoplasma e ativam uma cascata de caspases. Elas se ligam a alguns fatores efetores de morte, dentre os quais a endonuclease G, e a partir disso, ocorre a fragmentação do DNA e, subsequentemente, a PCD.

A apoptose possui características fenotípicas marcantes como a fragmentação do DNA, a ativação das caspases, a exposição superficial de fosfatidilserinas (PS) e a fragmentação celular em vesículas, denominado de corpos apoptóticos, fagocitados pelos macrófagos e eliminados sem causar danos inflamatórios. Ao contrário, por exemplo, da morte celular por necrose, na qual há um aumento do volume da célula até ocorrer um rompimento celular. Esse rompimento libera todo o seu interior, prejudicando as células ao seu redor e ocasiona uma reação inflamatória local (Grivicich, Regner, and Rocha 2007).

Segundo Hatice (2015) e Minina et al (2017), essas moléculas pró apoptóticas e anti apoptóticas nos organismos metazoários podem ser ativadas ou inibidas, por bactérias, vírus e parasitos através de um sistema interativo com os processos bioquímicos apoptóticos do hospedeiro, para assegurar a sobrevivência dos parasitos neste. Por exemplo, a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (causadora da tuberculose), o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o parasito *Trypanosoma brucei* (causador da doença do sono) induzem as moléculas pró-apoptóticas no processo da apoptose. Em contrapartida, por exemplo, a bactéria *Chlamydia trachomatis* (causadora da infecção sexualmente transmissível clamidíase), os vírus Baculovírus (infectante de insetos) e o parasito *T. cruzi* (causador da DC) inibem a apoptose através da ativação das moléculas anti-apoptóticas. Vale destacar, cada organismo citado possui mecanismos distintos de inibição ou ativação nos processos bioquímicos.

1.8. Metacaspase

Segundo Minina et al. (2017), o parasito *T. cruzi* ativa moléculas anti apoptóticas para prevenir a autodestruição da célula infectada. Esse processo se dá por determinadas proteínas, dentre elas possivelmente estão as metacaspases (MCAs), entretanto a estrutura e função celular dessas, na PCD ainda é desconhecida na literatura. As MCAs são proteases produzidas por plantas, fungos e protistas. Elas são

compostas por três tipos, a tipo I está relacionada com a apoptose e são encontradas nos três grupos de organismos citados; a tipo II é identificada em plantas, por exemplo, a *Arabidopsis thaliana*; e a tipo III é encontrada em organismos fitoplanctônicos, por exemplo, as algas do gênero *Haptophyta*, denominadas popularmente de algas douradas/ amarronzadas.

As caspases e as metacaspases são proteases do clã CD, peptidases de cisteína, e da família C14. Elas compartilham propriedades estruturais, como a díade catalítica histidina-cisteína e se distanciam pela especificidade das metacaspases de substrato-alvo em arginina/lisina, diferentemente das caspases, que possuem especificidade do substrato-alvo em resíduos de ácido aspártico. A atividade de autoprocessamento da maior parte das metacaspases é dependente de íons Ca^{2+} , como foi demonstrado nos estudos de Wong, Yan e Shi (2012) em testes *in vitro* para o organismo *Saccharomyces cerevisiae*. Foi observado um alto processo autocatalítico após concentrações elevadas de Ca^{2+} , transformando a metacaspase do tipo I em dois fragmentos menores, isto é, os resultados propõem a necessidade de uma alta concentração de Ca^{2+} para o processamento autocatalítico como também para atividades catalíticas da metacaspase do tipo I. Os estudos ainda revelam a protease como um regulador da PCD após estímulos de estresse oxidativo, de ácido acético e de toxinas.

Não há muitos estudos na literatura científica acerca do papel da metacaspase nos processos da PCD em *T. cruzi*. São encontrados, na maior parte, referências voltadas para o papel da proteína MCA em plantas. Entretanto, os estudos de Kosec et al. (2006) trazem dados relacionados aos tripanosomatídeos. Na pesquisa, foram encontrados cinco genes da metacaspase do tipo I em *Trypanosoma brucei* denominados *TbMCA1-5*. No organismo *T. cruzi*, foram identificados os genes metacaspase 3 (*TcMCA3*) e a metacaspase 5 (*TcMCA5*). O objetivo do estudo foi verificar a expressão dos genes em diferentes estágios morfológicos do parasito, por meio do soro de pacientes chagásicos em fase crônica através do processo *Western blot*. Os autores detectaram a presença da

proteína *TcMCA3* nos quatro estágios do parasito (tripomastigota metacíclico, amastigota, tripomastigota e epimastigota). Devido a isso, decidiram realizar experimentos com tratamento de soro humano fresco (do inglês, *fresh human serum*, FHS) em células epimastigotas, de forma a inibir a atividade da protease. Perceberam que após 3h de tratamento as células apresentaram características morfológicas típicas de uma apoptose. Os resultados apresentaram uma superexpressão da proteína *TcMCA3* e aparentemente essa alta expressão era letal para a célula. Segundo os autores, isso aponta que a metacaspase 3 participa da morte celular programada, mas ainda não é conhecido o seu papel no processo. Devido a isso, o gene *TcMCA3* de *T. cruzi* foi escolhido para o presente trabalho, como intuito de obtê-la na expressão em vetor de baculovírus (do inglês, *baculovirus expression vector*, BEV). Dentre os sistemas comerciais oferecidos, o utilizado para o trabalho foi o sistema Bac-to-bac™.

1.9. Sistema de Expressão baseado em Vetor de Baculovírus (BEV)

Segundo Ribeiro et al. (2015) o sistema BEV é baseado nos baculovírus (família *Baculoviridae*) que infectam insetos e esses divididos em quatro gêneros: *Alphabaculovirus* e *Betabaculovirus*, infectantes de lepidópteros, como as borboletas e as mariposas; *Gammabaculovirus* são infectantes de himenópteros, como as abelhas, vespas e formigas, e os *Deltabaculovirus* são infectantes de dípteros como moscas, mosquitos, pernilongos, etc. Os baculovírus possuem aplicações biotecnológicas em controle biológico de pragas agrícolas, como vetores de expressão de proteínas recombinantes em célula de inseto e vetores de terapia gênica. Destes, o mais estudado atualmente no ramo molecular, é a *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) isolada da lagarta *Autographa californica*. Os vírus dessa família produzem dois fenótipos distintos durante a infecção: (1) O vírus extracelular (do inglês, *extracellular virus*, BV) infecta de célula a célula e possui um único nucleocapsídeo envelopado e o (2) vírus derivados de oclusão (do inglês, *occluded derived virus*, DV), o qual promove

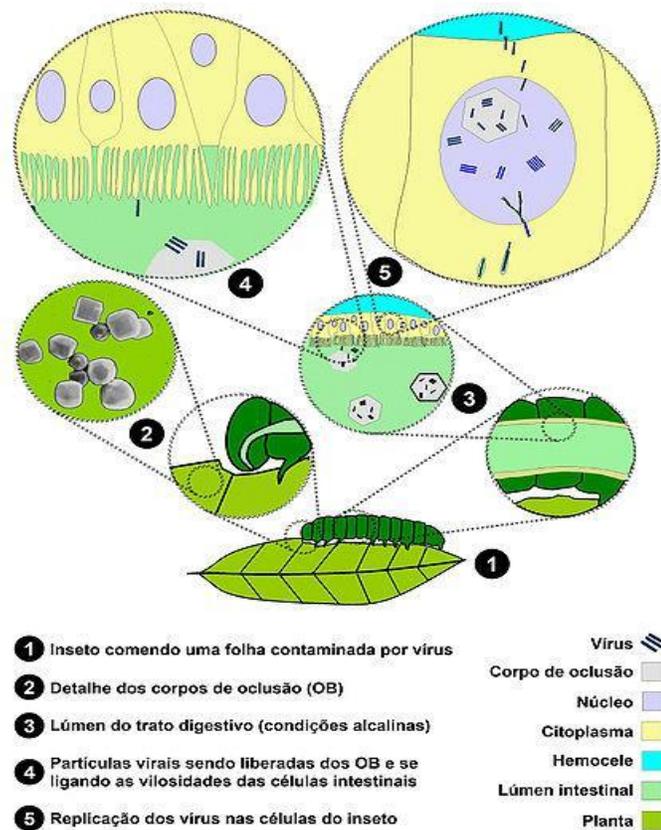
sua transmissão de infecção entre os insetos hospedeiros. Ele é envolto por uma proteína estabelecendo um corpo de oclusão (do inglês, *occlusion body*, OB).

Os autores, Ribeiro et al. (2015) explanam que o processo de infecção dos baculovírus se inicia quando a lagarta se alimenta de plantas contaminadas com os OBs. Esses são solubilizados, pelo pH alcalino, no intestino médio da lagarta, liberando-se partículas virais (ODVs). Essas partículas então atravessam a membrana peritrófica (consiste em uma membrana que reveste o intestino médio) e os nucleocapsídeos se fusionam nas microvilosidades da membrana intestinal. Uma vez internalizados, os nucleocapsídeos são transportados ao núcleo da célula infectada, e assim, liberam seu material genético, iniciando a sua expressão gênica. Essa é dividida em dois estágios: a precoce, onde ocorre a transcrição de genes cujos promotores são reconhecidos pela própria maquinaria da célula e a replicação do seu genoma; e a tardia, na qual, é dada a expressão gênica pós-replicação do DNA viral, também ocorrendo a produção de proteínas responsáveis pela estruturação de novos BVs. Após a infecção, o inseto perde a sua capacidade motora e de se alimentar, pode apresentar clareamento da epiderme, devido ao acúmulo de BVs nas células epidermais e adiposas, desintegra-se e libera alta quantidade de OBs no campo. Esses corpos de oclusão possuem como proteína principal a poliedrina (*polh*), com a funcionalidade de inóculo no campo para garantir a sua sobrevivência e continuar infectando outros hospedeiros (Fig. 2).

O sistema BEV utiliza o promotor do gene da poliedrina (*polh*) na expressão heteróloga. O gene *polh* pode ser fusionado ao gene da proteína de interesse para facilitar a purificação desta fusão por gradiente de sacarose. Esse sistema inclui também utilizar transposições sítio específicas para a expressão no genoma de um dos sistemas do baculovírus, denominado como bacmídeo, por exemplo, o sistema Bac-to-Bac™. Esse sistema usa a transposição específica de Tn7 no processo de desenvolvimento do bacmídeo recombinante, assim dependendo do vetor de transferência. Para o presente trabalho foi utilizado o vetor pFastBac™, onde o gene da metacaspase3 é clonado. Esse

vetor também possui o promotor do gene da poliedrina para sua expressão. Esse sistema possui alguns benefícios relevantes, como a eficiência em algumas alterações pós-traducionais, como na fosforilação e na N-glicosilação, sendo importantes para a imunogenicidade e a função da proteína recombinante (Ribeiro et al. 2015).

Fig. 2. Ciclo de infecção do baculovírus em um hospedeiro Lepidóptero. Na fase 1 e 2 a lagarta está se alimentando de uma folha contaminada com os vírus OBs; na fase 3 e 4 as partículas virais OBs são solubilizadas, pelo pH alcalino, no intestino médio da lagarta e liberam partículas virais ODVs. Assim, atravessam a membrana peritrófica e seus nucleocapsídeos fusionam-se nas microvilosidades da membrana; na fase 5 os nucleocapsídeos são levados para o núcleo da célula do inseto para iniciar sua expressão gênica para a produção de BVs. Em seguida, eles são transportados para outras células via hemolinfa (sistema circulatório) ou via traqueal (sistema respiratório), assim, infectando todo o corpo do inseto.



Fonte: Silva (2016)

Em contrapartida, o sistema de expressão por *E. coli* apresenta vantagens pelo baixo custo, rápida expressão, modificação do genoma com facilidade e a simples manipulação da cultura. Entretanto, esse sistema apresenta limitações em expressar proteínas com ligações dissulfeto em modificações pós traducionais, produção de proteínas com endotoxinas chamadas lipopolissacarídeos (LPS), que em alta densidade resultam em toxicidade celular, e na possível produção de proteínas na configuração de corpos de oclusão, sendo regularmente inativos e insolúveis (Demain and Vaishnav 2011). Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi utilizar a ferramenta BEV pelo sistema comercial Bac-to-Bac™ para a obtenção do gene MCA3 recombinante de *T. cruzi*, para potenciais caracterizações futuras como proteína participante dos processos de morte celular no hospedeiro e como um marcador de imunodiagnóstico para a DC.

2. Material e métodos

O presente trabalho alcançou os objetivos seguindo o plano experimental esquematizado abaixo (Fig. 3).

Fig. 3. Plano experimental.



Fonte: própria

2.1. Análise *in silico*

Nas análises *in silico*, foram utilizados programas que fornecem previsões acerca da proteína metacaspase 3 e obter uma previsão dos sítios de restrição ausentes no gene *TcMCA3*, para desenho subsequente de primers para PCR. As avaliações ocorreram por meio da sequência fasta do gene *TcMCA3* do organismo *T. cruzi*, da qual o número de acesso no banco de dados *nucleotide* (NCBI) é Xm_799145.1. Posteriormente, foi avaliado as propriedades físico-químicas da proteína. Os programas utilizados foram:

- TMHMM v2.0 (Krogh et al. 2001)– previsão de domínios transmembrana, nos

parâmetros padrões;

- SignalP-5.0 (José Juan Almagro Armenteros et al. 2019)– predição de presença de peptídeo sinal, foi alterado o parâmetro organismo para eucarioto;
- TargetP (Jose Juan Almagro Armenteros et al. 2019)– predição da localização sub-celular da proteína, nos parâmetros padrões;
- Blastp – Com objetivo de contrapor a proteína de interesse com o banco de dados da plataforma NCBI, avaliar semelhança desta com os demais organismos e, em particular, com outros protistas patogênicos. Foi alterado o parâmetro “organismo” para “Trypanosomatidae” e “*Leishmania*”.

2.2. Amplificação do gene *TcMCA3*

A amplificação do gene foi por meio da reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase chain reaction* - PCR), e para o gene metacaspase de *T. cruzi* (NCBI ref seq. Xm_799145.1), foram utilizados *primers* específicos. As sequências dos primers são descritas na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 — Primers utilizados nas PCRs. Sítio da enzima de restrição *NcoI* (vermelho), o sítio para a clivagem da proteína resultante por protease fator Xa (verde clara), o sítio de stop códon (verde-escuro). Temperatura média de fusão (T_m) das sequências, os números de bases nitrogenadas presente nos *primers* e as enzimas de restrição correspondente.

| Primer | Sequência (5'-3') | T_m 50nM NaCl | Número de bases | Enzimas de restrição |
|------------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|----------------------------|
| Metacaspase- Forward (MF) | CCATGGGCTTTGATTTGG C | 55.3 °C | 20 | NCO I |

| | | | | |
|---|---|---------|----|-------|
| Metacaspase– Reverse (MR) (protease) | CCATGGTCTGCCCTCAATT GTGGCGACGGCTGGATC | 70.3 °C | 36 | NCO I |
| Metacaspase– Reverse (MRS) (stop códon) | CCATGGTCA TGTGGCGACG GCTGGATC | 66.6 °C | 27 | NCO I |

O sistema de reação de PCR foi realizado em um volume final de 30 µL constituído com os seguintes reagentes, segundo o protocolo do kit de PCR da Invitrogen/Life Technologies: 3 µL de Tampão 10x; 1,0 µL de cada primer (10 uM); 0,9 µL de MgCl₂ [50 µM]; 0,6 µL de dNTPs [10 µM] e 0,4 µL de Platinum® Taq DNA Polimerase [5 unid/µL]. As amostras foram amplificadas no termociclador (Life Touch Bioer) e o programa utilizado foi:

1. Pré-desnaturação: 95°C por 4 min
- 40 X {
 2. Desnaturação: 95 °C por 45 seg
 3. Anelamento: 60 °C por 30 seg
 4. Extensão: 72 °C por 3 min
 5. Extensão final: 72°C por 5 min
6. Final: 12° C *ad infinitum*.

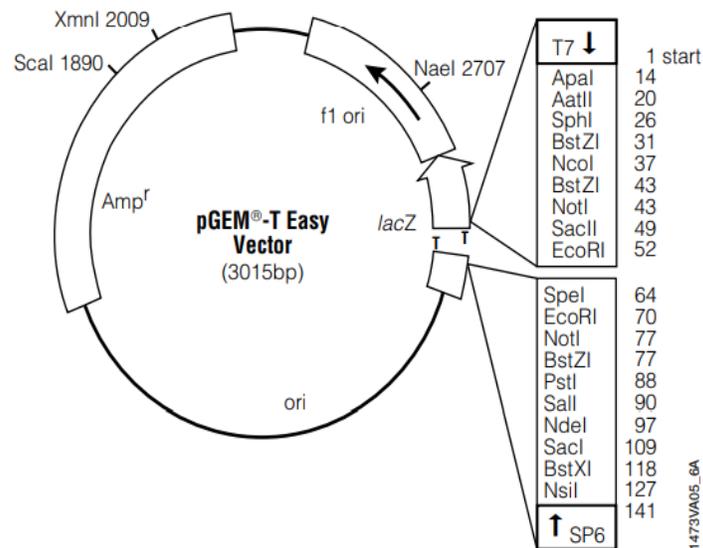
2.3. Análises de DNA em eletroforese em gel de agarose

Os *amplicons* das PCRs, as extrações de DNA plasmidial e as digestões com enzimas de restrição foram visualizadas em eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) com brometo de etídio em concentração de 0,5 µg/mL e o tampão SB 1x, feito a partir da diluição de tampão SB 20x (8 g de NaOH, 45 g de H₂BO₃ em 1 L água deionizada).

2.4. Clonagem do gene

Em seguida, os amplicons foram clonados em plasmídeos pGEM®-T Easy, utilizando o *kit* Promega segundo suas instruções (Fig.4).

Fig 4 — Mapa do vetor pGEM®-T Easy



Fonte: Promega corporation

2.5. Preparo de células termocompetentes

A linhagem bacteriana utilizada para as transformações foi *E. coli* Top 10 (Thermo Fisher Scientific) e essa foi tornada termocompetente de acordo com o protocolo descrito por Inoue (Sambrook and Russel 2001). Uma cultura de 25 mL em meio de lisogenia (LB, triptona 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v)) foi mantida em crescimento por 12 horas a 37°C, sob agitação de 180 rpm. Após esse período, volumes de 10 mL, 4 mL e 1 mL dessa cultura foram inoculadas em 150 mL de meio LB e essas foram deixadas sob agitação de 200 rpm a temperatura de 18°C *overnight*. No dia seguinte, assim que uma dessas culturas atingisse densidade óptica de 0,6 a 600 nm (aferida por espectrofotometria no aparelho Ultrospec 1000 da Pharmacia Biotec), essa

foi transferida para incubação em gelo por 10 minutos. Após isso, a cultura foi centrifugada a 2.500 x g por 10 minutos a 4°C. A seguir, o precipitado foi ressuspensão em 48 mL de tampão TB (10 mM HEPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, pH 6,7). Após nova centrifugação como descrita acima, o precipitado foi ressuspensão em 12 mL de tampão TB acrescido de DMSO na concentração de 7% do volume final. Finalmente, a solução resultante foi incubada em gelo por 10 minutos e então distribuída em alíquotas para congelamento em -80°C.

Nos experimentos abrangentes do sistema Bac-to-Bac™ “*Baculovirus Expression System*” da Invitrogen, foram utilizadas células *Escherichia coli* DH10Bac (Invitrogen) e essas foram tornadas termocompetentes de acordo com Li et al. (2010). Em 500 mL em meio de lisogenia foram adicionados os antibióticos, tetraciclina na concentração final de 15 µg/mL e kanamicina na concentração final de 35 µg/mL. Foi adicionado 5 mL do inóculo e mantido sob agitação moderada a 37 °C até alcançar uma densidade óptica de 0,35 a 0,4 (aferida por espectrofotometria no aparelho Ultrospec 1000 da Pharmacia Biotec) em absorvância de 600nm. Ao atingir a densidade óptica, a cultura foi centrifugada a 1200xg por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação o precipitado foi ressuspensão em 10 mL da solução (CaCl 75 mM e glicerol 15%) e incubado no gelo por 10 minutos. Após a incubação a amostra ressuspendida foi centrifugada novamente a 1200xg por 10 minutos a 4°C e ressuspendida em 4 mL da solução (CaCl 75 mM e glicerol 15%). A solução resultante foi distribuída em alíquotas para congelamento em freezer de -80 °C.

2.6. Transformação em células competente

A transformação das bactérias termocompetentes *E. coli*, da estirpe Top10 e da *E. coli*, da estirpe DH10Bac foi realizada segundo Sambrook e Russel (2001) com pequenas alterações. Para 50 µL de cultura de *E. coli*, foram acrescentados 5 µL da ligação do vetor pGEM-tEASY (Top 10) ou do vetor pFastBac1-6xHis-AcPH (Top 10) ou

do bacmídeo (DH10Bac) e essa foi incubada em gelo por 30 minutos. Em seguida, as culturas foram expostas a banho-maria a 42°C por 90 segundos e novamente incubadas no gelo por 5 minutos. A seguir, foram acrescentados 250 µL de meio SOC (0,5%(p/v) de extrato de levedura, 2%(p/v) de triptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ e 20 mM de glicose) e as culturas foram incubadas em agitação a 180 rpm a 37°C por 1 h. Após esse período, 50 µL foram inoculados em placas de meio LB contendo 50 µg/mL da droga ampicilina, 40 µg/mL de Xgal e 2,5 mM de IPTG para as culturas contendo o vetor pGEM-tEASY. Para culturas contendo o vetor pFastBac1-6xHis-AcPH, foram colocadas 50 µg/mL de ampicilina e 7 µg/mL de gentamicina e para as culturas contendo o vetor bacmídeo foram colocadas as drogas em 35 µg/mL de canamicina, 7 µg/mL de gentamicina e 15 µg/mL de tetraciclina.

2.7. Seleção de bactérias recombinantes

Para as bactérias recipientes dos plasmídeos pGEM-tEASY ou do plasmídeo pFastBac1-6xHis-AcPH ou em bacmídeo, foram selecionadas colônias brancas para o repique em meio LB líquido contendo 50 µg/mL de ampicilina, (plasmídeo pGEM-tEASY); 50 µg/mL de ampicilina e 7 µg/mL de gentamicina (plasmídeo pFastBac1-6xHis-AcPH); 35 µg/mL de canamicina, 7 µg/mL de gentamicina e 15 µg/mL de tetraciclina no bacmídeo. Após esse inóculo, as culturas foram cultivadas sob agitação de 180 rpm a 37°C *overnight*. Após isso, a presença do inserto nas bactérias transformadas foi confirmada por PCR, conforme descrito anteriormente, com 1µL de cultura no lugar do DNA molde.

2.8. Extração de DNA plasmidial

Para a obtenção dos plasmídeos pGEM-tEASY ou pFastBac1-6xHis-AcPH ou bacmídeo, culturas de *E. coli* passaram por uma extração plasmidial segundo o protocolo de minipreparação por lise alcalina contido em Sambrook e Russel (2001).

2.9. Quantificação de DNA plasmidial

As amostras resultantes das preparações de DNA plasmidial, amostras de DNA submetidas à digestão por enzimas de restrição e de purificação foram quantificadas através de espectrofotometria, no aparelho NanoDrop Lite (Thermo Scientific), utilizando 1 μ L da amostra, segundo instruções do fabricante.

2.10. Sequenciamento

Os plasmídeos pGEM-tEASY contendo o gene MCA3 foram encaminhados para o centro de genômica de alto desempenho do DF da Universidade Católica de Brasília usando *primers* T7 e SP6. O sequenciamento foi analisado por meio do programa chromas (disponível para *download* em <http://www.technelysium.com.au/chromas2.html>) e os cromatogramas que não apresentaram mutações do tipo inserção ou deleção foram comparadas com a sequência do banco de dados Nucleotide contido no National Center for Biotechnology Information (NCBI), por meio do programa nBLAST, utilizando os parâmetros padrões.

2.11. Digestão pela enzima de restrição de pGEM-tEASY e pFastBac1-6xHis-AcPH

Os plasmídeos cujos genes não apresentaram mutações do tipo inserção ou deleção comprometedoras à estrutura da proteína resultante, foram digeridos utilizando a enzima de restrição *Nco*I. Em pGEM-tEASY, a digestão ocorreu segundo o protocolo do *kit* Invitrogen™ Anza™ e foi utilizado o tampão Anza™ 10x Red Buffer. Em pFastBac1-6xHis-AcPH, a digestão enzimática foi realizada em conjunto com a fosfatase alcalina seguindo o protocolo do *kit* Invitrogen™ Anza™ e foi utilizado o tampão Anza™ 10x Buffer. As amostras foram incubadas segundo o protocolo do *kit* Invitrogen™ Anza no aparelho termociclador do modelo LifeTouch Bioer.

2.12. Purificação do DNA por gel de agarose

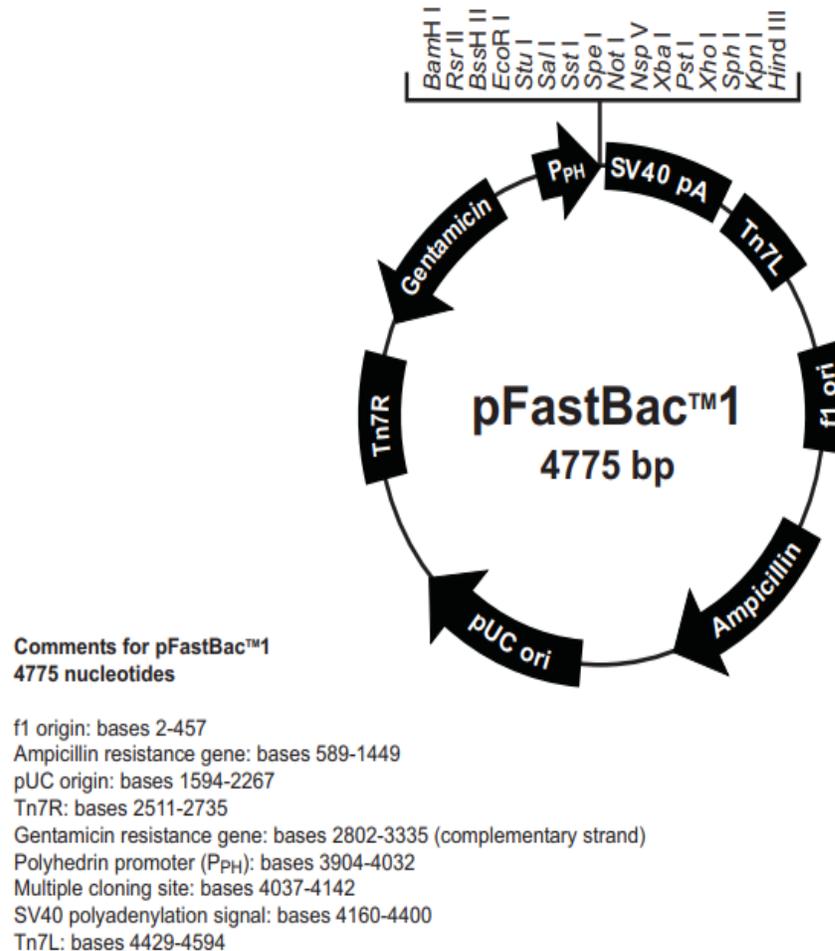
As amostras digeridas do pGEM-tEASY e do pFastBac1-6xHis-AcPH foram purificadas segundo o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e isso se deu conforme as instruções da fabricante.

2.13. Sub-Clonagem no sistema Bac-to-Bac™

O vetor a ser utilizado na sub-clonagem foi construído e cedido para o trabalho em questão pelo Laboratório de Baculovírus do Instituto de Biologia, o vetor pFastBac1-6xHis-AcPH, o qual é derivado do vetor comercial pFastBac1® (Life Technologies), (Fig.5). O vetor produzido possui as seguintes alterações: (1) a presença, apenas, do sítio da enzima de restrição *Nco*I no sítio de múltipla clonagem (2) foi inserido o gene *polh* em N-terminal, com a finalidade de facilitar a purificação do gene de interesse por gradiente de sacarose. Esse vetor foi utilizado no sistema de expressão Bac-to-Bac™ da Life Technologies, representado na Fig.6, segundo Ribeiro et al. (2015). Para confirmar a presença do vetor pFastBac1-6xHis-AcPH das colônias recombinantes, foi realizada uma PCR utilizando os *primers* BACV *Forward* e BACV *Reverse*, listados na Tabela 2. Para confirmar a fusão gênica do gene MCA3 de *T. cruzi* com o gene *polh* de baculovírus e a orientação do inserto, foi realizada uma PCR com *primer* BaCV *Reverse* (Tabela 2) e o *primer* Metacaspase *Forward* descrito na Tabela 1. No bacmídeo, foram utilizados os *primers* pUC/M13 *Forward* e pUC/M13 *Reverse*, descritos na Tabela 2, com a finalidade de confirmar a inserção do gene *TcMCA3* no bacmídeo recombinante segundo o protocolo Bac-to-Bac® *Baculovirus Expression System* da Invitrogen™.

Fig.5. Mapa do vetor pfastBaC™1. O vetor de clonagem possui um promotor do gene da poliedrina (Pph) que permite a expressão eficiente para o gene recombinante; os sítios de múltipla clonagem com diversas enzimas de restrição; o sinal de poliadenilação (SV40) permite a eficiência da transcrição e a poliadenilação do mRNA, protegendo o mRNA de degradações enzimáticas em 5' terminal; sítios de transposição específica Tn7 (Tn7L e Tn7R) para transpor o gene de interesse no bacmídeo; a origem de replicação (f1 ori); o gene de resistência à ampicilina, ela possibilita a seleção do plasmídeo em *E. coli*; a origem de

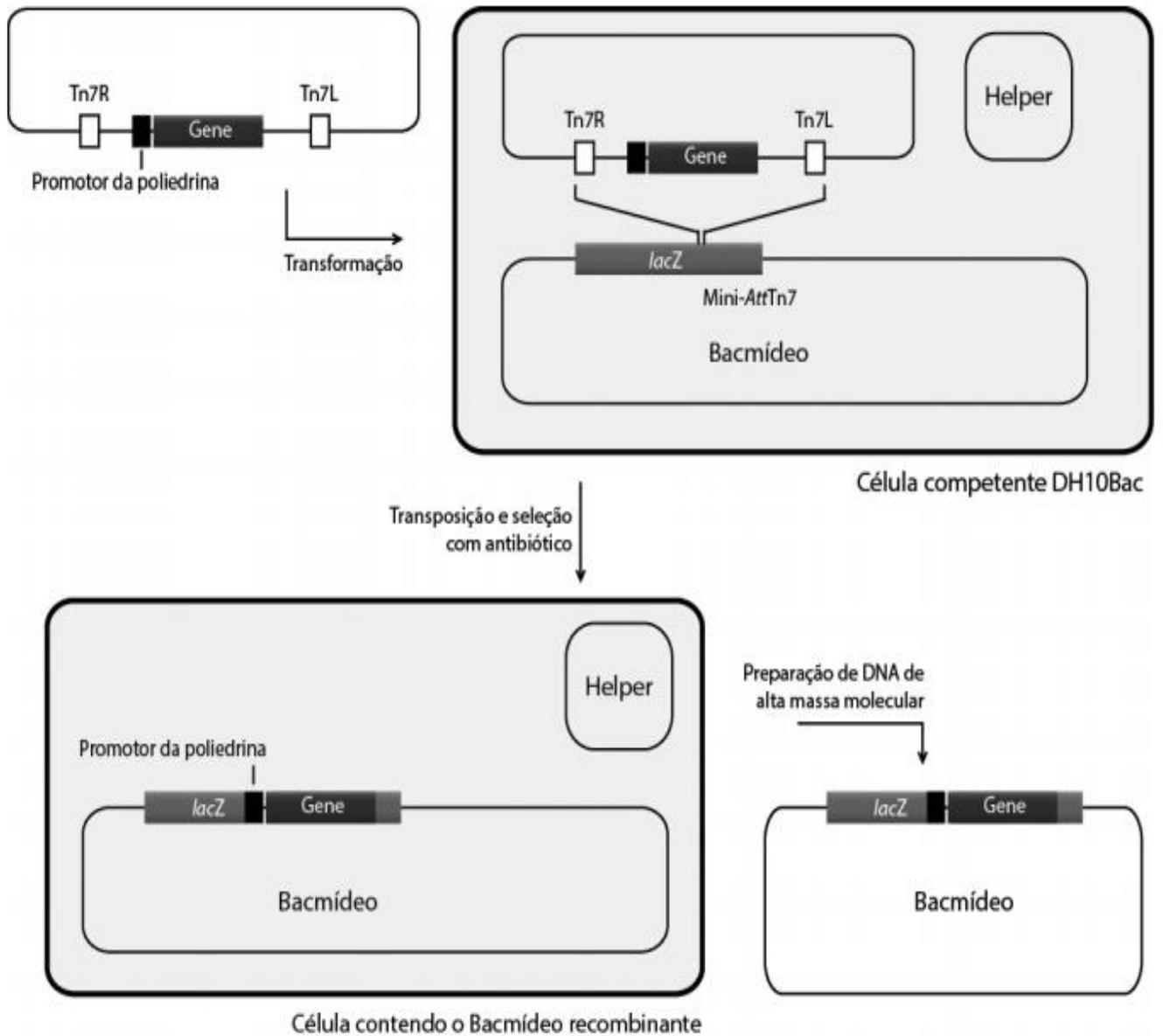
replicação (pUC ori) para manutenção de múltiplas cópias em *E. coli*; o gene de resistência à gentamicina permite a seleção do bacmídeo recombinante nas células DH10Bac™ *E. coli*.



Fonte: Life Technologies

Fig.6 - Esquema representativo do sistema Bac-to-Bac™. O gene *TcMCA3* foi clonado no vetor pFastBac1-6xHis-AcPH. O plasmídeo recombinante foi transformado em DH10Bac, uma linhagem de *E. coli* contendo o genoma íntegro do baculovírus AcMNVP, assim sendo chamado de bacmídeo. A função do plasmídeo *helper* é como um ajudante do bacmídeo, ele expressa proteínas de transposição codificadas que reconhecem os sítios mini Tn7. Esses sítios de transposição permitem a inserção do gene *TcMCA3* no bacmídeo por meio de transposases. Já o bacmídeo deriva do vetor pUC que possui o gene LacZα do

vetor de clonagem, codificante da enzima β -galactosidase. Conferindo colônias com fenótipos semelhantes ao das bactérias com o vetor pGEM-Teasy. Após a recombinação, ele será extraído com a finalidade de se transfectar em célula de inseto.



Fonte: Ribeiro et al. (2015)

Tabela 2 – Primers utilizados nas PCRs. Sequência de nucleotídeos dos primers, temperatura média de fusão (T_m) e o números de bases nitrogenadas dos primers.

| Primer | Sequência (5'-3') | T_m 50 nM NaCl | Número de bases |
|--------------------|---|---------------------------|-----------------------|
| BACV Forward | GGATCCCATATGCATCATCATCATCATTCCATGG | 64,1 | 37 |
| BACV Reverse | GGATCCCTCGAGTTAATACGCCGGACCAGTGAACAG A | 68,6 | 37 |
| pUC/M13 Forward | CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG | 59,6 | 23 |
| pUC/M13 Reverse | AGCGGATAACAATTTCACACAGG | 56,0 | 23 |

O sistema de reação de PCR foi realizado em um volume final de 30 μ L preparado com os seguintes reagentes, segundo o protocolo do kit de PCR da Invitrogen/Life Technologies: 3 μ L de Tampão 10x; 1,0 μ L de cada primer (10 μ M) ; 0,9 μ L de $MgCl_2$ [50 μ M]; 0,6 μ L de dNTPs [10 μ M] e 0,4 μ L de Platinum® Taq DNA Polimerase [5 unid/ μ L]. As amostras foram amplificadas no termociclador (Life Touch Bioer) e o programa utilizado foi:

1. Pré-desnaturação: 95°C por 4 min
 2. Desnaturação: 95 °C por 45 seg
 3. Anelamento: 57 °C por 30 seg
 4. Extensão: 72 °C por 3 min
 5. Extensão final: 72°C por 5 min
 6. Final: 12° C ad infinitum.
- 40 X {

3. Resultados e discussão

3.1. Análise in sílico

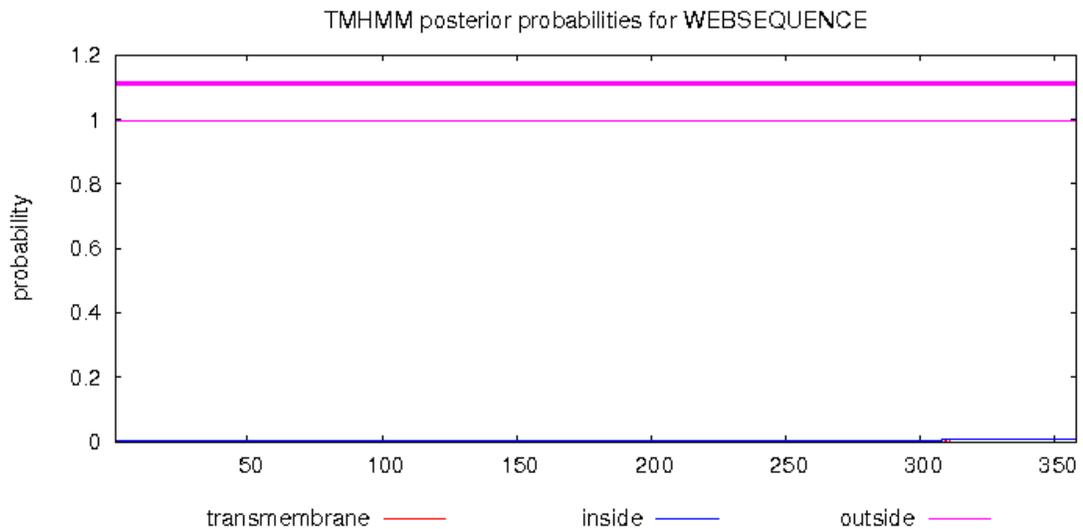
O servidor TMHMM v2.0 apontou a proteína metacaspase3 com uma provável secreção extracelular do organismo *T. cruzi* com uma probabilidade de 100%, Fig.7.

Fig.7. Predição de domínios transmembranas da proteína metacaspase 3.

TMHMM result

[HELP](#) with output formats

```
# WEBSEQUENCE Length: 358
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 0.13488
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.05201
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.00296
WEBSEQUENCE   TMHMM2.0   outside   1   358
```



Fonte: TMHMM v.2.0

O servidor SignalP-5.0 mostrou a proteína sendo secretada, embora tenha uma probabilidade de 1,79% de ser por vias clássicas de peptídeo sinal, é provável ela ser excretada por outras vias, com uma probabilidade de 98%, Fig.8.

Fig.8. Predição de presença de peptídeo sinal da proteína metacaspase3.

Predicted proteins

Sequence
Prediction: Other

| Protein type | Signal Peptide (Sec/SPI) | Other |
|--------------|--------------------------|--------|
| Likelihood | 0.0179 | 0.9821 |

Fonte: SignalP-5.0

O servidor TargetP-2.0 exibiu uma probabilidade de 74% no N-terminal da proteína metacaspase 3 de utilizar uma via não clássica de secreção e a probabilidade de 1,56% de utilizar vias clássicas como peptídeo de trânsito mitocondrial (mTP) na célula, Fig.9.

Fig.9. Predição da localização sub-celular da proteína metacaspase3.

Predicted proteins

Sequence
Prediction: Other

| Protein type | Other | Signal peptide | Mitochondrial transfer peptide |
|--------------|--------|----------------|--------------------------------|
| Likelihood | 0.7499 | 0.2345 | 0.0156 |

Fonte: TargetP-2.0

O servidor BlastP não encontrou similaridades com protozoários do gênero *Leishmania* a partir do gene *TcMCA3* de *T. cruzi*. Esse dado revela um resultado promissor para o gene em relação à especificidade dos resultados em testes sorológicos para o diagnóstico da DC crônica, devido às reações cruzadas que ocorrem nos testes sorológicos entre DC e leishmaniose (Matos et al. 2015).

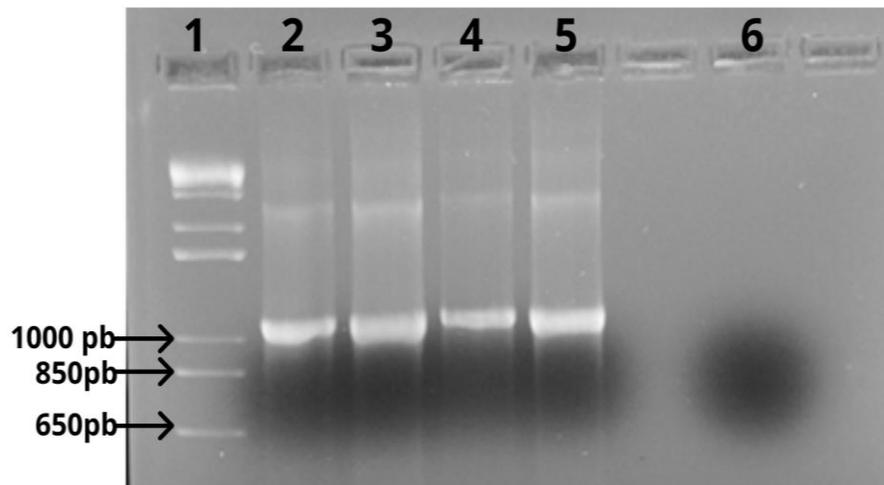
3.2. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Como foi relatado em material e métodos, foram construídos dois *primers* Metacasp *Reverse*. No primer MR foi inserido um sítio para a protease de fator Xa com intuito de posteriormente facilitar a purificação da proteína metacaspase 3 por gradiente de sacarose, assim permitindo a separação da poliedrina fusionada no vetor pFastBac1-

6xHis-AcPH. O primer MRS foi construído com um stop códon impossibilitando a leitura do gene da poliedrina. Esse mecanismo foi uma estratégia preventiva, para possibilitar a purificação da proteína heteróloga por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de níquel.

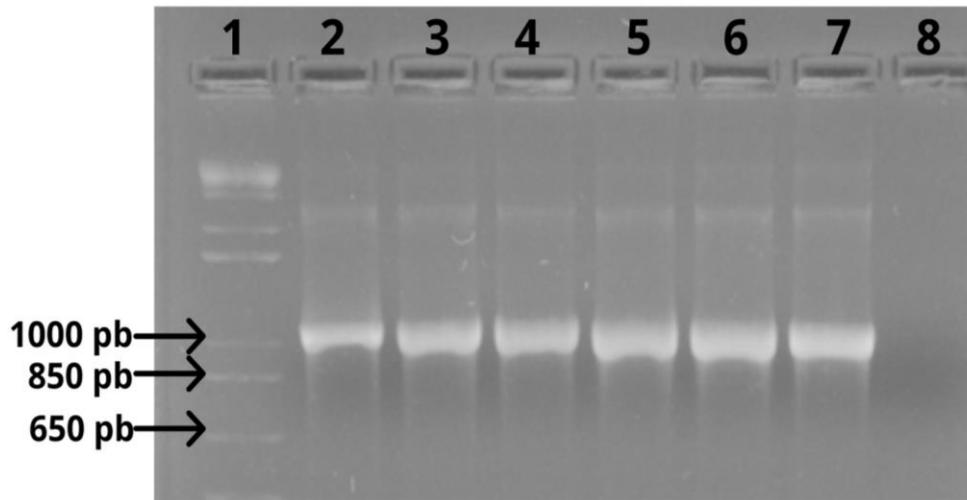
Sendo assim, a reação de polimerização em cadeia (PCR) com os *primers* específicos para o gene TcMCA3 foi realizada com êxito, com *amplicon* esperado de 1078pb e utilizando o programa do termociclador relatado em material e métodos (Fig.10). Os *amplicons* foram ligados em plasmídeos pGEM-tEASY e os seus produtos foram transformados em *E. coli* da estirpe Top10 termocompetentes, como foi mencionado em material e métodos. Foram selecionadas as colônias recombinantes brancas e confirmadas por PCR, como relatado em material e métodos. Após a confirmação do inserto e o descarte das amostras não amplificadas (Fig.11 e Fig.12) foi realizada a extração dos seus plasmídeos como descrito em material e métodos. Os plasmídeos recombinantes cuja presença do gene exógeno foi confirmada por PCR foram enviados para o sequenciamento de seus insertos.

Fig.10. Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR, revelando o produto de amplificação do gene. 1- *Ladder* 1kb plus (Thermo Fisher Scientific), 2 e 3 - Amostra derivada da PCR com o primer MF e o primer MR, 4 e 5 - Amostra derivada da PCR com o primer MF e com o primer MRS e 6 - Controle negativo.



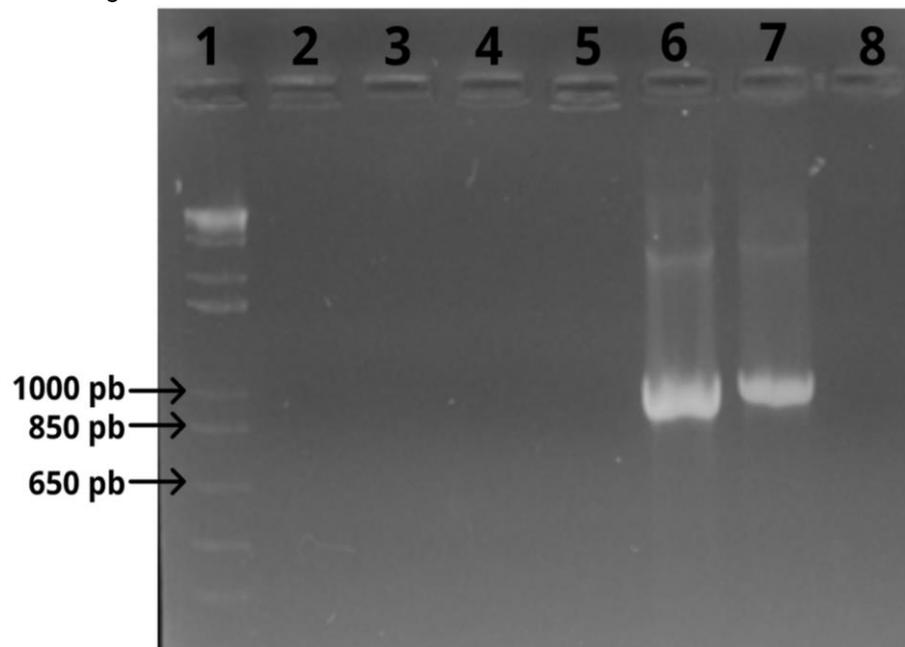
Fonte: própria

Fig.11. Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR, resultado do produto de amplificação do gene. 1 - Ladder 1kb plus (Thermo Fisher Scientific), 2 a 7 — Amostra derivada da PCR com os primers MF e MRS e 8 — Controle negativo.



Fonte: própria

Fig.12- Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR, resultado do produto de amplificação do gene. 1 - Ladder 1kb plus (Thermo Fisher Scientific), 2 a 7 — Amostra derivada da PCR com os primers MF e MR e 8 — Controle negativo.



Fonte: própria

3.3. Sequenciamento dos insertos ligados a pGEM-tEASY

Os insertos foram analisados a partir do sequenciamento dos clones e as amostras 6 e 7 da Figura 12 não apresentaram mutações que alterassem a estrutura da proteína correlata como descrito em material e métodos. Das duas sequências adquiridas, uma apresentou 100% de identidade com o gene metacaspase de *T. cruzi*, Fig .13a, e 93% de cobertura, Fig. 13b. A porcentagem inferior da cobertura é oriunda da sequência do plasmídeo pGEM-tEASY transformado em *E. coli* da estirpe Top10.

Fig.13a -Alinhamento e o resultado da identidade (em vermelho) por nBLAST. Sequência obtida a partir do cromatograma e da sequência de *T. cruzi* do banco de dados NCBI.

Trypanosoma cruzi strain CL Brener metacaspase (Tc00.1047053507297.30) partial mRNA
Sequence ID: [gij71402720|XM_799145.1](#) Length: 1077 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 758 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|-----------------|--|---------------|-----------|-----------|
| 1368 bits(1516) | 0.0 | 758/758(100%) | 0/758(0%) | Plus/Plus |
| Query 51 | ATGGGCTTTGATTTTGGCTGTCGTGTTAAAGCTGTGCAGCACAGTGTGAAGCCGGGTGGA | 110 | | |
| Sbjct 1 | ATGGGCTTTGATTTTGGCTGTCGTGTTAAAGCTGTGCAGCACAGTGTGAAGCCGGGTGGA | 60 | | |
| Query 111 | GCCCCGGGCCAATCAACTACATGGAAATCGGACTGAACCTTATCAAGATTGCAGCCCCG | 170 | | |
| Sbjct 61 | GCCCCGGGCCAATCAACTACATGGAAATCGGACTGAACCTTATCAAGATTGCAGCCCCG | 120 | | |
| Query 171 | TATATTGCCAGTATCTTGGCATTATGGAACGCCACCAGGGTTGACGTTGAGGAGTTC | 230 | | |
| Sbjct 121 | TATATTGCCAGTATCTTGGCATTATGGAACGCCACCAGGGTTGACGTTGAGGAGTTC | 180 | | |
| Query 231 | TTCCAGCAGGCGGAGGTGACGGAGGGTTTTAAGCCGTGGGAGACCAACCCATGTGAGC | 290 | | |
| Sbjct 181 | TTCCAGCAGGCGGAGGTGACGGAGGGTTTTAAGCCGTGGGAGACCAACCCATGTGAGC | 240 | | |
| Query 291 | GGCACCTTTCGTGCCCTTTTTCATCGGCATCAACTACTACGGCACCAGTGCCGAGCTCTCC | 350 | | |
| Sbjct 241 | GGCACCTTTCGTGCCCTTTTTCATCGGCATCAACTACTACGGCACCAGTGCCGAGCTCTCC | 300 | | |
| Query 351 | GGTTGTGCAATGATGTGAAACAAATAATCGCCACTACAAGGAAAAAAGATTCCCATC | 410 | | |
| Sbjct 301 | GGTTGTGCAATGATGTGAAACAAATAATCGCCACTACAAGGAAAAAAGATTCCCATC | 360 | | |
| Query 411 | GACGAGATGAGCATACTTGTGGATGAGAGGGGGTTCCCGGGGCCAACGGCTCCCCACA | 470 | | |
| Sbjct 361 | GACGAGATGAGCATACTTGTGGATGAGAGGGGGTTCCCGGGGCCAACGGCTCCCCACA | 420 | | |
| Query 471 | CGTGACAACATTGTGCGCTACATGGCGTGGCTTGTGGGGGTGCAAAACCGGGTGATGTG | 530 | | |
| Sbjct 421 | CGTGACAACATTGTGCGCTACATGGCGTGGCTTGTGGGGGTGCAAAACCGGGTGATGTG | 480 | | |
| Query 531 | CTCTTATGCACTATTCCGGTACGGCACGCATACCCGTGCGACGAGCGACACGGAGGAG | 590 | | |
| Sbjct 481 | CTCTTATGCACTATTCCGGTACGGCACGCATACCCGTGCGACGAGCGACACGGAGGAG | 540 | | |
| Query 591 | AAATTTGATCAATGCCCTTGCCTCCGCTCGACTTTTCGACTAAGGGCTGCATTCTTGACAAC | 650 | | |
| Sbjct 541 | AAATTTGATCAATGCCCTTGCCTCCGCTCGACTTTTCGACTAAGGGCTGCATTCTTGACAAC | 600 | | |
| Query 651 | GACATTTTCAGAAATTCCTCTCGGGACTGCCACAAGGAGTGCAGTCACTGTCGTATTT | 710 | | |
| Sbjct 601 | GACATTTTCAGAAATTCCTCTCGGGACTGCCACAAGGAGTGCAGTCACTGTCGTATTT | 660 | | |
| Query 711 | GACTGCTGCCACTCTGGCTCCATGCTTGACCTGCCGTACACGTTTGTGGGCAGCAGGAGT | 770 | | |
| Sbjct 661 | GACTGCTGCCACTCTGGCTCCATGCTTGACCTGCCGTACACGTTTGTGGGCAGCAGGAGT | 720 | | |
| Query 771 | TTGAGCAGAAGCGTCGCCGGTACATGCAGCGTATTTCG 808 | | | |
| Sbjct 721 | TTGAGCAGAAGCGTCGCCGGTACATGCAGCGTATTTCG 758 | | | |

Fonte: NCBI

Fig.13b- Resultado da cobertura (em vermelho) por nBLAST. Sequência obtida a partir do cromatograma e da sequência de *T. cruzi* do banco de dados NCBI

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

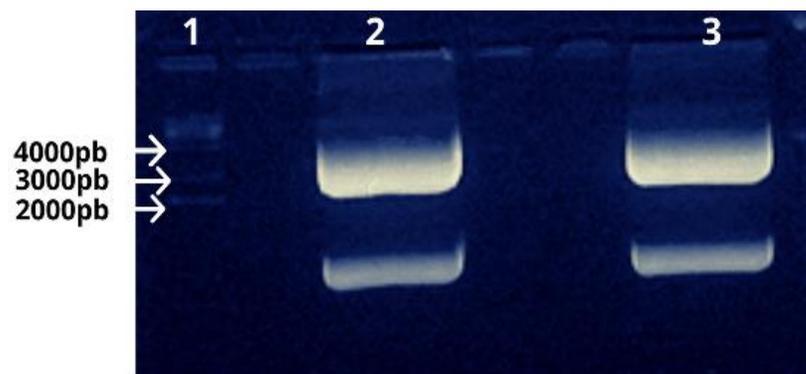
| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|--|
| <input type="checkbox"/> Trypanosoma cruzi strain CL Brener metacaspase (TC00.1047053507.30) partial mRNA | 1296 | 1296 | 93% | 0.0 | 100.00% | gill71402720 NM_799145.1 |

Fonte: NCBI

3.4. Sub-clonagem em pGEM-Teasy e pFastBac™

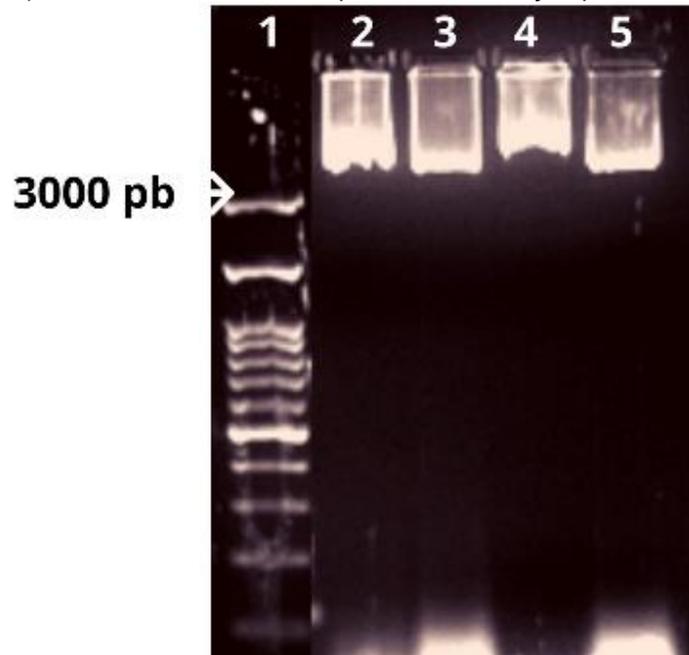
Em virtude dos resultados da análise de sequenciamento, os plasmídeos 6 e 7 da Fig.12 com o inserto foram digeridos com a enzima de restrição *Nco*I e purificados em gel de agarose como relatado em material e métodos. A Fig. 14 mostra a fragmentação do inserto de cerca de 1000 pb e o plasmídeo pGEM-tEASY com altura de cerca de 3000 pb. O plasmídeo pFastBac1-6xHis-AcPH foi transformado em *E. coli* estirpe Top10, extraído, quantificado e visualizado por eletroforese como relatado em material e métodos, o qual o plasmídeo possui cerca de 4700 pb (Fig. 15). Os plasmídeos 2 e 3 da Fig.15 apresentaram resultados consistente após o processo de digestão enzimática, desfosforilação e quantificação do DNA plasmidial como foi descrito em material e métodos. O processo de desfosforilação foi utilizado para impedir a recircularização do vetor com intuito de aumentar a sua eficiência na clonagem.

Fig.14 - Eletroforese em gel de agarose a 1% da digestão, revelando a fragmentação do inserto do plasmídeo. 1 — Ladder 1kb plus (Thermo Fisher Scientific), 2 e 3 — Amostra do produto da digestão enzimática.



Fonte: própria

Fig.15 - Eletroforese em gel de agarose a 1% do plasmídeo recombinante. 1 — Ladder 100 pb plus (Thermo Fisher Scientific), 2,3,4 e 5 — Amostra do produto da extração plasmidial.

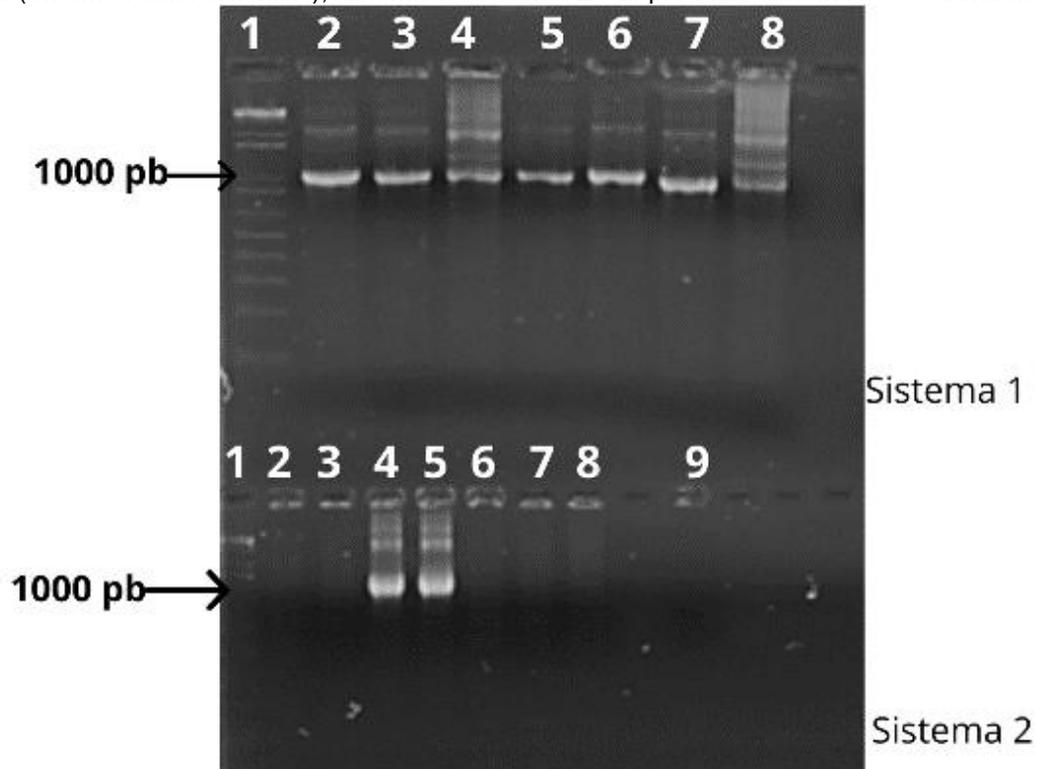


Fonte: própria

As amostras 2 e 3 com o inserto do possível gene da metacaspase 3 da Fig.14 foram transformadas juntamente com o produto da digestão e desfosforilação oriundas da Fig.15 em *E. coli* estirpe Top10 como descrito em material e métodos. Foram selecionadas sete colônias recombinantes e inoculadas no meio LB como descrito em material e métodos. Foi realizada uma PCR dos inóculos a fim de verificar a presença do gene, a orientação do inserto e a fusão gênica no plasmídeo recombinante, utilizando dois sistemas de verificação: no sistema (1) foram utilizados os *primers* metacasp Forward e metacasp Reverse como controle do inserto, e no sistema (2) foram utilizados os *primers* BACV-R, que se anela no sítio do gene da *polh* presente no vetor pFastBac1-6xHis-AcPH e a metacasp Forward a fim de verificar a orientação do inserto e confirmar se ocorreu a fusão gênica entre o gene da metacaspase3 com o gene *polh*, como relatado em material e métodos. Logo, a Fig.16, confirma a presença do inserto pela altura da banda estar em cerca de 1000 pb no sistema 1 e no sistema 2 confirma a orientação e

fusão gênica pela altura da banda estar em cerca de 1000 pb referentes ao marcador molecular nas amostras 4 e 5.

Fig.16 - Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR de confirmação oriunda do inóculo. 1 — Ladder 1 kb plus (Thermo Fisher Scientific), sistema 1 e sistema 2 são produtos da PCR e 9 — Controle negativo.



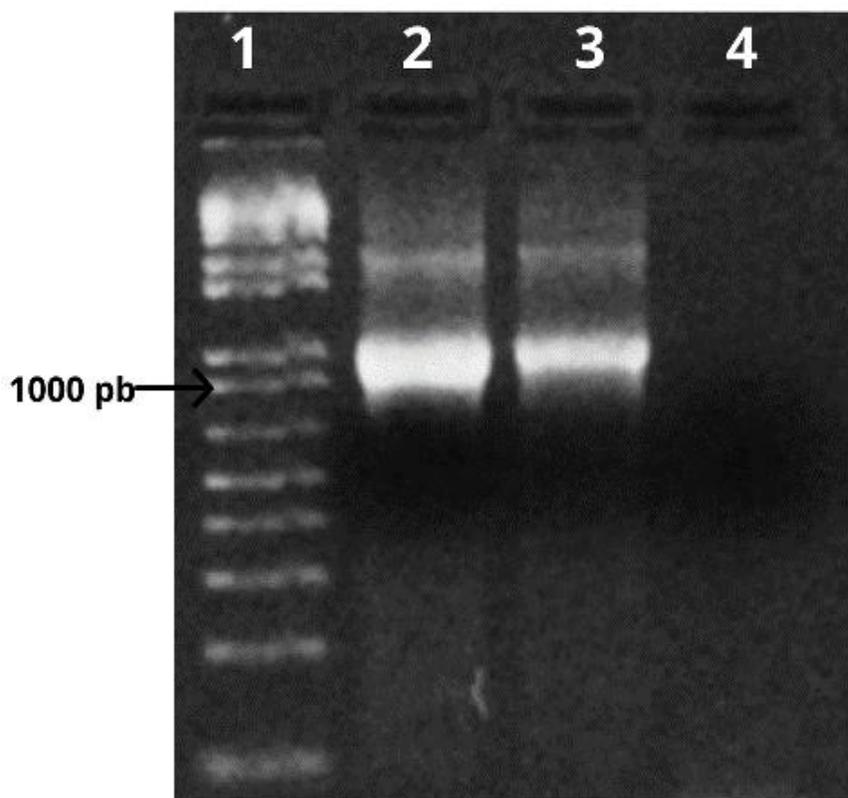
Fonte: própria

3.5. Sub clonagem gênica em baculovírus (bacmídeo) pelo sistema de expressão Bac-to-bac™ do sistema BEV.

Foi realizada uma extração plasmidial das colônias 4 e 5 contendo o gene de interesse no plasmídeo pFastBac1-6xHis-AcPH recombinante, como foi confirmada na Figura 16. Os produtos da extração foram transformados no plasmídeo DH10Bac. Foram selecionadas as colônias recombinantes e inoculadas no meio LB, após o crescimento *overnight*, realizou-se uma extração plasmidial e uma PCR de confirmação do possível gene MCA3 no plasmídeo DH10Bac com os primers metacasp *Forward* e metacasp

Reverse como relatado em materiais e métodos. Da análise eletroforética dos produtos da PCR, foi confirmada a presença do gene de interesse pela altura de banda de aproximadamente 1000 pb (Fig.17).

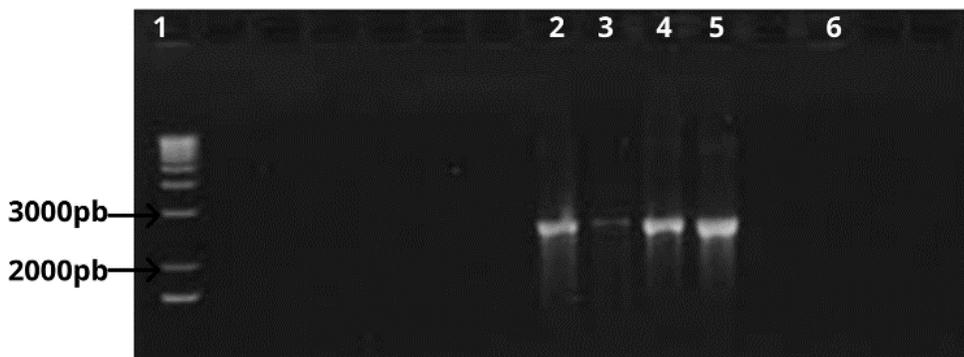
Fig.17 - Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR de confirmação. 1 — Ladder 1 kb plus (Thermo Fisher Scientific), 2 e 3 - produtos da PCR e 4 -controle negativo.



Fonte: própria

Para as amostras confirmadas, foi realizada uma nova PCR a fim de certificar a presença do inserto no bacmídeo recombinante com os *primers*, pUC/M13 Reverse e metacasp Forward como relatado em material e métodos. Na Fig.18 os resultados eletroforéticos da PCR foram efetivos por apresentar uma altura do bacmídeo recombinante com o gene metacaspase entre 2000 pb e 3000 pb.

Fig.18 - Eletroforese em gel de agarose a 1% da PCR de confirmação. 1 — Ladder 1 kb plus (Thermo Fisher Scientific), 2,3,4 e 5 - produtos da PCR e 6 - controle negativo.



Fonte: própria

4. Considerações finais

Diante dos resultados, pôde-se concluir que a obtenção do bacmídeo recombinante com o gene MCA3 de *T. cruzi* pelo sistema Bac-to-Bac™ (Invitrogen) foi bem sucedida. Como perspectiva, o trabalho necessita de um prosseguimento para observar a eficiência da expressão heteróloga pelo sistema BEV em células de inseto, a purificação por gradiente de sacarose e a realização de um imunoenensaio com a proteína metacaspase3 para observar seu potencial em imunodiagnóstico em DC pelo método ELISA. Pelo fato da proteína TcMCA não possuir muitos dados na literatura em relação aos processos da PCD em *T. cruzi* é necessário avaliar os possíveis papéis para a morte celular do parasito e das células hospedeiras do mamífero.

5. Referências bibliográficas

Armenteros, Jose Juan Almagro, Marco Salvatore, Olof Emanuelsson, Ole Winther, Gunnar Von Heijne, Arne Elofsson, and Henrik Nielsen. 2019. "Detecting Sequence Signals in Targeting Peptides Using Deep Learning." *Life Science Alliance* 2 (5): 1–14. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900429>.

Armenteros, José Juan Almagro, Konstantinos D. Tsirigos, Casper Kaae Sønderby,

Thomas Nordahl Petersen, Ole Winther, Søren Brunak, Gunnar von Heijne, and Henrik Nielsen. 2019. "SignalP 5.0 Improves Signal Peptide Predictions Using Deep Neural Networks." *Nature Biotechnology* 37 (4): 420–23.

<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>.

Assis Da Silva, Leonardo. 2016. "UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA FACULDADE DE MEDICINA PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR Expressão de Antígenos Virais Fusionados a Uma Proteína Formadora de Corpos de Oclusão de Um Vírus de Inseto." <https://repositorio.unb.br/handle/10482/23068>.

Bonney, Kevin M, Daniel J Luthringer, Stacey A Kim, Nisha J Garg, and David M Engman. 2018. "Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease." *The Annual Review Of Pathology: Mechanisms of Disease* 14 (1): 419–45.

<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>.

Brener, Zigman. 1997. *Typanosoma Cruzi: Morfologia e Ciclo Evolutivo*. Edited by FIOCRUZ. *Clínica e Terapêutica Da Doença de Chagas: Uma Abordagem Prática Para o Clínico Geral(Online)*. Rio de Janeiro: SciELO Books - Sociedade Brasileira de Zoologia. <http://books.scielo.org/id/nf9bn/03>.

Coura, José Rodrigues, and João Carlos Pinto Dias. 2009. "Epidemiology, Control and Surveillance of Chagas Disease - 100 Years after Its Discovery." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104 (SUPPL. 1): 31–40. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900006>.

Demain, A. L., and P. Vaishnav. 2011. "Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms." *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* 3 (3): 333–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00542-0>.

Dias, João Carlos Pinto, Alberto Novaes Ramos Jr., Eliane Dias Gontijo, Alejandro Luquetti, Maria Aparecida Shikanai-Yasuda, José Rodrigues Coura, Rosália Moraes

- Torres, et al. 2016. "Il Consenso Brasileiro Em Doença de Chagas, 2015." *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 25 (21): 1–10. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000500002>.
- Gasques, Luciano Seraphim, Paulo Alexandre Galvanini, Fernando Favaretto, Tamara Francislaine Santana, and João Alencar Pamphile. 2013. "Independência Ou Morte: A Apoptose Como Mecanismo de Defesa." *Arquivos de Ciências Da Saúde Da UNIPAR* 17 (1): 49–53.
<http://revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/4979/2905>.
- Grivicich, Ivana, Andréa Regner, and Andriana Brondani da Rocha. 2007. "Morte Celular Por Apoptose." *Revista Brasileira de Cancerologia*, April 2007.
http://www1.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao4.pdf.
- Hatice, Yorulmaz. 2015. "Apoptosis and Infections." In *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*, 233. InTech. <https://doi.org/10.5772/61306>.
- Kosec, Gregor, Vanina E Alvarez, Fernán Agüero, Daniel Sánchez, Marko Dolinar, Boris Turk, Vito Turk, and Juan J Cazzulo. 2006. "Metacaspases of Trypanosoma Cruzi: Possible Candidates for Programmed Cell Death Mediators." *Molecular and Biochemical Parasitology* 145 (1): 18–28.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.09.001>.
- Krogh, Anders, Bjorn Larsson, Gunnar von Heijne, and Erik L L Sonnhammer. 2001. "Predicting Transmembrane Protein Topology with a Hidden Markov Model: Application to Complete Genomes." *Journal of Molecular Biology* 305: 567–80.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>.
- Lana, Marta de, and Washington Luiz Tafuri. 2011. "Trypanossoma Cruzi e Doença de Chagas." In *Parasitologia Humana*, edited by David Pereira Neves, Alan Lane de Melo, Pedro Marcos Linardi, and Ricardo W. Almeida Vitor, 11º, 85. São Paulo:

Atheneu.

- Li, Xiaowei, Yan Zhang, Yan Zhao, Ying Zhai, Qingyu Wang, Xin Sui, and Yepeng Sun. 2010. "An Improved Calcium Chloride Method Preparation and Transformation of Competent Cells." *African Journal of Biotechnology* 9 (50): 8549–54. <https://doi.org/10.5897/AJB10.105>.
- Matos, Haroldo José de, Ana Yecê das Neves Pinto, Antonio Marcos Mota Miranda, Fernanda Lúcia Cardoso Silva, and Francisco Lúzio de Paula Ramos. 2015. "Reação Cruzada Nos Testes Sorológicos Entre Doença de Chagas e Leishmaniose Visceral Em Regiões Endêmicas Para Ambas as Doenças." *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 6 (1): 65–68. <https://doi.org/10.5123/s2176-62232015000100007>.
- Menna-Barreto, Rubem Figueiredo Sadok, and Solange Lisboa de Castro. 2015. "Between Armour and Weapons — Cell Death Mechanisms in Trypanosomatid Parasites." In *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*, 196–230. <https://doi.org/10.5772/61196>.
- Minina, E A, N S Coll, H Tuominen, and P V Bozhkov. 2017. "Metacaspases versus Caspases in Development and Cell Fate Regulation." *Cell Death and Differentiation*. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.18>.
- Ministério da Saúde. 2015. "Boletim Epidemiológico. Chagas Aguda No Brasil: Série Histórica de 2000 a 2013." *Secretaria de Vigilância Em Saúde* 46 (2358–9450): 1–9. <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020..pdf>.
- Opas. 2009. "Doença de Chagas." *Guia Para Vigilância , Prevenção, Controle e Manejo Clínico Da Doença e Chagas Aguda Transmitida Por Alimentos*, 92. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_prevencao_doenca_chagas.pdf.

- OPAS. 2020. “OPAS/OMS Brasil - Dia Mundial Da Doença de Chagas: Trazendo Uma Doença Esquecida à Atenção Mundial.” 2020.
https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6144:dia-mundial-da-doenca-de-chagas-trazendo-uma-doenca-esquecida-a-atencao-mundial&Itemid=812.
- Pérez-Molina, José A, and Israel Molina. 2018. “Chagas Disease.” *The Lancet* 391 (12): 82–94. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).
- Ribeiro, Bergmann M, Fabrício S Morgado, Daniel M. P Ardisson-araújo, Leonardo S Silva, Fábria P Cruz, and Lorena C. S Chaves. 2015. “Baculovírus Para Expressão de Proteínas Recombinantes Em Células de Insetos.” In *Biotecnologia Aplicada à Saude: Fundamentos e Aplicações*, edited by Rodrigo R. Resende, 1^a, 256–306. São Paulo: Blucher.
- Sambrook, Joseph, and David W. Russel. 2001. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. 3^a. Vol. 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Tanowitz, Herbert B., Louis M. Weiss, and Susan P. Montgomery. 2011. “Chagas Disease Has Now Gone Global.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (4): 4–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001136>.
- Vinhaes, Márcio Costa. 2013. “Vulnerabilidade de Municípios Brasileiros Para Ocorrência de Triatomíneos Sinantrópicos Baseada Em Indicadores Sociais, Demográficos, Epidemiológicos, Entomológicos e Ambientais.” Brasília-DF: Universidade de Brasília.
- Westphalen, Elizabeth Visone Nunes Araújo;, Márcia Conceição Bisugo, and Maria de Fátima Lereno Araújo. 2012. “Aspectos Epidemiológicos e Históricos Do Controle Da Doença de Chagas No Continente Americano.” *Secretaria de Estado Da Saúde de São Paulo* 9 (105): 17–34.

<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/bepa/v9n105/v9n105a02.pdf>.

Wong, Ada Hang-Heng, Chuangye Yan, and Yigong Shi. 2012. "Crystal Structure of the Yeast Metacaspase Yca1." *Biological Chemistry* 287: 29251–29251.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381806>.