

## **Una peptidasa ácida, insensible a inhibidores clásicos, en extractos proteicos de *Trypanosoma cruzi*, proveniente de una zona rural de Venezuela, endémica para la enfermedad de Chagas.**

Edgar Armando Zambrano, Henry Samuel de la Cruz y Blanca Elena Coita.

Laboratorio de Bioquímica de Parásitos, Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina. Caracas, Venezuela.

**Palabras clave:** peptidasa, inhibidores de peptidasas, *Trypanosoma cruzi*.

**Resumen.** Mediante dos métodos de ensayo de peptidasas, uno en fase líquida y otro en fase gel (zimografía en geles), se detectó una peptidasa, en extractos proteicos crudos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, provenientes de un área rural de Venezuela endémica para el mal de Chagas. La peptidasa mostró actividad en el intervalo de pH comprendido entre 2,0 y 2,9. Bajo las condiciones experimentales descritas, la peptidasa resultó insensible a concentraciones usuales de inhibidores clásicos de peptidasas de tipo: serina, cisteína, metalo-peptidasas y aspártico. No obstante, a semejanza de la pepsina porcina a pH 2,9, la peptidasa es inhibida en presencia de 5mM DTT.

**Description of an acidic peptidase, insensitive to classical inhibitors, in protein extracts of *Trypanosoma cruzi*, from a rural area of Venezuela, where Chagas disease is endemic.**

*Invest Clin* 2013; 54(3):270 - 283

**Keywords:** peptidase, peptidase inhibitors, *Trypanosoma cruzi*.

**Abstract.** Through two peptidase assay methods, one in liquid-phase and another, in gel-phase (gel zymography), an acid peptidase was detected in protein crude extracts of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*, from a rural area of Venezuela where Chagas disease is endemic. The peptidase shows activity at a pH range between 2.0 and 2.9. Under the experimental conditions

described, the acid peptidase was insensitive to usual concentrations of peptidase inhibitors of the types: serine, cysteine, aspartic and metallo-peptidases. Nevertheless, like porcine pepsin at pH 2.9, the peptidase was inhibited in the presence of 5mM DTT.

Recibido: 31-01-2013. Aceptado: 04-07-2013

## INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) un protozoo, parásito intracelular, es el agente causante de la enfermedad de Chagas, endémica de América Latina, en donde entre el 30 al 40% de los individuos infectados desarrollan una enfermedad crónica debilitante, caracterizada por cardiomiopatía y/o trastornos digestivos que produce entre 20.000 a 50.000 muertes anuales (1). La Organización Mundial de la Salud estima 200.000 nuevos casos de la enfermedad de Chagas anuales, lo que representa, después de la malaria y la esquistosomiasis, la tercera infección parasitaria más común en todo el mundo (2, 3). En Venezuela, según el último anuario de mortalidad del Ministerio del Poder Popular para la Salud, el Chagas, causó 744 decesos, ocupando el puesto dieciocho de las causas de muerte ocurridas en nuestro país (4).

La enfermedad de Chagas constituye un importante problema de salud pública, debido a que no se han desarrollado vacunas y no existen medicamentos profilácticos para prevenir la infección por *T. cruzi*. Aún más, desde 1960, el benznidazol y nifurtimox, son los únicos medicamentos aprobados para el tratamiento de la enfermedad, estos fármacos son efectivos durante la fase aguda de la infección, pero, tienen escasa efectividad en la fase crónica de la enfermedad (5). Por tal situación, actualmente se realizan esfuerzos, tanto para el desarrollo é identificación de nuevos enfoques quimioterapéuticos (6) y/o en el desarrollo de una vacuna (7).

En otro orden de ideas, las enzimas proteolíticas, proteinasas, proteasas o peptidasas, son un grupo diverso de biomoléculas, cuya función catalítica es hidrolizar los enlaces peptídicos presentes en proteínas y péptidos. Dependiendo del aminoácido o ion que participa en el mecanismo molecular de hidrólisis del enlace peptídico, las peptidasas se clasifican en: proteinasas de tipo: serina, treonina, cisteína, metalo, aspártico y glutámico (8).

Las peptidasas, desempeñan funciones regulatorias de procesos fisiológicos celulares fundamentales, como por ejemplo: ciclo celular, apoptosis, autofagia, repuesta inmune, cicatrización, digestión. Donde su acción, es estrictamente controlada, la desregulación de la actividad de tales enzimas, ha sido evidenciada en numerosas patologías, entre las que mencionaremos: diabetes, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer (9).

El estudio de las peptidasas en parásitos protozoarios ha atraído considerable atención en la última década, ya que algunas de estas enzimas, desempeñan un importante papel en la interacción hospedero/parásito, como factores de virulencia, que promueven: destrucción tisular, inflamación, evasión de la respuesta inmune. Un ejemplo particular en *Trypanosoma cruzi*, lo representa la oligopeptidasa B, una serina proteasa, que participa en la invasión del parásito a células del hospedero (10, 11). Las peptidasas, también participan en la fisiología del parásito, por ejemplo, la degradación de proteínas del hospedero para su nutrición (12).

De lo anteriormente expuesto, se deduce, que las peptidasas, son prometedoras dianas para el diseño de novedosos agentes antimicrobianos y/o vacunas, contra la enfermedad de Chagas. En el presente trabajo, se aportan evidencias que sugieren, la existencia de una actividad peptidasa ácida inédita, insensible a inhibidores clásicos de proteasas, incluyendo la pepstatina A, detectada en extractos de proteínas crudos, de un aislado de *Trypanosoma cruzi*, proveniente de una zona rural de Venezuela, endémica para el mal de Chagas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los inhibidores de proteasas tipo serina: fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF.; tipo cisteína: L-trans-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino)-butano (E64); tipo ácido aspártico: pepstatina-A; tipo metaloproteasas: ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el solvente dimetilsulfóxido (DMSO), el ácido fórmico y el cloruro de calcio, fueron obtenidos de Calbiochem (San Diego, Estados Unidos).

Los reactivos para estimar la concentración de proteínas, mediante reacción del ácido bicinonónico (BCA™) usando albúmina bovina como estándar; los reactivos para medir actividad de proteasas: Quanti Cleave™ Protease Assay Kit; el reactivo para lisar y extraer proteínas de células Y-Per™ protein Extraction Reagent; el reactivo quimioluminiscente Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate fueron de Thermo Fischer Scientific. Inc. (Rockford, Estados Unidos).

Dodecilsulfato de sodio (SDS), Tris, glicina, persulfato de amonio, de BIO-RAD (Hercules, Estados Unidos).

Glicerol, bromofenol, Tritón X-100, azida de sodio, gelatina libre de proteasas, proteasas de referencia: pepsina porcina, tripsina, papaína y colagenasa, hemoglobi-

na, anticuerpo monoclonal anti alfa-tubulina de Sigma (San Louis, Estados Unidos).

El anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, Estados Unidos).

El patrón de pesos moleculares provino de Bench Mark™ Invitrogen (Nueva York, Estados Unidos).

## Cultivo y lavado de Epimastigotes de aislado de *T. cruzi*

El aislado de campo de *T. cruzi* fue obtenido por xenodiagnóstico, como ha sido previamente descrito por Carrasco (13), a partir de mamíferos de vida silvestre (*Didelphis marsupialis*), capturados transitoriamente, en áreas rurales del estado Sucre de Venezuela. El aislado fue crecido en medio bifásico agar-sangre, seguido por cultivo en medio RPMI 1640 suplementado, como ha sido descrito por Miles (14). Los epimastigotes, se cosecharon en fase logarítmica de crecimiento, a una densidad promedio de alrededor a  $2 \times 10^7$  parásitos/mL (15), se lavaron tres veces consecutivas ( $900 \times g$ , 15 min) con buffer Tris- salino: 10 mM Tris-Cl pH 7,5, 150 mM NaCl a 4°C. Al final del tercer lavado, el sedimento se pesó y dependiendo de la disponibilidad de parásitos, se disolvió a una relación mínima entre 6-9 mg o máxima entre 12 a 18 mg, en un volumen final de 1,63 mL de buffer formiato 50 mM pH 2,9, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, suplementado con 1mM PMSF, 0,1 mM E64, 5 mM EDTA (Buffer formiato suplementado con inhibidores de peptidasas).

## Lisis de epimastigotes, obtención de extractos proteicos crudos

Los epimastigotes se lisaron por sonicación, usando un sonicador Branson, modelo 250, a una potencia de 12 watts, -14°C en tubos plásticos (polipropileno) de 15mL

de capacidad, fondo cónico, sumergidos en etanol-hielo, en algunos casos preliminares, se usaron tubos de micro-centrífuga de 1,5 mL (ver más adelante). El procedimiento total duro 2 min, divididos en seis eventos de 20 segundos de duración, con pausas de 30 segundos. El sonicado, se centrifugó a  $12000 \times g$  por 30 min a  $4^{\circ}C$ , se recuperó el sobrenadante (extracto proteico crudo), las proteínas se estimaron mediante el ensayo BCA™ Pierce y los ensayos de actividad peptidasa se realizaron inmediatamente.

#### **Efecto de la pre-incubación con distintas concentraciones de pepstatina A, sobre peptidasa presente en extracto crudo de *T. cruzi* y sobre la pepsina porcina**

Entre 15 y 25  $\mu g$  de proteínas totales del extracto proteico crudo, contenidos en 292,5  $\mu L$  de buffer formiato suplementado con coctel de inhibidores de peptidasas o sin el coctel, se preincubaron por 60 min a temperatura ambiente, con distintas concentraciones finales de pepstatina A, a saber: 1, 10, 20 y 100  $\mu M$ , en un volumen final de 300  $\mu L$ . En las distintas condiciones, el volumen de inhibidor (7,5  $\mu L$ ) fue a lo sumo, el 2,5% del volumen final de reacción. Controles, consistiendo de 2,5% DMSO v/v, se realizaron, para descartar la acción de este solvente, sobre la peptidasa ácida de *T. cruzi* y/o la pepsina (16). La pepstatina A y los otros inhibidores excepto el EDTA, se disolvieron en DMSO. Al final de la pre-incubación, se determinó el efecto de las distintas concentraciones del inhibidor, sobre la actividad de la peptidasa ácida, empleando hemoglobina como sustrato (ensayo en fase líquida) y/o gelatina (ensayo en fase gel, zimografía en gel). Con el propósito de verificar la eficacia del inhibidor pepstatina A en las condiciones experimentales descritas, se estudió el efecto de la pre-incubación de la pepsina porcina y con el inhibidor, en relación a la condición control, 2,5% v/v de DMSO en buffer formia-

to, suplementado o sin suplemento, con inhibidores de peptidasas. Luego se realizó la reacción de hidrólisis de hemoglobina. Ver próxima sección.

#### **Ensayos de actividad peptidasa en fase líquida. Hidrólisis de hemoglobina**

La actividad de la peptidasa ácida, presente en los extractos proteicos crudos y de la pepsina porcina, se determinó en fase líquida, empleando el método original de Anson (17) con ligeras modificaciones al ensayo original como describe Hirasawa (18). Brevemente, distintas cantidades de pepsina, que variaron entre un mínimo de 14,6  $\mu g$  a un máximo de 219,4  $\mu g$  totales, se pre-incubaron por una hora a temperatura ambiente con diferentes concentraciones finales de pepstatina A: 0,1, 1, 10 y 100  $\mu M$  y 5 mM DTT, en un volumen final de 300  $\mu L$  de buffer formiato pH 2,9. Al final de la pre-incubación, 80  $\mu L$  de pepsina pre-incubada o sin pre-incubación con el inhibidor (DMSO al 2,5% v/v) conteniendo (entre 8 a 80  $\mu g$  totales de la enzima) u 80  $\mu L$  extracto crudo de *T. cruzi*, conteniendo entre 2 a 7  $\mu g$  de proteínas totales en buffer formiato, se añadieron a 400  $\mu L$  de hemoglobina al 0,2% p/v en buffer 50 mM formiato pH 2,9, 100 mM NaCl, 5 mM  $CaCl_2$ , 0,025%  $NaN_3$ , contenidos en tubos de micro-centrífuga de 1,5 mL de capacidad, pre-equilibrados a  $43 \pm 0,1^{\circ}C$  por 30 min, en bloque de calentamiento VWR brand™.

La reacción se incubó por una hora, para el caso de la pepsina (en algunos casos por 19 horas, cuando la cantidad total de pepsina añadida a la hemoglobina fue de 8  $\mu g$ ) y por 19 horas, para el caso de el extracto crudo de *T. cruzi*. La reacción se finalizó, por precipitación de las proteínas mediante, la adición de 800  $\mu L$  de ácido tricloroacético al 5% v/v frío, se agitó vigorosamente y dejó 30 min en hielo, luego se centrifugó a  $10000 \times g$  a  $4^{\circ}C$  por 15 min, se retiró cuidadosamente el sobrenadante y

se midió la absorbancia correspondiente a los péptidos solubles a 280 nm. Para cada condición, el ensayo se realizó por triplicado. Se usó un espectrofotómetro Smartspec 3000™ BIO-RAD y cubetas de cuarzo semi-micro de BIO-RAD, para medir la absorbancia a 280 nm, en un volumen de 0,5 mL de cada sobrenadante.

Previamente, se verificó bajo condiciones experimentales y tiempos reacción descritos, cantidades crecientes, (en un intervalo entre 2 y 6  $\mu\text{g}$  totales de proteínas extraídas de *T. cruzi*), producen un incremento de hidrólisis del sustrato que resultan en un aumento gradual de la absorbancia a 280 nm, en un intervalo entre 0,01 y 0,15 unidades de absorbancia. Ensayos similares se realizaron para la pepsina entre 8 y 80  $\mu\text{g}$  totales que producen entre 0,07 a 1,2 unidades de absorbancia.

En cada ensayo se usaron los siguientes blancos: absorbancia cero, absorbancia de los reactivos, 480  $\mu\text{L}$  de buffer de formiato suplementado con inhibidores, sin hemoglobina disuelta, tratado con 800  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 5% v/v, de forma idéntica a como ha sido descrito. Absorbancia cero, blanco.

La absorbancia correspondiente a los péptidos solubles liberados por hidrólisis espontánea de la hemoglobina, en ausencia de enzimas añadidas, a tiempos y condiciones de reacción. Este valor se resta a la absorbancia blanco. (Ver más adelante ensayos preliminares, inactivación térmica).

En cada caso, se reporta el valor de absorbancia neta, valor correspondiente a la acción de las enzimas (pepsina o extracto proteico de *T. cruzi*) en presencia de DMSO, comparado al valor de enzimas pre-tratadas con pepstatina A, luego de haber sustraído el valor de la hidrólisis espontánea de hemoglobina y la absorbancia blanco.

Adicionalmente, preliminarmente se verificó, que la adición al sustrato (hemo-

globina disuelta 0,2% p/v en buffer formiato) de cantidades equivalentes en proteínas a las usadas en los ensayos con el extracto proteico de *T. cruzi*, previamente inactivadas por desnaturalización térmica, mediante el calentamiento de la suspensión de parásitos por 5 min a 100°C. Tales extractos (luego del tratamiento de precipitación de proteínas con ácido tricloroacético), resultaron en la producción de péptidos solubles, idénticos a los valores obtenidos, para la hidrólisis espontánea de la hemoglobina.

La inactivación térmica se realizó de la siguiente manera, 294  $\mu\text{L}$  de suspensión de parásitos en buffer formiato, se le añadió 6  $\mu\text{L}$  de SDS al 10% p/v, para lograr una concentración final de 0,2% v/v SDS, en tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, el tubo se mezcló gentilmente con vortex suave y sumergió inmediatamente en agua hirviendo (100°C), por cinco min, luego, se pasó a hielo por 1 min, seguidamente se centrifugó a 12000  $\times$  g por 30 min. Procedimiento descrito por Paba y col. (19). Se tomó 80  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se estudio su acción sobre hemoglobina como ya ha sido descrito. Es importante destacar, que con los métodos de ensayo utilizados, no pudimos detectar actividad peptidasa en estos sobrenadantes.

Las proteínas presentes en tales sobrenadantes, se visualizaron por SDS-PAGE al 12% según Laemmli (20) y tinción de Coomassie (solo en sedimentos cuyo peso fue igual o superior a 15 mg), pudiéndose apreciar diversos polipéptidos y especialmente la alfa tubulina, confirmada mediante inmunoblot, según Towbin (21), usando un anticuerpo monoclonal, diluido 1/800 en TBST, empleando anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluido 1/3500. Revelando con quimioluminiscencia, usando Super Signal™ Pierce.

En el caso de la pepsina, una unidad de actividad fue definida como la cantidad de enzima que produce un cambio en 7  $\times$



$10^{-2}$  unidades de absorbancia a 280 nm en una hora. Mientras para el extracto de *T. cruzi*, una unidad de actividad se definió, como la cantidad de enzima que produce un cambio de  $1,8 \times 10^{-3}$  unidades de absorbancia a 280 nm en una hora. Se aplicó a los resultados la prueba de T pareada. Los resultados que se muestran resumen un experimento típico, pero un comportamiento similar se observó en cinco preparaciones independientes.

#### Ensayos de actividad peptidasa en fase gel (zimografía en gel)

De manera simultánea y complementaria, a los ensayos en fase líquida descritos, se estudió en paralelo, la actividad gelatinasa de los extractos de *T. cruzi*, pretratados con 2,5% v/v DMSO o con distintas concentraciones de pepstatina A. Los ensayos denominados “zimografía en gel” se realizaron usando gelatina como sustrato, la cual, fue copolimerizada al 0,2% v/v en geles de poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). Se empleó, con ligeras modificaciones el método de Heussen & Dowdle (22). Brevemente entre 1,2 a 1,5  $\mu\text{g}$  de proteínas totales de extracto proteico de *T. cruzi* contenidos en 28  $\mu\text{L}$ , que habían sido preincubados en buffer formiato suplementado con los inhibidores, mencionados previamente, así como también, en presencia de diferentes concentraciones de pepstatina A: 1, 10, 20 y 100  $\mu\text{M}$ , se solubilizaron, sin calentamiento, por 30 min a temperatura ambiente, en un volumen final de 32  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra, sin agente reductor, cuya composición y concentración final fue la siguiente: 62,5 mM Tris-Cl pH 6,8, 25% glicerol, 2% p/v SDS, y 0,01% p/v bromofenol. En algunos casos, el buffer de muestra se suplementó con una concentración final de 5 mM o 84 mM DTT. Transcurrida la electroforesis, los geles fueron lavados dos veces sucesivas, 15 min cada vez, con 50 mL de Triton x-100 al 2,5% v/v a 4°C. Posterior-

mente, se lavaron tres veces sucesivas por 10 min cada vez, con agua ultrapura fría 4°C, luego se pre-incubaron por 19 horas a 35°C en buffer 50 mM formiato pH 2,9, 100 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,025% p/v  $\text{NaN}_3$ , suplementado en algunos casos con 5 mM DTT. La actividad de peptidasa se reveló como zonas claras después de la tinción del gel con 0,1% p/v de azul de Coomassie, Brilliant Blue R-250.

#### Dependencia de la actividad peptidasa a distintos pH en extractos proteicos obtenidos por lisis de cepa Y de *T. cruzi*

En principio, realizamos ensayos preliminares con la cepa Y de *T. cruzi*, crecida en medio infusión, hígado, triptosa (medio LIT), en estos ensayos, establecimos procedimientos metodológicos de ruptura y obtención de extractos proteicos crudos, para estudiar actividades peptidasas. Inicialmente con los sobrenadantes obtenidos, se realizó mediante zimografía, un análisis de la actividad peptidasa, a distintos valores de pH: 2, 4, 6, 8 y 10. En estos ensayos previos, se extrajeron las proteínas con los procedimientos mencionados, usando Y-PER™ (Pierce) como buffer de extracción de proteínas. Partiendo de sedimentos de parásitos cuyos pesos frescos, oscilaron entre 6 y 9 mg de proteínas. Luego de lavar los parásitos, el sedimento se suspendió en 250  $\mu\text{L}$  de Y-PER™ Pierce, en tubos de micro-centrífuga de 1,5 mL e inmediatamente se sonicó como ha sido descrito.

El sobrenadante resultante, se dividió en dos porciones de 100  $\mu\text{L}$  conteniendo entre 10 y 12  $\mu\text{g}$  de proteínas totales por porción, que se solubilizaron respectivamente, en 200  $\mu\text{L}$  buffer de muestra sin y con agente reductor a una concentración final de 84 mM DTT, cuya composición ha sido mencionada en la sección zimograma en gel. Los sobrenadantes se solubilizaron a temperatura ambiente y se separaron por electroforesis, en geles copolimerizados con

gelatina usando peine preparativo. Al final de la corrida y procesamiento de los geles para extraer el SDS, los geles se dividieron mediante cortes verticales, en cinco porciones similares, que se incubaron a 35°C por 18 horas en los siguientes buffer de incubación, suplementados con 5mM DTT o sin el agente reductor:

- 50 mM Glicina pH 2,0; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,025% p/v NaN<sub>3</sub>,
- 50 mM acético/acetato pH 4,0; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,025% p/v NaN<sub>3</sub>,
- 50 mM MES pH 6,0; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,025% p/v NaN<sub>3</sub>,
- 50 mM Tris pH 8,0; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,025% p/v NaN<sub>3</sub>,
- 50 mM CAPS pH 10; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,025% p/v NaN<sub>3</sub>

Los geles se tiñeron con Coomassie. En todos los casos, los geles se fotografiaron mediante Versac Doc™ 4000MP imaging System de BIO-RAD.

Se estudió, el efecto de la preincubación por una hora a temperatura ambiente, de extractos proteicos de aislado de *T. cruzi*, con 200 µM E64, se analizó el efecto mediante zimografía en gel, usando buffer formiato a pH 2,9 como ha sido descrito.

Cantidades crecientes de 1,5, 3,0 y 6,0 µg totales la pepsina, se analizaron mediante zimogramas en buffer glicina 50 mM pH 2,0, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,025% NaN<sub>3</sub>, como ha sido descrito y se visualizaron por SDS-PAGE 12% en condiciones disociantes y reductoras según Laemmli (20) y tinción de Coomassie.

Patrones de peso molecular de Invitrogen se usaron para estimar la movilidad de la peptidasa ácida, de la pepsina en los zimogramas y en SDS-PAGE 12%.

### Ensayos preliminares

Con excepción de la pepstatina A, la eficacia de cada uno de los inhibidores de peptidasas, usados en el buffer de pre-incubación e incubación en esta investigación,

se verificaron preliminarmente, usando proteasas de referencia (tripsina, papaína y colágenos) y el sistema comercial de ensayo para peptidasas, Quanti Cleave™ Pierce, que usa caseína como sustrato. Se siguieron instrucciones del fabricante, midiendo la absorbancia a 450 nm, en micro placas de fondo plano y 96 pozos con un lector de micro placas modelo ELx800™ BIO-TEK y el programa KC junior.

### RESULTADOS

En la Fig. 1A se muestran zimogramas resultantes de la preincubación de proteínas extraídas de la cepa Y de *T. cruzi*, desarrollado a distintos valores de pHs (2, 4, 6, 8 y 10), en presencia del agente reductor DTT, tanto en el buffer de muestra, como también en las distintas soluciones de incubación. Se evidencia, la ausencia de actividad peptidasa en los todos los diferentes pHs ensayados.

En la Fig. 1B, se muestra el resultado obtenido cuando se omite el DTT, tanto en el buffer de muestra, como en la solución de incubación. Bajo estas condiciones, destaca una proteasa de un Rf alrededor a 0,4, únicamente, en aquella porción del gel, que fue incubada en buffer a pH 2,0. Esta actividad peptidasa ácida, detectada en ausencia del agente reductor a pH 2,0, nos pareció inédita de *T. cruzi*. Este resultado, nos animó a investigar en un aislado de *T. cruzi* proveniente de zona rural de Venezuela endémica para la enfermedad de Chagas, la existencia de tal peptidasa, así como también, su susceptibilidad a inhibidores clásicos de proteasas.

En la Fig. 2A, se muestra un zimograma, desarrollado en buffer formiato a pH 2,9, en ausencia del agente reductor durante todo el procedimiento, correspondiente a extracto proteico crudo de aislado de *T. cruzi*.

En la condición control, DMSO 2,5%, se observa (a semejanza de la cepa Y), una

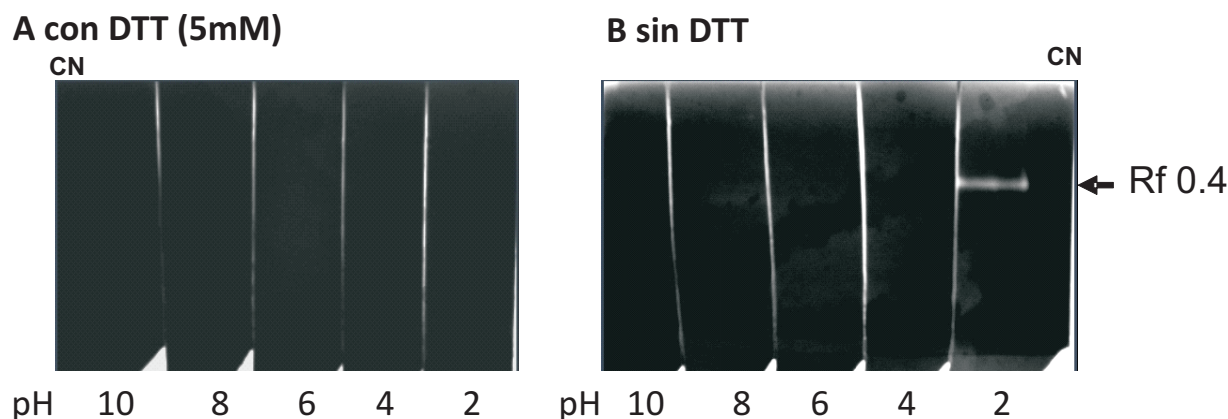


Fig. 1. Dependencia de la actividad peptidasa a distintos pH, efecto de la presencia de DTT sobre peptidasas presentes en extractos proteicos de cepa Y de *T. cruzi*. Extractos proteicos de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, se disolvieron en buffer de muestra con y sin DTT. Usando peine preparativo, se realizó el zimograma por 18 horas a 35°C en distintas soluciones buffers, 50 mM, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0, 0,025% p/v NaN<sub>3</sub>, ajustadas a distintos pH: (2, 4, 6, 8, 10), que se indican en la parte inferior de cada gel. **A:** soluciones de incubación suplementadas con 5mM DTT. **B:** soluciones de incubación sin DTT. CN: control negativo, sin extracto proteico. La flecha señala la gelatinasa y su Rf.

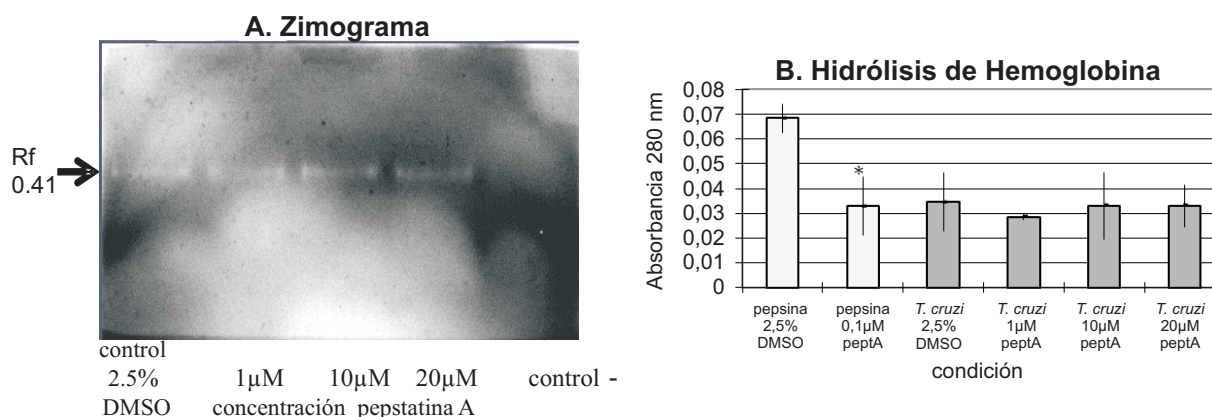


Fig. 2. Efecto de la pre-incubación con pepstatina A sobre la peptidasa de *T. cruzi* y la pepsina porcina. Extractos proteicos crudos de *T. cruzi* y de pepsina porcina se pre-incubaron con distintas concentraciones de pepstatina A. Como control, se usó DMSO. Finalizada la pre-incubación se analizó por: **A. Zimograma.** Actividad gelatinasa de los extractos proteicos de *T. cruzi*, con 2,5% DMSO (control) y distintas concentraciones de pepstatina A: 1, 10 y 20 µM; Control -, la actividad peptidasa de los reactivos sin enzimas añadidas. Los zimogramas se incubaron en buffer formiato suplementado con o sin coctel de inhibidores. **B Hidrólisis de hemoglobina por pepsina porcina y peptidasa ácida de *T. cruzi*.** La enzimas pre-incubadas con el inhibidor se añadieron a hemoglobina disuelta en buffer formiato suplementado con o sin coctel de inhibidores. La reacción se detuvo por precipitación con ácido tricloroacético, la absorbancia de los péptidos solubles se midió a 280 nm por triplicado. Las barras blancas: actividad enzimática de la pepsina. Barras grises: actividad enzimática de la peptidasa de *T. cruzi*. Líneas en el tope de las barras representan el error estándar. \* Significancia estadística de la prueba de t pareada. P= 0,037. Para ambas enzimas, la actividad control se llevó a cabo con 2,5% v/v DMSO. Las distintas concentraciones de pepstatina A (0,1; 1; 10 y 20 µM) están señaladas en la parte inferior con peptA.



actividad gelatinasa que presenta un Rf de 0,41, una movilidad relativa aparente (Mr) ligeramente inferior al patrón de peso molecular de 50 kDa (no mostrado). Los bolsillos contiguos, corresponden a la actividad resultante de la preincubación del extracto proteico, con tres concentraciones de pepstatina A: 1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ . Se evidencia que la pepstatina A, a las tres concentraciones de empleadas, no produce efecto inhibitorio sobre la actividad de peptidasa presente en el extracto proteico de *T. cruzi*. Aún más, es importante mencionar, la ausencia de inhibición de tal peptidasa en zimogramas, a concentraciones de pepstatina A de 100  $\mu\text{M}$ .

Con el propósito de validar estos resultados, se estudió, el efecto de la pepstatina A, sobre una proteasa de aspártico, como la pepsina porcina. Usando una metodología complementaria y alternativa, el ensayo peptidasa en fase líquida, usando hemoglobina como sustrato. Este método nos permitió estudiar y comparar, el efecto del inhibidor sobre la pepsina porcina y sobre la peptidasa evidenciada previamente en los extractos proteicos de *T. cruzi* mediante zimografía.

En la Fig. 2B, se muestran los resultados de un experimento típico, a la izquierda se muestra la actividad inhibitoria producida a la pepsina porcina por la pepstatina A, a una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$ , un valor entre diez a doscientas veces menor, a las concentraciones utilizadas para intentar inhibir la peptidasa ácida presente, en los extractos proteicos del aislado de *T. cruzi*.

En las condiciones de ensayo, el inhibidor produce una disminución de la actividad de la pepsina porcina alrededor del 55% respecto a la condición control (2,5% DMSO). Es importante tener presente, que la cantidad de pepsina pre-incubada con el inhibidor es este ensayo fue de 14,6  $\mu\text{g}$ . La inhibición parcial observada en una hora se mantiene también a las 19 horas. Esta dife-

rencia es estadísticamente significativa  $p=0,037$ , evidenciando la capacidad inhibitoria de la pepstatina A empleada en estos estudios.

En contraste, cuando se estudió el efecto de la pepstatina A, sobre la peptidasa ácida presente en el extracto proteico de aislado de campo de *T. cruzi*, se evidencia que en el intervalo de concentraciones estudiado 1, 10 y 20  $\mu\text{M}$ , el inhibidor no afectó, la actividad de peptidasa ácida sobre la hemoglobina en relación a la condición control (2,5% DMSO). Aún más, en concordancia a resultados obtenidos en zimogramas, a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  pepstatina A, tampoco observamos inhibición de la peptidasa detectada en los extractos crudos de *T. cruzi*.

En resumen, bajo las condiciones experimentales descritas, en el intervalo de concentraciones estudiadas (1-100  $\mu\text{M}$ ), la pepstatina A no afectó la actividad peptidasa, detectada en los extractos proteicos crudos del aislado venezolano de *T. cruzi*. En contraste, el inhibidor fue eficaz, a concentraciones diez veces menores, frente a cantidades de pepsina porcina relativamente mayores, del orden de décimas de microgramos.

## DISCUSIÓN

En este trabajo, mediante dos métodos de ensayo de peptidasas independientes, pero complementarios, se proporcionan evidencias experimentales, que sugieren la existencia de una peptidasa ácida inédita, en extractos proteicos crudos de un aislado *T. cruzi*, proveniente de una zona rural endémica para el Chagas de Venezuela, cuya actividad resultó insensible a inhibidores clásicos de peptidasas, incluyendo la pepstatina A.

La peptidasa, mostró actividad a valores de pH entre 2 y 2,9, en presencia o ausencia, de PMSF, E64 y EDTA. La adición

de tales inhibidores, responde a la necesidad de evitar hidrólisis inespecíficas, sin embargo, la presencia o ausencia de tales inhibidores en el buffer formiato, no afectó la magnitud de la actividad de la peptidasa de *T. cruzi* hacia los sustratos (hemoglobina y/o gelatina) a las concentraciones usadas en los ensayos. Este hecho, permite sugerir que en las condiciones experimentales descritas, esta activa sólo tal peptidasa, que resulta insensible a los inhibidores estudiados.

En tal sentido preliminarmente, verificamos la capacidad inhibitoria de cada uno de los inhibidores usados en este trabajo, a las concentraciones empleadas en los ensayos, mediante un sistema comercial de detección colorimétrico para peptidasas. Con tal sistema, estudiamos la acción de cada inhibidor con proteasas representativas de la clase serina, como la tripsina, de la clase cisteína, como la papaína y de la clase metalo peptidasa, como la colagenasa.

Es importante destacar, que en el caso particular de la pepsina porcina, el método de ensayo comercial, así como el uso de zimogramas copolimerizados con gelatina, no pudieron ser utilizados. En el caso del ensayo comercial, debido a la precipitación del sustrato (caseína) a pH 2 y 2,9. En el caso de los zimogramas, a consecuencia de la incapacidad de la pepsina de hidrolizar gelatina. Tal situación, demandó la implementación de una metodología alternativa, que permitiese comparar, bajo condiciones experimentales idénticas, la eficacia de la pepstatina A, validando los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición sobre la peptidasa ácida detectada en extractos proteicos crudos de *T. cruzi* mediante zimogramas.

El ensayo implementado, cuantifica la absorbancia de péptidos solubles, al ácido tricloroacético. Esta metodología, con los controles realizados, mide los péptidos liberados por hidrólisis enzimática de la hemoglobina en las distintas condiciones estudiadas.

Con este método, al preincubar 219,4  $\mu\text{g}$  totales de pepsina, con concentraciones de 10 y 100  $\mu\text{M}$  de pepstatina A y de 5 mM DTT, obtuvimos una inhibición de la enzima de un 42% y 90% a las concentraciones mencionadas del inhibidor y de un 32% frente al agente reductor en relación a la condición control, al estudiar la acción de 60  $\mu\text{g}$  de pepsina pre-tratada o sin pre-tratar sobre la hemoglobina.

Al disminuir la cantidad de pepsina pre-incubada con el inhibidor por un factor de 15, es decir preincubar 14,62  $\mu\text{g}$  totales de pepsina, encontramos una inhibición de la pepsina cercana al 55% a una concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  y de 100% a 1  $\mu\text{M}$  pepstatina A. Al ensayar 8  $\mu\text{g}$  totales de la proteasa pretratada sobre la hemoglobina.

En contraste, en el caso del extracto proteico crudo del aislado de *T. cruzi*, no observamos inhibición aun cuando los microgramos totales de proteínas preincubados con el inhibidor fueron entre 15 y 25  $\mu\text{g}$ . Considerando, que en tales extractos, la peptidasa ácida es una de las diversas proteínas componentes, su cantidad preincubada frente al inhibidor, podría ser de décimas de microgramos o menos, diez veces inferior a la cantidad de pepsina preincubada con el inhibidor, sin embargo, a pesar del exceso relativo del inhibidor frente a la proteasa de *T. cruzi*, la enzima, no mostró susceptibilidad a la pepstatina A.

Resumiendo, la eficacia del inhibidor, fue verificada contra pepsina porcina, ensayada a cantidades al menos diez veces mayores (en algunos casos podría ser 100 veces mayor), en relación a la cantidad de la peptidasa presente en los extractos crudos de *T. cruzi*. Bajo las condiciones experimentales, las concentraciones efectivas del inhibidor para la pepsina, fueron entre 200 a 1000 veces menores (0,1  $\mu\text{M}$ ) a las concentraciones utilizadas (20 a 100  $\mu\text{M}$ ) para intentar inhibir la peptidasa presente en los extractos crudos de *T. cruzi*.

Cuando la cantidad de pepsina preincubada con la pepstatina A, estuvo en rango inferior ( $14,6 \mu\text{g}$ ) verificamos que la magnitud de la inhibición observada en una hora, se observó también a las 19 horas de incubación.

El comportamiento mostrado por la pepsina frente a distintas condiciones y concentraciones de la pepstatina A estudiadas, es consistente con el comportamiento reportado para esta enzima por otros investigadores (23, 24). Lo que valida los resultados obtenidos en nuestras condiciones experimentales, con la peptidasa detectada en los extractos crudos de *T. cruzi*. Sugiriendo la insensibilidad de tal enzima, a los inhibidores estudiados y especialmente a la pepstatina A.

En referencia a este hecho, se podría argumentar que la insensibilidad hacia la pepstatina A exhibida por la peptidasa ácida, bajo las condiciones descritas, pudiese ser consecuencia de la asociación del inhibidor con otras proteínas presentes en el extracto crudo, lo que disminuiría la cantidad efectiva del inhibidor para ejercer su acción sobre la peptidasa ácida. Alternativamente, pudiese ser consecuencia de la acción de proteasas que degraden el inhibidor.

En referencia a tales posibilidades, consideramos que ciertamente la purificación de la peptidasa ácida es necesaria para probar fehacientemente su insensibilidad a la pepstatina A. No obstante, los resultados de algunos ensayos son inconsistentes con tales suposiciones, en referencia a la primera suposición, la ausencia de un efecto inhibitorio al menos parcial en experimentos donde se usó una concentración excesiva del inhibidor ( $100 \mu\text{M}$ ), es un hecho en contra de una factible susceptibilidad de tal peptidasa frente a la pepstatina A.

En referencia a la posible acción de otras proteasas que degraden el inhibidor, si este fuese el caso, tales enzimas deberían

actuar en las condiciones experimentales, y ser potencialmente inhibidas por los inhibidores usados. En consecuencia, en ausencia de inhibidores degradarían tanto la hemoglobina como a la pepstatina A. En presencia de inhibidores su acción sobre estos potenciales sustratos sería menor. Es el caso, que en las condiciones de ensayo, no observamos variaciones en la magnitud de la hidrólisis enzimática de la hemoglobina en ausencia y presencia de otros inhibidores (PMSF, E64, EDTA) usados en forma individual o conjunta.

En este orden de ideas, bajo las condiciones de ensayo empleadas en este estudio, presencia de inhibidores y valores de pH (2 y 2,9), resulta poco probable la actividad de proteasas de la clase metalo y/o serina, las cuales, por lo general, actúan respectivamente a pH neutros y básicos.

Aunado a las consideraciones mencionadas, para la peptidasa de *T. cruzi* se descarta un posible mecanismo de tipo cisteína, en efecto, mediante zimogramas, se investigó y constató, la ausencia de inhibición de la peptidasa por el inhibidor E64 a una concentración de  $200 \mu\text{M}$ . Al respecto, aun considerando una hipotética insensibilidad al E64 por la peptidasa, en presencia de 5 mM DTT, la peptidasa resultó inhibida. Estos hechos, son inconsistentes con un posible mecanismo de tipo cisteína, para la tal peptidasa de *T. cruzi*, de hecho, las peptidasas de tipo cisteína, por lo general son estimuladas por agentes reductores.

En conjunto, los hechos experimentales, sugieren que bajo las condiciones experimentales utilizadas, la única peptidasa en el extracto que probablemente manifiesta actividad, es la peptidasa ácida. Tal peptidasa, se mostró insensible a los inhibidores estudiados y a la pepstatina A.

En otro orden de ideas, en referencia a algunas características de la peptidasa detectada tenemos: a diferencia con la pepsina porcina, que no hidroliza gelatina, la

peptidasa del aislado venezolano, comparte a con dos aspartil-proteasas, recientemente purificadas por otros investigadores a partir de la cepa Y de *T. cruzi* (25), la capacidad de hidrolizar gelatina.

En segundo lugar, en nuestras condiciones experimentales (en zimogramas), la peptidasa del aislado de *T. cruzi*, mostró una movilidad relativa aparente, similar a la exhibida por la pepsina porcina Rf de 0,4, próxima al estándar de 50 kDa (no mostrado), lo que nos permite inferir, tamaños similares entre estas dos peptidasas. Tal movilidad, es también similar, a dos aspartil peptidasas, purificadas por investigadores brasileños (25).

La insensibilidad a 1, 10, 20 y 100  $\mu\text{M}$  de pepstatina A, de la peptidasa del aislado de *T. cruzi* de Venezuela, diferencia esta peptidasa de las aspartil peptidasas purificadas por investigadores brasileños, quienes aprovechando la susceptibilidad de ambas peptidasas a la pepstatina A, lograron purificarlas, de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, usando pepstatina-agarosa. Una de tales enzimas, la denominaron cruzipsin I, la cual resultó inhibida en un 70% por 10  $\mu\text{M}$  de pepstatina A. La otra, la denominaron cruzipsin II, la cual fue inhibida en un 96% a la misma concentración del inhibidor, en buffer acetato 100 mM a pH 3,5 (25).

Es importante mencionar, que por limitaciones técnicas, en nuestro experimentos, procesamos cantidades bastantes pequeñas de parásitos, sedimentos de epimastigotes, cuyos pesos, ocasionalmente fueron entre 12 y 20 mg totales y frecuentemente estuvieron entre 6 y 10 mg, en consecuencia, las cantidades de proteínas extraídas para la realización de los ensayos es bastante reducida. De hecho, en nuestras condiciones, tanto para el aislado venezolano, como para la cepa Y, la cruzipaína, principal cisteína proteasa de *T. cruzi* (26, 27) resulta en el mejor de los casos casi indetec-

table, aún en condiciones favorables para su funcionamiento enzimático, como lo son: pH 6,0, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  y la presencia de agentes reductores (5 mM DTT).

En contraste, en nuestras condiciones experimentales, tanto a pH 2,0 como a pH 2,9, detectamos la peptidasa ácida del aislado venezolano, lo que probablemente refleja su elevada actividad proteolítica relativa, hacia los sustratos estudiados (gelatina y hemoglobina). Esta enzima exhibe actividad peptidasa, en un estrecho intervalo de pH entre 2 y 3. Al respecto, en las condiciones experimentales descritas, resultados preliminares, con extractos proteicos de epimastigotes de la cepa Y evidencian en zimogramas, una gelatinasa de Rf 0,38 a pH 2,0, mientras que a pH 4,0, un valor muy cercano a 3,5, usado por el grupo de investigadores brasileños para evidenciar las aspartil proteasas mencionadas, no observamos actividad peptidasa. Aún mas, en zimogramas a pH 2,0, en presencia de 5 mM DTT, la actividad gelatinasa de la cepa Y también resultó inhibida. Lamentablemente, no hemos evaluado en nuestras condiciones experimentales, el efecto de la pepstatina A sobre la gelatinasa detectada en la cepa Y a pH 2,0 en ausencia de agentes reductores.

El efecto inhibitorio por agentes reductores sobre la peptidasa del aislado venezolano, es un comportamiento exhibido también por la cruzipsin I y II (25) y por la pepsina porcina (28). Este comportamiento, está documentado para aspartil-proteasas de mamíferos, las cuales funcionan como dímeros, cuyos dos dominios están conectados por puentes disulfuros, en donde el residuo de cisteína, responsable de la dimerización, se presenta en posiciones homólogas en las aspartil-proteasas de mamíferos (28, 29).

Lamentablemente, no ha sido posible para nosotros estudiar hasta el presente, la inhibición de la peptidasa ácida del aislado de *T. cruzi*, frente a otros inhibidores de as-

partil proteasas, tales como DAN y EPNP, que de ser efectivos, permitirían (como sugiere su comportamiento frente a agentes reductores y su movilidad en zimogramas) su clasificación como una aspartil-peptidasa, insensible a peptastina A, como ha descrito en otros microorganismos (30, 31).

Al presente, estamos diseñando estrategias para la purificación de la peptidasa ácida, esperando la disponibilidad de los inhibidores de aspartil peptidasas mencionados, para responder las interrogantes.

#### AGRADECIMIENTOS

Esta Investigación fue financiada por el proyecto G2005000827 del FONACIT.

#### REFERENCIAS

1. Tarleton RL, Curran JW. Is Chagas disease really the “new HIV/AIDS of the Americas”? PLoS Negl Trop Dis 2012; 6(10):e1861.
2. WHO-World Health Organization. Chagas disease Sixty-fifth Programme Report UNDP/TDR Geneva 2012; Available from: URL: <http://www.who.int/neglecteddiseases/>
3. WHO-World Health Organization. Weekly Epidemiological Record (WER) Chagas disease (American trypanosomiasis)-fact sheet (revised in August 2012). Available from: URL: [http://www.WklyEpidemiolRec.2012Dec14;87\(51/52\):519-522](http://www.WklyEpidemiolRec.2012Dec14;87(51/52):519-522).
4. Ministerio del Poder Popular para la Salud, Anuario de Mortalidad 2010 Septiembre del 2012; Available from: URL <http://www.mpps.gob.ve>
5. Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M. Diagnosis and treatment of Chagas disease. Enferm Infecc Microbiol Clin 2013 Suppl 1:26-34.
6. Benaim G, Sanders JM, Garcia-Marchán Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, Payares G, Sanoja C, Burgos JM, Leon-Rossell A, Concepcion JL, Schijman AG, Levin M, Oldfield E, Urbina JA. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. J Med Chem 2006; 49(3):892-899.
7. Quijano-Hernández I, Dumonteil E. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. Hum Vaccine 2011; 7(11):1184-1191.
8. Chou KC, Shen HB. ProtIdent: a web server for identifying proteases and their types by fusing functional domain and sequential evolution information. Biochem Biophys Res Commun 2008; 376(2):321-325.
9. Boris Turk, Dušan Turk, Vito Turk. Protease signalling: the cutting edge EMBO J 2012; 31(7): 1630-1643.
10. Burleigh BA, Caler EV, Webster P, Andrews NW A. cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca<sup>2+</sup> signaling in mammalian cells. J Cell Biol 1997; 136: 609-620.
11. Caler EV, Vaena de Avalos S, Haynes PA, Andrews NW, Burleigh BA. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. EMBO J 1998; 17: 4975-4986.
12. McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M. Proteases in parasitic diseases. Annu Rev Pathol 2006; 1: 497-536.
13. Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS. Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. Available from: URL: [/PLoS Negl Trop Dis 2012; 6\(6\):e1707](http://www.PLoSNeglTropDis2012;6(6):e1707).
14. Miles MA. Culturing and biological cloning of *Trypanosoma cruzi*. Methods Mol Biol 1993; 21: 15-28.
15. Hernández R & Cevallos AM, Nepomuceno-Mejía T, López-Villaseñor I. Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. Parasitol Res 2012; 111: 509-514.
16. Salvesen G, Nagase H. Inhibition of proteolytic enzymes. In: Beynon RJ, Bond JS, eds. Proteolytic Enzymes: a Practical Approach 1st Ed. Oxford: IRL press at Oxford University Press.1989, p 83-104.
17. Anson ML. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. J Gen Physiol 1938; 22(1):79-89.



18. **Hirasawa A, Athauda SB, Takahashi K.** Purification and characterization of turtle pepsinogen and pepsin. *J Biochem* 1996; 120(2):407-414.
19. **Paba J, Santana JM, Teixeira AR, Fontes W, Sousa MV, Ricart CA.** Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* *Proteomics* 2004; 4(4): 1052-1059.
20. **Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 (5259):680-685.
21. **Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.
22. **Heussen C, Dowdle EB.** Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates *Anal Biochem* 1980; 102:196-202.
23. **McKown M, Workman R, Gregerman RI.** Pepstatin Inhibition of Human Renin. Kinetic studies and estimation of enzyme purity. *J Biol Chem* 1974; 249(24):7770-7774.
24. **da Silva Gomes RA, Batista RP, Costa de Almeida A, da Fonseca DN, Juliano L, Hial V.** A fluorimetric method for the determination of pepsin activity. *Anal Biochem* 2003; 316(1):11-14.
25. **Pinho R T, Beltrami LM, Alves CR, De-Simone S G.** *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of aspartyl proteases. *Exp Parasitol* 2009; 112: 128-113.
26. **Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V.** Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1997; 378(1):1-10.
27. **Álvarez, Niemirowicz GT, Cazzulo JJ.** The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1824(1):195-206.
28. **Szeesi PB.** The aspartic proteases *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52(Suppl. 210):5-22.
29. **Maslat AO, Abuereish GM.** Reformation of reduced disulfide bonds of pepsinogen and pepsin: role of the phosphate group. *Biochem Int* 1984; 8(1):143-150.
30. **Toogood HS, Prescott M, Daniel RM.** A pepstatin-insensitive aspartic proteinase from a thermophilic *Bacillus* sp. *Biochem J* 1995; 307 (Pt 3):783-789.
31. **Takahashi K, Chang WJ.** The structure and function of acid proteases.V. Comparative studies on the specific inhibition of acid proteases by diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester, 1,2-epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane and pepstatin. *J Biochem* 1976; 80(3):497-506.