

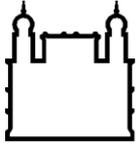
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

EXPRESSÃO GÊNICA E LOCALIZAÇÃO CELULAR DE CALPAÍNAS EM
Trypanosoma cruzi

VÍTOR ENNES VIDAL

Rio de Janeiro
Dezembro 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

VÍTOR ENNES VIDAL

**Expressão gênica e localização celular de calpaínas
em *Trypanosoma cruzi***

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor

Orientadores: Dr^a. Claudia Mansini d'Avila Levy
Dr. Rubem Sadok Figueiredo Menna-Barreto

RIO DE JANEIRO
Dezembro 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

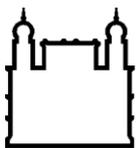
V649 Vidal, Vítor Ennes

Expressão gênica e localização celular de calpaínas em *Trypanosoma cruzi* / Vítor Ennes Vidal. – Rio de Janeiro, 2015.
xiv,119 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2015.
Bibliografia: f. 64-75

1. Calpaínas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Expressão gênica. 4.
Localização celular. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: VÍTOR ENNES VIDAL

**Expressão gênica e localização celular de calpaínas
em *Trypanosoma cruzi***

ORIENTADORES: Dr^a. Claudia Mansini d'Avila Levy
Dr. Rubem Sadok Figueiredo Menna-Barreto

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Andrea Henriques Pons (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz) - **Presidente**
Prof^a. Dr^a. Narcísa Leal da Cunha e Silva (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ)
Prof. Dr. José Franco da Silveira (Universidade Federal de São Paulo)
Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz)
Prof. Dr. Silvia Amaral Gonçalves da Silva (Universidade Estadual do Rio de Janeiro)

Rio de Janeiro, 16 de dezembro de 2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho Heitor, amor da minha vida e maior estímulo ao meu progresso, aprendizado e melhora.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus orientadores, Dra. Claudia Masini d'Avila Levy e Dr. Rubem Sadok Figueiredo Menna-Barreto, por toda confiança, estímulo e compreensão que tiveram por mim; além da boa orientação profissional, são também ótimos amigos desde que os conheci.

À Dra. Constança C. Britto, chefe do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (LABIMDOE), por ter me recebido de muito bem após minha convocação no concurso da Fiocruz (2008), e permitido minha pós-graduação.

Aos colaboradores do meu projeto Dr. André Nóbrega Pitaluga, Dr. André Luís Souza dos Santos e Dra. Marta Helena Branquinha por todo auxílio projeto que abracei com grande dedicação e carinho.

Às minhas alunas Bianca da Silva Vitória (informalmente durante seu mestrado) e Caroline Celestino da Silva Lopes (iniciação científica) por toda ajuda e compreensão nas pequenas coisas do dia a dia do laboratório.

Ao técnico Marcos Meuser Batista, técnico do Laboratório de Biologia Celular, por ter me ensinando a cultivar e infectar as células Vero, metodologia nova e essencial durante a minha formação.

À técnica Sheila Medeiros dos Santos Pereira da Coleção de Protozoários (COLPROT) da Fiocruz por socorrer minhas solicitações de epimastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, além da amizade e carinho como colega de laboratório.

Às tecnologistas Luiza Monteiro de Castro e Angélica Cardoso, por terem me ajudado nos momentos que não pude atender às demandas do LABIMDOE durante minha formação.

A todos os demais alunos e pesquisadores do Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia (LEIP) pelo companheirismo e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, além da compreensão por terem que dividir o técnico do laboratório com o doutorado.

Aos amigos do LBC e do Laboratório de Biologia Estrutural (LBE), em especial à técnica Sandra Souza, por me socorrerem com insumos, equipamentos ou mesmo espaço durante a realização dos meus experimentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisas em Malária que sempre me apoiaram, em especial à Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz que me abriu as portas da Fiocruz como aluno de iniciação científica, jamais deixarei de ser grato pela oportunidade.

Às plataformas de PCR em Tempo Real (PDTIS), de citometria de fluxo e microscopia eletrônica (IOC) que muitas vezes precisei usar para realização dos experimentos que compõem esta tese.

Aos meus pais Fernando e Márcia por todo amor, carinho, educação e incentivo, sendo sempre essências na minha formação e amadurecimento na vida.

À minha namorada Thais por todo carinho, apoio e compreensão comigo e com meu filho, principalmente nos momentos de maior estresse.

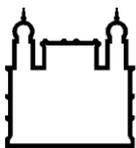
Ao meu padrinho Luiz Carlos por ter me acolhido em sua casa em um momento difícil da minha vida.

Ao meu irmão de sangue, Igor, e aos meus outros seis irmãos de coração (André, Bruno, Fábio, Júlio, Léo, Vinicius) que sempre me apoiaram e compreenderam minha ausência durante os períodos mais críticos de dedicação ao doutorado.

A todos os meus familiares e demais amigos pelo incentivo e carinho.

A todos não mencionados anteriormente que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a Deus por ter me dado força e discernimento para tomar as decisões necessárias e seguir em frente alcançando meus objetivos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

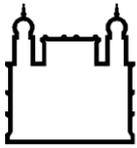
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Expressão gênica e localização celular de calpaínas em *Trypanosoma cruzi*

RESUMO

Vítor Ennes Vidal

As calpaínas são cisteíno-peptidases intracelulares dependentes de cálcio classicamente citosólicas envolvidas em diversas funções moduladoras da célula, como transdução de sinais, divisão celular, apoptose e diferenciação. Embora melhor caracterizadas em mamíferos, as calpaínas já foram descritas em insetos, nematódeos, plantas, fungos, protozoários e bactérias. No *Trypanosoma cruzi*, como nos demais tripanossomatídeos, já foi descrita a presença de uma ampla e diversa família de calpaínas em seu genoma, mas pouco se sabe a respeito das suas funções específicas. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo buscar as sequências de calpaínas do *T. cruzi* em seu genoma no intuito de classificá-las, assim como avaliar a expressão gênica das sequências de maior similaridade com as calpaínas de mamíferos. Além disso, um anticorpo gerado contra uma sequência peptídica conservada entre as calpaínas selecionadas foi utilizado em ensaios de identificação, expressão e localização celular. Nesse contexto, as análises *in silico* identificaram ao todo 55 sequências relacionadas às calpaínas no genoma do *T. cruzi*. Em seguida, através de alinhamentos múltiplos e análise de domínios conservados, foi possível classificar as calpaínas em quatro grupos distintos de acordo com a presença de domínios conservados característicos desta família multigênica. Dos quatro grupos identificados, foi selecionado para aprofundamento do estudo aquele que possuía o maior número de domínios conservados e continha o domínio que alberga o sítio catalítico das calpaínas (conservado ou não). A análise de expressão gênica de um total de dezesseis genes selecionados por qPCR revelou a presença de seis genes com expressão aumentada nas formas clinicamente relevantes (amastigotas e tripomastigotas) em relação as formas epimastigotas, e cinco genes nesta última forma. Em paralelo, o anticorpo anti-calpaínas se mostrou reativo em ensaios de *Western Blotting*, citometria de fluxo e microscopia de eletrônica de transmissão. Os ensaios de *Western Blotting* revelaram uma calpaína específica em amastigotas e outra em tripomastigotas, além de outras sete de massas moleculares variadas presentes nas três formas do parasito. Os resultados de citometria de fluxo indicam maior marcação intracelular do anticorpo nas formas amastigotas e tripomastigotas em relação aos epimastigotas. Por fim, as análises ultraestruturais revelaram a presença das calpaínas em todo citoplasma, nas membranas de vesículas, na membrana plasmática, e no flagelo das diferentes formas do parasito. O estudo comparativo da expressão das calpaínas nas formas evolutivas do *T. cruzi*, assim como a determinação de sua localização celular, podem ajudar a determinar as funções gerais desta família multigênica no parasito.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Gene expression and cellular localisation of calpains in *Trypanosoma cruzi*

Abstract

Vítor Ennes Vidal

Calpains comprise a family of calcium dependent cysteine peptidases commonly present in cytoplasm implicated in a broad range of cellular modular functions such as signal transduction, cellular division, apoptosis and differentiation processes. Although well-characterized in mammals, these peptidases have also been described in insects, nematodes, plants, fungi, protozoa and bacteria. In *Trypanosoma cruzi*, as in other trypanosomatids, the presence of an extensive and diverse family of calpains had already been described in its genome. However, the specific functions of these molecules are still unclear. In this context, the present study aimed to search calpain sequences in *T. cruzi* genome to classify the genes and to evaluate mRNA expression levels of the most conserved calpain sequences. In addition, an antibody against *T. cruzi* calpain was produced from a conserved sequence of trypanosomatid calpains to evaluate these proteases levels, also determining their ultrastructural localization. At first, *in silico* analysis revealed a total of 55 calpain sequences in *T. cruzi* genome. Through multiple alignments and phylogenetic analysis of conserved domains in these sequences, the calpains were sorted into four distinct groups characterized by the presence of classical domains of this multigenic family. After this *in silico* analysis, we decided to scrutinize the group that has the highest number of conserved domains and presents domain II, which contains the catalytic active site (either altered or conserved), in order to analyze mRNA and protein expression patterns in the different *T. cruzi* forms. The comparison of calpain mRNA abundance of sixteen genes by qPCR in the three distinct parasite forms revealed six genes with increased expression in the clinical relevant forms (amastigotes and trypomastigotes) and five in the invertebrate form. Simultaneously, the anti-tritryp-calpain antibody was capable of recognizing reactive molecules in Western Blotting, flow cytometry and transmission electron microscopy analysis. Altogether, Western Blotting analysis revealed seven calpains with different molecular masses present in the three forms of the parasite, while one specific calpain was detected either in amastigotes or trypomastigotes. Also, flow cytometry results showed a higher intracellular expression in amastigotes and trypomastigotes in comparison with epimastigotes. Finally, ultrastructural analysis revealed the presence of these proteases in the cytoplasm, vesicular membranes, plasma membranes and flagellum of the three life cycle forms. The comparative study of calpain gene expression in the distinct *T. cruzi* forms, as well as the cellular localization of these molecules could be useful approaches to find out the calpain main functions in this parasite.

ÍNDICE

Resumo	vii
Abstract	viii
I. INTRODUÇÃO	1-27
1.1 Calpaínas	1
1.1.1 História e nomenclatura	
Erro! Indicador não definido.	
1.1.2 Classificação	3
1.1.3 Estrutura e funções	4
1.1.4 Evolução e filogenia	6
1.2 A doença de Chagas e o <i>T. cruzi</i>	9
1.2.1 A descoberta	9
1.2.2 Epidemiologia	10
1.3.3 Manifestações clínicas	12
1.3.4 Tratamento	14
1.3.5 O <i>T. cruzi</i>	16
1.3.6 Ciclo biológico	19
1.3.7 Regulação da expressão gênica	22
1.3 Calpaínas em tripanossomatídeos	24
II. JUSTIFICATIVA	28-29
III. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	31-37
4.1 Análises <i>in silico</i> da presença de calpaínas no genoma do <i>T. cruzi</i>	31
4.2 Classificação das sequências e desenho de iniciadores específicos	31
4.3 Cultivo das diferentes formas do <i>T. cruzi</i>	32
4.4 PCR, purificação do produto e sequenciamento	32
4.5 Avaliação da expressão de RNAm d às calpaínas RT-PCR em Tempo Real	35
4.6 Produção de anticorpos contra peptídeo consenso de calpaínas	35
4.7 Identificação das calpaínas por <i>Western blotting</i> e citometria de fluxo	35
4.8 Imunolocalização das calpaínas por microscopia eletrônica de transmissão	36
V. RESULTADOS	38-56
5.1 Identificação e classificação das calpaínas do <i>T. cruzi</i>	38

5.2 Análise da expressão gênica relativa por PCR em Tempo Real	42
5.3 Identificação e quantificação das calpaínas por <i>Western Blotting</i> e citometria de fluxo	46
5.4 Imunolocalização das calpaínas por microscopia eletrônica de transmissão	51
VI. DISCUSSÃO	55-62
VII. CONCLUSÕES	63
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64-75
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64-75
VIII. ANEXO I "MDL28170, a potent calpain inhibitor, affects <i>Leishmania braziliensis</i> growth, ultrastructure, macrophage interaction and peptidases expression." (artigo submetido)	76-95
IX. ANEXO II " Why calpain inhibitors are interesting leading compounds to treat leishmaniasis? (artigo submetido)	96-112

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1.1 - Representação esquemática das subunidades maior e menor das calpaínas clássicas	4
Figura 1.2 - Estrutura tridimensional da calpaína 2	6
Figura 1.3 - Classificação das calpaínas em subfamílias conforme a presença dos domínios	7
Figura 1.4 - O médico sanitarista Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em seu trabalho no Instituto Soroterápico de Manguinhos	10
Figura 1.5 - Distribuição endêmica da doença de Chagas pelas Américas	12
Figura 1.6 - Criança com chagoma característico no olho direito e edema da pálpebra conhecida como sinal de Romaña	13
Figura 1.7 - Estrutura química do inibidor da cruzipaína K777	15
Figura 1.8 - Representação esquemática da morfologia da forma epimastigota do <i>T. cruzi</i> .	18
Figura 1.9 - Ilustração em corte longitudinal das principais estruturas celulares das três formas evolutivas de <i>T. cruzi</i>	15
Figura 1.10 - Ciclo evolutivo heteroxênico do <i>T. cruzi</i>	17
Figura 1.11 - Regulação da expressão gênica no parasito <i>T. cruzi</i>	23
Figura 1.12 - Representação esquemática da classificação das calpaínas presentes no genoma dos tripanossomatídeos em cinco grupos distintos proposta por Ersfeld e colaboradores (2005)	26
Figura 1.13 - Estrutura química do inibidor III de calpaínas, MDL28170	27

RESULTADOS

Figura 5.1 - Nova classificação das calpaínas de tripanossomatídeos proposta neste trabalho	39
Figura 5.2 - Teste dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados das calpaínas e dos genes endógenos do <i>T. cruzi</i>	44
Figura 5.3 - Expressão diferencial dos 16 transcritos de calpaínas comparados entre si das três formas evolutivas do parasito	46
Figura 5.4 - <i>Western blotting</i> demonstrando a reatividade cruzada do anticorpo anti-Trityp-calpain contra o extrato total das formas epimastigota (e), amastigota (a) e tripomastigota (t) do <i>T. cruzi</i> , e das células Vero (v)	48
Figura 5.5 - Citometria de fluxo das formas epimastigota (A), amastigota (B) e tripomastigota (C) do <i>T. cruzi</i> marcados com o anticorpo anti-trityp-calpain	49

Figura 5.6 - Imunocitoquímica ultraestrutural de calpaínas nas formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i>	52
Figura 5.7 - Imunocitoquímica ultraestrutural de calpaínas nas formas amastigotas do <i>T. cruzi</i>	53
Figura 5.8 - Imunocitoquímica ultraestrutural de calpaínas nas formas tripomastigotas do <i>T. cruzi</i>	54

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1.1 - Nomenclatura e distribuição tecidual dos genes relacionados às calpaínas em mamíferos	2
---	---

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 4.1 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores de calpaínas	34
---	----

RESULTADOS

Tabela 5.1 - Identificação das sequências de calpaínas de <i>T. cruzi</i> e subdivisão em grupos	40
---	----

Tabela 5.2 - Identificação dos domínios, massa molecular, presença da tríade catalítica e conservação da sequência utilizada para produção do anticorpo das calpaínas do grupo 3	41
---	----

Tabela 5.3 - Nome atribuído, identificação das sequências e análise da identidade dos fragmentos amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores das calpaínas	43
---	----

Tabela 5.4 - Análise da expressão gênica relativa dos transcritos de calpaínas das três diferentes formas evolutivas do <i>T. cruzi</i>	45
--	----

Tabela 5.5 - Índice de variação do MFI das três formas evolutivas do <i>T. cruzi</i>	50
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - Soro Albumina Bovina

°C - grau Celsius

Ca²⁺ - Cálcio divalente

cDNA - DNA complementar

Ct - *Threshold cycle* (Ciclo correspondente ao limiar de fluorescência)

CysPC - *cysteine protease core* (core proteolítico de cisteína)

Δ - Delta

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxiribonucleico

DTUs - Unidades Discretas de Tipagem

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ensaio enzimático de imunoabsorção)

FACS - *Fluorescence Activated Cell Sorting* (Separador de Células Ativado por Fluorescência)

Fw - *Forward* (senso)

GAPDH - *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)

h - Hora

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

kDNA - DNA do cinetoplasto

M - Molaridade

μL - Microlitro

μg - Micrograma

mg - Miligrama

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

min - Minuto

mM - Milimolar

mRNA - RNA mensageiro

nm - Nanomolar

pb - Pares de Base

PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

RT-PCR - *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa)

PBS - Tampão Fosfato Salina

qsp - Quantidade suficiente para

RNA - Ácido Ribonucleico

Rv – *Reverse* (anti-senso)

s - Segundo

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate* (Lauril Sulfato de Sódio)

SFB - Soro Fetal Bovino (FBS)

sp. - Espécie

spp. - Várias Espécies

TcI - *T. cruzi* I

TcII - *T. cruzi* II

TcIII - *T. cruzi* III

TcIV - *T. cruzi* IV

TcV - *T. cruzi* V

TcVI - *T. cruzi* VI

UTR - Untranslated Region (Região não Traduzida)

VERO - Célula epitelial de Rim de Macaco Verde

I. INTRODUÇÃO

1.1 As calpaínas

1.1.1 História e nomenclatura

A história da descrição das calpaínas começou há 52 anos, em 18 de julho de 1963, quando Gordon Guroff submeteu ao *Journal of Biological Chemistry* pela primeira vez a descrição de uma endopeptidase neutra ativada por cálcio na fração solúvel de cérebro de rato (Guroff, 1964). Em seguida, o futuro ganhador do Prêmio Nobel Edwin G. Krebs juntamente com R. B. Houston reportou a presença de um “fator” proteolítico dependente de cálcio em células musculares cardíacas (Houston & Krebs, 1968). O grupo de Krebs tinha como hipótese na época que o fator responsável pela ativação dependente de cálcio da fosforilase cinase de músculo esquelético poderia ser uma protease ativada por cálcio. Entretanto, os autores acreditavam que uma enzima proteolítica poderia ser ativada irreversivelmente e por qualquer alvo e, portanto, não poderia ser parte num mecanismo fisiológico regulatório relevante.

Em 1978, Ishiura e colaboradores finalmente conseguiram purificar em homogeneidade a primeira calpaína, até então ainda denominada de CANP (*calcium activated neutral protease*), e puderam observar que esta enzima era inibida por leupeptina, um conhecido inibidor de papaína, catepsina B e tripsina. Posteriormente, as endopeptidases neutras ativadas por cálcio encontradas em diversos tecidos foram denominadas de calpaínas, devido a sua similaridade estrutural com as papaínas e por serem ativadas por cálcio, logo os nomes “calpaína” e “CANP” foram unificados em 1991 (Suzuki, 1991). O cDNA correspondente à subunidade catalítica das calpaínas foi clonado pela primeira vez em 1984, o que revelou que as calpaínas conhecidas na época são moléculas quiméricas compostas de uma cisteína peptidase ligada a um homólogo da calmodulina, rico em sítios de ligação ao cálcio (Ohno et al., 1984). Nas duas décadas seguintes, centenas de moléculas relacionadas às calpaínas foram identificadas por projetos de clonagem e genoma (Sorimachi & Suzuki, 2001).

Nos mamíferos, onde as calpaínas estão melhor caracterizadas, duas principais isoformas existem, a μ -(micro) e a m(mili)-calpaína. Essas calpaínas são denominadas “convencionais”, e como próprio nome sugere são ativadas *in vitro* por concentrações micro- e milimolar de cálcio, respectivamente. Ambas isoformas existem como heterodímeros compostos da subunidade catalítica e de uma subunidade regulatória de 30 kDa comum entre

as calpaínas. A subunidade catalítica possui 80 kDa, e as duas isoformas compartilham 60% de identidade entre suas sequências de aminoácidos. Atualmente, os 16 homólogos de calpaínas de mamíferos recebem denominação por números sequenciais de 1 a 17 (a calpaína 4 corresponde a subunidade menor 1), assim como as duas subunidades menores. Algumas calpaínas mantêm o nome atribuído na época da sua identificação para evitar conflitos desnecessários, exemplos: μ CL/calpaína 1, mCL/calpaína 2, p94/calpaína 3, 30K/calpastatina 1, hTRA-3/calpaína 5, etc (Tabela 1.1) (Ono & Sorimachi, 2012).

Tabela 1.1: Nomenclatura e distribuição tecidual das calpaínas em mamíferos. Adaptado de: Soromachi et al., 2011.

Calpaína	Gene	Sinonímia	Domínio IV (<i>penta-EF-hand</i>) ¹	Distribuição Tecidual
Calpaína 1	CAPN 1	μ -calpaína, μ CAPN, calpaína I	presente	ubíquo
Calpaína 2	CAPN 2	m-calpaína, mCAPN, calpaína II	presente	ubíquo
Calpaína 3	CAPN 3	P94, nCL-1	presente	músculo esquelético e retina
Calpaína 5	CAPN 5	CAPN5, nCL-3	ausente	ubíquo
Calpaína 6	CAPN 6	CAPN6	ausente	placenta
Calpaína 7	CAPN 7	CAPN7, palBH	ausente	ubíquo
Calpaína 8	CAPN 8	CAPN8, nCL-2	presente	trato digestivo, estômago
Calpaína 9	CAPN 9	CAPN9, nCL-4	presente	trato digestivo, coração
Calpaína 10	CAPN 10	CAPN10	ausente	ubíquo
Calpaína 11	CAPN 11	CAPN11	presente	testículo
Calpaína 12	CAPN 12	CAPN12	presente	folículo piloso
Calpaína 13	CAPN 13	CAPN13	presente	ubíquo
Calpaína 14	CAPN 14	CAPN14	presente	ubíquo
Calpaína 15	CAPN 15	CAPN15, Sol H	ausente	ubíquo
Calpaína 16	CAPN 16	CAPN16, C6orf103	ausente	desconhecida
Calpaína 17	CAPN 17	CAPN17	ausente	desconhecida
Subunidade menor 1	CAPNS 1	CAPN4, CPNS1	presente	ubíquo
Subunidade menor 2	CAPNS 2	CPNS2	presente	ubíquo

¹ penta-EF-hand: presente no domínio IV rico em sítios de ligação ao cálcio

1.1.2 Classificação

Bioquimicamente, as calpaínas são classificadas pela IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) com o número EC 3.4.22.X que indica a classe hidrolase; subclasse peptidase; subsubclasse cisteína endopeptidase seguido de um número serial (X) alocado arbitrariamente 52 e 53 para se referir a micro-calpaína e mili-calpaína respectivamente (IUBMB, 2009).

A classificação da IUBMB foi muito útil na era que antecedeu o *boom* do sequenciamento de DNA. A partir do início do século XXI, o número de peptidases descritas aumentava numa velocidade tão alta, que o desafio trocara da descoberta para organização e catalogação dos dados, desafio este que não foi restrito às peptidases. Entretanto, esta classe enzimática por representar grande parte do conteúdo proteico de uma célula exigiu uma ação rápida da comunidade científica. Nesse contexto, foi criado o sistema de banco de dados de peptidases MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>). Esse sistema agrupa as enzimas proteolíticas em famílias de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos, com atenção especial aos domínios funcionais, principalmente o catalítico (Rawlings et al., 2014). Todas as famílias de peptidases com estrutura similar à papaína são ainda classificadas no clã CA, onde também se encontra a família de endopeptidase C2, na qual pertencem as calpaínas. As enzimas desse clã apresentam a tríade catalítica cisteína, histidina e asparagina (ou ácido aspártico) (Moldoveanu *et al.*, 2002).

As calpaínas podem ainda ser classificadas de acordo com sua estrutura como calpaínas clássicas (típicas ou convencionais) e não clássicas (atípicas ou não-convencionais), uma vez que classicamente as calpaínas são peptidases que apresentam o domínio catalítico (CysPc) e cinco motivos *EF-hand* no extremo C-terminal. Exemplos de calpaínas clássicas são: a calpaína 1 (μ -calpaína), a calpaína 2 (m-calpaína) e calpaína-3 (p94) de humanos (Ono & Sorimachi, 2012). Entretanto, uma característica relevante das calpaínas é sua diversidade estrutural. Os genes das calpaínas são produtos da fusão de vários genes como *C2-like*, 5 *EF-hand*, Sol H (*small optic lobe homology*), *cluster* de glicina, domínios transmembrana e dedos de zinco encontrados em calpaínas de diversos organismos. Portanto, apesar das calpaínas 1 e 2 terem sido primeiramente caracterizadas, o número de calpaínas “atípicas” é maior e mais difundido em outros organismos como animais, plantas, fungos, protozoários e até mesmo em algumas bactérias. Contudo, o termo clássico é mais adequado para a classificação destas moléculas (Croall & Ersfeld, 2007). A Figura 1.1 mostra o esquema das subunidades das calpaínas clássicas.

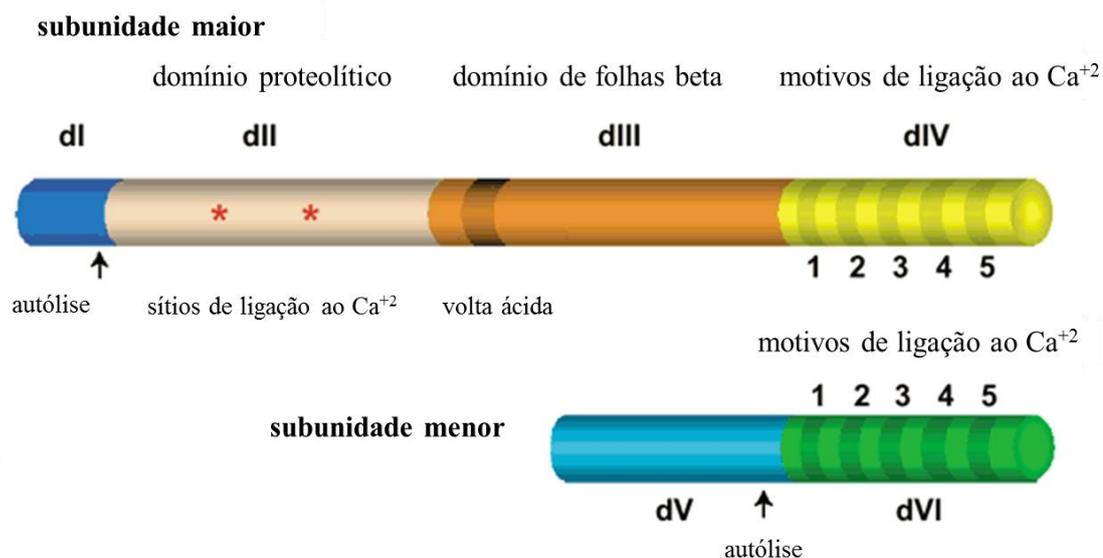


Figura 1.1: Representação esquemática das subunidades maior e menor das calpaínas clássicas. As siglas correspondem aos domínios de I a VI, e os subdomínios IIa e IIb estão agrupados juntos. Adaptado de: Khorchid & Ikura, 2002.

1.1.3 Estrutura e funções

De forma geral, os potenciais substratos descritos para as calpaínas clássicas são limitados e específicos. A caseína tem sido relatada como um bom modelo para aferir a atividade das calpaínas *in vitro*, apesar de não ser um substrato natural *in vivo*. Portanto, a especificidade dos substratos para essas enzimas continua sendo um grande enigma. Análises *in silico* demonstram que as calpaínas reconhecem estruturas tridimensionais de outras moléculas melhor que sequências lineares, embora exista uma preferência por certas sequências peptídicas já relatadas (Tompa et al., 2004).

Apesar de pouco se saber a respeito da identidade de seus substratos *in vivo*, já se sabe que as calpaínas atuam principalmente de forma proteolítica limitada, regulando funções celulares importantes através da ativação ou inativação de outras proteínas e enzimas, do que de fato digerindo outras moléculas (Ono & Sorimachi, 2012). Proteínas cinases, fosfatases, fosfolipases, proteínas do citoesqueleto, fatores de transcrição, caspases, entre outras proteínas de importância vital para a célula constituem, portanto, os substratos *in vivo* das calpaínas (Sorimachi et al. 1997; Kar et al., 2009). Uma vez que estas moléculas estão envolvidas em eventos celulares básicos e essenciais, a desregulação de sua atividade está envolvida em diversas desordens neurológicas humanas como o mal de Alzheimer, a doença de Huntington, doença de Parkinson e esclerose múltipla, assim como em distrofias

musculares, diabetes, tumorigênese, catarata e anemia falciforme (Saez et al., 2006; Donkor et al., 2015).

As calpaínas clássicas de mamíferos coexistem nas células com seu inibidor específico endógeno, denominado calpastatina, nome que sugere sua principal função de regulação das calpaínas (Goll et al., 1992; Nixon et al., 1994). Este inibidor é capaz de inibir de forma similar tanto as micro- como as mili-calpaínas. As subunidades catalítica e regulatória das calpaínas clássicas são divididas em quatro e dois domínios, respectivamente (Figura 1.1). A extremidade N-terminal da subunidade maior das calpaínas consiste em uma alfa-hélice de 18 a 20 aminoácidos que sofre autólise durante a ativação desencadeada pela ligação de íons cálcio, o que também dissocia as duas subunidades da molécula. Esta alça N-terminal era tida como o domínio I das calpaínas antes da cristalização da primeira calpaína por Stobl e colaboradores (2000), que demonstraram não haver um domínio I. Outros estudos tridimensionais demonstraram que na ausência de cálcio, o domínio catalítico das calpaínas é subdividido em dois subdomínios (IIa e IIb), se tornando apenas um domínio quando ativado (Figura 1.1). Dentre os resíduos catalíticos, a cisteína da tríade está no subdomínio IIa, enquanto que os resíduos de histidina e asparagina estão no subdomínio IIb. O domínio II é o mais conservado entre as calpaínas, e apenas sua presença é suficiente para definir um homólogo de calpaína (Ono & Sorimachi, 2012). De forma surpreendente, é possível observar atividade proteolítica apenas do domínio II da micro e da mili-calpaína expressos sem a presença dos demais domínios. Portanto, a atividade dependente de cálcio das calpaínas consiste em um controle que envolve toda a molécula, uma vez que todos os quatro domínios estão sujeitos à ação de remodelação envolvida pela ligação deste íon (Campbell & Davies, 2012).

A estrutura tridimensional do domínio III é composta por oito folhas betas anti-paralelas muito similar aos domínio C2 encontrados em proteínas regulatórias que se ligam ao cálcio, como as PKCs e as sinaptotagminas. Esse domínio também se liga ao cálcio e é crucial para o deslocamento transmembranar das calpaínas (Corbalan-Garcia & Gomez-Fernandez, 2010). Enquanto o domínio IV da subunidade maior é muito similar ao domínio VI da subunidade menor, contendo cinco motivos de ligação ao cálcio e por isso é denominado penta EF-hand. Entretanto, experimentos *in vitro* com a estrutura tridimensional cristalografada das calpaínas demonstram que apenas os três primeiros domínios se ligam ao cálcio (Kretsinger, 1997). Por fim, o domínio V presente na subunidade menor das calpaínas contém sítios ricos em glicina que o fazem extremamente hidrofóbico que permite a interação

das calpaínas com a membrana e suas proteínas por interação hidrofóbica. A figura 1.2 ilustra a estrutura tridimensional da calpaína 2 (mili-calpaína) e seus domínios.

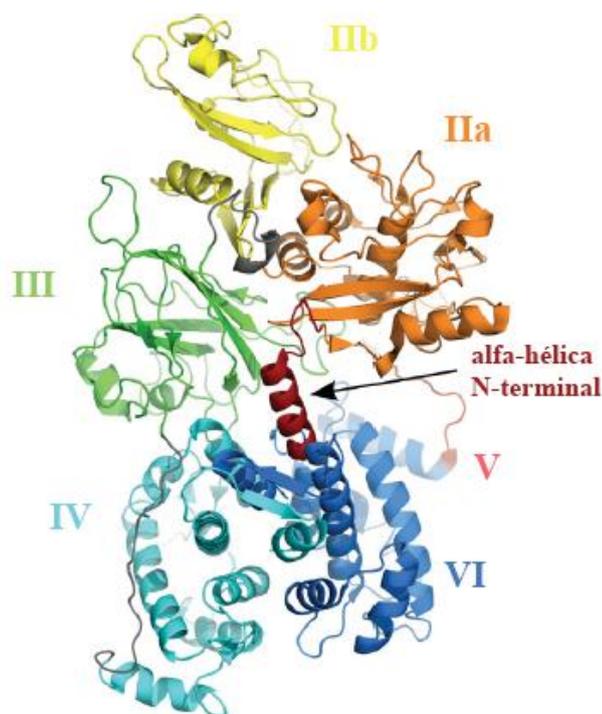


Figura 1.2: Estrutura tridimensional da calpaína 2. Os domínios de IIa e IIb ao domínio VI de ambas as subunidades estão separados por cores, assim como a alfa-hélice N-terminal que constitui o domínio I (vermelho escuro). Adaptado de: Campbell & Davies, 2012.

1.1.4 Evolução e filogenia

O mapeamento completo do genoma de diversos organismos permitiu um grande avanço no estudo das calpaínas. Primeiramente, foi possível observar uma grande expansão de genes parálogos relativamente recente no genoma dos primeiros animais a terem seus genomas sequenciados (Soromachi et al., 2010). Com o passar dos anos e estudos dedicados a classificar a diversidade das calpaínas nos diversos organismos analisados, foi possível dividir a superfamília das calpaínas em muitas subfamílias conforme a presença dos mais diversos domínios (Croall & Ersfeld, 2007).

Atualmente, a superfamília das calpaínas é dividida em muitas subfamílias de acordo com a distribuição de diversos domínios associados. Todas as calpaínas com estruturas de domínios similares às calpaínas 1 e 2 pertence a família das calpaínas clássicas. Entretanto, a maior parte das calpaínas possui identidade de 30 a 75% com o domínio catalítico das calpaínas clássicas e contêm diferentes domínios, muitas delas com domínios ainda não

identificados em mamíferos e, portanto, são classificadas como calpaínas não clássicas (Goll et al., 2003). Muitas dessas moléculas não são dependentes de cálcio e ainda não tiveram atividade proteolítica comprovada. Essas características sugerem que as calpaínas que conhecemos hoje foram geradas evolutivamente pela combinação de uma molécula ancestral de cisteína peptidase similar à calpaína com outros genes de funções diferentes (Croall & Ersfeld, 2007). A Figura 1.3 ilustra as principais subfamílias das calpaínas segundo a classificação atual dos domínios.

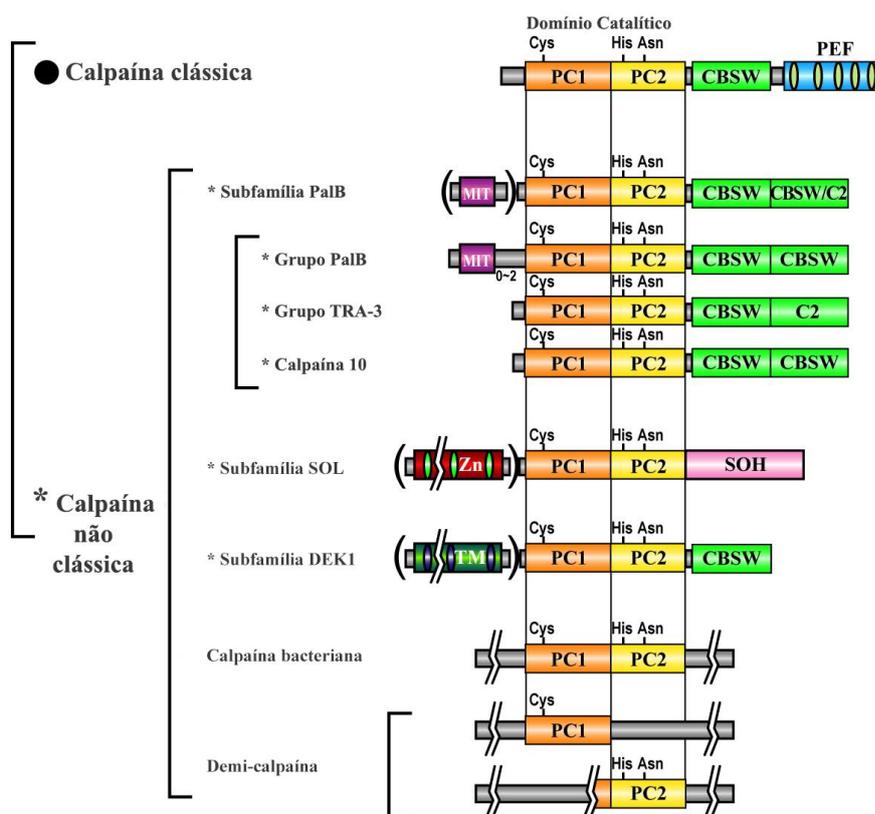


Figura 1.3: Classificação das calpaínas em subfamílias conforme a presença dos domínios. As calpaínas clássicas estão ilustradas no alto da figura para fins comparativos. As siglas representadas nas imagens correspondem: PC1 e PC2 aos domínios IIa e IIb, respectivamente; CBSW ao domínio III, também denominado domínio de folhas beta do tipo calpaína; PEF ao domínio IV contendo os 5 sítios de ligação ao cálcio; MIT ao domínio de interação e transporte de microtúbulos; SOH ao domínio de homologia a Sol característico de *Drosophila*; eTM ao domínio transmembranar. Adaptado de Calpain Research Portal (www.calpain.net).

As calpaínas não clássicas, por sua vez, podem ser divididas em diversas subfamílias, ou mesmo grupos dentro de cada subfamília, de acordo com sua configuração de domínios.

As subfamílias Sol, PalB e Dek1 são as que possuem membros melhor caracterizados até o momento (Ono & Soromachi, 2012). A calpaína 7, pertencente ao grupo PalBH da subfamília PalB, é a calpaína humana mais conservada evolutivamente, uma vez que possui homólogos em diversos vertebrados, fungos, protistas, nematodos e alguns insetos, mas não em plantas (Denison et al., 1995; Futai et al., 1999). Esse grupo de calpaínas frequentemente contém a repetição do domínio III em tandem na porção C-terminal da molécula, dos quais se divergem em identidade moderadamente das calpaínas convencionais, além de um conservado domínio de interação e transporte de microtúbulos (MIT) na porção N-terminal (Futai et al., 2001). A calpaína humana 10 e a calpaína TRA-3 de nematodos também compõem grupos da subfamília PalB (Soromachi et al., 2011).

Outra subfamília evolutivamente conservada e bem caracterizada atualmente é a subfamília SOL, que está presente em vertebrados, insetos, nematodos e algas verdes, embora não em fungos. Esta subfamília é caracterizada pela presença de quantidades variadas do domínio de dedos de zinco (*Zn-finger*) na porção N-terminal das calpaínas e do domínio SOH na porção C-terminal (Friedrich et al., 2004). Enquanto a subfamília DEK1 é caracterizada por calpaínas que possuem o domínio III e um domínio transmembranar (TM na porção N-terminal nas plantas, também denominadas fitocalpaínas. Os produtos alternativos do *splicing* da calpaína A de *Drosophila* e algumas calpaínas de nematodos também estão agrupados nesta família por possuírem o domínio III na extremidade N-terminal, embora não possuam o domínio transmembranar (Correa et al., 2001; Soromachi et al., 2011).

Recentemente, Zhao e colaboradores (2012) estudaram a evolução das calpaínas através de análises filogenéticas dos genes relacionados às calpaínas presentes em todos os organismos eucariotos unicelulares. Após a identificação dos diversos domínios associados e da distribuição dos genes, os autores concluíram que existem 41 configurações estruturais de calpaínas diferentes, sendo que 28 destas possuem uma estrutura de domínios até então ainda não estudadas. Baseado nas combinações de domínios de todos os genes estudados e sua distribuição nos mais diversos organismos, foi proposto que quatro destas variantes estruturais (apenas dII, dII-dIII, MIT-dII-dIII, TM-dII-dIII) provavelmente surgiram evolutivamente mais cedo na história dos eucariotos, antes mesmo da existência dos eucariotos pluricelulares como nematodos, animais e plantas. Inclusive, a calpaína atípica que apresenta apenas o domínio catalítico, é a mais ancestral de todas as calpaínas uma vez que é a mais distribuída entre todos os eucariotos e a única configuração presente no organismo mais ancestral, as bactérias (Zhao et al., 2012).

1.2 A doença de Chagas e o *T. cruzi*

1.2.1 A descoberta

Em 1907, o médico sanitarista Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (1879-1934)(Figura 1.4) foi chamado a participar de uma campanha de combate à malária no estado de Minas Gerais. Chagas foi informado da presença de um inseto hematófago encontrado nas frestas e buracos das casas da região, que era comumente conhecido como barbeiro, pois costumava picar o rosto das pessoas enquanto dormiam. Ao examinar o intestino dos insetos e o sangue de vários animais domésticos da região, Chagas observou a presença de formas flageladas de um protozoário que denominou de *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu professor Oswaldo Cruz (Chagas, 1909a,b; Morel, 1999).

Pouco tempo depois, em 1909, Chagas teve a prova que faltava para definir o ciclo da doença. Ele examinou uma criança de dois anos de Lassance (MG), chamada Berenice, e descobriu que ela frequentemente era picada por barbeiros à noite. Suspeitou que a menina pudesse estar infetada pelo *T. cruzi*, observado nos insetos da região. Ao analisar seu sangue verificou a presença do protozoário que ele descreveu pela primeira vez em um ser humano.

Chagas publicou em 1909 um resumo de sua importante descoberta no *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, o trabalho completo foi publicado na Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz em português e em alemão no mesmo ano (Chagas, 1909a). A descrição de uma nova doença parasitária teve repercussão mundial, que consagrou a Carlos Chagas como um dos mais importantes pesquisadores brasileiros do século XX, recebendo importantes prêmios e o reconhecimento internacional, sendo inclusive indicado para o Prêmio Nobel em 1913 e 1921 (Steverding, 2014). Todavia, questões políticas impediram que Carlos Chagas ganhasse o prêmio pelas suas descobertas (Coutinho et al., 1999; Bestetti et al., 2013). Além da contribuição inovadora à medicina tropical, a descoberta trouxe a público a realidade sanitária e social do interior do país, chamando a atenção sobre a necessidade do combate às endemias intimamente associadas à pobreza que, infelizmente, estão presentes até os dias atuais (Kropf, 2010).



Figura 1.4: O médico sanitarista Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas em seu trabalho no Instituto Soroterápico de Manguinhos. Adaptado de WIKIMEDIA (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carlos_chagas_2.jpg); acessado em 29 de julho de 2015.

1.2.2 Epidemiologia

Epidemiologicamente, a doença de Chagas é prevalente em populações rurais, onde se encontram milhares de insetos vetores nas moradias de adobe. Ao todo, estima-se que existam de 5 a 18 milhões de pessoas infectadas em todo mundo, sendo a maioria na América Latina (Stanaway & Roth, 2015). Durante as últimas décadas, notável esforço foi realizado no Brasil para se eliminar a transmissão domiciliar pelo principal transmissor da doença, o *Triatoma infestans*. O país passou a ser considerado então livre desta modalidade de infecção pela Comissão Intergovernante do Cone Sul (Coura & Dias, 2009). Entretanto, tal situação não considera importante o aspecto regional. No Nordeste brasileiro, por exemplo, há espécies de triatomíneos silvestres que se adaptam muito bem às moradias e são atraídos pelas luzes das casas (Borges-Pereira et al., 2002; Dias, 2007). Recentemente, devido às frequentes migrações da população, foram identificados casos da doença em lugares não endêmicos, como Estados Unidos e Europa. Esse fato tem gerado grande preocupação, pois devido à falta de triagem nos bancos de sangue nesses países, a doença de Chagas poderia tornar-se uma doença de distribuição global (Coura et al., 2014; WHO, 2015).

A transmissão do *T. cruzi* faz-se principalmente por intermédio do vetor, insetos triatomíneos em cujas fezes encontram-se as formas infectantes do parasito. Segue-se em importância a transmissão transfusional e a congênita, que vêm se tornando cada vez mais relevante. O fenômeno da migração rural em direção aos centros urbanos fez emergir a

transmissão por transfusão sanguínea no Brasil. Embora menos comuns, podem ocorrer ainda a transmissão por acidente de laboratório e por leite materno (Coura & Albajar-Viñas, 2010). Atualmente, as principais formas de controle para a transmissão da doença de Chagas são o combate aos vetores com produtos químicos aplicados diretamente nas moradias e proximidades, e os programas de melhoria de moradias rurais que dificultam a domicialização dos insetos vetores. Porém, recentemente ocorreram surtos da doença aguda seguida de morte por ingestão de formas tripomastigotas presentes em bebidas, como suco de cana e açaí, em que os insetos vetores foram triturados durante o preparo ou suas fezes contaminaram o alimento (Nóbrega et al., 2009; Coura et al., 2014).

A doença de Chagas segue como problema de saúde pública por todos os países da América Latina, sendo que sua distribuição cobre quase toda América do Sul e Central (Figura 1.5). No Brasil, com a progressiva melhora do Sistema Único de Saúde (SUS), houve avanços consideráveis em relação à atenção aos portadores da doença de Chagas. Entretanto, ainda há muito a ser feito, sobretudo em relação às populações vivendo distantes de qualquer atenção à saúde ou possibilidade de tratamento e acompanhamento de seus problemas e dificuldades. Entre as doenças infecto-parasitárias, a doença de Chagas é a quarta causa de morte no país sendo a faixa etária mais atingida aquela acima de 45 anos. Deve-se ainda ressaltar que o diagnóstico precoce da doença é importante, pois há medicamentos eficazes para tratamento dos sintomas (Rassi-Jr et al, 2012).



Figura 1.5: Distribuição endêmica da doença de Chagas pelas Américas. Em cinza estão marcadas as regiões endêmicas povoadas pelas diversas espécies de triatomíneos transmissores da doença. Adaptado de: Coura et al, 2014.

1.2.3 Manifestações clínicas

Embora faça parte de um grupo monofilético, o *T. cruzi* apresenta uma ampla diversidade morfológica, fisiológica e ecológica, além de variado grau de infectividade e virulência, patogenicidade e resistência a drogas. Toda esta heterogeneidade tem sido alvo de muitos estudos bioquímicos e moleculares, e poderia ser a explicação para toda a variedade de manifestações clínicas e diferenças geográficas de morbidade e mortalidade (Rassi-Jr et al., 2012). Nesse contexto, em 2009 foi realizada uma reunião em Búzios (RJ-Brasil), que precedeu o XIII Congresso Internacional de Protozoologia, que reconheceu que a nomenclatura para a diversidade genética do *T. cruzi* deve ser classificada em seis DTUs (*discrete typing units*), *T. cruzi* I-VI (Zingales et al., 2009).

Em geral, as manifestações clínicas da doença de Chagas ocorrem em duas fases: aguda e crônica. A fase aguda começa de 6 a 10 dias após a infecção e dura em média de 4 a 8 semanas. Algumas vezes esta fase não é corretamente diagnosticada em virtude da natureza inespecífica dos sintomas, que incluem febre, mal estar, hepatomegalia e linfadenopatia comuns a várias infecções. Como sintoma mais específico, o edema inflamatório denominado chagoma de inclusão no lugar da picada do inseto triatomíneo pode ser observado em boa

parte dos casos. Se a picada for perto do olho é frequente a conjuntivite com edema da pálpebra, também conhecido por sinal de Romaña (Figura 1.6). Miocardites e meningoencefalites agudas são raras, mas quando ocorrem podem ser fatais a crianças entre um e cinco anos de idade. As anomalias observadas durante a fase aguda no eletrocardiograma aparecem em 50% dos casos, mas desaparecem após dois a três meses com a cura ou não da doença (Rassi-Jr et al, 2012).



Figura 1.6: Criança com chagoma característico no olho direito e edema da pálpebra conhecida como sinal de Romaña. Adaptado de Rey, 2008.

Durante a fase aguda, tripomastigotas sanguíneos podem ser facilmente encontrados no sangue, de tal maneira que durante a infecção, o parasito e seu hospedeiro entram em um balanço imunológico capaz de levar a cronicidade da doença em 20 a 60% dos casos. Nessa fase, a parasitemia é reduzida drasticamente e os pacientes se tornam assintomáticos, em alguns casos para o resto de suas vidas. Entretanto, de 15% a 30% dos indivíduos infectados progridem para uma fase crônica determinada por sintomas que envolvem danos a órgãos internos que debilitam o paciente e exigem tratamento específico. O coração é o principal órgão atingido, resultando numa patologia denominada cardiopatia chagásica crônica. Os órgãos que compõem o tubo digestivo também apresentam elevada incidência de patologias durante a fase crônica, sendo o megaesôfago e megacólon as mais comuns. As manifestações crônicas da doença frequentemente começam 10 a 25 anos após a infecção (Malik et al., 2015).

Rotineiramente, o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* é realizado pela observação microscópica de pequenas amostras de sangue após cerca de duas semanas depois da picada,

sendo mais aconselhável apenas na fase aguda da doença. Uma técnica cada vez menos utilizada é o xenodiagnóstico, onde o paciente é intencionalmente picado por barbeiros não contaminados e seu intestino é examinado em busca de parasitos quatro semanas depois. Durante a fase crônica, quando a busca do parasito fica mais complicada pela escassez de tripomastigotas circulantes, técnicas de sorodiagnóstico capazes de detectar anticorpos específicos contra o parasito no sangue como, ensaio enzimático de imunoadsorção (*ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e hemaglutinação, são as mais comumente utilizadas. A detecção do DNA do parasito por reação de cadeia em polimerase (PCR) tem se mostrado a mais sensível no diagnóstico e no acompanhamento da eficácia terapêutica, mas consiste numa técnica mais laboriosa, que necessita de maior padronização e estrutura laboratorial. Entretanto, apesar da progressiva evolução das técnicas diagnósticas, nenhuma delas consegue confirmar a cura em todos os casos (Rassi-Jr et al., 2012).

1.2.4 Tratamento

O tratamento de escolha para a doença de Chagas é frequentemente através da administração de nitroimidazóis (benzonidazol) e de 5-nitrofuranos (nifurtimox), entretanto o nifurtimox não se encontra mais disponível comercialmente no Brasil. Nenhum destes compostos é ideal para o combate da doença uma vez que não são ativos durante a fase crônica da doença, apresentam sérios efeitos colaterais, requerem administração por longos períodos de tempo sob supervisão médica, além de haver uma grande variação na susceptibilidade de isolados do parasito a ação destas drogas (Wilkinson & Kelly, 2009; Mckerrow et al., 2009; Urbina, 2010).

Drogas para o tratamento da doença de Chagas são de pouco interesse de indústrias farmacêuticas, sendo os principais problemas o alto custo dos investimentos e a falta de um mercado potencial e seguro nos países em desenvolvimento. Desta forma, apesar da redução na incidência da transmissão, ainda há desafios críticos como o tratamento de pacientes na fase crônica e a ocorrência de novos casos agudos em algumas regiões da América Latina. Portanto, de um modo geral, o desenvolvimento de uma nova quimioterapia antiparasitária ocorre pela investigação de drogas já aprovadas para o tratamento de outras doenças, uma vez que já foram submetidas a ensaios clínicos muito dispendiosos como, por exemplo, o posaconazol, ou através da determinação de um ou mais alvos específicos identificados em vias metabólicas importantes para o parasito (Soeiro & De Castro, 2009; Urbina, 2010).

Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado que o *T. cruzi* requer esteróis específicos para sua a viabilidade e proliferação celular, conhecidos como derivados de

ergosterol. Assim, etapas da biossíntese de esteróis deste parasito que são divergentes em relação à síntese realizada por células de mamíferos têm sido quimicamente validadas como o mais promissor alvo para o tratamento da doença de Chagas. Nesse contexto, derivados triazólicos, como o D0870 e o posaconazol, têm-se mostrado capazes de induzir cura em modelos murinos de fase aguda e crônica da doença de Chagas, assim como erradicar as formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi* de cultura de cardiomiócitos (Urbina & Docampo, 2003, Silva et al., 2006). No entanto, o elevado custo de produção do posaconazol e sua necessidade de administração oral juntamente com uma refeição rica em gorduras podem limitar seu uso no tratamento de infecções crônicas por *T. cruzi* (Morris, 2009).

Dentre os outros potenciais alvos quimioterápicos com compostos em desenvolvimento para o tratamento da doença de Chagas se destacam: as diamidinas aromáticas que se associam à fenda menor do DNA em sítios ricos em AT, sendo capazes de interferir na função do cinetoplasto em tripanossomatídeos (Soeiro et al., 2013); o sistema glutationa redutase, que reduz os níveis de radicais livres contribuindo para a manutenção de um ambiente intracelular redutor (Heby et al., 2007); a hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase, enzima responsável pela conversão de bases de purina a ribonucleotídeos, essencial para a síntese de material genético nos tripanossomatídeos (Wenck et al., 2004); e as peptidases do parasito, cujos inibidores irreversíveis peptídicos tais como diazometilcetonas, fluorometilcetonas, alilsulfonas, vinilsulfonas e vinilsulfonamidas, vêm apresentando bons resultados no tratamento de infecções experimentais (Mckerrow et al., 2009). Nesse contexto, inibidores irreversíveis da principal cisteína peptidase do *T. cruzi* (cruzipaína) como o K777 (Figura 1.7) tem apresentado resultados promissores *in vivo*, levando à redução da carga parasitária e das lesões cardíacas em camundongos infectados (Barr et al., 2005; Renslo & Mckerrow, 2006).

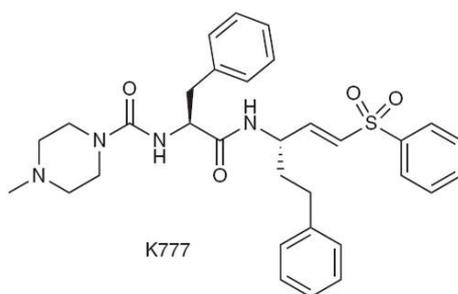


Figura 1.7: Estrutura química do inibidor da cruzipaína K777. Adaptado de Renslo & Mckerrow, 2006.

Com o conhecimento acumulado sobre a biologia e a bioquímica do *T. cruzi*, os esforços dirigidos à compreensão do mecanismo de ação de potenciais compostos contra este parasito se fazem necessários. O desenvolvimento de novas drogas pode vir a requerer a interação interdisciplinar dos diferentes campos da ciência como a biologia molecular e celular, química, bioquímica, farmacologia e toxicologia. Os avanços da genômica, da bioinformática, da química combinatória e das triagens automatizadas fortalecem a interação entre grupos de diferentes especialidades de modo a permitir a identificação de compostos eficazes com baixa toxicidade e a baixo custo de produção (Soeiro & Castro, 2009). Há ainda uma percepção cada vez maior na comunidade científica que os maiores desafios para a aprovação de quimioterápicos para tratamento de endemias tipicamente tropicais são muito mais de ordem econômica mundial e de marcos regulatórios brasileiros, do que relacionados a desafios científicos tecnológicos (Machado-Silva et al., 2006).

1.2.5 O *T. cruzi*

Taxonomicamente, *T. cruzi* é um protozoário classificado na classe Kinetoplastea, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Os membros desta família são também denominados tripanossomatídeos e, de forma geral, parasitam vertebrados (incluindo humanos), invertebrados (principalmente insetos) e plantas, causando sérios danos à saúde da população e à economia. Além da doença de Chagas causada pelo *T. cruzi*, o conjunto de manifestações clínicas que compõem as leishmanioses causadas pelas diversas espécies de *Leishmania* e a doença do sono causada pelo *T. brucei* são consideradas doenças negligenciadas causadas por tripanossomatídeos (Lopes et al., 2010).

Assim como os demais tripanossomatídeos, o *T. cruzi* possui organelas comuns aos demais eucariotos, como núcleo, retículo endoplasmático, Golgi e mitocôndria. Entretanto, o parasito apresenta algumas organelas e estruturas características da família Trypanosomatidae, como por exemplo, os microtúbulos subpeliculares, a estrutura paraflagelar, os reservossomos, o cinetoplasto, o citóstomo, os glicossomos e os acidocalcissomos (de Souza, 2002). A presença de um único flagelo e do cinetoplasto, uma estrutura formada por DNA altamente compactado que se organiza em maxi e mini círculos interligados contidos em uma mitocôndria única que se ramifica por toda a célula do parasito, constitui a característica mais marcante dos tripanossomatídeos. Estas particularidades são facilmente identificáveis ao microscópio ótico (d'Avila-Levy et al. 2015; de Souza, 2002).

Dentre as demais singularidades do *T. cruzi*, pode-se destacar o glicosomo, organela que quebra glicose em piruvato de forma mais eficiente que os demais eucariotos. (Vickermann, 1994). O glicosomo também possui outras funções relacionadas à biossíntese de pirimidinas, recuperação de purinas, síntese de éter-lipídios e β -oxidação de ácidos graxos (Michels et al., 2000). Outra característica de destaque do *T. cruzi* é o flagelo único que se exterioriza através da bolsa flagelar. O flagelo é composto basicamente por axonema e uma estrutura paraflagelar, que consiste em um complexo arranjo de filamentos proteicos de diferentes espessuras (25 a 70 nm). As principais funções associadas ao flagelo são: locomoção do parasito, adesão ao tecido hospedeiro, morfogênese, divisão e evasão do sistema imune (de Souza et al., 2010). A aderência do flagelo ao corpo do parasito define uma região especializada rica em proteínas imunogênicas de alto peso molecular denominada de zona de adesão flagelar (*FAZ – flagellar attachment zone*) (Gull, 1999).

Para garantir a sustentação celular, o *T. cruzi* conta ainda com um citoesqueleto composto por uma camada de microtúbulos subpeliculares que formam ligações cruzadas entre si e com a membrana plasmática garantindo a sustentação da célula e morfologia característica. Por outro lado, este arcabouço do citoesqueleto representa barreira importante ao transporte vesicular, restringindo o sítio de endocitose e exocitose à bolsa flagelar e a abertura da citofaringe onde os microtúbulos subpeliculares não estão presentes denominada citóstomo (Gull, 1999). Ao penetrarem nesta estrutura, as macromoléculas são internalizadas em vesículas endocíticas que irão se fundir com uma rede de túbulos e vesículas e, posteriormente, com os reservossomos. Essas organelas esféricas e eletrodensas de armazenamento, por sua vez, constituem o ponto final da via endocítica do parasito (De Souza et al., 2009) (Figura 1.8).

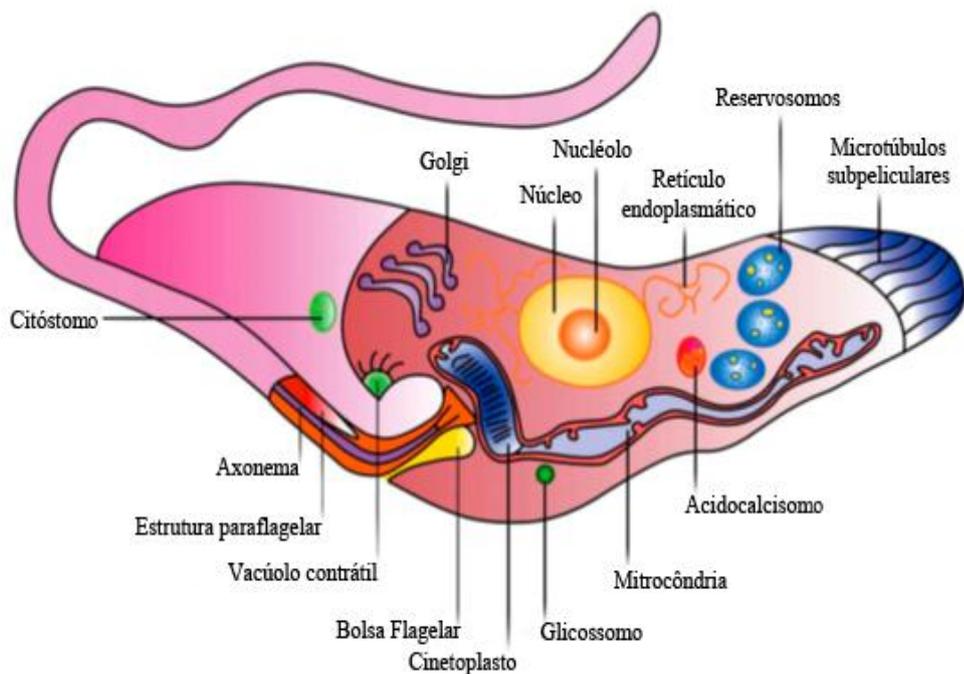


Figura 1.8: Representação esquemática da morfologia da forma epimastigota do *T. cruzi*. Adaptado de Lopes et al., 2010.

Morfologicamente, o *T. cruzi* apresenta ainda três formas evolutivas durante seu ciclo de vida heteroxênico: amastigota, tripomastigota e epimastigota. Resumidamente, essas três formas se diferenciam pela morfologia do corpo, e pela posição da bolsa flagelar e do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e ao local de emergência do flagelo, além, é claro, pela expressão diferenciada de diversas moléculas. Além das três principais formas distintas, o *T. cruzi* apresenta diversas formas intermediárias indefinidas com tamanho celular, local emergência do flagelo e forma do cinetoplasto distintos (De Souza, 2010) (Figura 1.9).

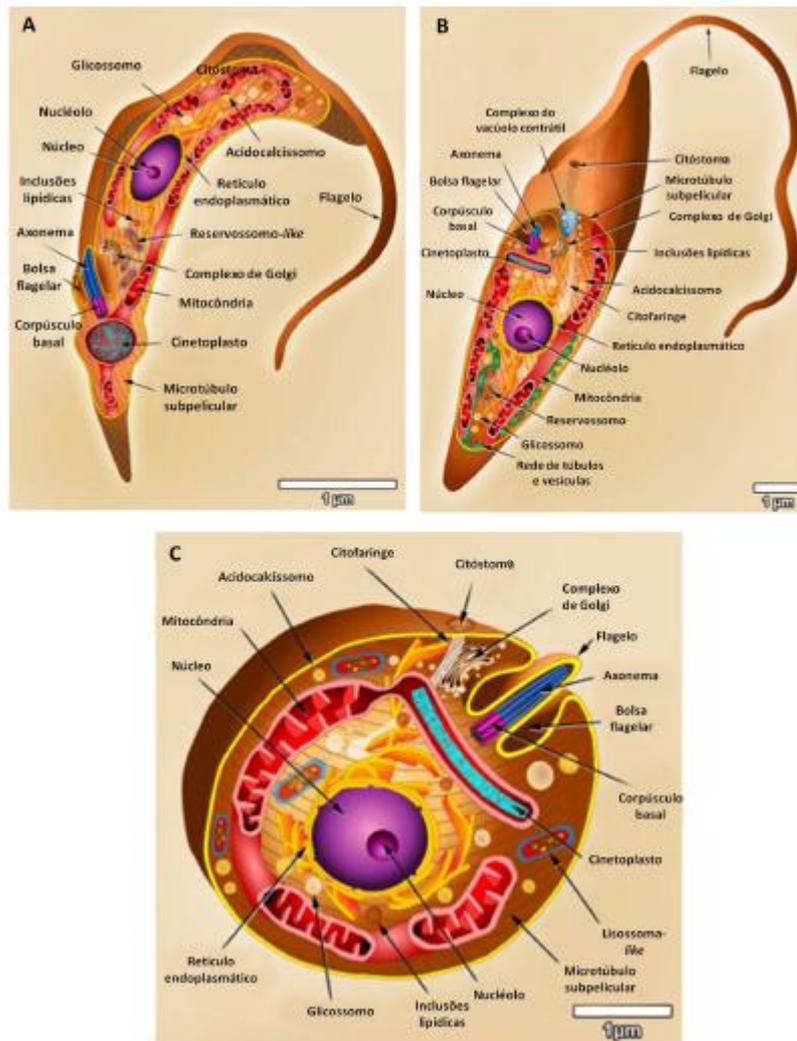


Figura 1.9: Ilustração em corte longitudinal das principais estruturas celulares das três formas evolutivas de *T. cruzi*. (A) Forma tripomastigota. (B) Forma epimastigota. (C) Forma amastigota. Adaptada de Teixeira et al., 2012.

1.2.6 Ciclo biológico

O ciclo biológico do *T. cruzi* é bastante complexo, envolvendo diferentes estágios de desenvolvimento em dois diferentes organismos hospedeiros: um hospedeiro vertebrado mamífero, podendo este ser o Homem; e um hospedeiro invertebrado que é o inseto triatomíneo hematófago, popularmente chamado de barbeiro, que é o vetor da doença em seu ciclo de transmissão convencional. As formas replicativas são denominadas de epimastigotas e amastigotas, enquanto as não replicativas de tripomastigotas, podendo estes ser ainda sanguíneos ou metacíclicos, se estão no hospedeiro vertebrado ou no inseto vetor, respectivamente.

O ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado se inicia quando um animal de sangue quente se infecta pelo barbeiro (triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* ou *Rhodnius*) que excreta as formas tripomastigotas metacíclicas do parasito em suas fezes, durante ou logo após alimentar-se do sangue (Figura 1.10). Estas formas infectantes podem penetrar por meio de lesões na pele ou ainda através de mucosas. Logo após a penetração, os tripomastigotas metacíclicos são fagocitados por macrófagos, e diferenciam-se em amastigotas. Estas formas arredondadas se reproduzem por divisão binária, se diferenciando novamente em tripomastigotas sanguíneos que rompem a célula hospedeira e disseminam-se para o restante do organismo pela circulação sanguínea. Quando chegam ao coração, esôfago ou cólon, principais órgãos atingidos, os parasitos penetram ativamente nas fibrilas musculares desses órgãos e repetem o ciclo intracelular. Os tripomastigotas podem ainda ser fagocitados por macrófagos nos órgãos do sistema fagocitário mononuclear (fígado, baço, linfonodos, medula óssea), onde se reproduzem novamente como amastigotas, utilizando o sistema linfocitário para disseminação para órgãos e tecidos (Lima et al., 2010; Bern et al., 2011).

Em dado momento da infecção, os tripomastigotas sanguíneos são ingeridos por outro triatomíneo durante um novo repasto sanguíneo, reiniciando assim o ciclo no hospedeiro invertebrado. Uma vez ingeridas pelo inseto, as formas tripomastigotas aderem à parede epitelial do intestino médio e se diferenciam em epimastigotas, que são formas proliferativas flageladas de corpo mais largo e rígido. Após intensa proliferação, as formas epimastigotas se diferenciam novamente em tripomastigotas metacíclicas conforme migram em direção ao intestino posterior do triatomíneo. Estas formas metacíclicas não ficam aderidas ao epitélio do intestino, estando prontas para iniciar uma nova infecção ao hospedeiro vertebrado (Bern et al., 2011).

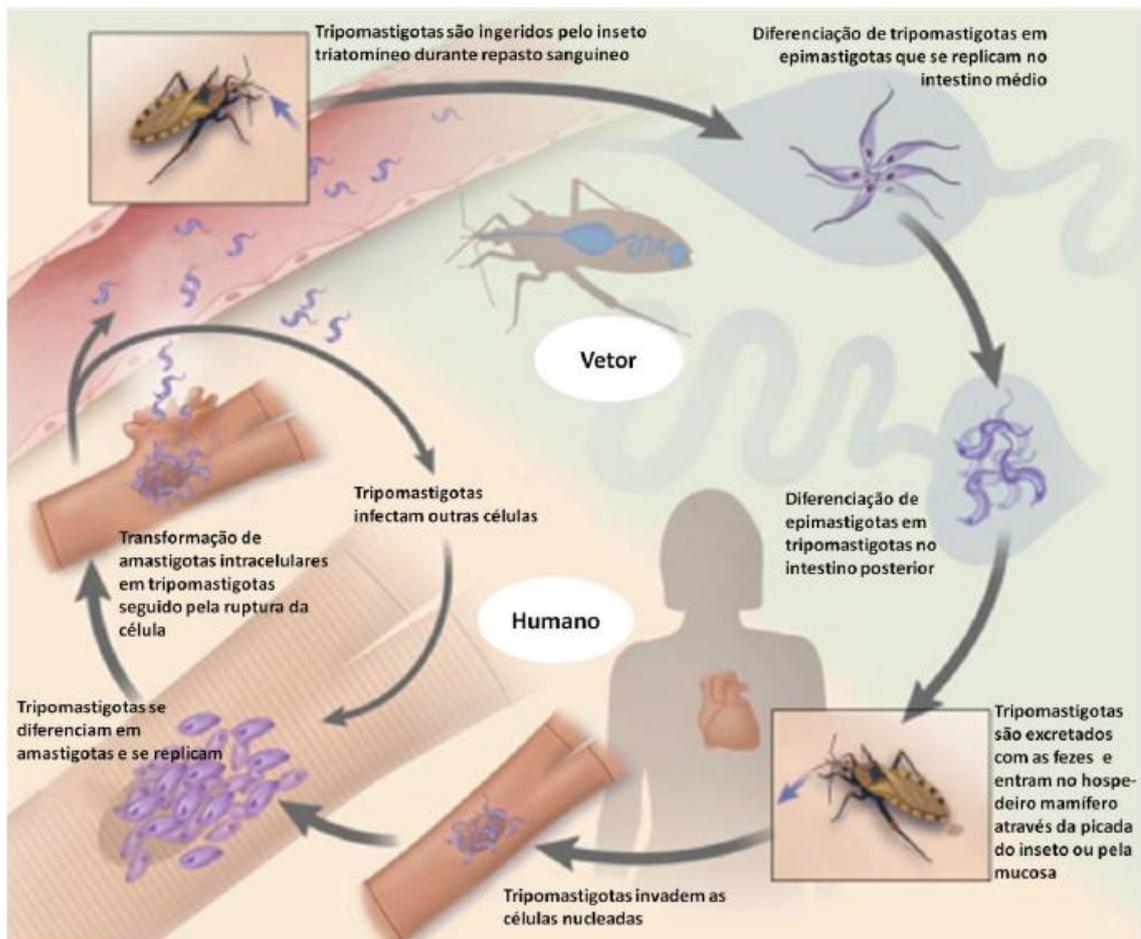


Figura 1.10: Ciclo biológico heteroxênico do *T. cruzi*. Adaptado de Bern et al., 2011.

Epidemiologicamente, três distintos ciclos de transmissão vetorial do *T. cruzi* são considerados. O ciclo de maior importância é o doméstico, já que perpetua a infecção nos seres humanos. No ciclo silvestre, participam triatomíneos que, uma vez contaminados, infectam roedores, marsupiais e outros animais silvestres. Por fim, no ciclo peridoméstico participam roedores, marsupiais, gatos e cães que entram e saem das residências, e os insetos silvestres atraídos às casas pela disponibilidade de alimento. Esse ciclo serve de ligação entre os ciclos doméstico e silvestre (Rey, 2008). Ao todo, hoje se estima que mais de 130 espécies de triatomíneos representem potenciais vetores de *T. cruzi*, mas somente cinco espécies possuem particular importância na transmissão da doença de Chagas no Brasil (Coura & Dias, 2009).

1.2.7 Regulação da expressão gênica em *T. cruzi*

Durante sua vida, todas as células produzem constantemente por transcrição moléculas de RNA que estão envolvidas direta ou indiretamente em processos como: reprodução, desenvolvimento, reparo e regulação de metabolismo. Assim, a maior parte dos organismos controla a expressão de seus genes a nível transcricional antes do início da síntese do RNA mensageiro, embora sejam conhecidos outros mecanismos de controle durante a transcrição, ou mesmo em nível de estabilidade e transporte da molécula de RNA já formada (Martínez-Calvillo et al., 2010).

O *T. cruzi*, assim como todos os tripanossomatídeos, apresenta características peculiares quanto à organização do seu genoma e sua expressão gênica. A organização incomum do genoma dos tripanossomatídeos foi observada pela primeira vez em 1999, no cromossomo 1 de *L. major*, o primeiro cromossomo inteiramente sequenciado desta família (Myler et al., 1999). Os genes de tripanossomatídeos são organizados dentro de grandes grupos policistrônicos, PGCs (*Polycistronic gene clusters*), que originam transcritos de pré-RNAs mensageiros policistrônicos, representados por uma única grande molécula de RNA, geralmente contendo informação de diversos genes de vias não necessariamente relacionadas entre si, como ocorre nos operons de procariotos. Assim, estes RNAm policistrônicos devem ser processados até RNAm individuais por dois processos: *trans-splicing* e poliadenilação. O *trans-splicing* é o processo que adiciona à extremidade 5' de cada região codificante presente nos RNAm maduros a estrutura de um capeamento de 39 nucleotídeos, denominada *splice leader*. Enquanto isso, a poliadenilação ocorre em regiões ricas em pirimidinas presentes nas regiões intergênicas (Martínez-Calvillo et al., 2010).

Portanto, os genes dos tripanossomatídeos são policistrônicos e não se tem conhecimento de mecanismos de regulação pré-transcricionais, embora sejam encontradas diferentes concentrações de RNAm maduros nos diferentes morfotipos do parasito. Análises por *Northern blotting* e qPCR da glicoproteína gp82, por exemplo, mostram o aumento dos níveis de RNAm em tripomastigotas metacíclicos comparados com os níveis de RNAm em epimastigotas, além de uma expressão reduzida de gp82 em cepas avirulentas deste parasito (Gentil et al., 2009). Já em *Leishmania*, a glicoproteína gp63 se destaca por apresentar expressão diferencial de acordo com os estágios de vida do parasito (Yao et al., 2003). Portanto, a ausência de mecanismo de regulação transcricional em conjunto com dados indicando o acúmulo específico de RNAm levanta a questão sobre de que maneira uma transcrição constitutiva permite o acúmulo diferencial de RNAm distintos.

Atualmente, se acredita que a expressão gênica em tripanossomatídeos seja regulada principalmente a nível pós-transcricional (Figura 1.11). As sequências 3'UTR e 5'UTR (*untranslated region*) dos RNAm têm sido amplamente estudadas, e há indícios de seu papel no processamento dessas moléculas, o que afetaria sua estabilidade, meia vida e tradução (Araújo & Teixeira, 2011). Nesse sentido, um estudo mostrou recentemente que a proteína de choque térmico HSP70 possui regulação gênica em *T. cruzi*, uma vez que a meia vida dos RNAm de HSP70 aumenta após o choque térmico e a estabilização é dependente da síntese de proteínas. Os ensaios que avaliaram o decaimento de RNA e o ensaio com gene repórter para região 5'e 3' UTR concluíram que as regiões de HSP70 3'e 5'UTR regulam a estabilidade do RNAm durante o choque térmico em *T. cruzi* (Rodrigues et al., 2010). Até o momento, os poucos estudos acerca de expressão gênica em tripanossomatídeos indicam que a abundância RNAm e de proteínas não são correlacionáveis, e também que o controle traducional e pós-traducional tem um papel importante na regulação da expressão gênica (Martínez-Calvillo et al., 2010; Kramer, 2012).

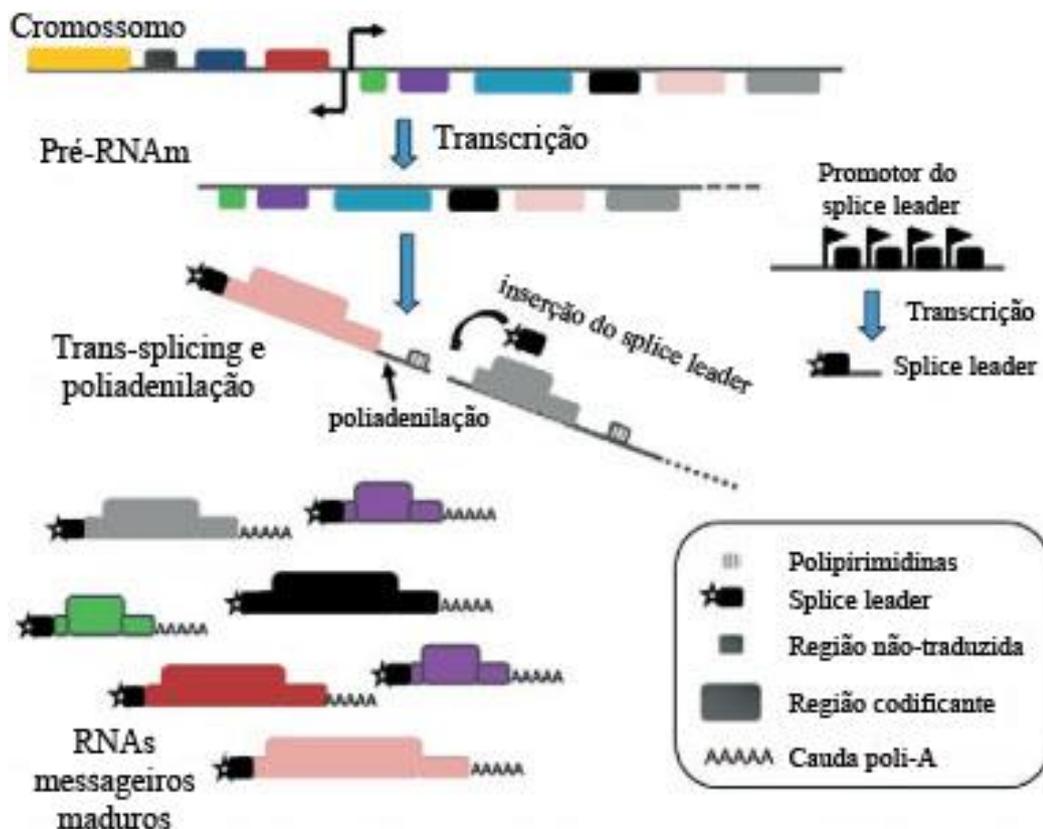


Figura 1.11: Regulação da expressão gênica no parasito *T. cruzi*. Os grupos de genes policistrônicos são transcritos em grandes RNAs mensageiros policistrônicos (pré-RNAm) e processados em reações de *trans-splicing* e poliadenilação. Em seguida, os RNAm maduros monocistrônicos recebem a

inserção da sequência do *splice leader* proveniente do cinetoplasto, e são acumulados em diferentes níveis no citoplasma por mecanismos ainda pouco conhecidos. Adaptado de Araújo & Teixeira, 2011.

Recentemente, Kelly e colaboradores (2012) criaram um novo marco no estudo da regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos. Ao estudarem a posição genômica dos transcritos de RNA que têm expressão diferencial durante o choque térmico em *T. brucei*, os autores puderam observar que esses genes possuem uma posição seletiva nas unidades transcricionais policistrônicas: as moléculas que sofrem regulação positiva posicionam-se distantes dos sítios de iniciação da transcrição, enquanto as reguladas negativamente ficam próximas a esses sítios. A abundância de RNAm durante o ciclo celular também é dependente da localização dos genes correspondentes em relação ao sítio de início da transcrição. A organização dos genes no genoma dos tripanossomatídeos pode estar relacionada a um controle temporal coordenado, uma vez que promotores seletivos ainda não foram caracterizados nesses organismos (Kelly et al., 2012). Portanto, estudos acerca da abundância da expressão gênica irão ajudar no conhecimento desta parte da biologia destes parasitos.

1.3 Calpaínas em tripanossomatídeos

Dentre todos os genomas analisados até hoje, o genoma dos protistas da família Trypanosomatidae parece ser o que mais possui genes relacionados às calpaínas (Ersfeld et al. 2005; Croall & Ersfeld, 2007; Soromachi et al., 2011). Mesmo antes do mapeamento completo do genoma dos tripanossomatídeos, uma cisteína peptidase neutra dependente de cálcio foi detectada nas formas promastigotas de *L. donovani* (Bhattacharya et al., 1993). A enzima foi denominada caldonopaína devido às suas características bioquímicas serem muito semelhantes às calpaínas, embora a reatividade cruzada de anticorpos anti-calpaínas ou a determinação da sequência da proteína para análise de homologia nunca tenham sido descritas. Portanto, ainda há dúvidas quanto à identidade da proteína como o primeiro relato de calpaína na família Trypanosomatidae. Anos mais tarde, o mesmo grupo estudou o papel da caldonopaína sobre a interação *in vitro* de *L. donovani* com macrófagos murinos, onde foi possível observar que a ação do cálcio para a atividade da caldonopaína consiste em um pré-requisito para facilitar a invasão dos parasitos nas células hospedeiras, sugerindo a participação desta molécula neste processo (Dey et al., 2006).

O tripanossomatídeo cuja caracterização das calpaínas está mais avançada até o momento é o *T. brucei*. Em 2001, Hertz-Fowler e colaboradores identificaram uma proteína

com similaridade com a região catalítica das calpaínas associada ao citoesqueleto na forma tripomastigota procíclica do *T. brucei*, e a denominaram CAP5.5. Na tentativa de melhor caracterizar esta calpaína, os autores descobriram que se tratava de uma proteína estágio específica, palmitoilada e miristoilada na sua porção N-terminal, o que sugere uma interação da molécula com a membrana celular do parasito. Além disso, a CAP5.5 não apresenta o domínio IV, que possui sítios de ligação ao cálcio encontrado nas calpaínas clássicas, e também não foi detectada atividade proteolítica. Tal fato pode ser explicado pela troca dos aminoácidos cisteína e histidina, que compõem a tríade catalítica das calpaínas clássicas, por resíduos de serina e tirosina. Contudo, a CAP5.5 foi, de fato, o primeiro homólogo de calpaína caracterizado em tripanossomatídeos.

Logo após a publicação do genoma dos três principais tripanossomatídeos de importância médica, *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* (Berriman et al., 2005; El-Sayed et al., 2005; Ivens et al., 2005), o mesmo grupo que identificou e caracterizou a CAP5.5 do *T. brucei* revelou a presença de uma enorme e diversa família de calpaínas no genoma destes tripanossomatídeos (Ersfeld et al., 2005). Ao todo, foram identificadas 18 sequências gênicas com homologia à calpaínas em *T. brucei*, 27 em *L. major* e 24 em *T. cruzi*. O domínio catalítico dessas sequências apresenta uma taxa de identidade de 20 a 30%, mas a tríade catalítica da maior parte das calpaínas identificadas não está intacta. Na região N-terminal de algumas dessas calpaínas foram identificados ainda sítios de acilação por ácidos graxos indicando possível associação à membrana plasmática, e não se identificou o domínio IV na extremidade C-terminal em nenhuma sequência, embora alguns sítios de ligação ao cálcio e no domínio catalítico estão parcialmente conservados no domínio II das calpaínas de tripanossomatídeos.

Ersfeld e colaboradores (2005) ainda classificaram as calpaínas em cinco grupos diferentes com base na presença e disposição dos domínios identificados. Os homólogos dos grupos 1 e 2 apresentam quatro domínios, dI, dII, dIII e uma cauda C-terminal, e são distinguidos pela identidade do domínio N-terminal: enquanto o grupo 1 apresenta sequências com o domínio I altamente conservadas entre os tripanossomatídeos, o grupo 2 contém o domínio pouco conservado. Esses dois grupos são os que apresentam uma configuração estrutural de domínios mais próxima a das calpaínas atípicas. As moléculas classificadas como o grupo 3 foram denominadas de pequenas proteínas relacionadas às calpaínas de cinetoplastídeos (SKCRPs), uma vez que consistem em pequenas sequências que possuem apenas o domínio I das calpaínas exclusivas desses organismos. Foram encontrados seis desses genes relacionados às calpaínas em *T. brucei*, nove em *T. cruzi* e dez em *L. major*,

codificando proteínas de uma média de 200 aminoácidos. Por fim, os grupos 4 e 5 contêm calpaínas altamente divergentes e ainda não estudadas. O grupo 4 é caracterizado pela presença de três repetições dos domínios II e III, enquanto o grupo 5 apresenta uma região rica em repetições do domínio I na porção N-terminal e apenas um domínio II e um domínio III. A Figura 1.12 ilustra a classificação proposta por Ersfeld e colaboradores.

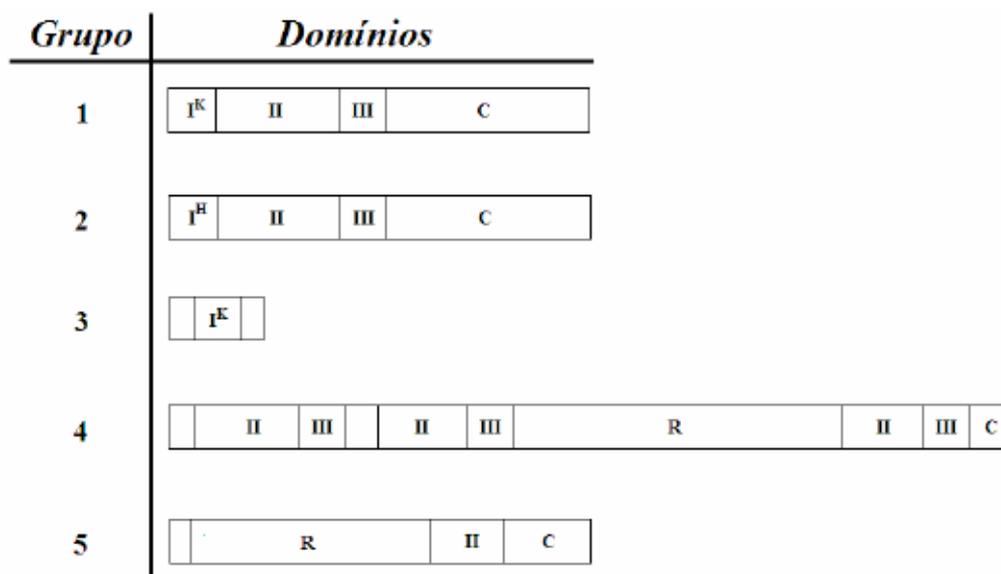


Figura 1.12: Representação esquemática da classificação das calpaínas presentes no genoma dos tripanossomatídeos em cinco grupos distintos proposta por Ersfeld e colaboradores (2005). As siglas representam: I^K domínio I conservado entre tripanossomatídeos; I^H domínio I não conservado; II domínio II; III domínio III; C domínio C-terminal; e R região rica em repetições.

Recentemente, seguindo uma abordagem molecular para melhor caracterizar as cópias gênicas da proteína flagelar H49 e suas repetições de sequências, Galetovic e colaboradores (2011) descobriram que as H49 são membros da família de calpaínas do *T. cruzi*. Através da busca no genoma de sequências similares às da sequência clonada da proteína H49 (Gene Bank ID L09564), os autores identificaram oito genes contendo as repetições de 204 pares de base desta proteína associadas ao domínio catalítico das calpaínas. Foi possível ainda identificar ao todo 53 calpaínas anotadas no genoma do *T. cruzi*, sendo que estas oito H49/calpaínas fazem parte dos grupos 4 e 5 previamente classificados por Ersfeld e colaboradores (2005).

Paralelamente a identificação da CAP5.5 no *T. brucei* e aos estudos de identificação genômica das calpaínas em tripanossomatídeos, nosso grupo de pesquisa se envolveu no estudos dessas moléculas. Primeiramente, em um estudo com o tripanossomatídeo monoxênico classicamente não patogênico *Angomonas deanei*, previamente classificado

como *Crithidia deanei* (Teixeira et al. 2011), foi purificada uma cisteína peptidase neutra dependente de cálcio, de aproximadamente 80 kDa totalmente inibida por E-64 e EGTA. Esta proteína purificada apresentou reatividade cruzada com um anticorpo que reconhece a família de calpaínas de *D. melanogaster* (d'Avila-Levy et al., 2003). Pouco tempo depois, em *L. amazonensis*, nosso grupo também detectou uma proteína de aproximadamente 80 kDa, com reatividade cruzada contra o mesmo anticorpo, e pode-se observar efeitos citotóxicos causados pelo inibidor III de calpaínas, MDL28170 (Z-Val-Phe-CHO) (Figura 1.13) em formas promastigotas do parasito (d'Avila-Levy et al., 2006).

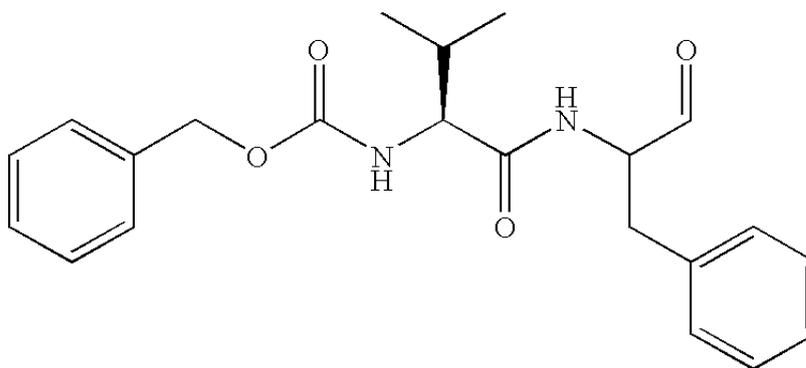


Figura 1.13: Estrutura química do inibidor III de calpaínas, MDL28170. Adaptado de MERK MILLIPORE GROUP – Calpain Inhibitors (<http://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Calpain-Inhibitor-III>); acessado em 27 de julho de 2015.

O efeito do inibidor de calpaínas MDL28170 foi avaliado sobre as diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, onde foi capaz de inibir a proliferação do parasito de modo dose-dependente, além de diminuir a percentagem de infecção em macrófagos murinos e bloquear a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas *in vitro* (Sangenito et al., 2011; Ennes-Vidal et al., 2012). Epimastigotas tratados apresentaram ainda danos ultraestruturais no Golgi, reservossomos e na membrana plasmática, além de aderirem menos ao intestino de *Rhodnius prolixus ex vivo* (Ennes-Vidal et al., 2011). A reatividade cruzada de anticorpos direcionados contra calpaínas de diversos organismos, incluindo a CAP5.5 de *T. brucei*, também foi observada nesses estudos com *T. cruzi*, o que sugere que estas proteínas estão fazendo parte de eventos cruciais no ciclo de vida do parasito.

II. JUSTIFICATIVA

As calpaínas constituem uma família de cisteíno-peptidases dependentes de cálcio classicamente citosólicas, que estão expressas em todas as células de mamíferos e possuem atividade proteolítica limitada em pH neutro. A sua atividade proteolítica está mais envolvida no processamento de substratos para transformação e/ou modulação para ativação. Portanto, as calpaínas podem ser consideradas “proteases moduladoras” responsáveis por diversas funções celulares, como transdução de sinais, divisão celular, apoptose e diferenciação (Soromachi et al., 2011). No genoma humano, há ao todo 16 genes que codificam o domínio proteolítico das calpaínas, que podem ou não estar associados a diversos tipos de domínios de ligação ao cálcio, domínio Zinco-finger, entre outros. A versatilidade das calpaínas é ainda legitimada pela ampla diversidade de homólogos encontrados em insetos, nematódeos, plantas, fungos, protozoários parasitos como os tripanossomatídeos, e bactérias. Em todos esses modelos estudados, as funções fisiológicas celulares desempenhadas pelas calpaínas são tão importantes que diversas condições estão associadas à desregulação dessa atividade: distrofia muscular, diabetes e tumorigênese em humanos; letalidade embriogênica em camundongos; deficiência neuronal em moscas; diferenciação sexual incompleta em nematodos; deficiência no desenvolvimento celular do milho; e suscetibilidade a choques alcalinos e osmóticos em levedura (Zhao et al., 2012). Nesse sentido, diversos inibidores de calpaínas estão em estágios pré-clínicos de desenvolvimento para o tratamento de doenças humanas onde das calpaínas estão com sua atividade desregulada.

Diferente dos mamíferos, a maior parte dos organismos apresenta poucas sequências de calpaínas em seus genomas. Contudo, nos tripanossomatídeos essa realidade é diferente. Em 2005, Ersfeld e colaboradores descreveram a presença de uma grande e diversa família de 24 sequências de calpaínas em *T. cruzi*, 18 em *T. brucei* e 27 em *L. major*. Os autores classificaram as sequências encontradas em 5 grupos diferentes baseados na presença e na conservação dos seus domínios. Em *T. brucei*, os estudos desse mesmo grupo estão mais avançados, inclusive com dados que apontam uma expressão diferencial de algumas variantes nas diferentes formas evolutivas do parasito, que estão envolvidas com a correta morfogênese do parasito (Olego-Fernandez et al., 2009, Liu et al., 2009, Hayes et al., 2014). Já no parasito *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, Galetovic e colaboradores (2011) encontraram recentemente um maior número de sequências de calpaínas no genoma do parasito – 53 ao todo - enquanto buscavam uma melhor caracterização de um fator de virulência clássico do parasito, a proteína flagelar H49. Esta proteína está associada à zona de

adesão do flagelo e parece ter uma função basicamente estrutural. Todas as 8 cópias identificadas como H49 possuem o domínio II, que contém o sítio catalítico das calpaínas. Contudo, as calpaínas presentes na família Trypanosomatidae ainda aguardam estudos mais detalhados, uma vez que essa grande e surpreendente expansão dos genes pode estar relacionada às diferentes condições ambientais que o parasito enfrenta para sobreviver, proliferar e se diferenciar nos hospedeiros vertebrados e invertebrados durante seu ciclo de vida. Portanto, o estudo das sequências encontradas no genoma, quanto a expressão gênica e proteica relativas, assim como da localização celular das calpaínas nas diversas formas do parasito pode ajudar a determinar as funções dessa família multigênica de grande diversidade e importância na literatura. De um modo geral, este trabalho pretende contribuir de modo efetivo para a melhor compreensão da expressão e localização celular das calpaínas nas diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho objetivou primeiramente analisar e classificar as calpaínas no genoma de *T. cruzi* para em seguida avaliar a expressão gênica e localização celular nas diferentes formas do parasito.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Analisar a presença das calpaínas no genoma de *T. cruzi*;
- 2) Classificar as sequências obtidas em grupos visando a seleção de genes para estudos de expressão gênica;
- 3) Comparar a expressão gênica relativa dos genes entre formas epimastigota, amastigota e tripomastigota;
- 4) Identificar uma sequência peptídica consenso entre as calpaínas para produção de um anticorpo anti-calpaínas;
- 5) Avaliar a expressão de calpaínas reconhecidas pelo anticorpo obtido em epimastigota, amastigota e tripomastigota.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análises *in silico* da presença de calpaínas no genoma do *T. cruzi*

Inicialmente, a identificação de calpaínas foi feita através de varreduras nos genomas de *T. cruzi* disponíveis na base de dados do Trityp db (<http://tritypdb.org>) utilizando duas abordagens complementares. As buscas dos genes de calpaínas no genoma foram feitas localmente utilizando os programas do Blast e HMMER. A partir de sequências previamente identificadas, foi criado um modelo utilizando o HMMModel posteriormente calibrado pelo HMMcalibrate. Após a elaboração do modelo HMM foi feita a busca com o HMMsearch na base de dados de proteínas do organismo. Paralelamente também foi feita uma busca utilizando as ferramentas do pacote do Blast e pela palavra chave “calpain” no banco de dados. Utilizamos principalmente o BlastX e o tBlastn para analisarmos as proteínas e genomas da espécie em estudo. As sequências obtidas foram consideradas como calpaínas por similaridade com sequências já descritas de outros organismos, para tal foi considerado o valor de corte do e-value de 10^{-3} . As sequências obtidas com as estratégias mencionadas acima foram comparadas por alinhamentos múltiplos utilizando o programa MAFFT para podermos identificar e remover possíveis sequências redundantes.

4.2 Classificação e análise das sequências pertencentes às famílias multigênicas e desenho de iniciadores específicos

As sequências obtidas foram alinhadas para a identificação do grupo funcional baseado nos domínios conhecidos das calpaínas, utilizando os programas SMART (smart.embl-heidelberg.de) e ProDom (prodom.prabi.fr/prodom). As sequências que possuem os principais domínios, incluindo o domínio proteolítico conservado, foram selecionadas para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores para análise da expressão gênica das diversas formas evolutivas do *T. cruzi*. Esses iniciadores foram desenhados utilizando o programa Primer3plus (www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi) otimizados para uso em PCR quantitativo e conferidos tanto com as demais sequências de calpaínas peptidases, quanto contra os respectivos genomas para garantir a especificidade da PCR.

4.3 Cultivo das diferentes formas do *T. cruzi*

Formas epimastigotas do *T. cruzi* pertencentes à cepa Y da Coleção de Protozoários da Fiocruz (COLPROT 106, www.colprot.fiocruz.br) foram cultivadas a 28 °C em meio

complexo de Warren suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino termodesativado (Warren et al., 1964). Na fase logarítmica de crescimento, 10^9 células foram contadas em Câmara de Neubauer, recolhidas por centrifugação a $1500 \times g$ por 10 min e lavadas três vezes em tampão salina fosfatado (PBS). O isolamento de formas tripomastigotas e amastigotas do parasito *T. cruzi* foi realizado de acordo com Fietto e colaboradores (2004), utilizando tripomastigotas sanguíneos obtidos no pico da parasitemia de camundongos *Swiss*. (CEUA LW 16/13). Para obtenção dos tripomastigotas, cerca de 5×10^6 células Vero foram infectadas com tripomastigotas obtidos de infecção murina na proporção 1:10. Após 5–6 dias, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a $500 \times g$ por 5 min e deixado em repouso a 37 °C por 30 min. Durante este período, os tripomastigotas do precipitado se movem em direção ao sobrenadante, permanecendo os amastigotas no precipitado. Após este procedimento, o sobrenadante foi coletado e centrifugado, a $3.000 \times g$ por 10 min para coleta das formas tripomastigotas. A pureza deste protocolo de purificação é de aproximadamente 95% para cada uma das formas do parasito (Fietto et al., 2009).

4.4 PCR, purificação do produto e sequenciamento

As amostras das três formas evolutivas do *T. cruzi* tiveram seu RNA extraído pela metodologia do Trizol (Invitrogen), que em seguida foi convertido em cDNA pela reação da transcriptase reversa. O cDNA obtido foi amplificado pela PCR com os oligonucleotídeos iniciadores desenhados (tabela 4.1) adotando as seguintes condições: 20 ng de cDNA molde, 1 unidade de *Taq* polimerase (Invitrogen), 200 μ M de cada dinucleotídeo, 2 mM de $MgCl_2$, 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador e 2 μ L de tampão de PCR 10 \times (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4, KCl 500 mM) (volume final de 20 μ L). A ciclagem da PCR realizada no termociclador GeneAmp 9600 (Applied Biosystems) consistiu em: 95 °C por 5 min para ativação da enzima; 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 65 °C por 30 s e 72 °C para amplificação do gene de interesse; e 72 °C por 4 min para extensão final. Em seguida, os produtos de DNA amplificados foram visualizados através de coloração com Nancy-520 (Sigma) após separação eletroforética em géis de agarose 1,5% contendo tampão TBE (Tris 1,1 M; Ácido Bórico 0,9 M; EDTA 25 mM, pH 8.3) em cuba horizontal por 50 min à 90 V. Os géis foram analisados e as imagens registradas através de um sistema fotográfico de documentação em gel. As bandas correspondentes aos produtos da reação de PCR foram incisadas e purificadas através do kit de purificação de produtos de PCR GFX (Ge Healthcare), utilizando o protocolo do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada com uso do kit de sequenciamento *BigDyeTM Terminator v3.1* (Applied Biosystems), utilizando a reação padrão

com 2 μL de DNA molde (5-20 ng), 1 μL de Tampão Applied Biosystems 5 \times , 1 μL de *BigDye* (Applied Biosystems) e água Milli-Q qsp 10 μL . A ciclagem da reação consistiu em 35 ciclos de 96 °C por 15 s, 50 °C por 10 s e 60 °C por 4 min. A precipitação das amostras foi realizada com acetato de sódio-EDTA 0,8 M, etanol 95% e 70%. Após a secagem, as amostras foram submetidas ao sequenciamento automático no sequenciador capilar ABI 3730 (Applied Biosystems) utilizando os mesmos oligonucleotídeos da PCR, na plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/ FIOCRUZ.

Tabela 4.1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores dos transcritos de calpaínas.

Identificação do RNA	Nome atribuído	Sequência nucleotídica	Tamanho do produto
XM_802888.1	TcCalp1 Fw	5' TGGATGATGCTGGGCGGGAG 3'	93 pb
	TcCalp1 Rev	5' CCTCCTTGACGCGCTCCTCT 3'	
XM_814216.1	TcCalp2 Fw	5' ATGGAGCCCGTTCATCCCC 3'	94 pb
	TcCalp2 Rev	5' CCGCTGGGTGCTTTCGCTTG 3'	
XM_809547.1	TcCalp3 Fw	5' AGGGCGGTGGTGTCTGCTAC 3'	115 pb
	TcCalp3 Rev	5' TCCGCCTTCTGCTCAACCCG 3'	
XM_809545.1	TcCalp4 Fw	5' GCTTAGGGCTGGAGCTGGGT 3'	107 pb
	TcCalp4 Rev	5' GCCGCATTCCCCACACACAC 3'	
XM_815008.1	TcCalp5 Fw	5' CGTAGTCCGGTGGAGGTGGG 3'	128 pb
	TcCalp5 Rev	5' TCCGTTTGGCACGACACCGT 3'	
XM_806634.1	TcCalp6 Fw	5' AGGTTTGCCCACAGCAGCGA 3'	149 pb
	TcCalp6 Rev	5' AATCGAGAGGCGGGACACCC 3'	
XM_797497.1	TcCalp7 Fw	5' TCCGCCACTTGGACCCATCC 3'	114 pb
	TcCalp7 Rev	5' CACCAGCAGGAGTTCGGCAC 3'	
XM_799223.1	TcCalp8 Fw	5' TCCGTGCTGGGTGAATATCGGC 3'	90 pb
	TcCalp8 Rev	5' CTCGGGAGATGCTGCAAACGC 3'	
XM_815007.1	TcCalp9 Fw	5' TACCCAGACGTGGCTGAGGC 3'	108 pb
	TcCalp9 Rev	5' AAAGGAAACGCCCCACCGT 3'	
XM_797584.1	TcCalp10 Fw	5' TGCAGAGTCAAGGGACCGGG 3'	129 pb
	TcCalp10 Rev	5' AGTACAGGGCACCACCAGCC 3'	
XM_811602.1	TcCalp11 Fw	5' CATTCCCCGCACCACATCGG 3'	106 pb
	TcCalp11 Rev	5' ACTCCTCGTTGCAGGAGCCC 3'	
XM_807018.1	TcCalp12 Fw	5' GGAAGAAACAGTGCGGGCGG 3'	121 pb
	TcCalp12 Rev	5' AGCGTGTGTCAGGAACGGCA 3'	
XM_804721.1	TcCalp13 Fw	5' CGACACGACGAGTACCCGCA 3'	133 pb
	TcCalp13 Rev	5' AACGGCGACGTCATCCGCCA 3'	
XM_812364.1	TcCalp14 Fw	5' GTCGAGAACGCCTTGCTGCT 3'	112 pb
	TcCalp14 Rev	5' TGCCGAGGGATTTGTCCTGC 3'	
XM_815009.1	TcCalp15 Fw	5' TTGGGGCACCGACCTTTGTC 3'	90 pb
	TcCalp15 Rev	5' ACGCCACACATCATCCTTAGC 3'	
XM_809239.1	TcCalp16 Fw	5' AACAGCGAGTGGGGTGAGGG 3'	145 pb
	TcCalp16 Rev	5' GCTTGTGTCGTTGGTCCGGC 3'	
XM_807044.1	TcGAPDH Fw	5' GTCGAGAACGCCTTGCTGCT 3'	100 pb
	TcGAPDH Rev	5' TGCCGAGGGATTTGTCCTGC 3'	
AF232214.1	Tc18S Fw	5' GTGTGACCAAAGCAGTCATTCG 3'	124 pb
	Tc18S Rev	5' TGTCACACTGCCCCATAATCTC 3'	

Fw: *foward*; Rev: *reverse*; pb: pares de base.

4.5 Avaliação da expressão de RNAm dos genes relacionados às calpaínas peptidases nas diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* por RT-PCR em Tempo Real

Os níveis de expressão destas peptidases nas diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* foram comparados por RT-PCR acoplado a PCR em tempo real. Apesar de não haver controle transcricional nestes protozoários, mecanismos de estabilização das moléculas de RNAm parecem estar envolvidos com o aumento da meia-vida do RNAm e com os níveis traducionais das proteínas. Assim, o RNAm previamente isolado pelo uso da metodologia do Trizol (Invitrogen) foi convertido a DNA complementar pela reação da transcriptase reversa, incubando-se o RNA com um iniciador poli-(d)T seguindo as instruções do fabricante do kit SuperScript III (Invitrogen). Posteriormente, as amostras foram diluídas e utilizadas na reação em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o reagente Go-Taq PCR Master Mix (Promega). Oligonucleotídeos iniciadores desenhados para os genes GAPDH e 18S foram utilizados como controles endógenos. As reações em tempo real foram realizadas em um sistema ABI Prism 7500 FAST (Applied Biosystem), disponível na plataforma de PCR em Tempo Real PDTIS/FIOCRUZ (Pitaluga et al., 2009).

4.6 Produção de anticorpos a partir da síntese de peptídeo das regiões consenso de diversas calpaínas

Um peptídeo correspondente à sequência mais conservada entre todas as calpaínas que possuem o domínio II (LEKAYAKLHGYSY) foi sintetizado e utilizado na imunização de coelhos para obtenção de anticorpo policlonal capaz de reagir com o maior número de calpaínas possível. A imunogenicidade destes peptídeos foi avaliada com o algoritmo de Hopp e Woods (Hoop & Woods, 1981) (www.bioinformatics.org/JaMBW/3/1/7/). O peptídeo e os anticorpos foram encomendados da empresa Rheabiotech (Campinas, SP, Brazil) (Telleria et al., 2010).

4.7 Identificação das calpaínas e análise da expressão proteica em *T. cruzi* através de *Western blotting* e citometria de fluxo

Para as análises de *Western Blotting*, 40 µg do extrato total das diferentes formas evolutivas dos parasitos foi extraído com SDS 10%. Em seguida, as proteínas extraídas foram ressuspensas em tampão de amostra de proteína (32 mM de Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 0,01% azul de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol), fervidas por 5 min e separadas através de SDS-PAGE 10% por 2 h a 40 mA. As amostras foram então transferidas para membrana de nitrocelulose 0,45 µm no sistema de transferência úmida por corrida

eletroforética em tampão de transferência (1 M Tris, 192 mM glicina, 20% metanol) a 100 V por mais 2 h. A membrana foi bloqueada por 1 h com PBS suplementado com leite desnatado 10% e Tween 20 a 2%. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 2 h com o anticorpo policlonal obtido da imunização em coelhos contra a calpaína (anti-tritryp-calpain). O anticorpo foi diluído em PBS leite 0,5% na diluição de 1:250. Em seguida, as membranas foram lavadas para remoção de anticorpos não ligados, e incubadas por 1 h com o anticorpo secundário contra IgG de coelho conjugado à enzima peroxidase na diluição de 1:1000 PBS leite 0,5%. As membranas foram lavadas no mesmo tampão para remoção de anticorpos não ligados e reveladas por quimiluminescência com o kit Super Signal (ThermoFisher) no equipamento ImageQuant LAS4000 (Ge Healthcare) disponível da plataforma de Imuno-Análise do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ. Para as análises de citometria de fluxo, amostras de células das três diferentes formas evolutivas do parasito (10^6 céls/ml) foram fixadas em PBS contendo paraformaldeído 1% por 30 min à temperatura ambiente. Alternativamente, um sistema de células foi previamente permeabilizada em Triton X-100 0,05% por 15 min. Ambos os sistemas foram lavadas em PBS e sequencialmente incubados com o anticorpo primário descrito acima, e secundário contra IgG de coelho conjugado à Alexa Fluor-488 (Molecular Probes). As células foram lavadas, ressuspensas em PBS e submetidas à leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience) disponível na plataforma de Citometria de Fluxo do IOC/FIOCRUZ. Os resultados obtidos de 10.000 células/leitura foram ainda submetidos ao cálculo do índice de variação da média da intensidade de fluorescência (MFI) através da divisão do MFI da amostra incubada com anticorpo contra calpaínas pelo MFI do seu respectivo controle negativo não tratado.

4.8 Imunolocalização das calpaínas nas diferentes formas evolutivas do parasito por microscopia eletrônica de transmissão

As três formas evolutivas do parasito foram lavadas em PBS, fixadas por 40 min em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 contendo glutaraldeído 0,1%, paraformaldeído 2% e ácido pícrico 0,02%, lavadas e em seguida desidratadas em concentrações crescentes de metanol (30% - 100%). As três amostras foram infiltradas em resina Lowicryl (Polysciences) misturada com metanol 100% a -20 °C. A polimerização da resina foi realizada em cápsulas de gelatina durante 7 dias, a -20 °C, sob ação de luz ultra violeta. Os cortes ultrafinos obtidos foram incubados por 30 min com BSA 4% diluído em PBS, pH 7,2 e em seguida com o anticorpo policlonal anti-Tritryp-calpain diluído em solução de bloqueio contendo BSA 4% por 2 h. Após lavagem em PBS e em solução de bloqueio, os cortes ultrafinos foram

incubados por 1 h com anticorpo secundário contra IgG de coelho conjugado a partículas de ouro coloidal de 10 nm. Após lavagem em PBS e água destilada, as amostras foram contrastadas apenas com acetato de uranila para observação em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (Jeol, Tóquio, Japão) disponível na plataforma de Microscopia Eletrônica IOC/FIOCRUZ.

V. RESULTADOS

5.1 Identificação e classificação das calpaínas presentes no genoma do *T. cruzi*

O presente estudo considerou válida uma nova busca e classificação das sequências de calpaínas da família Trypanosomatidae. Na Figura 5.1 está ilustrada a nova classificação proposta das sequências de calpaínas encontradas e as principais famílias já descritas em outros organismos. As calpaínas clássicas, bem caracterizadas em mamíferos, possuem os quatro domínios conservados (D1, D2, D3 e sítio de ligação a cálcio penta EF-hand). As calpaínas não clássicas são subdivididas em diversas famílias, na Figura 5.1 estão ilustradas as famílias PalB, SOL, bacteriana e de tripanossomatídeos. Cada uma dessas famílias apresenta pelo menos um dos quatro domínios característicos das calpaínas, particularmente, o domínio do core proteolítico está sempre presente. Neste estudo, as análises *in silico* identificaram ao todo 55 sequências relacionadas às calpaínas no genoma do *T. cruzi*, e 36 em *L. braziliensis*. Pela primeira vez foram identificadas: 1) calpaínas no genoma de *L. braziliensis* (Vitório BS, 2014, dissertação de mestrado); e 2) 31 sequências relacionadas às calpaínas do *T. cruzi* que não haviam sido descritas anteriormente. Esta família de calpaínas de tripanossomatídeos foi subdividida em quatro grupos distintos: o grupo 1 possui apenas o domínio I, N-terminal, rico em sequências muito pequenas (menores que 300 aminoácidos); o grupo 2 possui apenas o domínio II com baixa homologia entre as sequências (*e-value* ao redor de 0,1 a 0,001); o grupo 3 possui o domínio II mais o domínio I ou o domínio III; e o grupo 4 é caracterizado pelas proteínas H49 ricas em regiões repetitivas anteriormente descritas por Galetovic e colaboradores (2011).

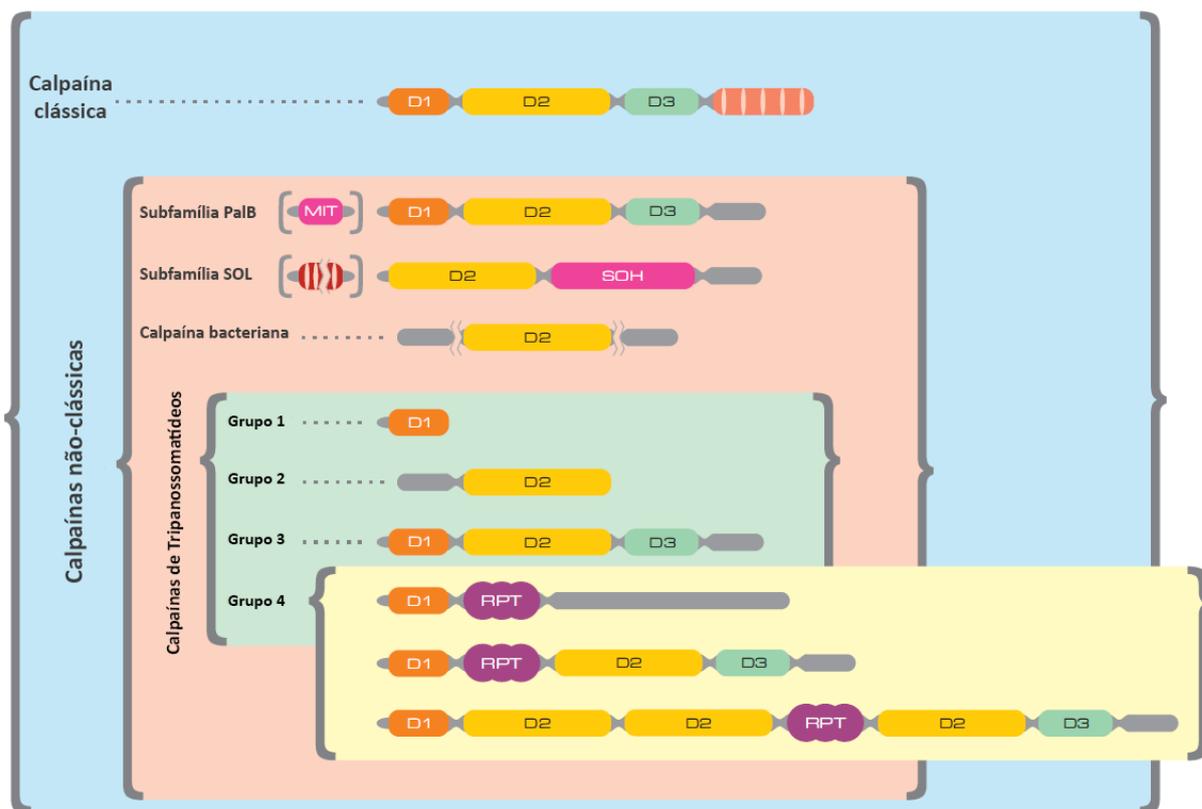


Figura 5.1: Nova classificação das calpaínas de tripanossomatídeos proposta neste trabalho. Para fins comparativos são ilustradas as calpaínas clássicas (encontradas em mamíferos) e algumas famílias de calpaínas não clássicas, como a de fungos (PalB), *Drosophila melanogaster* (SOL), e eubactérias. As calpaínas de tripanossomatídeos são apresentadas em quatro grupos caracterizados pela presença ou ausência dos domínios típicos da família das calpaínas. As formas laranja, amarela e verde correspondem aos domínios I (D1), II (D2) e III (D3), respectivamente; enquanto o domínio rico em repetições (RPT) é ilustrado pela forma roxa.

O número de identificação das sequências proteicas das calpaínas encontradas nas análises *in silico* – com exceção de dois pseudogenes -, assim como o grupo em que foram agrupadas, estão delineadas na Tabela 5.1. Dos quatro grupos identificados, o grupo três foi selecionado por possuir o maior número de domínios conservados e o sítio catalítico das calpaínas (conservado ou não) como alvo para aprofundamento do estudo. Em seguida, através de alinhamentos múltiplos das sequências deste grupo, foi identificada uma sequência peptídica conservada e específica das calpaínas no genoma dos tripanossomatídeos. Esta sequência (LEKAYAKLHGSY) foi enviada a empresa Rheabiotech que sintetizou o peptídeo e obteve soro policlonal contra esse peptídeo. A Tabela 5.2 delineia as sequências do grupo 3 com suas respectivas massas moleculares preditas e a conservação do peptídeo utilizado para produção do anticorpo.

Tabela 5.1: Identificação das sequências de calpaínas de *T. cruzi* e subdivisão em grupos.

Grupo	Identificação no GeneDB
Grupo 1¹	XP_806365.1 XP_805998.1 XP_009311373.1 XP_803067.1
	XP_802398.1 XP_805996.1 XP_806366.1 XP_805998.1
	XP_806368.1 XP_816693.1 XP_009311373.1 XP_807771.1
	XP_806366.1 XP_806364.1 XP_805997.1 XP_805996.1
	XP_807299.1 XP_814641.1 XP_806365.1 XP_807300.1
Grupo 2¹	XP_809737.1 XP_803755.1 XP_804990.1 XP_802590.1
	XP_802462.1
	XP_807981.1 XP_819309.1 XP_814640.1 XP_806849.1
Grupo 3¹	XP_814638.1 XP_817457.1 XP_816695.1 XP_806305.1
	XP_820101.1 XP_816696.1 XP_820102.1 XP_812111.1
	XP_814639.1 XP_809456.1 XP_820100.1 XP_802677.1
	XP_816695.1 XP_811564.1 XP_803757.1 XP_809335.1
	XP_803057.1
Grupo 4¹	XP_804109.1 XP_804989.1 XP_804989.1 XP_803263.1
	XP_803263.1 XP_816478.1 XP_814332.1

¹As sequências foram classificadas em quatro grupos distintos segundo a presença e conservação dos domínios clássicos de calpaínas: o grupo 1 é representado por sequências que contêm apenas o domínio I N-terminal; o grupo 2 é composto por sequências de menor similaridade ao proteolítico domínio II; o grupo 3 possui as sequências com o maior número de domínios e possui maior identidade com as calpaínas de mamíferos; e o grupo 4 é composto por sequências ricas em repetições (ver Figura 5.1). Os pseudogenes não possuem uma identificação de sequência proteica associada, portanto, não estão anotados na tabela.

Tabela 5.2: Identificação dos domínios, massa molecular, presença da tríade catalítica e conservação da sequência utilizada para produção do anticorpo das calpaínas do grupo 3.

Identificação da proteína ¹	Massa molecular (kDa) ²	Domínios ³	Tríade catalítica	Peptídeo conservado para produção do anticorpo ⁴ (LEKAYAKLHGSY)
XP_807981.1	150.32	Domínio II (142-449 aa) e domínio III (707-849 aa)		<i>baixa similaridade</i>
XP_819309.1	161.78	Domínio II (257-346 aa)		SLDLYAWERGGT
XP_814640.1	84.37	Domínio I (37-134 aa) e domínio II (185-483 aa)		LEKAYAKALGSY
XP_814638.1	81.06	Domínio I (41-137 aa) e domínio II (187-519 aa)		VEKAYAKVHGSY
XP_820101.1	78.11	Domínio I (38-138 aa) e domínio II (185-505 aa)		LQKAYAKIHGGY
XP_806849.1	95.4	Domínio I (142-242 aa) e domínio II (290-613 aa)	<i>presente</i>	LQKAFKLNHSY
XP_809456.1	88.15	Domínio II (223-463 aa)		VEKAFKLYGGY
XP_820100.1	95.78	Domínio I (185-285 aa) e domínio II (332-646 aa)		LEKAFKLNHSY
XP_802677.1	64.88	Domínio II (42-372 aa)		LEKAYAKVHHSY
XP_816695.1 ^A	94.62	Domínio I (128-237 aa) e domínio II (295-619 aa)		VEKAYAKLHGNV
XP_816695.1 ^A	94.62	Domínio I (128-237 aa) e domínio II (295-533 aa)		VEKAYAKLHGNV
XP_812111.1 ^B	116.16	Domínio II (462-611 aa) e domínio III (613-745 aa)		LEKALAKLNGGY
XP_811564.1 ^B	115.98	Domínio II (462-611 aa) e domínio III (613-745 aa)		LEKALAKLNGGY
XP_814639.1 ^C	88.68	Domínio I (76-175 aa) e domínio II (221-528 aa)		LQKAYAKLHGSY
XP_803757.1 ^C	80.79	Domínio I (76-175 aa) e domínio II (221-528 aa)		LQKAYAKLHGSY
XP_817457.1 ^D	120.56	Domínio II (269-563 aa) e domínio III (760-926 aa)	<i>presente</i>	MEKAFVKLCGGSY
XP_809335.1 ^D	98.6	Domínio II (77-371 aa) e domínio III (568-734 aa)	<i>presente</i>	MEKAFVKLCGGSY
XP_820102.1 ^E	82.47	Domínio I (56-155 aa) e domínio II (202-515 aa)		LEKAYAKLHGSY
XP_816696.1 ^E	82.64	Domínio I (56-155 aa) e domínio II (202-515 aa)		LEKAYAKLHGSY
XP_806305.1	135.52	Domínio II (10-304 aa) e domínio III (309-448 aa)		LEKAYAKFYTGY
XP_803057.1	65.54	Domínio II (7-304 aa) e domínio III (309-448 aa)		LEKAYAKFYTGY

¹O número de identificação das sequências (ID) foi obtido no TritypDB. ²A massa molecular predita *in silico* foi calculada em http://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html. ³O banco de dados de domínios de proteínas ProDom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php>) foi utilizado para identificação dos domínios e da tríade catalítica das calpaínas do *T. cruzi*. Através de alinhamentos múltiplos no Blastp, a sequência peptídica consenso foi selecionada para produção de um anticorpo capaz de reconhecer o maior número de calpaínas do nosso estudo. ⁴A identidade dos peptídeos conservados é indicada pela cor azul escura na sequência, enquanto as mudanças de aminoácidos por outros aminoácidos com características bioquímicas similares, portanto mudanças pouco relevantes irrelevantes para as características da sequência peptídica estão indicadas pela cor azul clara. As letras em sobrescrito indicam genes parálogos.

5.2 Análise da expressão gênica relativa das três diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* por PCR em Tempo Real

O grupo selecionado para as análises de expressão gênica possui ao todo 21 sequências de calpaínas. Destas, 10 sequências possuem uma cópia paráloga de alta identidade que impossibilitou o desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos para análise individual. Portanto, 5 pares desses iniciadores foram desenhados capazes de amplificar apenas uma das cópias, enquanto as outras 5 cópias tiveram que ser omitidas das nossas análises. A partir desta etapa, a sequência utilizada passa a ser do RNAm das sequências, portanto, para facilitar a organização dos dados foi atribuído um número sequencial das sequências da seguinte forma: Tc no início da denominação indicando o organismo *T. cruzi*; Calp, abreviando o nome calpaínas; e o número sequencial para identificar cada sequência utilizada. A partir destas sequências de RNAm foram desenhados os pares de iniciadores específicos para as calpaínas e dois genes de referência (GAPDH e 18S), que já foram testados e validados para garantir especificidade para sequências do *T. cruzi* na PCR convencional. Além de gerar um único fragmento nas amostras testadas do parasito (Figura 5.2), os iniciadores não reagiram contra sequências das células Vero utilizadas para o cultivo do protozoário nem contra outras sequências do seu genoma. Os segmentos amplificados das amostras do parasito foram purificados e sequenciados pela plataforma de sequenciamento de DNA (PDTIS/FIOCRUZ). Na Tabela 5.3 podemos verificar a nomeação atribuída, assim como o resultado da análise do sequenciamento com o *e-value* de cada calpaína, mostrando a alta especificidade das regiões selecionadas.

Tabela 5.3: Nome atribuído, identificação das sequências e análise da identidade dos fragmentos amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores desenhados para as calpaínas.

Nome atribuído ¹	Identificação do RNA	Identificação da proteína	e-value do fragmento
TcCalp1	XM_802888.1	XP_807981.1	9e-23
TcClap2	XM_814216.1	XP_819309.1	7e-21
TcCalp3	XM_809547.1	XP_814640.1	1e-20
TcCalp4	XM_809545.1	XP_814638.1	2e-10
TcCalp5	XM_815008.1	XP_820101.1	2e-41
TcCalp6	XM_806634.1	XP_806849.1	1e-24
TcCalp7	XM_797497.1	XP_803057.1	1e-18
TcCalp8	XM_799223.1	XP_809456.1	4e-24
TcCalp9	XM_815007.1	XP_820100.1	2e-30
TcCalp10	XM_797584.1	XP_802677.1	7e-39
TcCalp11	XM_811602.1	XP_816695.1	3e-23
TcCalp12	XM_807018.1	XP_812111.1	2e-30
TcCalp13	XM_804721.1	XP_814639.1	5e-11
TcCalp14	XM_812364.1	XP_817457.1	1e-10
TcCalp15	XM_815009.1	XP_820102.1	7e-14
TcCalp16	XM_809239.1	XP_806305.1	2e-40
TcGAPDH	XM_807044.1	XP_812137.1	6e-22
Tc18S	AF232214.1	RNA ribossomal	3e-33

¹As colunas correspondem ao nome atribuído, identificação no banco de dados e identidade encontrada das calpaínas em estudo. As sequências obtidas no sequenciamento foram analisadas por *Blastn* contra o genoma de *T. cruzi*, os valores *e-value* apresentados são referentes aos próprios genes de interesse.

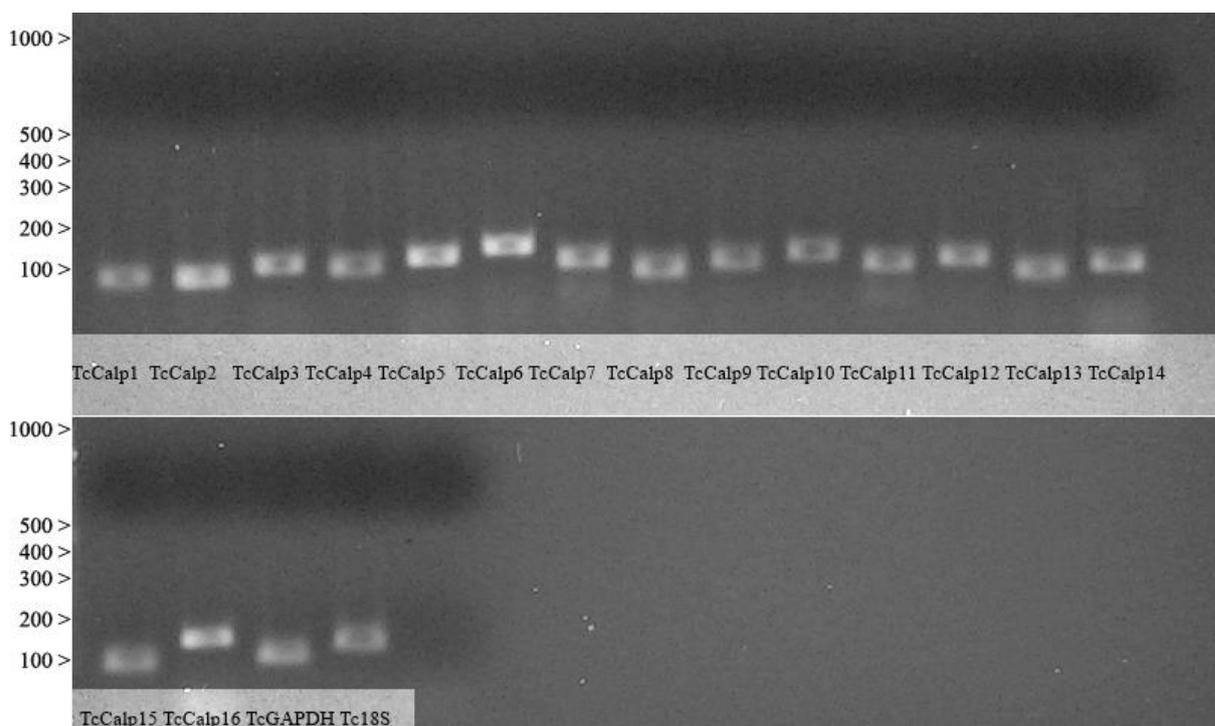


Figura 5.2: Teste dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados das calpaínas e dos genes endógenos do *T. cruzi*. Eletroforese em gel de agarose 1,5% demonstrando a presença de um único produto amplificado em todos os oligonucleotídeos iniciadores testados. As amostras correspondem ao cDNA das formas epimastigotas do *T. cruzi* submetidas a PCR nas seguintes condições: 95°C/5 min para ativação da enzima, seguido da ciclagem 95°C/30 s, 65°C/30 s, 72°C/30 s, e extensão final 72°C/10 min. O peso molecular em pares de base (pb) assim como o nome atribuído às calpaínas alvo de nosso estudo (TcCalp) estão especificadas na figura.

Para avaliar a expressão gênica relativa das 16 calpaínas selecionadas do *T. cruzi*, foram sintetizados cDNAs a partir de amostras de RNA de quatro replicatas biológicas das formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas. Essas amostras foram amplificadas por PCR em Tempo Real e submetidas ao método do Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$) para quantificação relativa das amostras. A validação do método do $\Delta\Delta Ct$ foi realizada através dos valores de eficiência obtidos para cada calpaína e dos genes endógenos normalizadores (TcGAPDH e Tc18S), que estão de acordo com os desejados para o método do $\Delta\Delta Ct$, uma vez que não foram observadas grandes diferenças nos valores de Ct entre as diferentes formas evolutivas testadas (Livak & Schmittgen, 2001). A expressão gênica das calpaínas foi calculada em relação à forma epimastigota encontrada no hospedeiro invertebrado, que foi utilizado como calibrador.

As análises de expressão gênica relativa indicam que apenas duas das 16 calpaínas estudadas - TcCalp2 e TcCalp16 - possuem valores de expressão constitutivos entre as três diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, uma vez que seus valores relativos estão bem

próximos, conforme podemos observar na tabela 5.4. O valor estabelecido como marcador de expressão diferencial é a partir de duas vezes e meia em relação à forma epimastigota. Seis calpaínas - TcCalp1, TcCalp3, TcCalp5, TcCalp7, TcCalp8 e TcCalp12 – apresentaram-se aumentadas em pelo menos uma das duas formas clinicamente relevantes do parasito (amastigota e tripomastigota) em relação a forma epimastigota. A expressão da TcCalp7 chega a ser 56,9 vezes maior nas forma amastigota quando comparada a epimastigota, número que dobra quando comparada ao valor de expressão da forma tripomastigota. Por outro lado, a forma epimastigota apresenta cinco calpaínas – TcCalp4, TcCalp6, TcCalp11, TcCalp14, TcCalp15 – com expressão gênica aumentada em relação às duas outras formas. As outras três calpaínas – TcCalp9, TcCalp10 e TcCalp13 – apresentam pequenas variações de expressão entre as formas epimastigota e amastigota, e expressão bem reduzida na forma tripomastigota. A tabela 5.4 sumariza os resultados obtidos da expressão gênica relativa das três diferentes formas do parasito.

Tabela 5.4: Análise da expressão gênica relativa dos transcritos de calpaínas das três diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*.

Calpaína	Epimastigota ¹	Amastigota	Tripomastigota
TcCalp1	1	2,6	13,8
TcCalp2	1	1,3	0,8
TcCalp3	1	5,1	5,5
TcCalp4	1	0,3	0,4
TcCalp5	1	0,8	4,3
TcCalp6	1	0,1	0,1
TcCalp7	1	56,9	0,5
TcCalp8	1	8,9	0,3
TcCalp9	1	0,7	0,4
TcCalp10	1	1,0	0,2
TcCalp11	1	0,2	0,4
TcCalp12	1	2,5	0,3
TcCalp13	1	1,9	0,2
TcCalp14	1	0,2	0,2
TcCalp15	1	0,2	0,4
TcCalp16	1	1,0	0,9

¹Os valores correspondem a razão da diferença da expressão das formas amastigotas e tripomastigotas em relação à forma epimastigota configurada como 1. Os transcritos de calpaínas que tiveram aumento da expressão a partir 2,5 vezes em pelo menos uma das duas formas clinicamente relevantes do parasito estão marcados em negrito. As médias correspondem a um total de 11 experimentos de três replicatas biológicas diferentes.

Com base nos valores de Ct obtidos nos 11 diferentes experimentos foi possível criar uma fórmula para comparação relativa entre as 16 calpaínas normalizadas pelos endógenos. A Figura 5.3 ilustra as calpaínas das mais expressas às menos expressas em cada forma do parasito. A TcCalp5 é a calpaína mais expressa nas formas epimastigota e amastigota, e a segunda mais expressa em tripomastigota. Tal dado sugere que seja a calpaína de maior expressão do *T. cruzi*. Enquanto isso, a TcCalp 14 e a TcCalp10 estão entre as 4 menos expressas nas três formas evolutivas.

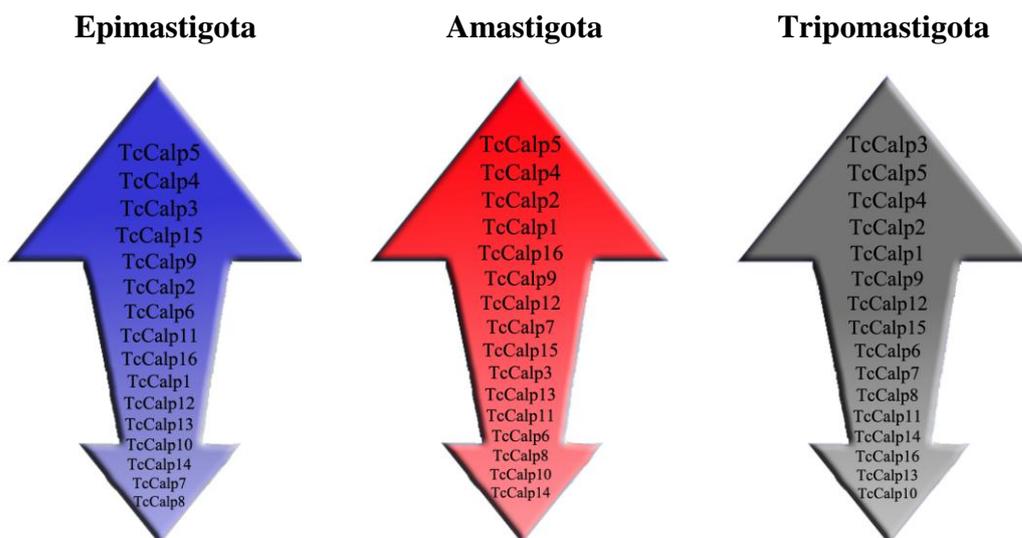


Figura 5.3: Expressão diferencial dos 16 transcritos de calpaínas comparados entre si das três formas evolutivas do parasito. A direção das setas indica as calpaínas de maior a menor expressão relativa ordenadamente nas formas epimastigota, amastigota e tripomastigota.

5.3 Identificação e quantificação de proteínas reativas ao anticorpo anti-Tritryp-calpain nas três diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* por *Western Blotting* e citometria de fluxo

Em paralelo às análises de expressão gênica, através de ferramentas *in silico* foi possível identificar uma sequência peptídica conservada e específica das calpaínas no genoma do *T. cruzi*. Essa sequência (LEKAYAKLHGSY) foi enviada a empresa Rheabiotech que sintetizou o peptídeo e obteve soro policlonal contra esse peptídeo. O anticorpo foi denominado anti-tritryp-calpain, e foi utilizado em diferentes técnicas que objetivaram a identificação, a quantificação e a determinação da localização celular das calpaínas.

As análises de *Western blotting* com o anticorpo contra calpaínas revelaram a presença de bandas de massa molecular variadas no extrato total das três formas evolutivas do parasito e no extrato de células Vero utilizadas no cultivo das formas clinicamente relevantes do parasito. Nas amostras de *T. cruzi* foi possível observar bandas reativas com massa molecular aproximada calculada em reatividade de aproximadamente 138, 108, 86, 62, 45, 40 e 37 kDa nas três formas evolutivas, e mais uma banda ao redor de 65 kDa visualizada apenas na forma amastigota e uma de cerca de 36 kDa apenas na forma tripomastigota. É importante destacar que as calpaínas que foram alvo do nosso estudo possuem massa molecular predita *in silico* de 60 a 150 kDa, e que a molécula reativa em torno de 65 kDa nas formas amastigotas poderia ser a TcCalp7, que possui massa molecular predita em torno de 65 kDa. Nas amostras de célula Vero, foi verificada reatividade do anticorpo com moléculas de aproximadamente 127, 97, 63, 43 e 35 kDa, todas com menor intensidade que as encontradas nas amostras do parasito. A marcação na faixa de 127 e 63 kDa pode ser justificada pelo fato da sequência utilizada para gerar o anticorpo estar 100% conservada nas sequências das calpaínas 3 e 12, respectivamente, do genoma do macaco verde africano (*Chlorocebus aethiops*) de onde derivam esta linhagem celular. A Figura 5.4 ilustra os resultados obtidos no *Western blotting*.

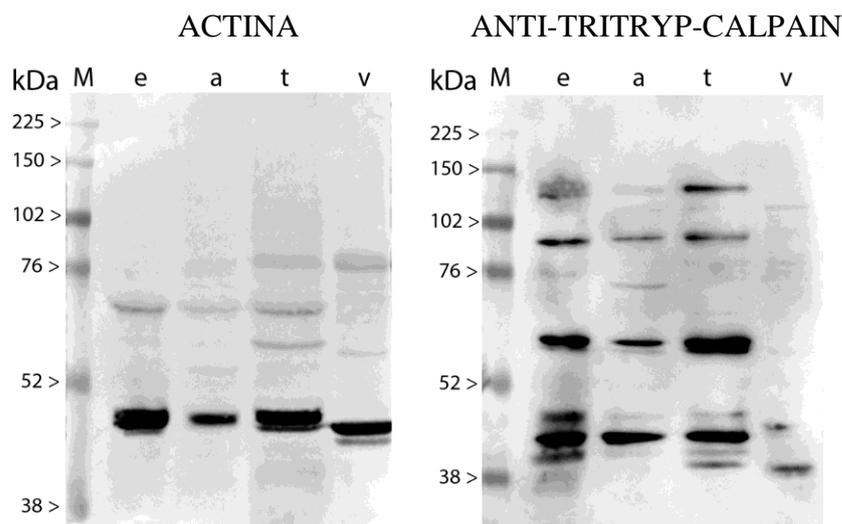


Figura 5.4: *Western blotting* demonstrando a reatividade cruzada do anticorpo anti-Tritryp-calpain contra o extrato total das formas epimastigota (e), amastigota (a) e tripomastigota (t) do *T. cruzi*, e das células Vero (v). Amostras correspondentes a 10^9 células de cada forma evolutiva do parasito e 10^8 células Vero, utilizadas para cultivo das formas amastigota e tripomastigota, foram extraídas com SDS 10% e dosadas por fluorimetria com kit de dosagem de proteínas Qubit. Em seguida, os extratos proteicos foram submetidos à corrida eletrofóretica em gel SDS-PAGE 10%, transferidas para membrana de nitrocelulose de 0,45 μ m e coradas com o corante de proteínas Ponceau's. As membranas foram então incubadas overnight em PBS Leite 10% com 2% de Tween 20. No dia seguinte, a membrana, dividida em duas, foi incubada com os anticorpos anti-Tritrip-calpain na diluição de 1:250 e anti-actina na diluição de 1:5000 por 2 h. Após lavagem, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário contra IgG de coelho conjugado a peroxidase por 1 h, e revelada por quimiluminescência seguida de aquisição no equipamento ImageQuant LAS4000. Um marcador de massa molecular (M) de proteínas foi corrido no mesmo gel para identificação da massa molecular dos polipeptídeos reativos.

Após a verificação da reatividade cruzada do novo anticorpo contra as proteínas em sua forma linear pela técnica de *Western Blotting*, foi avaliada a reatividade do antri-tritryp-calpain contra moléculas em sua forma nativa por análises de citometria de fluxo, que permite a marcação das calpaínas no corpo do parasito. Conforme ilustrado nos histogramas da Figura 5.5, os resultados obtidos pela marcação de moléculas reativas ao anticorpo indicam uma maior expressão de calpaínas reativas em amastigotas e tripomastigotas em relação à forma epimastigota nos parasitos permeabilizados com Triton X-100 0,05%, que permite uma marcação intracelular das calpaínas com o anticorpo. No intuito de oferecer uma maior confiança dos dados gerados pelo deslocamento da fluorescência emitida por cada amostra marcada, assim como avaliar a diferença de expressão das calpaínas em cada forma evolutiva, os resultados foram submetidos ao cálculo do índice de variação da média da intensidade de

fluorescência (MFI). O cálculo deste índice consiste na divisão do MFI da amostra submetida à marcação pelo anticorpo pelo MFI do seu respectivo controle negativo não tratado com o anticorpo contra calpaínas. Na Tabela 5.5 pode-se observar, portanto, que a forma amastigota apresenta um maior aumento da expressão das moléculas reativas ao anticorpo anti-Trityp-calpain em comparação às demais formas evolutivas nas análises de citometria de fluxo.

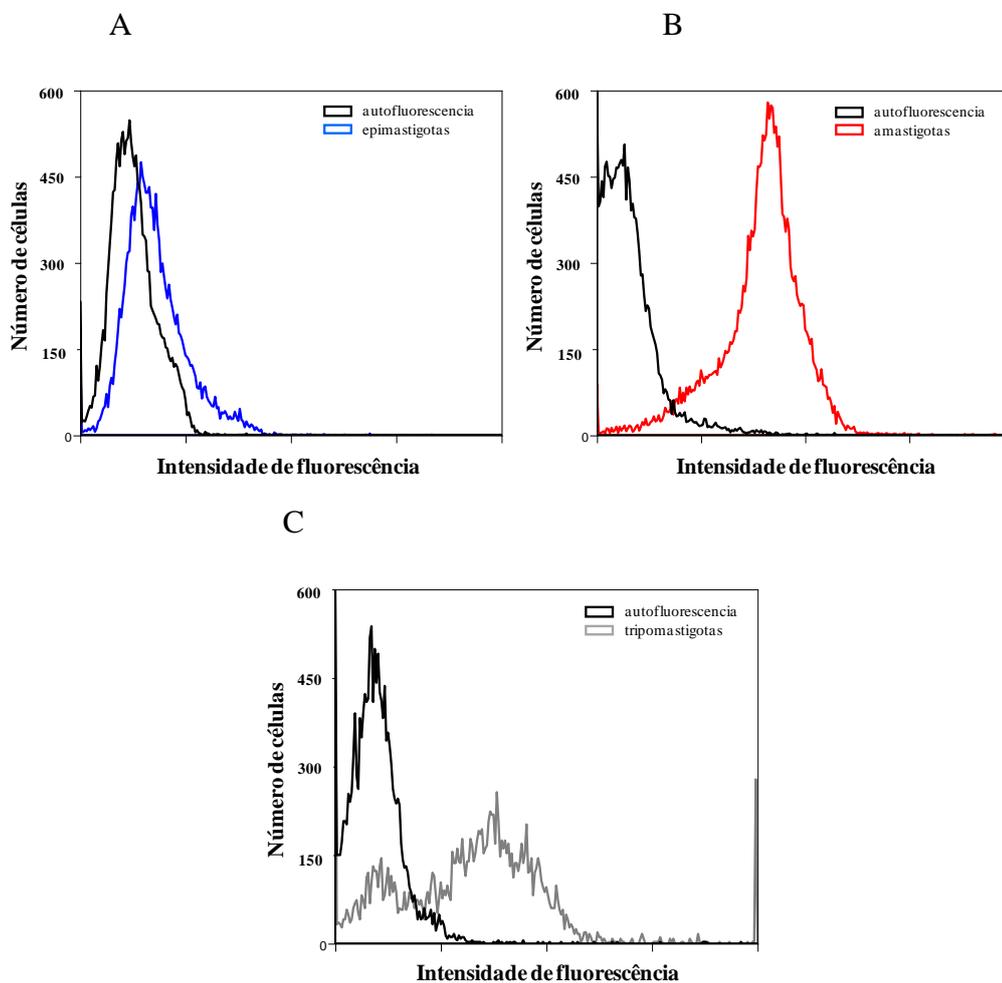


Figura 5.5: Citometria de fluxo das formas epimastigota (A), amastigota (B) e tripomastigota (C) do *T. cruzi* marcados com o anticorpo anti-trityp-calpain. Cerca de 10^6 células foram fixadas com paraformaldeído 1% por 30 min e permeabilizadas com Triton X-100 0,05% por 10 a 15 min. Em seguida, essas células foram incubadas com o anticorpo anti-Trityp-calpain na diluições de 1:250 por 2 h, e com o anticorpo secundário contra IgG produzido em coelho conjugado à Alexa Fluor 488 na diluição de 1:750 por 1 h. A reatividade do anticorpo pode ser observada pelo deslocamento da intensidade de fluorescência em relação ao controle não tratado com o anticorpo anti-calpaína. Os dados apresentados nos gráficos consistem em um experimento representativo da análise de 10,000 células de um total de três realizados para cada forma evolutiva.

Tabela 5.5: Índice de variação do MFI das três formas evolutivas do *T. cruzi*.

Forma evolutiva	Índice de variação do MFI ^{1,2}	Erro padrão
Epimastigota	2,05	0,51
Amastigota	16,49	1,02
Tripomastigota	10,27	1,75

¹O índice de variação é calculado pela razão da MFI dos parasitos incubados com o anti-tritryp-calpain e o controle sem anticorpo primário. ²Ao todo foram realizados pelo menos três experimentos para cada forma evolutiva do parasito.

5.4 Imunolocalização das calpaínas nas três formas evolutivas do *T. cruzi* por microscopia eletrônica de transmissão

Por fim, na tentativa de determinar a localização celular das calpaínas no corpo do *T. cruzi* foram realizados ensaios de imunocitoquímica ultraestrutural. Estes ensaios necessitaram de uma intensa padronização no processo de fixação, emblocamento e titulação dos anticorpos, uma vez que a resina hidrofílica utilizada e a fixação mais branda das amostras preservam melhor o sítio antigênico exposto das proteínas aos anticorpos (revisto por Hoog et al., 2010). A Figura 5.6 ilustra a distribuição das calpaínas por todo citoplasma, na membrana plasmática e no flagelo da forma epimastigota, e rara marcação inespecífica do anticorpo secundário conjugado a partículas de ouro eletrodensas no controle negativo. Na forma amastigota pode ser observada marcação na membrana plasmática, por todo citoplasma, na estrutura paraflagelar, em membrana de vesículas e rara marcação inespecífica no cinetoplasto, conforme observado na Figura 5.7. Além da marcação na membrana plasmática e por todo citoplasma observada nas duas formas já citadas, na Figura 5.8 pode-se observar que nos tripomastigotas a marcação do flagelo deixou fortes indícios de ser a zona paraflagelar a região do flagelo que possui moléculas reativas ao anticorpo anti-tritryp-calpain. A rara marcação inespecífica observada nos controles não tratados com o anticorpo contra calpaína e nos ácidos nucleicos são inerentes à técnica e não invalidam a especificidade do anticorpo.

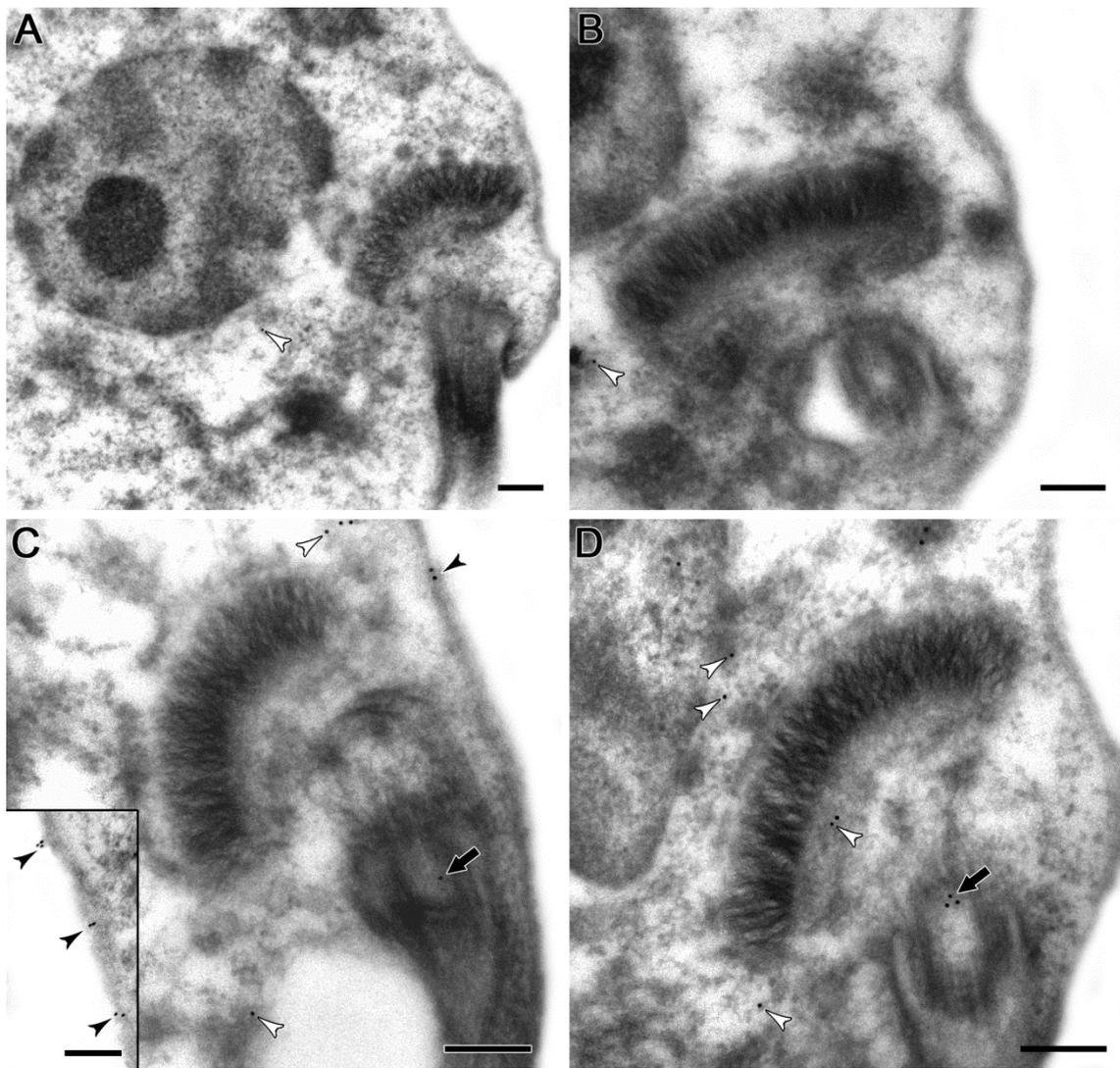


Figura 5.6: Imunocitoquímica ultraestrutural de calpaínas nas formas epimastigotas do *T. cruzi*. As células foram fixadas, desidratadas e emblocadas em Lowicryl. Após a polimerização, foram realizados cortes ultrafinos, que foram incubados com o anticorpo anti-calpaína por 2 h, seguidos pela incubação com anticorpo secundário conjugado a partícula de ouro coloidal por 1 h. Após uma branda contrastação com acetato de uranila, os cortes foram analisados em microscópio eletrônico de transmissão. (A, B) A omissão do anticorpo primário apontou a presença de rara marcação inespecífica citoplasmática (cabeças de seta brancas) nas células tratadas com o anticorpo secundário apenas. (C, D) As células incubadas com o anti-calpaína indicam a marcação na membrana plasmática (cabeças de setas pretas), por todo citoplasma (cabeças de seta brancas) e no flagelo (setas largas pretas). Em detalhe, a marcação na superfície do parasito (C, **Inset**). A figura corresponde a uma imagem representativa de três replicatas biológicas. Barra: 0,2 μm ; Barra do *inset*: 0,1 μm .

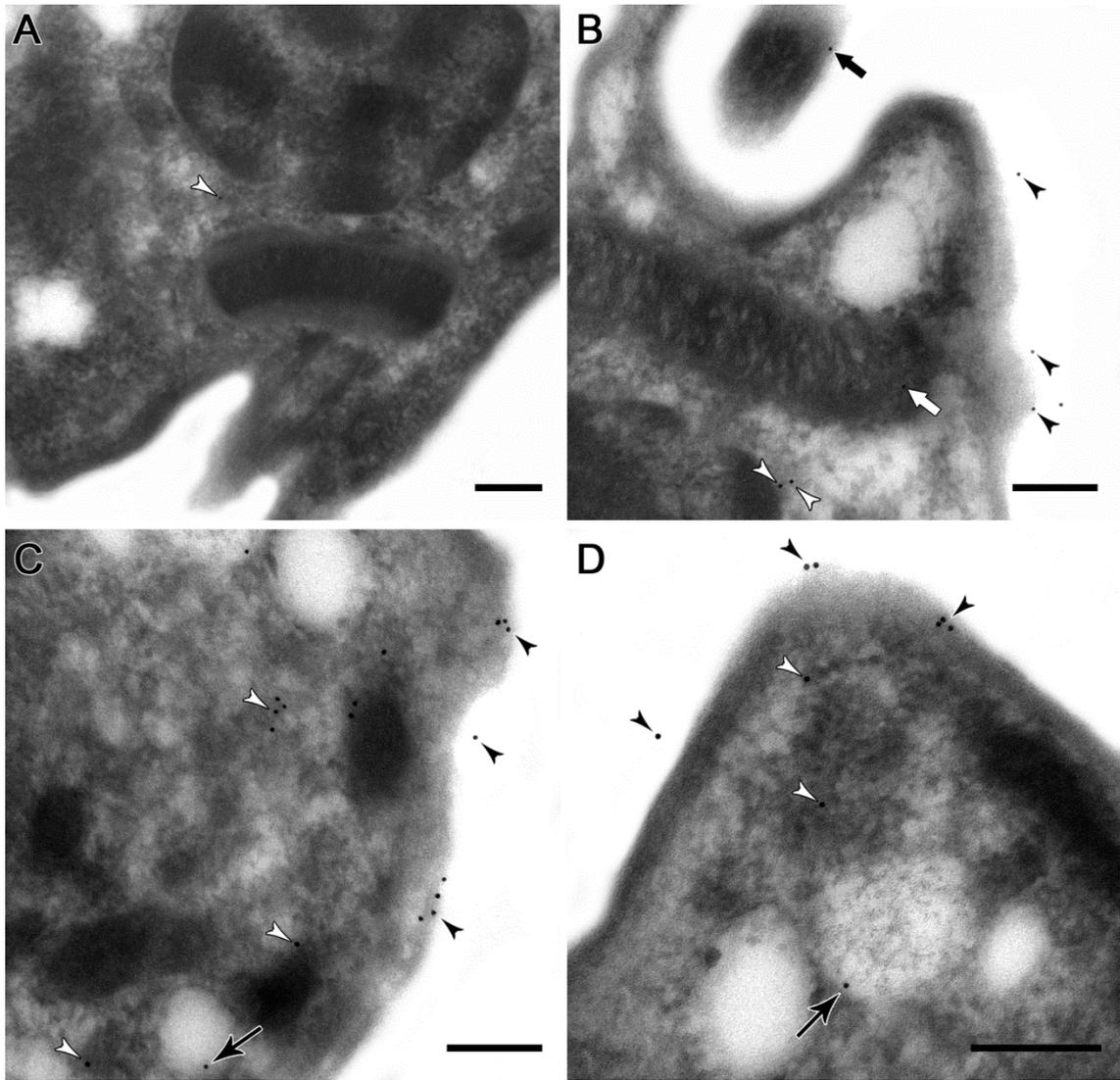


Figura 5.7: Imunocitoquímica ultraestrutural de calpaínas nas formas amastigotas do *T. cruzi*. As células foram fixadas, desidratadas e emblocadas em Lowicryl. Após a polimerização, foram realizados cortes ultrafinos, que foram incubados com o anticorpo anti-calpaína por 2 h, seguidos pela incubação com anticorpo secundário conjugado a partícula de ouro coloidal por 1 h. Após uma branda contrastação com acetato de uranila, os cortes foram analisados em microscópio eletrônico de transmissão. **(A)** A omissão do anticorpo primário apontou a presença de rara marcação inespecífica citoplasmática (cabeças de seta brancas) nas células tratadas com o anticorpo secundário apenas. **(B, C, D)** As células incubadas com o anti-calpaína indicam a marcação na membrana plasmática (cabeças de seta pretas), por todo citoplasma (cabeças de seta brancas), na estrutura paraflagelar (setas largas pretas), em membrana de vesículas (setas pretas) e rara marcação inespecífica no cinetoplasto (seta larga branca). A figura corresponde a uma imagem representativa de três replicatas biológicas. Barra: 0,2 μm .

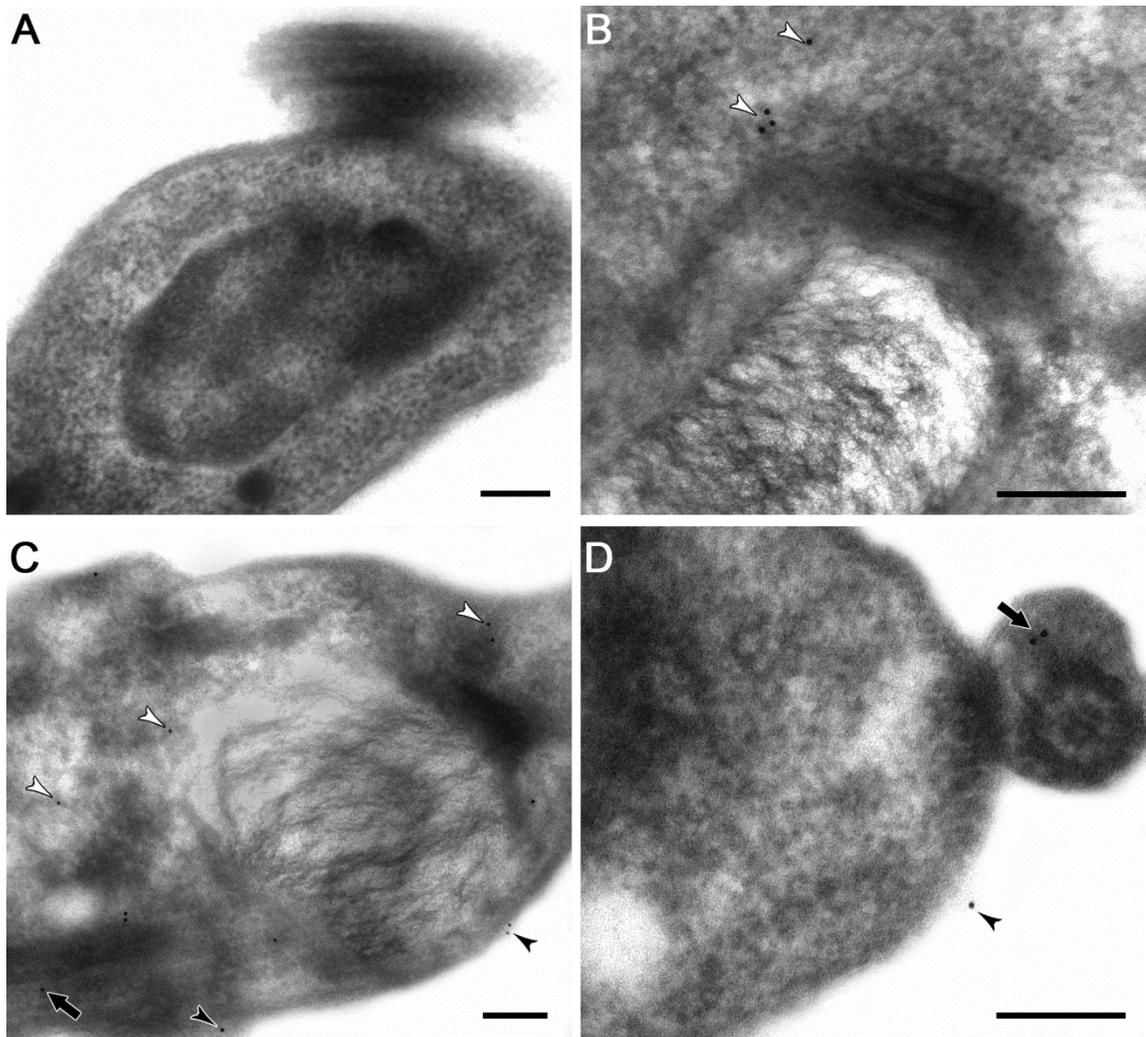


Figura 5.8: Imunocitoquímica ultraestrutural de calpaínas nas formas tripomastigotas do *T. cruzi*. As células foram fixadas, desidratadas e emblocadas em Lowicryl. Após a polimerização, foram realizados cortes ultrafinos, que foram incubados com o anticorpo anti-calpaína por 2 h, seguidos pela incubação com anticorpo secundário conjugado a partícula de ouro coloidal por 1 h. Após uma branda contrastação com acetato de uranila, os cortes foram analisados em microscópio eletrônico de transmissão. **(A)** A omissão do anticorpo primário não apontou a presença marcações inespecíficas nas células tratadas com o anticorpo secundário apenas. **(B, C, D)** As células incubadas com o anti-calpaína indicam a marcação na membrana plasmática (cabeças de setas pretas), por todo citoplasma (cabeças de seta brancas) e na estrutura paraflagelar (setas largas pretas). A figura corresponde a uma imagem representativa de três replicatas biológicas. Barra: 0,2 μ m.

VI. Discussão

Desde seu primeiro relato por Guroff em 1964, centenas de novas sequências com homologia às calpaínas vêm sendo descritas no genoma de todos os organismos eucariotos e bactérias estudadas. As proteínas codificadas por esses genes são homólogos das mais variadas estruturas e combinações, incluindo desde domínios de ligações ao cálcio clássicos desta família a domínios de interação com proteínas estruturais. Além da diversidade estrutural observada nessas calpaínas, uma série de funções celulares tem sido atribuídas a essas proteases, tais como: diferenciação sexual em nematodos, desenvolvimento embrionário em *Drosophila*, resistência a choques osmóticos e alcalinos em leveduras, regulação do ciclo celular e apoptose em mamíferos, dentre outros (Soromachi et al., 2011; Zhao et al., 2012). Nos tripanossomatídeos, Ersfeld e colaboradores (2005) foram os pioneiros na identificação e classificação das calpaínas presentes nos primeiros genomas sequenciados: *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*. De forma concomitante, diversos estudos bioquímicos, a maior parte destes com anticorpos direcionados às calpaínas de outros organismos, também detectaram a presença de homólogos de calpaínas nesses mesmos tripanossomatídeos (Hertz-Fowler et al., 2001; Giese et al., 2008; Sengenito et al., 2009) e em alguns outros, como *L. amazonensis* (d'Avila-Levy et al., 2006), *A. deanei* **syn.** *C. deanei* (d'Avila-Levy et al., 2003), *Herpetomonas samuelpeessoai* (Pereira et al., 2009) e *Phytomonas serpens* (Oliveira et al., dados não publicados).

O critério que caracteriza de fato uma calpaína consiste na presença do domínio que contém o core proteolítico dessa protease (domínio II), mesmo que este seja proteoliticamente inativo pela ausência de um dos resíduos da tríade catalítica (Zhao et al., 2012). Entretanto, conforme descrito anteriormente, os tripanossomatídeos possuem em seu genoma sequências codificantes homólogas ao domínio N-terminal (domínio I) das calpaínas sem similaridade com qualquer outra proteína descrita até o momento (Ersfeld et al., 2005). Inicialmente, essas pequenas sequências foram consideradas na busca e classificação das calpaínas deste trabalho. No presente trabalho, 55 sequências correspondentes a calpaínas foram detectadas no genoma do *T. cruzi* e classificadas em quatro grupos distintos com base na presença e conservação de domínios. Esta nova classificação proposta, além de atualizar e diminuir os grupos anteriormente propostos (Ersfeld et al., 2005), permitiu focar este estudo nas sequências de calpaínas de maior similaridade às calpaínas melhor caracterizadas dos mamíferos. Enquanto na análise de Ersfeld e colaboradores (2005) as calpaínas de tripanossomatídeos foram divididas em cinco grupos distintos, dois deles (grupos 4 e 5) com sequências ricas em

repetições de domínios ou repetições em tandem de um determinado número de aminoácidos, a classificação aqui proposta condensou tais sequências em um único grupo com todas as sequências que apresentavam repetições (grupo 4). Recentemente, um estudo molecular que buscava caracterizar a proteína flagelar H49 e suas repetições revelou que essas proteínas são na verdade as calpaínas do grupo IV da classificação proposta por Ersfeld e colaboradores (2005) do *T. cruzi*. Os autores detectaram na época um total de 53 calpaínas no genoma do parasito, sendo 8 associadas às repetições que caracterizam os antígenos flagelares H49 (Galetovic et al., 2011). Outra marcante diferença da divisão dos grupos neste trabalho foi separar as sequências com baixa identidade do domínio II (grupo 2, e-value entre 10^0 a 10^{-3}) das que apresentavam maior identidade ao domínio II das calpaínas clássicas, que inclusive quase sempre também possuíam outro domínio de calpaínas associado (grupo 3). Essas sequências com baixa identidade no domínio II não apresentaram homologia com qualquer outro domínio de proteína conhecido após serem submetidas às análises nos softwares SMART e ProDom.

A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos possui algumas peculiaridades. Acredita-se que RNAs mensageiros que são transcritos na unidade policistrônica não são necessariamente relacionados a alguma função e os níveis de mRNA maduros podem variar entre os transcritos. Assim, a expressão gênica em tripanossomatídeos pode estar sendo majoritariamente regulada a nível pós-transcricional, com um importante papel das sequências 3'UTR e 5'UTR no processamento destas moléculas (Martínez-Calvillo et al., 2010). O entendimento dos mecanismos moleculares da regulação da expressão gênica nestes tripanossomatídeos é fundamental para que se possa conhecer novos alvos capazes de agir de maneira seletiva e eficaz contra as doenças causadas por estes protozoários (Kramer, 2012). Nesse contexto, após a classificação das calpaínas do *T. cruzi* realizada neste trabalho, as sequências de calpaínas mais conservadas (grupo 3) tiveram seus transcritos de RNA submetidos à análise da expressão gênica relativa por PCR em Tempo Real, o que resultou na identificação de calpaínas diferencialmente expressas nas três diferentes formas evolutivas do parasito. Ao todo, seis transcritos de calpaínas apresentaram expressão diferencial de pelo menos 2,5 vezes em uma das formas clinicamente relevante do parasito em relação aos epimastigotas. Seguindo esta mesma metodologia de estudo da expressão das calpaínas em *T. cruzi*, Giese e colaboradores (2008) demonstraram maior expressão gênica de uma calpaína (XM_811604.1), correspondente a TcCalp5 do nosso estudo, de 2,5 vezes maior em epimastigotas submetidos a estresse nutricional precedente à metaciclogênese em relação a epimastigotas em meio de cultura rico em nutrientes. Apesar de a metaciclogênese consistir

em um processo de diferenciação do parasito à tripomastigota, os autores não encontraram reatividade cruzada de anticorpos produzidos contra esta calpaína contra do extrato total das formas amastigotas e tripomastigotas metacíclicos do parasito nos ensaios de *Western blotting*. No presente trabalho, a TcCalp5 apresentou expressão gênica 4,3 vezes maior em tripomastigotas sanguíneos em relação aos epimastigotas cultivados em meio axênico rico em nutrientes. Contudo, a forma tripomastigota utilizada não foi a exatamente a mesma e nenhuma técnica bioquímica foi realizada especificamente contra a TcCalp5. Além disso, quando os dados gerados pelas análises de expressão gênica foram utilizados para ordenar de forma decrescente as calpaínas do *T. cruzi* conforme sua expressão gênica, a TcCalp5 foi a mais expressa das calpaínas nas formas epimastigota e amastigota, e a segunda mais expressa na forma tripomastigota.

Diversos outros estudos moleculares vêm demonstrando que as calpaínas dos cinetoplastídeos possuem expressão diferenciada conforme a forma evolutiva do parasito e em situações de estresse causado por fármacos (Minning et al., 2003; Atwood et al., 2005; Vergnes et al., 2007; Olego-Fernandez et al., 2009; Liu et al., 2010). Em *L. amazonensis*, Ramos e colaboradores (2004) detectaram a expressão aumentada da proteína META 2, que é uma calpaína que possui apenas o domínio I, nas formas promastigotas em relação às amastigotas. Em seguida, também em *L. amazonensis*, outro grupo reportou por análises proteômicas a presença de uma proteína relacionada à calpaína (SKCRP-14.1) intimamente envolvida com o programa de morte celular induzido por drogas, onde pode-se observar a participação desta proteína na indução da apoptose induzida por antimoniais, e ao mesmo tempo na diminuição da apoptose induzida pela miltefosina (Vergnes et al., 2007). Já em *T. brucei*, dois trabalhos do mesmo grupo detectaram a diferença de expressão gênica de calpaínas entre a forma procíclica e a forma tripomastigota sanguínea do parasito. No primeiro relato, Olego-Fernandez e colaboradores (2009) observaram que os tripomastigotas metacíclicos apresentavam uma expressão cerca de 15 vezes aumentada de uma variante análoga da CAP5.5, e a denominaram CAP5.5V. Ambos homólogos de calpaínas, CAP5.5 e CAP5.5V, estão relacionados à correta morfogênese do *T. brucei*, conforme foi observado em estudos ultraestruturais com parasitos silenciados para essas duas proteínas (Olego-Fernandez et al., 2009). Em seguida, em um estudo sobre a expressão e localização celular dos homólogos de calpaínas descritos no genoma do *T. brucei* foi relatada a diferença de pelo menos 4,5 vezes na expressão de transcritos de duas calpaínas nas formas tripomastigotas sanguíneas e de três outras nas formas procíclicas do parasito (Liu et al., 2010). Portanto, os dados de expressão gênica apresentados neste trabalho, juntamente com os dados da literatura,

sugerem uma modulação nos níveis dos transcritos das calpaínas nos tripanossomatídeos durante seu ciclo de vida. Esta diferença de expressão pode estar associada com o desenvolvimento de cada forma evolutiva como: 1) na locomoção e na adesão ao aparelho digestivo e no escape do sistema imune do hospedeiro invertebrado; e 2) no processo de diferenciação entre as formas, na infecção e na multiplicação no hospedeiro vertebrado. Sobre esta última hipótese, em estudos prévios com formas epimastigotas tratadas com o inibidor de calpaínas MDL28170 pudemos observar uma diminuição significativa na proliferação, na diferenciação por metaciclogênese e na interação com células do hospedeiro vertebrado e invertebrado *in vitro* (Sangenito et al., 2009; Ennes-Vidal et al., 2010, 2011).

Em paralelo à análise classificatória das sequências e à análise de expressão gênica, o alinhamento das sequências proteicas das calpaínas do *T. cruzi* permitiu a seleção da sequência peptídica mais conservada das calpaínas estudadas para produção de um anticorpo anti-calpaínas de tripanossomatídeos. Parte desta sequência, o motivo KAYAK, já havia sido relatado como uma assinatura das calpaínas de tripanossomatídeos por Ersfeld e colaboradores em 2005, e pode ainda ser encontrado em calpaínas de outros organismos. O peptídeo selecionado foi sintetizado pela empresa Rheabiotech e utilizado para imunização de coelhos para obtenção de um soro policlonal, que precisou passar por uma coluna de adsorção de BSA para purificação dos anticorpos contra calpaínas. Esse soro policlonal foi denominado anti-Trityp-calpain, uma vez que a sequência peptídica selecionada *in silico* é conservada nas calpaínas de todos os tripanossomatídeos que possuem seus genomas sequenciados. Além disso, o anticorpo reagiu contra moléculas de *L. braziliensis* (Vitório, 2014, dissertação de mestrado).

No *T. cruzi*, o peptídeo consenso utilizado para produção do anticorpo está completamente conservado em duas das 21 sequências correspondentes ao grupo 3 proposto, e quase completamente conservada em outras 17 sequências deste grupo, sendo apenas as TcCalp1 e a TcCalp2 as únicas sequências com baixa identidade. A TcCalp1, inclusive, está anotada no banco de dados como uma quinesina, uma vez que possui um domínio de quinesina na extremidade N-terminal da sequência. Neste estudo, a TcCalp1 apresentou um domínio II pouco conservado ($e\text{-value} > 10^{-3}$) no meio da sequência e o domínio III conservado ($e\text{-value} < 10^{-3}$) na extremidade C-terminal. As quinesinas são ATPases motoras divididas em diversas famílias que se movem pelos microtúbulos, e apresentam funções relacionadas ao processo de meiose e apoptose (Goshima & Vale, 2005). Portanto, visto que as calpaínas são conhecidas por desempenharem funções celulares envolvidas nos processos de diferenciação, regulação do ciclo celular e divisão celular (Gull et al., 2003, Ono &

Sorimachi, 2012), é compreensível que durante a evolução genes relacionados às calpaínas ancestrais possam ter se fundido aos domínios de quinesina. Nesse contexto, Zhao e colaboradores (2012) demonstraram através de análises filogenéticas que as calpaínas dos eucariotos unicelulares apresentam 27 tipos de arquiteturas de domínios diferentes, onde se pode observar a existência das mais diversas associações de domínios ao domínio II das calpaínas, inclusive domínios de ligação aos microtúbulos já descritos nas calpaínas atípicas de eucariotos pluricelulares melhor caracterizadas.

Neste estudo, o anticorpo anti-tritryp-calpain foi utilizado no intuito de observarmos de uma maneira geral sua reatividade contra moléculas presentes nas três diferentes formas evolutivas do parasito em técnicas que envolvam abordagens diferentes. Nas análises de *Western blotting*, pudemos observar a reatividade do anti-Tritryp-calpain contra proteínas em sequências peptídicas lineares de variadas massas moleculares e, inclusive, a presença da marcação de bandas específicas nas amostras de amastigotas e tripomastigotas. Na banda específica dos amastigotas a massa molecular encontrada foi de 65 kDa, a mesma predita *in silico* para a TcCalp7 desse estudo, que apresentou uma expressão gênica relativa de 56,9 vezes maior em relação à forma amastigota nos ensaios de qPCR em Tempo Real. Este dado sugere que esta calpaína seja estágio-específica, assim como já reportado nos estudos em *T. brucei* (Olego-Fernandez et al., 2009; Liu et al., 2010). Entretanto, com a exceção da banda de aproximadamente 65 kDa da forma amastigota, não foi possível observar direta relação da massa molecular predita *in silico* com as encontradas experimentalmente. É importante destacar que as calpaínas de tripanossomatídeos sofrem modificações pós-traducionais que poderiam justificar a diferença de massa molecular predita *in silico* da encontrada nos ensaios (Hertz-Fowler et al., 2001; Cordero et al., 2009). Outro motivo que justifica a massa molecular das bandas encontradas experimentalmente é o fato das calpaínas poderem estar sofrendo autólise durante sua ativação ou inibição, conforme descrito para as calpaínas caracterizadas de outros organismos (Goll et al., 2003; Ono & Sorimachi, 2012).

Com o intuito de também avaliar a expressão das calpaínas reconhecidas pelo anticorpo anti-tritryp-calpain na sua forma nativa, foram realizadas análises de citometria de fluxo. Nesses ensaios foi possível detectar a presença de calpaínas nas células do parasito permeabilizadas com Triton X-100, e ainda verificar uma expressão aumentada das moléculas reativas nas formas amastigotas e tripomastigotas em relação aos epimastigotas. Nesse contexto, Hertz-Fowler e colaboradores (2001) já haviam descrito por técnicas bioquímicas que a CAP5.5 do *T. brucei* está intimamente associada ao citoesqueleto das formas procíclicas do parasito. Os autores relataram que a CAP5.5 tem domínios que permitem a ligação ao

ácido palmítico e ao ácido mirístico, sugerindo uma estável interação com a membrana plasmática e com os microtúbulos do citoesqueleto. Com o passar dos anos, o mesmo grupo vem realizando uma série de estudos dedicados a melhor compreensão das calpaínas em *T. brucei* que corroboram essa maior expressão das calpaínas no meio intracelular, a associação dessas proteínas ao citoesqueleto e o seu envolvimento nos processos de divisão e diferenciação celular do parasito (Olego-Fernandez et al., 2009; Liu et al., 2010; Hayes et al., 2014). Já em *T. cruzi*, nosso grupo de pesquisa demonstrou em outros estudos a reatividade cruzada de anticorpos contra calpaínas de outros organismos contra moléculas presentes no meio intracelular, ou mesmo na superfície em menores níveis (Sangenito et al., 2008; Ennes-Vidal et al., 2011). Inclusive, a expressão de calpaínas detectadas pelo anticorpo contra calpaínas de *Drosophilla melanogaster* nos ensaios de citometria de fluxo demonstrou que epimastigotas recém-diferenciados de tripomastigotas sanguíneos possuem expressão aumentada das moléculas reativas quando comparada aos epimastigotas mantidos em cultura. Entretanto, a reatividade cruzada deste anticorpo com epítomos das outras formas evolutivas do parasito não fora verificada (Ennes-Vidal et al., 2011).

Nas análises de imunocitoquímica ultraestrutural empregando o anticorpo anti-calpaína produzido pela Rheabiotech, a marcação das calpaínas foi verificada em todo o citoplasma, na membrana plasmática, na membrana de vesículas citoplasmáticas e no flagelo das três formas do *T. cruzi*. As imagens obtidas nas formas tripomastigotas do presente estudo indicam que a região do flagelo reconhecida pelo anticorpo é provavelmente a zona de adesão flagelar, que é uma estrutural essencial para o processo de alongamento do flagelo durante a diferenciação do parasito. Através de outra técnica que objetiva a identificação da localização celular, a imunofluorescência, Liu e colaboradores (2010) obtiveram resultados similares quando empregaram anticorpos contra calpaínas específicos para cada calpaína do *T. brucei*, uma vez que detectaram a marcação dos anticorpos no citoplasma, no flagelo e na periferia do corpo celular. No intuito de compreender melhor a localização de umas das calpaínas na ponta do flagelo, os autores realizaram mutações sítio específicas nas extremidades 3' e 5' de um dos genes e puderam verificar a perda da localização celular da proteína quando pelo menos 35 resíduos de aminoácidos foram deletados da sua extremidade C-terminal. Embora não tenham sido encontrados dados *in silico* indicando motivos de sequência na extremidade C-terminal da desta calpaína que indiquem a localização flagelar, a sequência peptídica desta proteína possui um acúmulo de resíduos básicos e ponto isoelétrico de 9,7, assim como seu ortólogo em *T. cruzi*, a TcCalp15 deste trabalho (pI = 10,6). Os autores relataram ainda que nenhum ortólogo desta calpaína está presente nos genomas de *Leishmania* anotados, e que a

localização desta proteína na ponta do flagelo sugere um possível envolvimento nas funções sensoriais do parasito (Liu et al., 2010). Ainda em *T. brucei*, uma calpaína rica em regiões repetitivas, denominada CalpGM6, foi identificada como essencial para o processo de alongamento e localização celular do flagelo durante a multiplicação das formas procíclicas em cultura axênica (Hayes et al., 2014). O silenciamento por RNAi da CalpGM6 de *T. brucei* reduziu a taxa de proliferação do parasito e fez com que as formas procíclicas assumissem uma forma similar a epimastigota, com flagelo em posição central próximo ao núcleo e quase completamente livre. As análises ultraestruturais realizadas no trabalho permitiram observar encurtamento e desorganização estrutural da zona de adesão flagelar, o que levou os autores a concluírem a associação desta calpaína com a organização estrutural do parasito (Hayes et al., 2014). Em consonância, as calpaínas estudadas em outros modelos estão frequentemente envolvidas em funções celulares reguladas por cálcio como apoptose, diferenciação, proliferação e sinalização celular, o que é condizente com a localização celular encontrada neste trabalho (Soromachi et al., 2011).

Estudos proteômicos também vêm corroborando a localização celular observada pela imunocitoquímica empregando o anti-Tritryp-calpain. Em 2009, Sant'anna e colaboradores identificaram a presença de uma calpaína em uma fração purificada de reservossomos de epimastigotas de *T. cruzi*. A molécula identificada corresponde a TcClap13 do presente trabalho e possui sítios de modificações pós-traducionais de miristilação e palmitilação preditos *in silico*, e, portanto, poderia ser a molécula detectada nas vesículas das formas epimastigotas tratadas com o anticorpo nos ensaios de imunocitoquímica. Em outro estudo, dedicado a identificar proteínas de membrana solúveis das formas evolutivas encontradas no hospedeiro invertebrado, foram identificadas ao todo 5 calpaínas expressas nos epimastigotas, sendo 4 destas também expressas nos tripomastigotas metacíclicos e com sítios de de miristilação e palmitilação associação à membrana preditos *in silico* (Cordero et al., 2009). Uma destas calpaínas identificadas na membrana consiste na TcCalp15 deste trabalho, que apresentou expressão gênica aumentada nas formas epimastigotas do *T. cruzi*. Corroborando os dados de proteômica disponíveis na literatura, foi possível observar por análises ultraestruturais de epimastigotas tratados com o inibidor de calpaínas MDL28170 a desorganização estrutural dos reservossomos e da membrana plasmática dos parasitos tratados (Ennes-Vidal et al., 2011). Mais recentemente, foram identificadas ao todo 18 diferentes calpaínas no extrato total das formas tripomastigotas sanguíneas do parasito utilizando a metodologia do *shotgun* proteoma (Brunoro et al., 2015).

O conjunto de dados gerados por este trabalho indica que: 1) as diversas sequências de calpaínas presentes no genoma do *T. cruzi* possuem número de domínios diversificados, assim como graus de similaridade variados; 2) a expressão gênica da cada calpaína é diferenciada entre as formas evolutivas, assim como observado no *T. brucei*; 3) uma sequência peptídica conservada entre as calpaínas selecionadas para este estudo é capaz de gerar um anticorpo reativo contra moléculas presentes no parasito; 4) e a reatividade deste anticorpo indica a presença de calpaínas no citoplasma, em membranas e na zona de adesão flagelar em todas as formas do parasito. Embora esses resultados suscitem mais perguntas a respeito da expressão e das funções das calpaínas do *T. cruzi*, este estudo revelou informações relevantes sobre estas moléculas neste tripanossomatídeo. Outras abordagens poderão ser futuramente empregadas para tentar compreender melhor todos os dados gerados sobre essa família tão complexa de proteínas, que apresentam potencial terapêutico, uma vez que membros compartilham apenas cerca de 20 a 30% de identidade com as calpaínas de mamíferos. Nesse sentido, trabalhos anteriores demonstraram o potencial quimioterápico do inibidor de calpaínas, MDL28170, sobre as diferentes formas evolutivas do *T. cruzi* (Sangenito et al., 2009; Ennes-Vidal et al., 2010 e 2011), e as formas promastigotas de *L. amazonensis* (Marinho et al., 2014) e *L. braziliensis* (Vitório BS, 2014, dissertação de mestrado). Entretanto, apesar do MDL28170 apresentar alta especificidade para as calpaínas, não podemos descartar a possibilidade de ação inespecífica sobre outras cisteínas peptidases. Este trabalho buscou ainda a possibilidade de modelar a estrutura da calpaína para realizar ensaios de *docking* contra este inibidor, para em seguida buscar em bancos de estrutura de compostos com potencial atividade quimioterápica. Entretanto, as calpaínas com estrutura 3D resolvida experimentalmente, que poderiam ser utilizadas como molde para a determinação estrutural das calpaínas do parasito através de técnicas de modelagem comparativa apresentou baixa identidade com as sequências de *T. cruzi*, o que inviabilizou desta abordagem. Por fim, as diversas calpaínas expressas pelo *T. cruzi* poderiam ser um potencial alvo para o desenvolvimento de novas drogas mais potentes e seletivas, e outros estudos devem ser iniciados para aumentar o conhecimento acerca desta fascinante família de peptidases.

VII. Conclusões

O presente trabalho permite concluir que:

1. O *T. cruzi* possui 55 sequências com homologia às calpaínas no seu genoma com diversificada estrutura e conservação de domínios;
2. A diversidade das sequências das calpaínas pode ser classificada em diferentes grupos conforme a presença e a conservação dos domínios de cada sequência;
3. As calpaínas em *T. cruzi* possuem expressão gênica diferenciada nas três formas evolutivas do parasito, sendo seis dessas calpaínas mais expressas em uma das duas formas clinicamente relevantes do parasito e cinco delas na forma presente no inseto vetor;
4. Um peptídeo conservado entre as calpaínas do *T. cruzi* é capaz de gerar um anticorpo reativo contra diversas moléculas presentes nas três formas evolutivas do parasito;
5. O anticorpo produzido contra as calpaínas do *T. cruzi*, anti-tritryp-calpain, foi capaz de detectar um nível de expressão de calpaínas diferencial entre as formas evolutivas, onde as formas amastigotas e tripomastigotas, respectivamente, apresentaram maior marcação em relação aos epimastigotas;
6. O anti-tritryp-calpain foi capaz ainda de detectar ultraestruturalmente calpaínas expressas no citoplasma, na membrana plasmática, na estrutura paraflagelar e em vesículas nas três formas evolutivas do parasito.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirde P, Romanha AJ. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. J Proteome Res. 2008; 7(6): 2357-2367.

Araújo PR, Teixeira SM. Regulatory elements involved in the post-transcription control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* – A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011; 106 (3): 257-266.

Atwood JA, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. Science. 2005; 309: 473-476.

Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streit J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 2034–2039.

Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. N Engl J Med. 2011; 364(26): 2527–34.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. Science. 2005; 309(5733): 416-22.

Bestetti RB, Couto LB, Cardinalli-Neto A. When a misperception favors a tragedy: Carlos Chagas and the Nobel Prize of 1921. Int J Cardiol. 2013; 169(5): 327-30.

Bhattacharya J, Dey R, Datta SC. Calcium dependent thiol protease caldonopain and its specific endogenous inhibitor in *Leishmania donovani*. Mol Biochem Parasitol. 1993; 126: 9-16.

Borges-Pereira J, Castro JA, Campos JH, Nogueira JDES, Zauza PL, Marques P. Study of the infection and morbidity of Chagas' disease in municipality of Joao Costa: National Park Serra da Capivara, Piaui, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2002; 35(4): 315-322.

Branquinha MH, Marinho FA, Sangenito LS, Oliveira SS, Goncalves KC, Ennes-Vidal V, et al. Calpains: potential targets for alternative chemotherapeutic intervention against human pathogenic trypanosomatids. *Curr Med Chem*. 2013; 20(25): 3174-85.

Brunoro GV, Caminha MA, Ferreira AT, Leprevost Fda V, Carvalho PC, Perales J, et al. Reevaluating the *Trypanosoma cruzi* proteomic map: the shotgun description of bloodstream trypomastigotes. *J Proteomics*. 2015; 115:58-65.

Campbell RL, Davies PL. Structure-function relationships in calpains. *Biochem J*. 2012; 447(3): 335-51.

Chagas C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909; 1: 159–218.

Chagas C. Neue Trypanosomen: Vorläufige Mitteilung. *Arch Schiffs Trop Hyg*. 1909; 13: 120–122.

Corbalán-García S, Gómez-Fernández JC. The C2 domains of classical and novel PKCs as versatile decoders of membrane signals. *Biofactors*. 2010; 36(1): 1-7.

Cordero EM, Nakayasu ES, Gentil LG, Yoshida N, Almeida IC, da Silveira JF. Proteomic analysis of detergent-solubilized membrane proteins from insect-developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *J Proteome Res*. 2009; 8(7): 3642-52.

Correa GC, Margis-Pinheiro M, Margis R. Identification, classification and expression pattern analysis of sugarcane cysteine proteinases. *Genet Mol Biol*. 2001; 24: 275-283.

Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 (1): 31-40.

Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010; 465(7301): S6-7.

Coura JR, Viñas PA, Junqueira AC. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014; 109(7): 856-62.

Coutinho M, Freire O Jr, Dias JC. The noble enigma: Chagas' nominations for the Nobel prize. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(1): 123-9.

Croall DE, Ersfeld K. The calpains: modular designs and functional diversity. Genome Biol. 2007; 8(6): 218.

d'Avila-Levy CM, Souza RF, Gomes RC, Vermelho AB, Branquinha MH. A novel extracellular calcium-dependent cysteine proteinase from *Crithidia deanei*. Arch Biochem Biophys. 2003; 420: 1-8.

d'Avila-Levy CM, Marinho FA, Santos LO, Martins JL, Santos AL, Branquinha MH. Antileishmanial activity of MDL 28170, a potent calpain inhibitor. Int J Antimicrob Agents. 2006; 28(2): 138-142.

d'Avila-Levy CM, Boucinha CM, Kostygova A, Carneiro HLS, Morelli KA, Grybchuk-Ieremenko A, et al. Exploring environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. Mem Inst Oswaldo Cruz. *in press*.

De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Curr Pharm. 2002; 8(4): 269-285.

De Souza W, Sant'Anna C, Cunha-e-Silva NL. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. Prog Histochem Cytochem. 2009; 44(2): 67-124.

De Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol. 2010; 295394.

Denison SH, Orejas M, Arst HN Jr. Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. J Biol Chem. 1995; 270(48): 28519-22.

Dey R, Bhattacharya J, Datta SC. Calcium-dependent proteolytic activity of a cysteine protease caldonopain is detected during *Leishmania* infection. *Mol Cell Biochem.* 2006; 281(1-2): 27-33.

Dias JC. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad Saude Publica.* 2007; 23: 13-22.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science.* 2005; 309(5733): 409-15.

Donkor IO. An updated patent review of calpain inhibitors (2012 - 2014). *Expert Opin Ther Patents.* 2015; 25(1): 17-31.

Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 1395–8.

Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. MDL28170, a potent Calpain Inhibitor, Affects *Trypanosoma cruzi* Metacyclogenesis, Ultrastructure and Attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Plos One.* 2011; 6(4): e18371.

Ersfeld K, Barraclough H, Gull K. Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *J Mol Evol.* 2005; 61(6): 742-757.

Fietto JL, De Marco R, Nascimento IP, Castro IM, Carvalho TM, De Souza W, et al. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 316: 454-60.

Friedrich P, Tompa P, Farkas A. The calpain-system of *Drosophila melanogaster*: coming of age. *Bioessays.* 2004; 26(10): 1088-96.

Futai E, Sorimachi H, Jeong SY, Kitamoto K, Ishiura S, Suzuki K. *Aspergillus oryzae* palBory encodes a calpain-like protease: homology to *Emericella nidulans* PalB and conservation of functional regions. *J Biosci Bioeng.* 1999; 88(4): 438-40.

Futai E, Kubo T, Sorimachi H, Suzuki K, Maeda T. Molecular cloning of PalBH, a mammalian homologue of the *Aspergillus* atypical calpain PalB. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1517(2): 316-9.

Galetović A, Souza RT, Santos MR, Cordero EM, Bastos IM, Santana JM, et al. The repetitive cytoskeletal protein H49 of *Trypanosoma cruzi* is a calpain-like protein located at the flagellum attachment zone. *PLoS One.* 2011; 6(11): e27634.

Gentil LG, Cordero EM, do Carmo MS, dos Santos MR, da Silveira JF. Posttranscriptional mechanisms involved in the control of expression of the stage-specific GP82 surface glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2009; 109(2): 152-8.

Giese V, Dallagiovanna B, Marchini FK, Pavoni DP, Krieger MA, Goldenberg S. *Trypanosoma cruzi*: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(6): 598-601.

Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Zalewska T. Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *Bioessays.* 1992;14(8): 549-56.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Ver* 2003; 83: 731-801.

Goshima G, Vale RD. Cell cycle-dependent dynamics and regulation of mitotic kinesins in *Drosophila* S2 cells. *Mol Biol Cell.* 2005; 16(8): 3896-907.

Gull K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1999; 53: 629-655.

Guroff G. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem.* 1964; 239: 149-55.

Hayes P, Varga V, Olego-Fernandez S, Sunter J, Ginger ML, Gull K. Modulation of a cytoskeletal calpain-like protein induces major transitions in trypanosome morphology. *J Cell Biol.* 2014; 206(3): 377-84.

Hertz-Fowler C, Ersfeld K, Gull K. CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 116: 25-34.

Huston RB, Krebs EG. Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme. *Biochem.* 1968; 7: 2116-22.

IUBMB. Enzyme nomenclature (cysteine endopeptidases). Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/22>. Acesso em: 20 de julho de 2015.

Ishiura S, Murofushi H, Suzuki K, Imahori K. Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle. I. Purification and characterization. *J Biochem.* 1978; 84(1): 225-30.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science.* 2005; 309(5733): 436-42.

Kar P, Chakraborti T, Samanta K, Chakraborti S. μ -Calpain mediated cleavage of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in isolated mitochondria under A23187 induced Ca^{2+} stimulation. *Arch Biochem Biophys.* 2009; 482(1-2): 66-76.

Kelly S, Kramer S, Schwede A, Maini PK, Gull K, Carrington M. Genome organization is a major component of gene expression control in response to stress and during the cell division cycle in trypanosomes. *Open Biol.* 2012; 2(4): 120033.

Khorchid A, Ikura M. How calpain is activated by calcium. *Nat Struct Biol.* 2002; 9(4): 239-41.

Kramer S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of Kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol*. 2012; 181: 61-72.

Kretsinger RH. EF-hands embrace. *Nat Struct Biol*. 1997; 4(7): 514-6.

Kropf SP. Carlos Chagas and the debates and controversies surrounding the disease of Brazil (1909-1923). *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2009; 16 Suppl 1: 205-27.

Lima FM, Oliveira P, Mortara R a, Silveira JF, Bahia D. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? *New Biotech*. 2010; 27(6): 837-43.

Liu W, Apagyí K, McLeavy L, Ersfeld K. Expression and cellular localisation of calpain-like proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2010; 169(1): 20-6.

Lopes AG, Souto-Padrón T, Dias FA, Gomes M, Rodrigues GC, Zimmermann LT, et al. Trypanosomatids: Odd organisms, devastating diseases. *Open Parasitol J* 2010; 4: 30-59.

Machado-Silva A, Guimarães PP, Tavares CA, Sinisterra RD. New perspectives for leishmaniasis chemotherapy over current anti-leishmanial drugs: a patent landscape. *Expert Opin Ther Pat*. 2015; 25(3): 247-60.

Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. Chagas Heart Disease: An Update. *Am J Med*. 2015; 9343(15): 00447-7.

Marinho FA, Gonçalves KC, Oliveira SS, Gonçalves DS, Matteoli FP, Seabra SH, et al. The calpain inhibitor MDL28170 induces the expression of apoptotic markers in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *PLoS One*. 2014; 9(1): e87659.

Martínez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010: 525241.

Michels PAM, Hannaert V, Bringaund F. Metabolic aspects of glycosomas in trypanosomatidae – new data and views. *Parasitol Today*. 2000; 16: 482-89.

Minning TA, Bua J, Garcia GA, McGraw RA, Tarleton RL. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003; 131: 55-64.

Moldoveanu T, Hosfield CM, Lim D, Elce JS, Jia Z, Davies PL. A Ca²⁺ switch aligns the active site of calpain. *Cell* 2002; 108: 649-60.

Morel CM. Chagas disease, from discovery to control - and beyond: history, myths and lessons to take home. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94 Suppl 1: 3-16.

Myler PJ, Audleman L, deVos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, et al. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(6): 2902-6.

Nixon RA, Saito KI, Grynspan F, Griffin WR, Katayama S, Honda T, Mohan PS, Shea TB, Beermann M. Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1994; 747: 77-91.

Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(4): 653-5.

Ohno S, Emori Y, Imajoh S, Kawasaki H, Kisaragi M, Suzuki K. Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature* 1984; 312: 566-570.

Olego-Fernandez S, Vaughan S, Shaw MK, Gull K, Ginger ML. Cell morphogenesis of *Trypanosoma brucei* requires the paralogous, differentially expressed calpain-related proteins CAP5.5 and CAP5.5V. *Protist*. 2009; 160(4): 576-90.

Ono Y, Sorimachi H. Calpains: an elaborate proteolytic system. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1824(1): 224-36.

Organização Mundial de Saúde (www.who.int). Chagas Disease(American trypanosomiasis). [acesso em 30 de julho de 2015]. Disponível em: http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/.

Pereira FM, Elias CG, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos AL. Cysteine peptidases in *Herpetomonas samuelpessoai* are modulated by temperature and dimethylsulfoxide-triggered differentiation. *Parasitology*. 2009; 136(1): 45-54.

Pitaluga AN, Beteille V, Lobo AR, Ortigão-Farias JR, Dávila AM, Souza AA, et al. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. *Mol Genet Genomics*. 2009; 282: 307-17.

Ramos CS, Franco FAL, Smith DF, Uliana SR. Characterization of a new *Leishmania* META gene and genomic analysis of the META cluster. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 238: 213-219.

Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012; 26(2): 275-91.

Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42: D503-9.

Rey L. *Parasitologia*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Rodrigues DC, Silva R, Rondinelli E, Urményi TP. *Trypanosoma cruzi*: modulation of HSP70 mRNA stability by untranslated regions during heat shock. *Exp Parasitol*. 2010; 126(2): 245-53.

Saez ME, Ramirez-Lorca R, Moron FJ, Ruiz A. The therapeutic potential of the calpain family: new aspects (Review). *Drug Discov Today* 2006; 11(19- 20): 917-23.

Sangenito LS, Ennes-Vidal V, Marinho FA, Da Mota FF, Santos ALS, d'Avila-Levy CM, et al. Arrested growth of *Trypanosoma cruzi* by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms. *Parasitology*. 2009; 136: 433–41.

Sant'anna C, Nakayasu ES, Pereira MG, Lourenço D, De Souza W, Almeida IC. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. *Proteomics*. 2009; 9(7): 1782-1794, 2009.

Soeiro MN, de Castro SL. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*. 2009; 13(1): 105-21.

Soeiro MN, Werbovetz K, Boykin DW, Wilson WD, Wang MZ, Hemphill A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology*. 2013; 140(8): 929-51.

Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J*. 1997; 328 (3): 721-32.

Sorimachi H, Suzuki K. The structure of calpain. *J Biochem*. 2001; 129(5): 653-64.

Sorimachi H, Hata S, Ono Y. Expanding members and roles of the calpain superfamily and their genetically modified animals. *Exp Anim* 2010; 59; 549-566.

Sorimachi H, Hata S, Ono Y. Calpain chronicle - an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2011; 87: 287-327.

Stanaway JD, Roth G. The Burden of Chagas Disease: Estimates and Challenges. *Glob Heart*. 2015; 10(3): 139-44.

Stevens JR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC: The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitol*. 1999; 118: 107–116.

Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasit Vectors*. 2014; 7: 317.

Strobl S, Fernandez-Catalan C, Braun M, Huber R, Masumoto H, Nakagawa K, et al. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(2): 588-92.

Suzuki K. Nomenclature of calcium dependent proteinase. *Biomed Biochem Acta*. 1991; 50(4-6): 483-4.

Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(8): e1749.

Telleria EL, de Araújo AP, Secundino NF, d'Avila-Levy CM, Traub-Csekö YM. Trypsin-like serine proteases in *Lutzomyia longipalpis* - expression, activity and possible modulation by *Leishmania infantum chagasi*. *PLoS One*. 2010; 5(5): e10697.

Tompa P, Buzder-Lantos P, Tantos A, Farkas A, Szilágyi A, Bánóczy Z, et al. On the sequential determinants of calpain cleavage. *J Biol Chem*. 2004; 279(20): 20775-85.

Vergnes B, Gourbal B, Gorard I, Sundar S, Drummel-Smith J, Ouellette M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteom*. 2007; 6: 88–101.

Vickerman K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol*. 1994; 24: 1317-1331.

Warren LG, Guevara A. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. IV. Evidence in Favor of the Presence of a Hexokinase. *J Protozool*. 1964; 11: 107-8.

Wilkinson SR, Kelly JM. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev Mol Med*. 2009; 11: e31.

Yao C, Donelson JE, & Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 132(1): 1-16.

Zhao S, Liang Z, Demko V, Wilson R, Johansen W, Olsen OA, et al. Massive expansion of the calpain gene family in unicellular eukaryotes. *BMC Evol Biol.* 2012; 12: 193.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104(7): 1051-4.

From: **Parasite & Vectors** <em@editorialmanager.com>
Date: 2015-11-25 16:18 GMT-02:00
Subject: Confirmation of your submission to Parasites & Vectors
To: "Claudia M. d'Avila-Levy" <davila.levy@ioc.fiocruz.br>

This is the Header!

MDL28170, a potent calpain inhibitor, affects Leishmania braziliensis growth, ultrastructure, macrophage interaction and peptidases expression.

Bianca S. Vitória, MSc; Vitor Ennes-Vidal, PhD; Rubem F. S. Menna-Barreto, PhD; Silvia A. G. Silva, PhD; André L. S. Santos, PhD; Marta H. Branquinha, PhD; Claudia M. d'Avila-Levy, Pd.D
Parasites & Vectors

Dear Dr. d'Avila-Levy,

Thank you for submitting your manuscript 'MDL28170, a potent calpain inhibitor, affects Leishmania braziliensis growth, ultrastructure, macrophage interaction and peptidases expression.' to Parasites & Vectors.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following website:

<http://parv.edmgr.com/>

Your username is: Your username is: davila.levy

Your password is: Your password is: available at this link http://parv.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Claudia&lastname=d%27Avila-Levy&email_address=davila.levy@ioc.fiocruz.br

Best wishes,

Editorial Office
Parasites & Vectors
<http://www.parasitesandvectors.com>

Parasites & Vectors

MDL28170, a potent calpain inhibitor, affects Leishmania braziliensis growth, ultrastructure, macrophage interaction and peptidases expression.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:									
Full Title:	MDL28170, a potent calpain inhibitor, affects Leishmania braziliensis growth, ultrastructure, macrophage interaction and peptidases expression.								
Article Type:	Research								
Section/Category:	Protozoan Biology and Disease								
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BR)</td> <td>Dr. Claudia M. d'Avila-Levy</td> </tr> <tr> <td>Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (BR)</td> <td>Dr. Claudia M. d'Avila-Levy</td> </tr> <tr> <td>Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro</td> <td>Dr. Claudia M. d'Avila-Levy</td> </tr> <tr> <td>Fundação Oswaldo Cruz (BR)</td> <td>Dr. Claudia M. d'Avila-Levy</td> </tr> </table>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BR)	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (BR)	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy	Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy	Fundação Oswaldo Cruz (BR)	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (BR)	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy								
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (BR)	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy								
Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy								
Fundação Oswaldo Cruz (BR)	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy								
Abstract:	<p>Background: The various species of Leishmania are parasites responsible for severe human diseases. The drugs used in the treatment of leishmaniasis are extremely limited because of concerns of toxicity, efficacy and resistance. Peptidases and its inhibitors are a promising alternative for new therapeutic interventions. This study is focused on calpains, which comprise a family of neutral cysteine peptidases that are involved in pathophysiological human diseases. In this context, some inhibitors are under clinical trial, therefore opening the possibility for a "me-too" approach to treat leishmaniasis.</p> <p>Methods: Through multiple alignments of several trypanosomaitds' calpain sequences, a consensus region was selected for the synthesis of a peptide used to generate a polyclonal serum, named anti-tritryp-calpain antibody. The anti-tritryp-calpain antibody was employed in flow cytometry to assess calpain abundance in Leishmania braziliensis. Also, the effects of MDL28170, a potent and specific calpain inhibitor, were assayed on promastigotes growth, ultrastructure and expression of gp63, cpb and calpain molecules. A paralleled comparison between parasites recently isolated from hamster lesions and a culture-adapted strain was also performed.</p> <p>Results: By flow cytometry analysis, calpain homologues have been recognized by the anti-tritryp-calpain antibody mainly intracellularly. In inhibition assays, MDL28170 presented a leishmaniostatic effect with a dose-dependent reduction in the proliferation rate, either in recently isolated or culture-adapted promastigotes. The treatment of the parasites with the inhibitor prior to the interaction with peritoneal mouse macrophages led to a decrease in the association index and to an increase in the percentage of host cells with attached parasites. Ultrastructural analysis of treated promastigotes revealed the formation of multivesicular bodies, concentric membranar structures as well as plasma and flagellar membrane blebbing and Golgi disruption. Finally, MDL28170 enhanced the expression of gp63 molecules, while cpb and calpain expression was not affected.</p> <p>Conclusion: This study demonstrated the effects of the calpain inhibitor MDL28170 on L. braziliensis growth, ultrastructure, interaction with peritoneal macrophages and peptidases expression. Therefore, these results add new in vitro insights into the exploitation of calpain inhibitors as an alternative treatment for leishmaniasis and further supports this peptidase family as an interesting target for the development of more potent and specific inhibitors.</p>								
Corresponding Author:	Claudia M. d'Avila-Levy, Pd.D Fundacao Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, RJ BRAZIL								
Corresponding Author Secondary Information:									
Corresponding Author's Institution:	Fundacao Oswaldo Cruz								

Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Bianca S. Vitório, MSc
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Bianca S. Vitório, MSc
	Vitor Ennes-Vidal, PhD
	Rubem F. S. Menna-Barreto, PhD
	Silvia A. G. Silva, PhD
	André L. S. Santos, PhD
	Marta H. Branquinha, PhD
	Claudia M. d'Avila-Levy, Pd.D
Order of Authors Secondary Information:	

[Click here to view linked References](#)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

MDL28170, a potent calpain inhibitor, affects *Leishmania braziliensis* growth, ultrastructure, macrophage interaction and peptidases expression.

Bianca da Silva Vitória^{1#}; Vítor Ennes-Vidal^{1#}; Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto²; Sílvia Amaral Gonçalves da-Silva³; Marta Helena Branquinha de Sá⁵; André Luis Souza dos Santos⁵ and Claudia Masini d'Avila-Levy^{1,*}

¹Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratório de Imunofarmacologia Parasitária, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil

⁴Laboratório Biologia Molecular de Parasitos e Vetores, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil

⁵Laboratório de Investigação de Peptidases, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

These authors contributed equally to the work.

*Corresponding author: Av. Brasil, 4365. Pavilhão Arthur Neiva, sala 14. Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. CEP 21040-360, Tel: (+55) 21 2562 1014. E-mail: davila.levy@ioc.fiocruz.br

E-mail addresses:

Bianca da Silva Vitória: bia.bio@ioc.fiocruz.br

Vitor Ennes-Vidal: vidal@ioc.fiocruz.br

Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto: rubemb@ioc.fiocruz.br

Sílvia Amaral Gonçalves da Silva: silvasag@gmail.com

Marta Helena Branquinha de Sá: mbranquinha@micro.ufrj.br

André Luis Souza dos Santos: andre@micro.ufrj.br

Claudia Masini d'Avila-Levy: davila.levy@ioc.fiocruz.br

Abstract:

Background: The various species of *Leishmania* are parasites responsible for severe human diseases. The drugs used in the treatment of leishmaniasis are extremely limited because of concerns of toxicity, efficacy and resistance. Peptidases and its inhibitors are a promising alternative for new therapeutic interventions. This study is focused on calpains, which comprise a family of neutral cysteine peptidases that are involved in pathophysiological human diseases. In this context, some inhibitors are under clinical trial, therefore opening the possibility for a “me-too” approach to treat leishmaniasis.

Methods: Through multiple alignments of several trypanosomatids’ calpain sequences, a consensus region was selected for the synthesis of a peptide used to generate a polyclonal serum, named anti-tritryp-calpain antibody. The anti-tritryp-calpain antibody was employed in flow cytometry to assess calpain abundance in *Leishmania braziliensis*. Also, the effects of MDL28170, a potent and specific calpain inhibitor, were assayed on promastigotes growth, ultrastructure and expression of gp63, cpb and calpain molecules. A paralleled comparison between parasites recently isolated from hamster lesions and a culture-adapted strain was also performed.

Results: By flow cytometry analysis, calpain homologues have been recognized by the anti-tritryp-calpain antibody mainly intracellularly. In inhibition assays, MDL28170 presented a leishmanistatic effect with a dose-dependent reduction in the proliferation rate, either in recently isolated or culture-adapted promastigotes. The treatment of the parasites with the inhibitor prior to the interaction with peritoneal mouse macrophages led to a decrease in the association index and to an increase in the percentage of host cells with attached parasites. Ultrastructural analysis of treated promastigotes revealed the formation of multivesicular bodies, concentric membranar structures as well as plasma and flagellar membrane blebbing and Golgi disruption. Finally, MDL28170 enhanced the expression of gp63 molecules, while cpb and calpain expression was not affected.

Conclusion: This study demonstrated the effects of the calpain inhibitor MDL28170 on *L. braziliensis* growth, ultrastructure, interaction with peritoneal macrophages and peptidases expression. Therefore, these results add new *in vitro* insights into the exploitation of calpain inhibitors as an alternative treatment for leishmaniasis and further supports this peptidase family as an interesting target for the development of more potent and specific inhibitors.

Keywords: calpains, chemotherapy, *Leishmania braziliensis*, MDL28170, peptidases.

Background

The various species of *Leishmania* are parasites of considerable medical and economic importance. Each year, there are an estimated of 1.5 – 2 million new cases of leishmaniasis with around 70 000 deaths, and 350 million people are at risk of infection and disease. This disease is characterized by a spectrum of clinical manifestations: ulcerative skin lesions developing at the site of the sandfly bite (localized cutaneous leishmaniasis [LCL]); multiple non-ulcerative nodules (diffuse cutaneous leishmaniasis [DCL]); destructive mucosal inflammation (mucosal leishmaniasis); and disseminated visceral infection (visceral leishmaniasis) [1,2]. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the most broadly distributed causative agent of cutaneous leishmaniasis in Brazil [3]. The current therapy for leishmaniasis is limited to a handful of drugs that suffer from unacceptable toxicity, difficulties of administration and increasing treatment failures, since resistance to these compounds has become a severe problem. Consequently, the discovery of new trypanosomatid targets and novel bioactive compounds is an urgent need [4].

In the parasite life cycle, *Leishmania* spp. are transmitted to human and animals by sandflies bite. In the mammalian host, the parasite has an obligate intracellular form, the amastigotes, while in the invertebrate host, procyclic promastigotes and the infective metacyclic promastigotes are the major forms [5]. *Leishmania* peptidases - a class of hydrolytic enzymes responsible for breaking the peptide bonds - are essential for all parasite morphotypes. These molecules are involved in crucial physiological reactions such as simple digestion of proteins for nutrition, proliferation and growth, differentiation, signaling, death pathways, and mediating and sustaining the infectious disease process [6]. Since peptidases play several roles in the parasite life cycle and pathogenesis, these enzymes have attracted the attention of many laboratories as an alternative chemotherapy to treat protozoan diseases. In this sense, among *Leishmania* peptidases, calpains have been presenting interesting finds and seem to be a remarkable target for the development of an alternative target to treat leishmaniasis [7-9].

Calpains are non-lysosomal neutral calcium-dependent cysteine peptidases (EC 3.4.22.17; Clan CA, family C02) of which at least 15 isoforms exist, while two isoforms, μ -calpain (calpain 1) and m-calpain (calpain 2) are well characterized mammalian calpains that are differentiated on the calcium concentrations, micro and millimolar, respectively, required for the activation. Some evidence indicates that these enzymes may participate in a variety of cellular processes, including the rearrangement of cytoskeletal proteins, different signal

1 transduction pathways and apoptosis [10, 11]. The calpains were characterized primarily in
2 humans, and therefore calpain homologs have been identified based on the primary sequence
3 characteristics of the calpain-like peptidase domain (CysPc) and domain structure in almost all
4 eukaryotes and a few bacteria [12-14]. In trypanosomatids, a classical study employing whole
5 genome analyses showed the presence of a large and diverse family of calpains in
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

transduction pathways and apoptosis [10, 11]. The calpains were characterized primarily in humans, and therefore calpain homologs have been identified based on the primary sequence characteristics of the calpain-like peptidase domain (CysPc) and domain structure in almost all eukaryotes and a few bacteria [12-14]. In trypanosomatids, a classical study employing whole genome analyses showed the presence of a large and diverse family of calpains in *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi* [8,15]. Since the deregulation of calpain activity is implicated in human diseases, as muscular dystrophy and neurological disorders, a broad range of calpain inhibitors are under development and the potential clinical utility of these inhibitors has been shown to treat several diseases. Therefore, several classes of inhibitors, including peptide aldehydes, are in the process of clinical evaluation in animal models of human disease [16]. One of these compounds, the membrane permeable calpain inhibitor MDL28170 (calpain inhibitor III, Z-Val-Phe-CHO), can inhibit calpain within cells. MDL28170 has been reported to exhibit neuroprotective effects in numerous rodent neurotrauma models, including spinal cord injury, neonatal hypoxia-ischemia and focal cerebral ischemia, and also to reduce neuronal loss and improve locomotor functions in a mouse model of Parkinson's disease [17,18]. Considering the difficulties to develop and approve a new drug to treat neglected diseases [19], our research group has been advocating a "me-too" approach with calpain inhibitors. In this sense, MDL28170 was capable of arresting irreversibly the growth of *L. amazonensis* promastigotes in a dose-dependent manner [7], while one possible mechanism of action is through the activation of an apoptotic-like pathway [9]. MDL28170 was also effective against all the morphological stages found in *T. cruzi*, without displaying any relevant cytotoxic effect on mammalian host cells [20,21]. The calpain inhibitor also arrested the *in vitro* metacyclogenesis of *T. cruzi* and impaired parasite adhesion to the gut of the insect vector *Rhodnius prolixus* in a dose-dependent manner [22]. Notwithstanding, the calpain family is highly expanded in trypanosomatids genome [15] and is detected abundantly in proteomics assays, with a differential expression related to drug resistance and virulence [23-25]. These data encouraged our research group to confirm the presence of calpain proteins in *L. braziliensis*, and compare by flow cytometry the calpain levels between parasites recently isolated from hamster lesions or culture-adapted promastigotes. In addition, we extended our studies on the evaluation of the effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the growth, ultrastructure and interaction with mouse peritoneal macrophages, as well as its effects on calpains, cpb and gp63 abundance.

Methods

1
2 *Parasite culture*

3 *Leishmania braziliensis* (strain Thor MCAN/BR/1998/619) was isolated from hamster
4 lesions. Afterwards, parasites were routinely cultured at 26 °C in Schneider's insect medium
5 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and gentamicin (40 mg/mL).
6 Up to six sub-cultures *in vitro* were considered recently isolated parasites, while parasites from
7 20-30 sub-cultivations were considered culture-adapted strain. Experiments were carried out
8 in accordance with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at
9 Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes of the Universidade Estadual do Rio de Janeiro
10 (UERJ) (CEUA/027/2013).
11
12
13
14
15
16
17
18

19 *Chemicals*

20
21 The calpain inhibitor III, MDL28170 (carbobenzoxy-valylphenylalanial; Z-Val-Phe-CHO),
22 was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Stock solutions of the drug (500 mM)
23 were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO). Panotico was purchased from Laborclin (Pinhais,
24 PA, Brazil). All other reagents were analytical grade or superior.
25
26
27
28
29

30 *Anti-trityp-calpain polyclonal antibody*

31 The rabbit polyclonal antibody was raised against a conserved polypeptide from
32 trypanosomatids' calpains (LEKAYAKLHGYSY). The peptide synthesis and rabbit immunization
33 were performed by Rhea Biotech Enterprise (Campinas, São Paulo, Brazil) and purified by
34 affinity chromatography using a column with the peptide. The antibody was named 'anti-
35 trityp-calpain', and the final concentration was 0.1 mg/ml.
36
37
38
39
40
41

42 *Flow cytometry for calpain detection*

43
44 Promastigotes (1.0×10^6 cells) used for these experiments were fixed at 4 °C in 0.4%
45 paraformaldehyde in cold phosphate-buffered saline (PBS; 150 mM NaCl, 20 mM phosphate
46 buffer pH 7.2) for 30 min, followed by extensive washing in the same buffer. Alternatively, the
47 fixed cells were permeabilized by 0.01% Triton X-100 in PBS for 15 min at room temperature
48 and then washed twice in PBS. The fixed and permeabilized cells maintained their
49 morphological integrity, as verified by optical microscopic observation. After this step, the cells
50 were incubated for 1 h at room temperature with a 1:250 dilution of the anti-trityp-calpain
51 polyclonal antibody. Cells were then incubated for an additional hour with a 1:750 dilution of
52 Alexa 488-labelled goat anti-rabbit IgG [20]. The cells were then washed three times in PBS,
53 and the parasite associated fluorescence was excited at 488 nm and quantified on a flow
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

cytometer (FACSCalibur, BD Bioscience, USA) equipped with a 15 mW argon laser emitting at 488 nm. Non-treated cells and those treated with the secondary antibody alone were run in parallel as controls. Each experimental population was then mapped by using a two-parameter histogram of forward-angle light scatter versus side scatter. The mapped population ($n=10\,000$) was then analyzed for log green fluorescence by using a single parameter histogram.

Multiplication inhibition assay

The effects of MDL28170 on *L. braziliensis* promastigotes were assessed by a method similar to that described previously [7,21]. Briefly, promastigotes were counted using a Neubauer chamber and re-suspended in fresh medium to a final concentration of 1.0×10^6 viable promastigotes/mL. The inhibitor compound was added to the culture at final concentrations of 1.25, 2.5, 5, 10 and 20 μM (starting from a 500 mM solution in DMSO that was serially diluted in the culture medium). Dilutions of DMSO corresponding to those used to prepare the drug solutions were assessed in parallel. After 24, 48, 72 and 96 h incubation at 26 °C, the number of viable motile promastigotes was quantified by counting the flagellates in a Neubauer chamber. Alternatively, parasites grown for 48 h in the absence or presence of the calpain inhibitor were washed three times in PBS prior to re-suspension in a drug-free fresh medium and allowed to grow for another 96 h to evaluate the leishmanicidal or leishmanistatic effect. The number of live motile promastigotes was evaluated under optical microscopy at 24 h intervals. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}), i.e. the drug concentration that caused a 50% reduction in survival in comparison with that in identical cultures without the compound, was calculated daily.

Interaction between murine macrophages and L. braziliensis

Peritoneal macrophages were extracted from BALB/c mice and maintained in coverslips (3×10^5 cells) with RPMI 1640 medium in a 4% CO_2 atmosphere at 37 °C for 24 h, gently washed three times with PBS to remove non-adhered cells and used in the interaction assay as follows. The parasites from stationary phase of growth were harvested by centrifugation, washed twice with PBS, and then washed once with RPMI 1640 medium. The parasites were pre-incubated for 1 h in Schneider's insect medium in the absence or presence of the inhibitor compound at final concentrations of one-half $\text{IC}_{50}/48\text{h}$, $\text{IC}_{50}/48\text{h}$ and at two times $\text{IC}_{50}/48\text{h}$ doses. DMSO (at the higher concentration used as a drug diluent) was assessed in parallel. The promastigotes were then allowed to interact with the macrophages for 1 h at a ratio of 10:1 parasite to macrophage. Thereafter, unbound parasites were removed by abundant washing with PBS, and the coverslips were fixed and stained with Panotico. Then,

1 the coverslips were observed by optical microscopy. The percentage of infected macrophages
2 was determined by randomly counting at least 200 cells in each of triplicate cover slips.
3 Experiments were repeated three times. The association index was obtained by multiplying the
4 percentage of infected macrophages by the number of amastigotes per infected macrophage.
5 Experiments were carried out in accordance with protocols approved by the Institutional
6 Animal Care and Use Committee at FIOCRUZ (CEUA LW 16/13).
7
8
9

10 11 12 *Effects of the calpain inhibitor on peptidase levels*

13 Promastigotes (1.0×10^6 cells) of *L. braziliensis* were incubated with MDL28170 at the
14 $IC_{50}/48h$ concentration for 48 h at 26 °C. Thereafter, cells were fixed and processed for flow
15 cytometry analysis, as described before, in order to detect the well-known *L. braziliensis*
16 peptidases: cpb, gp63, as well as the focus of this study - calpain molecules. The parasites were
17 incubated at room temperature for 1 h with a 1:250 dilution of the anti-tritryp-calpain, 1:500
18 of anti-cpb (kindly provided by Dr Mary Wilson – Department of Internal Medicine,
19 Biochemistry, Microbiology and Epidemiology, Program in Molecular Biology, University of
20 Iowa, USA) and 1:1000 of anti-gp63 (kindly provided by Dr Peter Overath – Max-Planck-Institut
21 für Biologie, Abteilung Membranbiochemie, Germany). Thereafter, the parasites were
22 incubated for an additional hour with the secondary antibody and analyzed in a flow
23 cytometer.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 35 *Transmission electron microscopy analysis*

36 Briefly, promastigotes from the *L. braziliensis* recently isolated from hamster lesions
37 (1.0×10^6 cells/ml) were treated or not (control condition) with final concentration of one-half
38 $IC_{50}/48h$ of MDL28170 in Schneider's insect medium at 26 °C. Afterwards, the parasites were
39 fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.2) at room temperature for
40 40 min at 25 °C and post-fixed with a solution of 1% OsO₄, 0.8% potassium ferricyanide and 2.5
41 mM CaCl₂ in the same buffer for 20 min at 25°C [26]. The cells were dehydrated in an
42 ascending acetone series and embedded in PolyBed 812 resin. Ultrathin sections were stained
43 with uranyl acetate and lead citrate and examined in Jeol JEM1011 transmission electron
44 microscope.
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 55 *Statistical analysis*

56 All experiments were repeated at least three times and performed in triplicate. The
57 results shown represent the media and standard deviation of the mean or representative
58 images of the experiments. The data were analyzed statistically by Student's *t* test using
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

GraphPad Prism Version 5.00 software. *P* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

Results and discussion

Over the past few years some studies have described the presence of calpain related proteins in trypanosomatids of medical importance. At first, a classical study employing whole genome analyses showed the presence of a large and diverse family of calpains in *T. brucei*, *L. major* and *T. cruzi* [15]. Our research group provided the first evidence on the effects of the calpain inhibitor, MDL28170, against the etiological agents of Chagas disease, leishmaniasis and also in classically non-pathogenic trypanosomatid [7,20-22,27]. In the present study, we demonstrated the recognition of calpains in *L. braziliensis* by a polyclonal antibody designed against a conserved region of trypanosomatids calpain (Fig. 1). The anti-tritryp-calpain antibody was capable of recognizing molecules in the intracellular milieu of promastigotes that were recently isolated from hamster lesions, and also in a cultured-adapted strain. The low increase in the fluorescence in non-permeabilized parasites in comparison to the control is compatible with an intracellular localization, which is in accordance to the cytosolic cellular localization of classical calpains [14]. Also in *T. brucei*, a calpain-like protein named CAP5.5 was detected distributed across the subpellicular microtubule corset of the parasite [28]. More recently, Liu *et al.* [29] presented a comprehensive analysis of the expression patterns and subcellular localization of selected calpains in *T. brucei* and these peptidases were detected in the flagellum and also in the cell body, especially in the cell periphery. Additionally, our research group demonstrated in *T. cruzi* by ultrastructural immunolabelling using a cross-reacting antibody, produced from a *Drosophila melanogaster* calpain, that *T. cruzi* calpains are mainly cytosolic with scarce labeling in the parasite membrane [22].

It has been extensively described that virulence factors decrease its expression after long time cultivation *in vitro* [30, 31]. In this sense, we compared calpain abundance by flow cytometry between parasites that were recently isolated from hamster lesions and a culture-adapted strain. Surprisingly, no statically significant difference in the mean of fluorescence intensity was detected (Fig. 1). In *T. cruzi*, calpain molecules are up-regulated in parasites recently isolated from mice in comparison to a culture adapted strain [20]. Although tempting, a direct relationship between increased expression and parasite virulence cannot be established. On the other hand, its unaltered expression is not a robust data to discard its role in parasite pathogenesis.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Once the calpain family has an important therapeutic potential and a huge effort has been made in the field of research to develop means of identifying selective calpain inhibitors [16], available calpain inhibitors already developed, tested and approved in clinical trials can be an interesting “me-too” approach for the treatment of neglected diseases, like Chagas disease and leishmaniasis. It has been debated by the scientific community that the challenges for the introduction of new compounds to treat neglected diseases are more economic than biological [19]. In this sense, we evaluated the effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the growth rate of *L. braziliensis* promastigotes. MDL28170 was added to an axenic culture of *L. braziliensis* promastigote forms in concentrations ranging from 1.25 μ M to 20 μ M, and the cellular growth was compared daily to the control without treatment through 96 h. In parallel, DMSO, the drug dilutor, was added to an alternative control and no effect on the parasite growth behavior was observed. Our results showed that MDL28170 arrested the growth in a dose-dependent manner (Fig. 2A). The IC_{50} from each day was calculated and compared between recently isolated and culture-adapted strains (Table 1). The $IC_{50}/48$ h was chosen for further investigations, since the parasites were in the beginning of the logarithmic growth phase (Fig. 2A). The antileishmanial activity was reversible, since protozoa treated for 48 h with the calpain inhibitor at $IC_{50}/48$ h and two times the $IC_{50}/48$ h values resumed growth when cultured in a drug-free fresh medium (Fig. 2B). No significant difference was observed in the growth inhibition between recently isolated and culture-adapted strains (Table 1). It is also interestingly to note that the parasites treated with MDL28170 at both concentrations presented a longer lag phase than control cells, lasting up to 48 h (Fig. 2B). The growth rate was comparable to control cells only from 48 to 72 h, while cells treated with two times the $IC_{50}/48$ h clearly entered in a stationary phase after 72 h (Fig. 2B). Similar to parasites cultivated in the presence of the drug, such effect was also detected in concentrations as low as 2.5 μ M (Fig. 2A). These results strongly suggest that the inhibitor interferes in the parasite growth, promoting a shift in the typical growth curve of the parasite. This is consistent with calpain participation in the regulation of cell cycle and growth [32].

After we analyzed the effect of the calpain inhibitor MDL28170 on the promastigote growth, we prompted to investigate whether the calpain inhibitor might have any effect on the interaction between *L. braziliensis* and mouse peritoneal macrophages. For this purpose, we performed experiments in which the promastigote forms of the parasite were treated for 1 h, before the interaction, with MDL28170 at concentrations of one-half the $IC_{50}/48$ h, the $IC_{50}/48$ h and twice the $IC_{50}/48$ h. Under this experimental condition, the parasites maintained their viability, as judged by their morphology and motility, in which >95% of the parasites were viable (data not shown). The compound presented a significant dose-dependent inhibition

1 profile, where the inhibition increased as MDL28170 concentration rose. DMSO at a dose
2 equivalent to the highest concentration used to dissolve the drug did not promote any
3 significant effect (Fig. 3A). Similar results were observed in *T. cruzi*, the pre-treatment of
4 trypomastigotes with MDL28170 in concentrations ranging from 6.25 to 50 μ M showed a clear
5 dose-dependent inhibition profile on the interaction assays with macrophages [21]. Curiously,
6 while the association index decreased, the number of adhered promastigotes to the
7 macrophages increased in a dose-dependent manner (Fig. 3B). These data suggest that the
8 calpain inhibitor could be acting in the parasite invasion of the mammalian cell by inhibiting
9 early steps of the parasite infection, since the promastigotes were capable of adhering but not
10 entry into the macrophages. Nevertheless, although MDL28170 is a relatively specific calpain
11 inhibitor, it cannot be ruled out that it may act on other *L. braziliensis* cysteine peptidases to a
12 lesser level. Notwithstanding, the host cell used in this experiment is a professional phagocyte,
13 therefore it is a puzzle that somehow the parasite phagocytosis was hampered by the pre-
14 treatment with MDL28170.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25 The effects of calpain inhibitors on trypanosomatids raise the interesting possibility of
26 using these inhibitors to better understand the calpain functions in these parasites [8]. In this
27 context, further studies assessing the effects of calpain inhibitors on the overall protein
28 expression of treated parasites might help to shed some light on calpain function in
29 trypanosomatids. Here, we assayed by flow cytometry the effect of MDL28170 on the
30 expression partner of some peptidases like calpains, and two well-characterized *Leishmania*
31 molecules, cpb and gp63, which are well described virulence factors in several *Leishmania*
32 species [33, 34]. No significant effect was observed in calpains and cpb expression when the
33 parasites were treated for 48 h with MDL28170 at concentrations of one-half the $IC_{50}/48h$, the
34 $IC_{50}/48h$ and twice the $IC_{50}/48h$. However, gp63 levels increased in parasites treated with twice
35 the $IC_{50}/48h$ (Fig. 4). We envisage two possible explanation for the increased levels of gp63-like
36 molecules: MDL28170 could be directly affecting the calpains functions, and as a physiological
37 form of compensation, other parasite peptidases are overexpressed [35]; or the calpain
38 inhibition could be producing other non-specific effects on treated promastigotes, leading to
39 changes in the gene expression of the parasite in order to compensate the inhibited one. A
40 similar compensatory mechanism was reported in *L. amazonensis*, in which both gp63 and cpb
41 were up-regulated after treatment with aspartic peptidase inhibitors nelfinavir, amprenavir
42 and lopinavir [36]. In *T. cruzi*, MDL28170 treatment led to a reduction in the contents of
43 calpains, which was paralleled by an increased expression of main virulent peptidase of *T.*
44 *cruzi*, the cruzipain [20].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Given that the calpain inhibitor can reduce the growth of *L. braziliensis* promastigotes, interfere in the parasite invasion of mouse peritoneal macrophages and in the levels of gp63 protein, we investigated the ultrastructural effects of MDL28170 in the promastigote forms by transmission electron microscopy. For this purpose, the morphology of non-treated cells (Fig. 5A) was compared with the ultrastructure of parasites treated for 48 h with one-half IC₅₀ of MDL28170 (Fig. 5B-F). The inhibitor led to the appearance of concentric membrane structures diffused in the cytoplasm (Fig. 5B) and of the multivesicular bodies (Fig. 5B-D). Another organelle affected by the treatment was the Golgi, that presented network disruption in Trans region (Fig. 5B). In detail, a concentric distribution of the Golgi cisternae, surrounding portions of cytoplasm (Fig. 5B, inset). The calpain inhibitor also induced a frequent formation of blebbing in the plasma and flagellar membrane (Fig. 5E,F).

In a previous study, our research group demonstrated that *L. amazonensis* promastigotes treated at concentrations of the IC₅₀ and two times the IC₅₀ of MDL28170 resulted in altered chromatin condensation pattern with apparent loss of nuclear integrity, vacuolization of the cytoplasm, and disorganization of the endocytic pathway, once a reduced electron density as well as an accumulation of small vesicles were observed [9]. These effects were reported as suggestive of an apoptosis-like cell death process, as described elsewhere in trypanosomatids treated with other drugs [37], which was confirmed by biochemical assays [Marinho et al. 2014]. In this report, the accumulation of small vesicles and the formation of concentric membrane structures diffused in the cytoplasm are suggestive of autophagic process induced by MDL28170 in *L. braziliensis*. Briefly, autophagy comprises a physiological self-degradative pathway crucial to maintain the metabolic balance and the recycling of cellular structures during normal cell growth, and its deregulation leads to death [38,39]. Although poorly understood in trypanosomatids, there is no doubt that the autophagic machinery decisively influences the pathogenesis and virulence of protozoan infections; this machinery may therefore represent a promising target for drug discovery [40]. Further studies are necessary to better understand the molecular mechanisms implicated in the MDL28170 effects observed in *L. braziliensis*. It is conceivable that both death mechanisms may occur, for instance, when *L. amazonensis* was treated with the aspartic peptidase inhibitors, ultrastructural alterations compatible with autophagy and apoptosis were observed [36].

Conclusions

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

In this study we demonstrated the effects of the calpain inhibitor MDL28170 on *L. braziliensis* growth, ultrastructure, interaction with peritoneal macrophages and peptidases expression. These results added new insights into the study of calpain inhibition as an attractive anti-trypanosomatid approach irrespective of whether these proteins are proteolytically active or not. Since the upregulation of several members of the calpain family is involved in a diverse range of biological processes and human diseases, massive efforts have been made in the development of a mean to identify selective calpain inhibitors [16]. Therefore, further studies in trypanosomatid calpains may employ existing drugs developed for human calpains inhibition, since extreme biochemical selectivity may not be necessary for anti-protozoan drugs because of the inherent biologic selectivity in the function and location of protozoan peptidases [8]. Moreover, although more studies are necessary for better understanding the functional role of calpain in *L. braziliensis*, our work adds more data about the possible functions of trypanosomatid calpains as playing an important role in some steps of the parasite life cycle.

Competing interests:

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

Acknowledgements:

This study was supported by grants from the Brazilian Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). André L.S. Santos, Marta H. Branquinha and Claudia M. d'Avila-Levy are supported by CNPq and FAPERJ fellowships. We are grateful to Msc. Luciana Costa and Dra. Léa Cysne Finkelstein for their excellent technical assistance.

Authors' contributions:

Conceived and designed the experiments: VEV, MHB, ALSS, CMdL. Performed the experiments: BSV, VEV, RFSMB, SAGS. Analyzed the data: BSV, VEV, RFSMB, SAGS, CMdL. Contributed reagents, materials and analysis tools: RFSMB, SAGS, MHB, ALSS, CMdL. Wrote the paper: BSV, VEV, RFSMB, MHB, ALSS, CMdL. All authors read and approved the final manuscript.

References:

- 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65
1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. WHO Leishmaniasis Control Team: Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*. 2012; 7(5): e35671.
2. Reveiz L, Maia-Elkhoury ANS, Nicholls RS, Romero GAS, Yadon ZE, et al. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. *Plos One*. 2013; 8: e61843.
3. Rangel EF & Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 (7): 937-54.
4. WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of Leishmaniasis. World Health Organization; Geneva: 2010.
5. Rodrigues JCF, Godinho JLP, de Souza W. Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure. In: Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM, Kneipp L, Sodré C, editors. *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma*. Springer; 2014. v. 74, p. 1-42.
6. Santos ALS, Sodré CL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Proteolytic inhibitors: implications on microorganisms development, virulence and pathogenesis. *Curr Med Chem*. 2013; 20(25): 3035-40.
7. d'Avila-Levy CM, Marinho FA, Santos LO, Martins JLM, Santos ALS, Branquinha MH. Antileishmanial activity of MDL28170, a potent calpain inhibitor. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 28: 138-142.
8. Branquinha MH, Marinho FA, Sangenito LS, Oliveira SSC, Gonçalves KC, Ennes-Vidal V, et al. Calpains: potential targets for alternative chemotherapeutic intervention against human pathogenic trypanosomatids. *Curr Med Chem*. 2013; 20(25): 3174-85.
9. Marinho FA, Gonçalves KC, Oliveira SSC, Gonçalves DS, Matteolli FP, Seabra SH, et al. The calpain inhibitor MDL28170 induces the expression of apoptotic markers in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Plos One*. 2014; 9(1): e87659.
10. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev*. 2003; 83: 731-801.
11. Campbell RL & Davies PL. Structure-function relationships in calpains. *Biochem J*. 2012; 447: 335-351.
12. Futai E, Maeda T, Sorimachi H, Kitamoto K, Ishiura S, Suzuki K. The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol Gen Genet*. 1999; 260: 559-568.

13. Correa GC, Margis-Pinheiro M, Margis R. Identification, classification and expression pattern analysis of sugarcane cysteine proteinases. *Genet Mol Biol.* 2001; 24: 275-283.
14. Sorimachi H, Hata S, Ono Y. Calpain chronicle-an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2011; 87(6): 287-327.
15. Ersfeld K, Barraclough H, Gull K. Evolutionary reflationary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *The J Mol Evolution.* 2005; 61: 742-757.
16. Donkor IO. An updated patent review of calpain inhibitors (2012 - 2014). *Expert Opin Ther Pat.* 2015; 25(1): 17-31.
17. Wang CH, Chen YJ, Lee TH, Chen YS, Jawan B, Hung KS, et al. Protective effect of MDL28170 against thioacetamide-induced acute liver failure in mice. *J Biomed Sci.* 2004; 11(5): 571-8.
18. Kawamura M, Nakajima W, Ishida A, Ohmura A, Miura S, Takada G. Calpain inhibitor MDL 28170 protects hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats by inhibition of both apoptosis and necrosis. *Brain Res.* 2005; 1037(1-2): 59-69.
19. Machado-Silva A, Guimarães PP, Tavares CA, Sinisterra RD. New perspectives for leishmaniasis chemotherapy over current anti-leishmanial drugs: a patent landscape. *Expert Opin Ther Pat.* 2015; 25(3): 247-60.
20. Sangenito LS, Ennes-Vidal V, Marinho FA, Da Mota FF, Santos ALS, et al. Arrested growth of *Trypanosoma cruzi* by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms. *Parasitology.* 2009; 136: 433-441.
21. Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of *Trypanosoma cruzi in vitro*. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 1395-8.
22. Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos AL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. MDL28170, a calpain inhibitor, affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to *Rhodnius prolixus* midgut. *PLoS One.* 2011; 6(4): e18371.
23. Salotra P, Duncan RC, Singh R, Subba Raju BV, Sreenivas G, Nakhasi HL. Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Microbes Infect.* 2006; 8(3): 637-44.
24. Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummel-Smith J, Ouellette M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics.* 2007; 6(1): 88-101.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
25. Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirdé P, Romanha AJ. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *J Proteome Res.* 2008; 7(6): 2357-67.
 26. Meirelles RMS & Soares MJ. Quick fixation of eukaryotic cell suspensions for routine transmission electron microscopy. *Acta Microscopica.* 2001; 10: 19-22.
 27. Pereira FM, Elias CGR, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos ALS. Cysteine peptidases in *Herpetomonas samuelpessoai* are modulated by temperature and dimethylsulfoxide triggered differentiation. *Parasitology.* 2009; 136: 45-54.
 28. Hertz-Fowler C, Ersfeld K, Gull K. CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 116: 25-34.
 29. Liu W, Apagyi K, Mcleavy L, Ersfeld K. Expression and cellular localisation of calpain-like proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2010; 169: 20-26.
 30. Lima AK, Elias CG, Souza JE, Santos AL, Dutra PM. Dissimilar peptidase production by avirulent and virulent promastigotes of *Leishmania braziliensis*: inference on the parasite proliferation and interaction with macrophages. *Parasitology.* 2009; 136(10): 1179-91.
 31. Moreira D, Santarém N, Loureiro I, Tavares J, Silva AM, Amorim AM, et al. Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(1): e1469.
 32. Croall DE & Ersfeld K. The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biol.* 2007; 8(6): 218.
 33. Caffrey CR, Lima AP, Steverding D. Cysteine peptidases of kinetoplastid parasites. *Adv Exp Med Biol.* 2011; 712: 84-99.
 34. Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect.* 2012; 14(15): 1377-89.
 35. Yong V, Schmitz V, Vannier-Santos MA, de Lima AP, Lalmanach G, Juliano L, et al. Altered expression of cruzipain and a cathepsin B-like target in a *Trypanosoma cruzi* cell line displaying resistance to synthetic inhibitors of cysteine-proteinases. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; 109(1): 47-59.
 36. Santos LO, Marinho FA, Altoé EF, Vitória BS, Alves CR, et al. HIV Aspartyl peptidase interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. *Plos One.* 2009, 4(3): e4918.
 37. Vannier-Santos MA, De Castro SL. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. *Curr Drug Targets.* 2009; 10: 246–260.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
38. Menna-Barreto RF, Corrêa JR, Cascabulho CM, Fernandes MC, Pinto AV, Soares MJ, et al. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 2009; 136(5): 499-510.
 39. Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdrón-López M, Colombo MI, et al. Autophagy in protists. *Autophagy*. 2011 ;7(2): 127-58.
 40. Duque TLA, Menna-Barreto RFS, de Andrade-Neto VV, Ennes-Vidal V, Souto XM. Autophagic balance between mammals and protozoa: a molecular, biochemical and morphological review of Apicomplexa and Trypanosomatidae Infections. INTECH Open Access Publisher, 2013.

18 **Figure Legends**

19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

Fig. 1. Binding of anti-calpain antibody (**anti-tritryp-calpain**) to *L. braziliensis* recently isolated or culture-adapted strain by flow cytometry analysis. 10^6 cells from parasites recently isolated from hamster lesions (**A**), or from parasites kept regularly in axenic culture (**B**) were fixed and permeabilized (**black fill**) or not (**grey fill**) and incubated in the absence (autofluorescence control) or in the presence of anti-tritryp-calpain antibody at 1:250 dilution and analyzed by flow cytometry. When treated only with the secondary-Alexa 488 antibody at 1:750 dilution (**black line**), cells generated similar curves to that observed in the autofluorescence of cells (data not shown). Representative data of the analysis of 10,000 cells from one of three experiments are shown.

36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig. 2. Effect of MDL28170 inhibitor on the growth rate of *L. braziliensis* promastigotes. (A) The growth pattern of the promastigotes was followed at 26 °C for 96 h in the absence (control) or in the presence of MDL28170 concentrations ranging from 1.25 μ M to 20 μ M. The inhibitor was added to the cultures at 0 h, and the actively motile cells were counted daily in a Neubauer chamber. DMSO, used as the drug diluent, did not interfere with growth behavior. The results shown are from parasites recently isolated from hamster lesions, similar results were also observed in parasites kept regularly in axenic culture (data not shown). Concentrations as low as 10 μ M significantly inhibited parasite growth from 24 h on in relation to the control (*P* values < 0.05). (B) Parasites grown for 48 h in the absence or presence of the calpain inhibitor ($IC_{50}/48h$ or twice $IC_{50}/48h$) were washed three times in cold PBS prior to re-suspension in a drug-free fresh medium and allowed to grow for another 96 h to evaluate whether the inhibitor was reversible or irreversible, as well as compare the growth pattern with the control. DMSO, used as the drug diluent, did not interfere with the growth behavior. The results shown are from parasites recently isolated from hamster lesions, similar results

1 were observed in parasites kept regularly in axenic culture (data not shown). Data shown are
2 the mean of three independent experiments performed in triplicate, the bars indicate the
3 standard deviation of the mean. (P values < 0.05).
4
5

6 **Fig. 3.** Effect of the pre-treatment of *L. braziliensis* recently isolated promastigotes with
7 MDL28170 during the process of interaction with mouse peritoneal macrophages.
8 Promastigotes of *L. braziliensis* were treated or not with MDL28170 in the concentration of
9 one-half $IC_{50}/48h$, $IC_{50}/48h$ and twice the $IC_{50}/48h$ for 1 h at 26 °C prior to macrophage-parasite
10 interaction, and thereafter washed three times in PBS. Parasites maintained their viability
11 under this experimental condition. Subsequently, macrophages adhered in coverslips were
12 infected for 1 h at 37 °C with pretreated or not promastigotes, the monolayers were then
13 washed with PBS to remove unbound parasites, fixed and stained with Panotic. The association
14 index **(A)**, as well as the percentage of macrophage cells containing at least one adhered
15 parasite/cell **(B)**, were determined by counting at least 200 cells randomly from each triplicate
16 coverslip by light microscopy. The results correspond to the mean of at least three
17 independent experiments performed in triplicate, the bars indicate standard deviation of the
18 mean. Promastigotes from parasites kept regularly in axenic culture were unable to produce a
19 notable infection, and therefore data were not compared with the recently isolated strain.
20 Asterisks denote statistic difference from control (P values < 0.05).
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **Fig. 4.** Effect of MDL28170 inhibitor on the expression pattern of the peptidases calpain, cpb
34 and gp63 in *L. braziliensis*. 10^6 cells from parasites recently isolated from hamster lesions were
35 fixed with paraformaldehyde and permeabilized with Triton X-100. Parasites were treated or
36 not (white bar) with MDL28170 inhibitor in the concentration of $IC_{50}/48h$ (**light grey bar**) and
37 twice the $IC_{50}/48h$ (**dark grey bar**). The cells were incubated in the absence of the primary
38 antibody (for autofluorescence control) or in the presence of **anti-tritryp-calpain** antibody at
39 1:250 dilution, **anti-cpb** antibody at 1:500 dilution and **anti-gp63** antibody diluted 1:1000.
40 Then, samples were analyzed by flow cytometry and the data presented in the graphs
41 represent the variation index of the mean of fluorescence intensity of the experimental
42 systems in comparison to the autofluorescence levels. The results shown represent the
43 analysis of 10,000 cell of in three independent experiments performed in biological duplicates.
44 Asterisks denote statistic difference between no treatment and MDL28170 treatment (P
45 <0.05).
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

57 **Fig. 5.** Ultrastructural effects of MDL28170 in *L. braziliensis* promastigotes. **(A)** Untreated
58 parasite presenting typical morphology. **(B-F)** Promastigotes treated with 3.5 μM calpain
59
60
61
62
63
64
65

1 inhibitor for 48h. **(B-D)** Treated promastigotes showed concentric membranar structures in the
2 cytosol (white arrows), multivesicular bodies (MB), as well as Golgi disruption (black star) and
3 concentric formation of this organelle (white star). **(E,F)** The treatment with the inhibitor also
4 induced the blebbing of plasma and flagellar membranes (black arrows). Kinetoplast (K);
5 mitochondrion (M); flagella (F); Golgi (G); endoplasmic reticulum (ER) and nucleus (N). Bars =
6
7
8
9 0.5 μm .

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table

Table 1. Comparison of MDL28170 IC₅₀ values calculated each day from recently isolated and culture-adapted strains of *L. braziliensis*.

Time (h)	Recently isolated strain (IC ₅₀)*	Culture-adapted strain (IC ₅₀)*
24	6.8 ± 0.6 μM	6.7 ± 0.6 μM
48	6.6 ± 0.4 μM	6.4 ± 0.3 μM
72	5.9 ± 0.3 μM	7.1 ± 0.3 μM
96	4.8 ± 0.4 μM	5.6 ± 0.4 μM

* No significant statistic difference between strains (*P* values < 0.05).

Vitório BS et al.

Table

Table 1. Comparison of MDL28170 IC₅₀ values calculated each day from recently isolated and culture-adapted strains of *L. braziliensis*.

Time (h)	Recently isolated strain (IC₅₀)*	Culture-adapted strain (IC₅₀)*
24	6.8 ± 0.6 µM	6.7 ± 0.6 µM
48	6.6 ± 0.4 µM	6.4 ± 0.3 µM
72	5.9 ± 0.3 µM	7.1 ± 0.3 µM
96	4.8 ± 0.4 µM	5.6 ± 0.4 µM

* No significant statistic difference between strains (*P* values < 0.05).

Fig 1

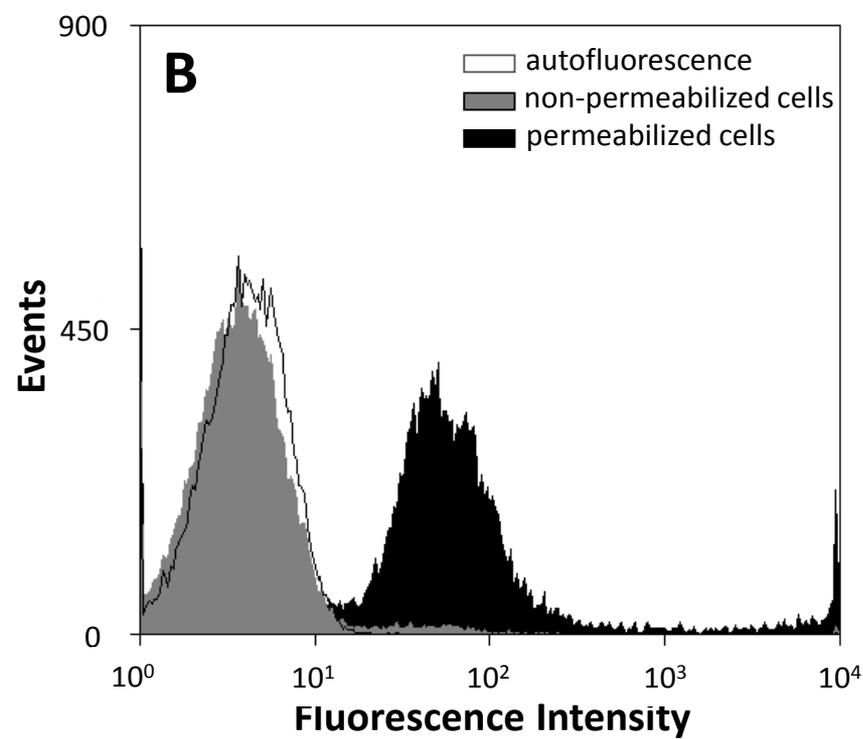
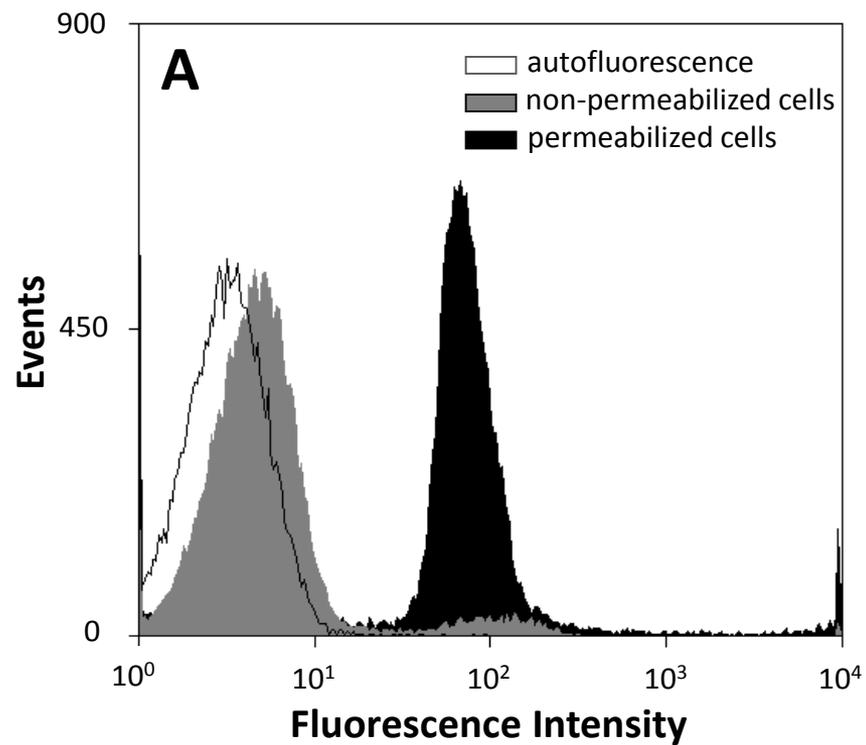


Fig 2

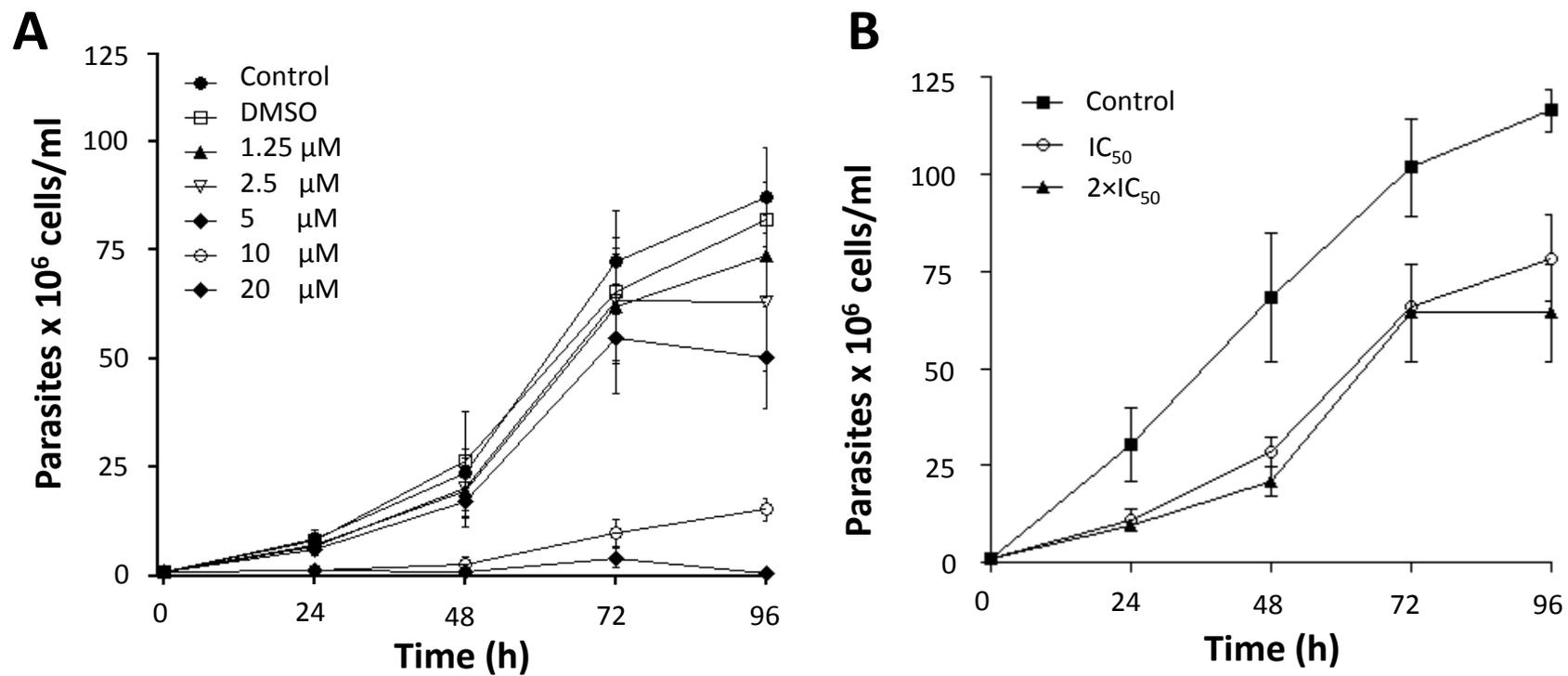
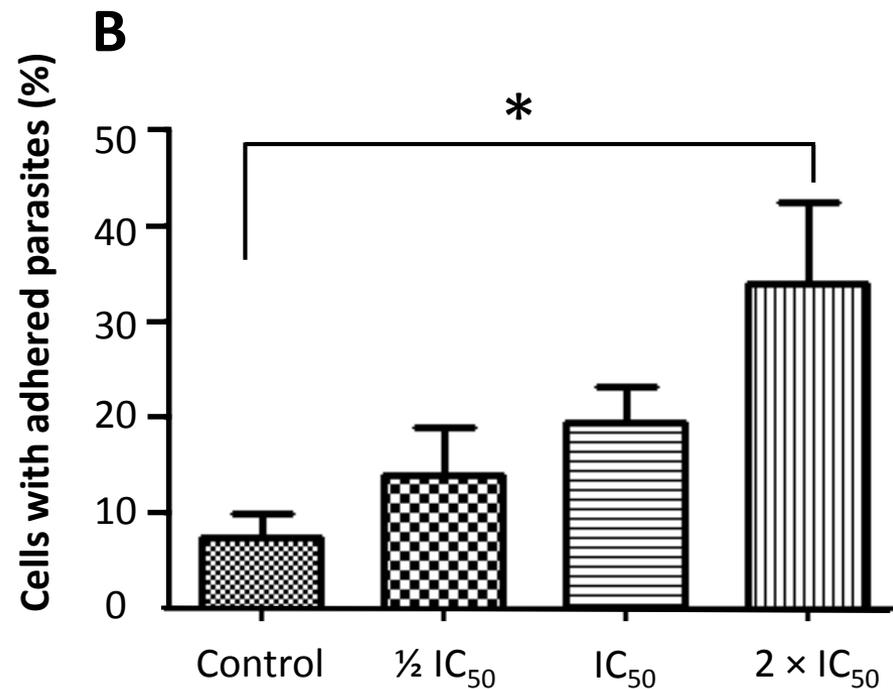
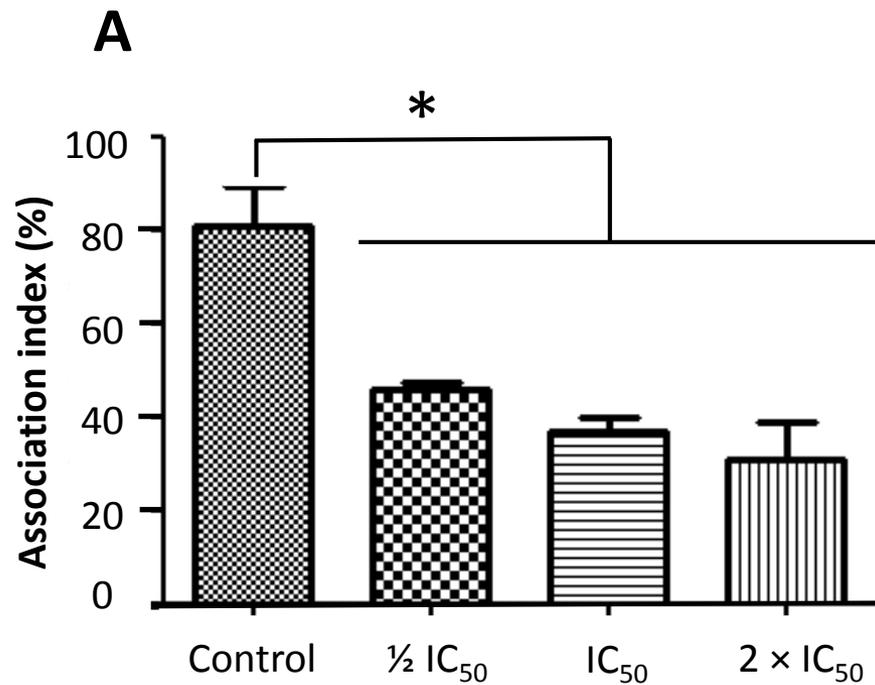
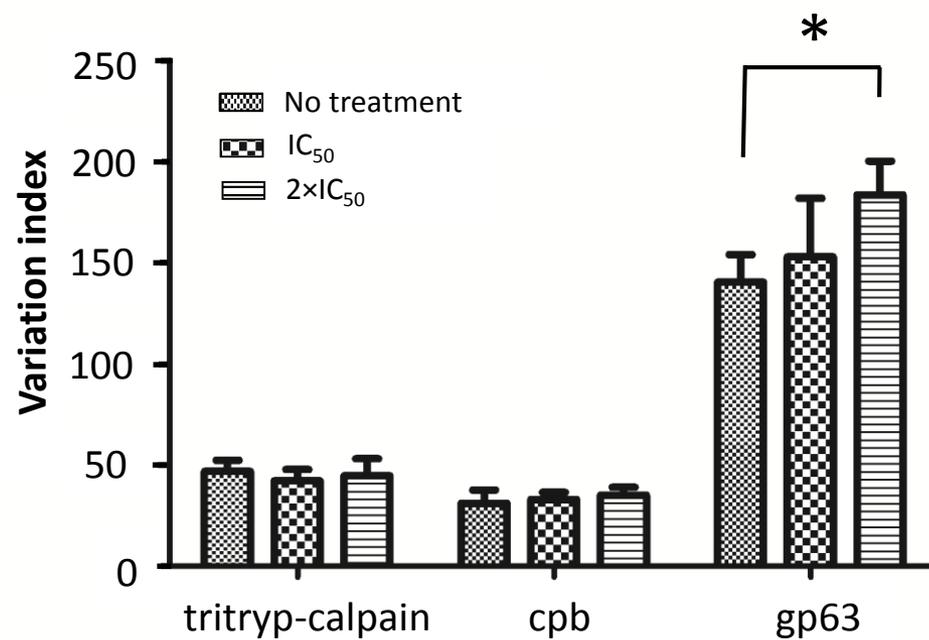


Fig 3

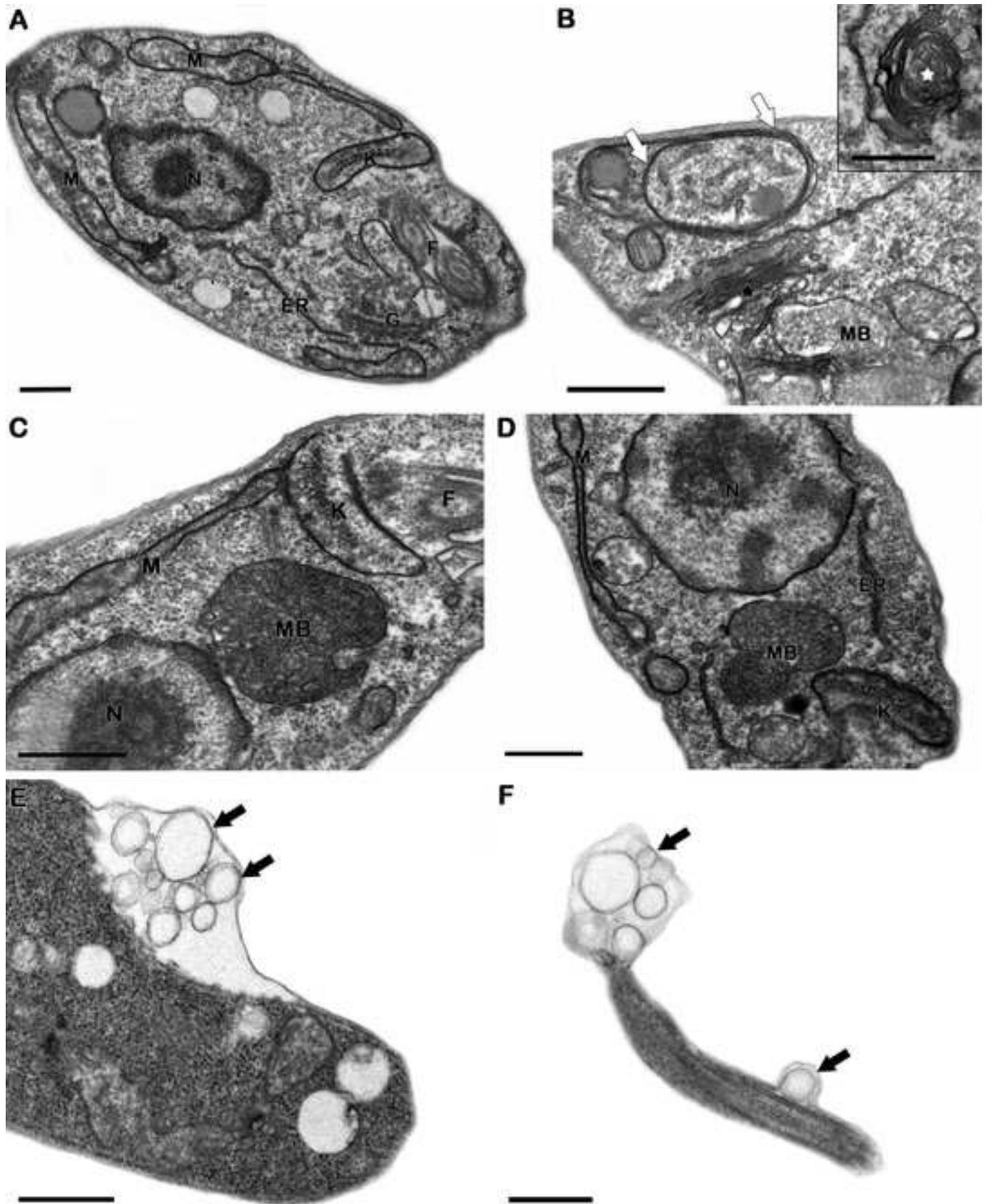


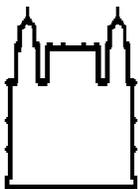
* P<0.05

Fig 4



* P<0.005





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia

Dear Editors,

All authors of this manuscript declare that we have seen and approved the submitted version of this manuscript.

Yours faithfully,

Claudia Masini d'Avila-Levy

List of Co-author names:

Date:

Signature:

1. Bianca da Silva Vitória

26/11/2015

2. Vítor Ennes Vidal

26/11/2015

3. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto

26/11/2015

4. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

26/11/2015

5. Marta Helena Branquinha de Sá

26/11/2015

6. André Luis Souza dos Santos

26/11/2015

7. Claudia Masini d'Avila-Levy

26/11/2015

Parasites & Vectors

Why calpain inhibitors are interesting leading compounds to treat leishmaniasis?

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:									
Full Title:	Why calpain inhibitors are interesting leading compounds to treat leishmaniasis?								
Article Type:	Review								
Section/Category:	Protozoan Biology and Disease								
Funding Information:	<table border="1"> <tr> <td>Fundação Oswaldo Cruz</td> <td>Dr. Claudia M. d'Avila-Levy</td> </tr> <tr> <td>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico</td> <td>Dr. Claudia M. d'Avila-Levy</td> </tr> <tr> <td>Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior</td> <td>Dr. Claudia M. d'Avila-Levy</td> </tr> <tr> <td>Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro</td> <td>Dr. Claudia M. d'Avila-Levy</td> </tr> </table>	Fundação Oswaldo Cruz	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy	Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy
Fundação Oswaldo Cruz	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy								
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy								
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy								
Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro	Dr. Claudia M. d'Avila-Levy								
Abstract:	<p>Background: Leishmaniasis is one of the most neglected diseases in terms of drug development. Current drugs are highly toxic, resistance is a relevant emerging issue and compliance of patients to treatment is low due to the time-consuming treatment. Therefore, the development of new drugs is an urgent need, and among the available options, the "me-too" or repurpose are interesting approaches for neglected diseases. Areas covered: This opinion article will briefly highlight the feasible use of a family of neutral calcium-dependent cysteine peptidases (designated as calpains) as a potential target to develop novel chemotherapeutic drugs against leishmaniasis. Calpains are extensively studied in mammalian cells, and are also found in almost all organisms analyzed. Once deregulated, these enzymes are associated with several diseases that promoted tremendous advances in the development of potent and selective inhibitors. The calpain family is highly expanded in trypanosomatids genome, and has been abundantly detected in proteomics assays, with a differential expression related to drug resistance and virulence in Leishmania. In addition, synthetic calpains inhibitors have been proven in vitro efficacy against Leishmania amazonensis. Neglected diseases pose an additional economic challenge to the difficulties in discovering, testing and approval of a new drug. Therefore, a "me too" or repurpose approaches with calpain inhibitors may be an interesting shortcut to drug development. The repurposing of drugs has some milestone success, which will be presented for a parallel discussion. Expert Opinion: Massive efforts have been made in the field of research to validate calpain inhibitors by preclinical assays to treat diseases like cancer, ocular disorders, neurological disorders, tibial muscular dystrophy, protection against age-related lesions and sickle-cell. Taking into account the difficulties to develop and approve new drugs for neglected diseases, mainly hampered by economic disinterest of pharmaceutical industry, "me-too" or repurposing approaches with available calpain inhibitors already developed, tested and approved in clinical trials can be an alternative for the treatment of leishmaniasis. Particularly because calpains are critical for the complex life cycle of the parasites and their inhibitors present potent anti-leishmanial activity.</p>								
Corresponding Author:	Claudia M. d'Avila-Levy, Pd.D Fundacao Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, RJ BRAZIL								
Corresponding Author Secondary Information:									
Corresponding Author's Institution:	Fundacao Oswaldo Cruz								
Corresponding Author's Secondary Institution:									
First Author:	Vitor Ennes-Vidal								
First Author Secondary Information:									
Order of Authors:	Vitor Ennes-Vidal								

	Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto
	Marta Helena Branquinha
	André Luis Souza Santos
	Claudia M. d'Avila-Levy, Pd.D
Order of Authors Secondary Information:	

[Click here to view linked References](#)

Why calpain inhibitors are interesting leading compounds to treat leishmaniasis?

Vítor Ennes-Vidal¹; Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto²; Marta Helena Branquinha³;
André Luis Souza dos Santos³ and Claudia Masini d'Avila-Levy^{1,*}

¹Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratório de Investigação de Peptidases, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author: Av. Brasil, 4365. Pavilhão Arthur Neiva, sala 14. Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil. CEP 21040-360, Tel: (+55) 21 2562 1014. E-mail: davila.levy@gmail.com

E-mail addresses:

Vítor Ennes Vidal: vidal@ioc.fiocruz.br

Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto: rubemb@ioc.fiocruz.br

Marta Helena Branquinha: mbranquinha@micro.ufrj.br

André Luis Souza dos Santos: andre@micro.ufrj.br

Claudia Masini d'Avila Levy: davila.levy@ioc.fiocruz.br

Abstract:

Background: Leishmaniasis is one of the most neglected diseases in terms of drug development. Current drugs are highly toxic, resistance is a relevant emerging issue and compliance of patients to treatment is low due to the time-consuming treatment. Therefore, the development of new drugs is an urgent need, and among the available options, the “me-too” or repurpose are interesting approaches for neglected diseases.

Areas covered: This opinion article will briefly highlight the feasible use of a family of neutral calcium-dependent cysteine peptidases (designated as calpains) as a potential target to develop novel chemotherapeutic drugs against leishmaniasis. Calpains are extensively studied in mammalian cells, and are also found in almost all organisms analyzed. Once deregulated, these enzymes are associated with several diseases that promoted tremendous advances in the development of potent and selective inhibitors. The calpain family is highly expanded in trypanosomatids genome, and has been abundantly detected in proteomics assays, with a differential expression related to drug resistance and virulence in *Leishmania*. In addition, synthetic calpains inhibitors have been proven *in vitro* efficacy against *Leishmania*

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

amazonensis. Neglected diseases pose an additional economic challenge to the difficulties in discovering, testing and approval of a new drug. Therefore, a “me too” or repurpose approaches with calpain inhibitors may be an interesting shortcut to drug development. The repurposing of drugs has some milestone success, which will be presented for a parallel discussion.

Expert Opinion: Massive efforts have been made in the field of research to validate calpain inhibitors by preclinical assays to treat diseases like cancer, ocular disorders, neurological disorders, tibial muscular dystrophy, protection against age-related lesions and sickle-cell. Taking into account the difficulties to develop and approve new drugs for neglected diseases, mainly hampered by economic disinterest of pharmaceutical industry, “me-too” or repurposing approaches with available calpain inhibitors already developed, tested and approved in clinical trials can be an alternative for the treatment of leishmaniasis. Particularly because calpains are critical for the complex life cycle of the parasites and their inhibitors present potent anti-leishmanial activity.

Keywords: calpain inhibitors, leishmaniasis, “me too” approach, repurpose approach, MDL28170.

1. Introduction

The Trypanosomatidae family belongs to the Kinetoplastea class that is composed of a large group of exclusively parasitic protozoa, some of which adapted to parasitize and cause important diseases in humans [1]. Altogether, about 37 million people worldwide are infected with *Trypanosoma brucei*, the etiological agent of African sleeping sickness; *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease or American trypanosomiasis; and different species of the genus *Leishmania*, which are responsible for a wide spectrum of clinical manifestations known as cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis [2]. Once these diseases have strong and complex links with poverty they are classified as Neglected Tropical Disease by the World Health Organization (WHO). Other factors like malnutrition, weak immunity, illiteracy, lack of resources and environmental changes, as well as the migration of non-immune people to endemic areas, play important roles in the dynamic of these diseases [2-5].

All the clinical manifestations collectively known as leishmaniasis comprise one of the most prevalent neglected diseases worldwide with more than 2 million new cases occurring annually and endangering around 350 million people in 98 countries in the tropics, sub-tropics and European Mediterranean area [2]. Visceral leishmaniasis, also known as *kala-azar*, is the most severe one, and can be fatal if untreated. This clinical manifestation affects the vital organs of the body and is characterized by irregular bouts of fever, weight loss, anemia, and swelling of the spleen and liver. If not fully healed, visceral leishmaniasis can progress to post-kalazar dermal leishmaniasis, which is characterized by a hypopigmented macular, maculopapular and nodular rash. Cutaneous leishmaniasis, the most common form of the disease, causes ulcers on exposed skin areas of the body, leading to disfigurement, permanent scars, social stigma and in some cases disability. However, this is usually a self-healing illness. Finally, mucocutaneous leishmaniasis consists of the most destructive form of the disease, since it causes partial or total mutilation of mucous membranes in the nose, mouth and throat. In almost all cases, it may cause serious deformities [6, 7].

Despite the great advances in combating infectious diseases over the past century, current therapy to treating neglected diseases like leishmaniasis is limited to a handful of drugs that suffer from unacceptable toxicity, high costs, difficulties of administration and increasing treatment failures, since resistance to these compounds has become a severe problem [4, 8, 9]. In view of this scenario, the development of new drugs is an urgent need, which has led to

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

the assay of several compounds chosen empirically, or through studies that identify metabolic targets in the parasite and the rational drug design and selection [10].

The success rate in the discovery of a novel drug with innovative chemical and biological profiles of activity is very low. In fact, even chemical entities within the same structural class of an approved one, a “me-too” drug, are becoming rare nowadays. Among 1,035 drugs approved by FDA during 1989 to 2000, only 361 or 35% contained new active molecules [11]. Of these, only fewer than a half were granted priority review status by FDA, indicating that the rest were not significantly relevant to therapy and the delay in their approvals would not affect medical care. Opinions differ about the development of "me-too" drugs, since such drugs are developed after patents on top-selling original drugs run out and many are not truly new medicines. Nevertheless, the regulatory agencies are not obliged to consider better efficacy over existing drugs as a criterion for approval; rather, they require only the establishment of efficacy and safety of the new drug over a placebo [11]. Another approach should be the repurpose of an existing drug to treat another disease [12].

Taking into consideration this last possibility, a family of neutral calcium-dependent cysteine peptidases, the calpains, calls attention because a huge effort has been made in the field of research to develop a means of identifying selective inhibitors [13]. These enzymes are involved in a variety of calcium-regulated cellular processes, such as signal transduction, cytoskeleton remodeling, cellular proliferation and differentiation, sex determination, membrane fusion, environmental regulated processes and apoptosis. Besides their normal physiological roles, calpains unregulated activity in humans seems to be increased during normal aging and in muscular dystrophy, neurological disorders like Alzheimer’s, Huntington’s and Parkinson’s diseases and multiple sclerosis, cataract, arthritis, cancer, strokes, diabetes and in acute traumas including traumatic brain and spinal cord injury and cerebral and cardiac ischemia [14-17]. It has been advocated that the specific inhibition of calpains under these condition can treat these pathologies. Therefore, a broad range of calpain inhibitors are under development and the potential clinical utility of these inhibitors has been shown to treat some of these pathologies [6, 18]. Over the past few years, some studies have described the presence of calpain-related proteins in almost all eukaryotes analyzed [19], including a large and diverse gene family in *Leishmania* spp. [20]. The investigation of changes in leishmanial gene expression between drug resistant/sensitive strains and in the upregulation of virulence-related genes in infective forms has highlighted the importance of calpains as well as its participation in crucial pathogenic events for the parasite [21]. In addition, synthetic inhibitors of calpains have been proven *in vitro* efficacy against trypanosomatids [22-26]. In this context, considering the difficulties to develop and approve a new drug to treat neglected diseases

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

[27], a “me-too” or repurpose approaches with approved calpain inhibitors could be an interesting alternative for the treatment of leishmaniasis.

2. Examples of “me too” or repurpose drugs

Historically, many "me-too" drugs have proved to be considerably better than their original counterparts in some aspect. A “me-too” drug can be an interesting approach, the case of the oral hypoglycemic drug troglitazone is a good example. At first, this compound was approved as an anti-diabetic drug in 1997, and some years later it was withdrawn from the market following reports of unacceptable hepato-toxicity. The follow-up "me-too" drugs, rosiglitazone and pioglitazone, are much less toxic and are today widely used. If these drugs were not developed, the withdrawal of troglitazone would have left a major therapeutic gap in anti-diabetic therapy [28].

An interesting example of a blockbuster success of repurpose drug is the Pfizer’s Viagra (Sildenafil), which blocks the enzyme cyclic guanosine monophosphate–specific phosphodiesterase type 5, and is used to combat erectile dysfunction. Initially, the drug was developed for heart disease treatment, but the observation that penile erections were a common side effect in phase I trials led to pilot studies with sildenafil in male erectile dysfunction [29]. In 1998, soon after the introduction of Viagra to the US market, more than one million patients had received prescriptions for sildenafil [30]. Nowadays, the same compound have been postulated to be an alternative to treat pulmonary vascular diseases, demonstrating the chemotherapeutic potential of a drug first designed to a specific disease to treat others.

In *Leishmania*, there is already an example of a repurpose drug. Miltefosine was initially described with antiprotozoal and antineoplastic activities coincidentally and simultaneous by independent groups [31]. Despite the excellent activity profile of miltefosine against trypanosomatid parasites, due to economic interest, priority was given to the development of the compound as a local treatment for cutaneous metastases of breast cancer, which led to the approval of a topical formulation (Miltexw, Baxter, UK) [32]. However, the application of this compound in an oral formulation in the treatment of different tumors was discontinued due to dose-limiting gastrointestinal side effects in Phase II studies. Therefore, since miltefosine already presented high bioavailability in previous pre-clinical studies and there is a clear need for an easy-to-administer oral treatment for *Leishmaniasis*, clinical studies of an oral formulation for the treatment of human visceral leishmaniasis were conducted in India with very promising results. Eventually, successful Phase II and III trials

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

outcomes in India led to the approval of the compound in 2002 as the first and still the only oral drug for the treatment of visceral leishmaniasis [33]. Taking all therapies for leishmaniasis into consideration, this compound is not the cheapest option available, but used in combination with others drugs it can be the most cost-effective. Additionally, as the only oral drug available, miltefosine is sometimes logistically the only viable option for the treatment of patients [31]. Unfortunately, there is an increased emergency of drug resistance in the field, and consequently the future of miltefosine is probably confined to its use in combination with other agents to treat leishmaniasis.

3. Promising calpain inhibitor compounds

Since the discovery of calpain in the mid-1960s [34, 35], several research groups have sought methods to inhibit its activity. Early attempts used calcium chelators, but as knowledge of calpain substrate specificity increased, and inhibitors from natural products screening programs became available, more selective inhibitors have been designed and synthesized. Most small-molecule calpain inhibitors reported are modified peptides containing reactive functional groups that interact with the cysteine thiol in the active site of the enzyme. Unfortunately, they lack selectivity for calpain, and are capable of inhibiting other cysteine peptidases such as cathepsins B and L, and the proteasome, which leads to cellular apoptosis [36, 37]. In addition, their poor membrane permeability renders them inadequate for rapid and selective inhibition of calpain in intact cells. Throughout the literature, low-molecular-weight calpain inhibitors were classified in various ways. Initially, these compounds were classified as active-site directed and allosteric effectors. However, detailed studies on the kinetics of inhibition revealed much more detailed categories such as mechanism-based, tight binding, slow binding, affinity labels, suicide substrates, transition state analogs, and dead-end inhibitors [38, 39]. Allosteric calpain inhibitors are known not to target the active site but most likely interact with allosteric sites, which are involved in catalysis and activation; as a result, these molecules may provide more therapeutic benefit than peptide inhibitors. An example is α -mercaptoacrylate PD150606, a potent and selective inhibitor of calpain-1 [40].

Active site-directed inhibitors, as the name suggests, interact directly with the active site. These compounds are usually peptidomimetics of calpain substrates, composed of modified amino acids that are recognized by the enzyme, and can be either reversible or irreversible inhibitors [41]. Examples of the former include the synthetic compounds aldehydes, α -ketoheterocycles, and α -ketocarboxyls [42, 43], and natural compounds such as leupeptin and calpastatin [44]. This last one is the only specific inhibitor of the calpain family

1 discovered to date; its specificity is determined by the simultaneous binding of three
2 calpastatin subdomains to both subunits of heterodimeric calpains [15, 16].

3
4 Incited by the potential clinical use of approved calpain inhibitors together with the
5 high expansion of the calpain family in trypanosomatids genome [20, 21], our research group
6 has started pre-clinical *in vitro* studies on the effects of the calpain inhibitor MDL28170 (Cbz-
7 Val-Phe-H) on *Leishmania* spp. parasites. MDL28170 is a potent, cell-permeable, synthetic and
8 reversible peptide inhibitor of calpain I and II, also known as calpain inhibitor III [44]. Our
9 results showed that MDL28170 was capable of arresting irreversibly the growth of *L.*
10 *amazonensis* promastigotes in a dose-dependent manner [22], while one possible mechanism
11 of action is through the activation of an apoptotic-like pathway, which was confirmed by
12 ultrastructural alterations and biochemical approaches [26]. The inhibitor was also able to
13 defeat leishmania infection in macrophage cells [Marinho FA & Branquinha MH, unpublished
14 data]. These results prompted our group to asses a species of the *Viannia* subgenus, *L.*
15 *braziliensis* is the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in Brazil [45]. MDL28170
16 inhibited the growth, macrophage interaction and caused critical ultrastructural alterations in
17 *L. braziliensis* morphology, such as the formation of multivesicular bodies, concentric
18 membranar structures as well as plasma and flagellar membrane blebbing and Golgi disruption
19 [Vitório BS, Ennes-Vidal V & d'Avila-Levy CM, unpublished data]. Nevertheless, further studies
20 evaluating the effects of inhibitors are necessary for better understanding the functional role
21 of trypanosomatids calpains and to make these compounds candidates for computational-
22 assisted drug design and subsequent *in vivo* assays.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

39 **4. Expert opinion**

40
41 The process of drug development is time consuming, laborious and expensive. On average,
42 a drug is developed in 15 – 17 years, from the discovery process to pharmacological regulatory
43 agencies approval. Before the availability for doctors to prescribe, millions are spent, starting
44 from the discovery process that involves screening chemically diverse compounds (synthetic or
45 natural sources), including the preclinical testing in animal models, to clinical trials and then
46 the final approval. Preclinical phase studies are performed in the laboratory and then in
47 animals, generally testing for biological activity for compounds against a disease. In this phase
48 the safety of the compound is evaluated at first. Sometimes, a computational group screens
49 compounds virtually using simulation programs by docking structures of compounds libraries
50 with potential targets, helping to select and guide chemical modification of compounds [46,
51 47]. Even after the three clinical phases approval, the promising compounds still requires
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 periodic reports regarding its safety. In neglected diseases, though, the reality is quite
2 different, since the link with poverty results in low investment in rational drug development. A
3 high number of patents are dead due to failure of payment of maintenance cost, or revoked
4 for not meeting patentability requirements. It seems to be an indication of the difficulties
5 faced by research institutes and universities for disclosed compounds to reach the final stages
6 of innovation, entering into the market [27]. Consequently, governmental action is crucial to
7 guarantee innovation. Once accepted by the scientific community that the challenges for the
8 introduction of new compounds to treat neglected diseases are more economic than
9 biological, an available option could include those that rely on discovering and developing
10 follow-up molecules of existing drugs and drugs under development, all of them patent
11 protected and termed as “me-too” approach for drug discovery. Additionally, new disease
12 targets from old compounds are also a possibility – repurpose drugs [12].

21 Since the upregulation of several members of the calpain family is involved in a wide
22 range of biological processes and human diseases, this family of peptidases has an important
23 therapeutic potential, and massive efforts have been made in the field of rational drug
24 development to identify selective calpain inhibitors. The preclinical studies of calpain inhibitors
25 provide new leads for managing diseases such as cancer, ocular disorders, neurological
26 disorders, tibial muscular, dystrophy, protection against age-related lesions and sickle-cell
27 disease [15-18]. The link between these inhibitors and a “me-too” or repurpose approaches for
28 leishmaniasis chemotherapy encouraged our group to access the effects of an inhibitor against
29 pathogenic trypanosomatids’ parasites. Up to now, the inhibitor MDL28170 showed promising
30 results in pre-clinical studies *in vitro* with some *Leishmania* species. MDL28170 interfered in
31 various steps of the parasite life cycle and incited our research group to program further
32 studies to better understand the calpain functions in these organisms. Moreover, by proteomic
33 approaches, it was shown that calpains are up-regulated in drug-resistance *Leishmania* strains
34 and in virulent strains, highlighting its participation in crucial pathogenic events for the
35 parasite [48, 49]. Therefore, it is promising to consider calpain inhibitors as an interesting
36 alternative treatment for leishmaniasis with a shortcut possibility for clinical trials.

51 **5. Declaration of interest**

54 The authors were supported by CNPq, FAPERJ, Fiocruz and CAPES. The authors have no
55 other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a
56 financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the
57 manuscript apart from those disclosed.
58
59
60
61
62
63
64
65

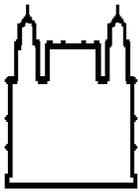
6. Bibliography

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
1. d'Avila-Levy CM, Boucinha CM, Kostygov A, Santos HLC, Morelli KA, Grybchuk-leremenko A, et al. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2015; 110: 1-10.
2. WHO. http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ (2015). Accessed 25 Set 2015.
3. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 2006; 22: 552-7.
4. Boelaert M, Meheus F, Robays J, Lutumba P. Socio-economic aspects of neglected diseases: sleeping sickness and visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2010; 104(7): 535-42.
5. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2001; 95: 239-43.
6. WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of Leishmaniasis. World Health Organization; Geneva: 2010.
7. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012; 7: e35671.
8. Cavalli A, Bolognesi ML. Neglected tropical diseases: multitarget-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J. Med. Chem.* 2009; 52: 7339-59.
9. Wilkinson, S.R.; Kelly, J.M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev. Mol. Med.* 2009; 11: 1-24.
10. De Menezes JP, Guedes CE, Petersen AL, Fraga DB, Veras PS. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *Biomed Res. Int.* 2015; e815023.
11. Correa CM. Ownership of knowledge – the role of patents in pharmaceutical R&D. *Bull. World. Health. Organ.* 2004; 82: 784-7.
12. Kwok AK, Koenigbauer FM. Incentives to Repurpose Existing Drugs for Orphan Indications. *ACS Med. Chem. Lett.* 2015; 6(8): 828-30.
13. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol. Rev.* 2003; 83: 731-801.
14. Huang Y, Wang KK. The calpain family and human disease. *Trends Mol. Med.* 2001; 7: 355-62.
15. Battaglia F, Trinchese F, Liu S, Walter S, Nixon RA, Arancio O. Calpain inhibitors, a treatment for Alzheimer's disease: position paper. *J. Mol. Neurosci.* 2003; 20: 357-62.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
16. Carragher NO. Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Curr. Pharm. Des.* 2006; 12:615-38.
 17. Saez, M.E.; Ramirez-Lorca, R.; Moron, F.J.; Ruiz, A. The therapeutic potential of the calpain family: new aspects. *Drug Discov. Today.* 2006; 11: 917-23.
 18. Donkor IO. An updated patent review of calpain inhibitors (2012 - 2014). *Expert Opin. Ther. Patents.* 2015; 25(1): 17-31.
 19. Zhao S, Liang Z, Demko V, Wilson R, Johansen W, Olsen OA, et al. Massive expansion of the calpain gene family in unicellular eukaryotes. *BMC Evol. Biol.* 2012; 12: 193.
 20. Ersfeld K, Barraclough H, Gull K. Evolutionary reflationary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *J. Mol. Evol.* 2005; 61: 742-57.
 21. Branquinha MH, Marinho FA, Sangenito LS, Oliveira SSC, Gonçalves KC, Ennes-Vidal V, et al. Calpains: potential targets for alternative chemotherapeutic intervention against human pathogenic trypanosomatids. *Curr. Med. Chem.* 2013; 20: 3174-85.
 22. d'Avila-Levy CM, Marinho FA, Santos LO, Martins JLM, Santos ALS, Branquinha MH. Antileishmanial activity of MDL28170, a potent calpain inhibitor. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2006; 28: 138-42.
 23. Sangenito LS, Ennes-Vidal V, Marinho FA, Da Mota FF, Santos ALS, et al. Arrested growth of *Trypanosoma cruzi* by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms. *Parasitology.* 2009; 136: 433-41.
 24. Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of *Trypanosoma cruzi in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65: e1395-8.
 25. Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos AL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. MDL28170, a calpain inhibitor, affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to *Rhodnius prolixus* midgut. *PLoS One.* 2011; 6: e18371.
 26. Marinho FA, Gonçalves KC, Oliveira SSC, Gonçalves DS, Matteolli FP, Seabra SH, et al. The calpain inhibitor MDL28170 induces the expression of apoptotic markers in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Plos One.* 2014; 9: e87659.
 27. Machado-Silva A, Guimarães PP, Tavares CA, Sinisterra RD. New perspectives for leishmaniasis chemotherapy over current anti-leishmanial drugs: a patent landscape. *Expert Opin. Ther. Pat.* 2015; 25: 247-60.
 28. Mendes D, Alves C, Batel-Marques F. Number needed to harm in the post-marketing safety evaluation: results for rosiglitazone and pioglitazone. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* 2015; *in press*, doi: 10.1002/pds.3874.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
29. Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006; 5: 689-702.
30. Zusman RM, Morales A, Glasser DB, Osterloh IH. Overall cardiovascular profile of sildenafil citrate. *Am. J. Cardiol.* 1999; 83: 35C-44C.
31. Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67: 2576-97.
32. Smorenburg CH, Seynaeve C, Bontenbal M, Planting AS, Sindermann H, Verweij J. Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Anticancer Drugs.* 2000; 11: 825–8.
33. Paladin Labs Inc. Application for Inclusion of Miltefosine on WHO Model List of Essential Medicines. 2010.
http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/18/applications/Miltefosine_application.pdf
34. Guroff G. A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.* 1964; 239: 149–55.
35. Huston RB, Krebs EG. Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Ca²⁺. II. Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme. *Biochem.* 1968; 7: 2116–22.
36. Sasaki T, Kishi M, Saito M, Tanaka T, Higuchi N, Kominami E, et al. Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins. *J. Enzyme Inhib.* 1990; 3: 195-201.
37. Haas M, Page S, Page M, Neumann FJ, Marx N, Adam M, et al. Effect of proteasome inhibitors on monocytic IκB-α and -β depletion, NF-κB activation, and cytokine production. *J. Leukoc. Biol.* 1998; 63: 395-404.
38. Otto HH, Schirmeister T. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 1997; 97: 133–72.
39. Vicik R, Busemann M, Baumann K, Schirmeister T. Inhibitors of cysteine proteases. *Curr. Top. Med. Chem.* 2006; 6: 331–53.
40. Wang KK, Nath R, Posner A, Raser KJ, Buroker-Kilgore M, Hajimohammadreza I et al. An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 6687-92.
41. Angelastro MR, Mehdi S, Burkhart JP, Peet NP, Bey P. Alpha-diketone and alpha-keto ester derivatives of N-protected amino acids and peptides as novel inhibitors of cysteine and serine proteinases. *J. Med. Chem.* 1990; 33: 11-13.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
42. Tao M, Bihovsky R, Wells GJ, Mallamo JP. Novel peptidyl phosphorus derivatives as inhibitors of human calpain I. *J. Med. Chem.* 1998; 41: 3912-16.
43. Kawasaki H, Emori Y, Imajoh-Ohmi S, Minami Y, Suzuki K. Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium dependent protease. *J. Biochem.* 1989; 106: 274-81.
44. Mehdi, S. Cell penetrating inhibitors of calpain. *Trends Biochem. Sci.* 1991; 16: 150-53.
45. Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 937-54.
46. Ali HI, Nagamatsu T, Akaho E. Structure-based drug design and AutoDock study of potential protein tyrosine kinase inhibitors. *Bioinform.* 2011; 5: 368-74.
47. Mortier J, Rakers C, Frederick R, Wolber G. Computational tools for in silico fragment-based drug design. *Current Top. Med. Chem.* 2012; 12: 1935-43.
48. Salotra P, Duncan RC, Singh R, Subba Raju BV, Sreenivas G, Nakhasi HL. Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Microbes Infect.* 2006; 8: 637-44.
49. Vergnes B, Gourbal B, Girard I, Sundar S, Drummelsmith J, Ouellette M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics.* 2007; 6: 88-101.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Laboratório de Estudos Integrados em Protozoologia

Dear Editors,

All authors of this manuscript declare that we have seen and approved the submitted version of this manuscript.

Yours faithfully,

Claudia Masini d'Avila-Levy

List of Co-author names:

Date:

Signature:

1. Vítor Ennes Vidal

30/11/2015

3. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto

30/11/2015

4. Marta Helena Branquinha de Sá

30/11/2015

6. André Luis Souza dos Santos

30/11/2015

7. Claudia Masini d'Avila-Levy

30/11/2015