

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

VÍTOR ENNES VIDAL

**Identificação de homólogos das calpaínas em
Trypanosoma cruzi e avaliação do efeito do MDL28170, um
inibidor de calpaínas, sobre o parasito**

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

Orientadora: Prof. Dr^a. Claudia Mansini d'Avila Levy

RIO DE JANEIRO

2010

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

VÍTOR ENNES VIDAL

**Identificação de homólogos das calpaínas em
Trypanosoma cruzi e avaliação do efeito do MDL28170, um
inibidor de calpaínas, sobre o parasito**

ORIENTADOR: Prof. Dr^a. Claudia Masini d'Avila Levy

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Solange Lisboa de Castro – Presidente

Prof. Dr^a. Patricia Cuervo Escobar

Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes

Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

Prof. Dr^a. Patricia Maria Lourenço Dutra

Rio de Janeiro, 15 de julho de 2010

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Fernando e Márcia e a minha esposa Isabela por todo apoio, amor e compreensão durante esses dois maravilhosos anos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha orientadora, Dra. Claudia Masini d'Avila Levy, por todo apoio e confiança que teve por mim; além de ótima orientadora, foi também uma excelente amiga desde que entrei no laboratório.

À Dra. Constança Britto por ser a maior responsável pela minha vinda ao Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, que me acolheu muito bem e permitiu a realização de meus objetivos profissionais e pessoais.

Ao Dr. Carlos Roberto Alves e ao Dr. Otacílio Moreira da Cruz pelas dicas e conselhos nas prévias de entrevista de mestrado, seminário discente e defesa da tese.

Às tecnologistas do laboratório, Luiza e Angélica, por terem me ajudado muito a me adaptar ao novo ambiente de trabalho e às novas metodologias empregadas no meu estudo.

Ao Dr. André Luís Souza dos Santos e à Dr^a. Marta Helena Branquinha pela elaboração do projeto que abracei com grande dedicação e carinho, e pelas críticas e sugestões nos artigos antes da submissão.

Ao Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto por toda a colaboração prestada durante boa parte do meu trabalho, além de ser um amigo.

A todos os demais alunos e pesquisadores pelo companheirismo e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, além da compreensão por terem que dividir o técnico do laboratório com o mestrado.

À plataforma de citometria de fluxo que muitas vezes precisei usar para leitura 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.

Aos meus amigos da época da faculdade, Rodrigo, Melissa e Larissa, por sempre acreditarem que eu chegaria mais longe na minha vida acadêmica.

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 presente trabalho.

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, ao nosso Mestre amado que nos permite viver, aprender e triunfar, sempre em busca de sua melhor compreensão. Obrigado, Senhor!

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
I. INTRODUÇÃO	1-25
1. A família Trypanosomatidae	1
2. A doença de Chagas	3
3. O <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
4. O tratamento da doença de Chagas	11
5. Peptidases	12
6. Peptidases no <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
7. Calpaínas	17
8. Calpaínas nos tripanossomatídeos	20
9. Inibidores proteolíticos	23
II. OBJETIVOS	27
III. RESULTADOS	28-63
Artigo 1: “Arrested growth of <i>Trypanosoma cruzi</i> by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms”	29
Artigo 2: “Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of <i>Trypanosoma cruzi</i> in vitro”	39
Artigo 3: “MDL28170, a potent calpain inhibitor, affects <i>Trypanosoma cruzi</i> metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to the luminal midgut surface of <i>Rhodnius prolixus</i> ”	44
IV. DISCUSSÃO	71-79
V. CONCLUSÕES	80
VI. BIBLIOGRAFIA	81-98

RESUMO

CALPAÍNAS EM *TRYPANOSOMA CRUZI*: PARTICIPAÇÃO NO CICLO DE VIDA, DIFERENCIAÇÃO E INFECTIVIDADE

Vítor Ennes Vidal

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

As calpaínas constituem uma família de cisteína-peptidases neutras dependentes de cálcio presentes numa ampla variedade de organismos. Em virtude da relevância fisiológica dessas proteases, inibidores de calpaínas já vêm sendo desenvolvidos para o tratamento de doenças humanas e microbianas. Estudos recentes vêm relatando a presença de diversas proteínas relacionadas às calpaínas em tripanossomatídeos, mas pouco se sabe a respeito das funções específicas dessas proteínas nesses micro-organismos. Nesse contexto, uma vez que os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da doença de Chagas apresentam sérios efeitos colaterais e podem ser ineficazes, inibidores proteolíticos poderiam ser uma alternativa no tratamento desta doença. Portanto, o presente trabalho investiga a presença de moléculas similares às calpaínas no *Trypanosoma cruzi* e o efeito inibidor do inibidor III de calpaínas (MDL28170) sobre a proliferação, viabilidade, diferenciação, ultraestrutura e interação das diferentes formas do parasito com células hospedeiras em ensaios *in vitro*. Nossos resultados revelam a reatividade cruzada de anticorpos produzidos contra calpaínas já bem caracterizadas de *Drosophila melanogaster*, *Homarus americanus* e *Trypanosoma brucei* contra moléculas de superfície do *T. cruzi*, conforme demonstrado por imunofluorescência e citometria de fluxo. Em ensaios de Western Blotting foi possível observar que o anticorpo anti-Dm-calpaína foi capaz de reagir contra uma proteína de 80 kDa. Pesquisas realizadas no GenBank demonstraram a presença de 4 seqüências homólogas à calpaína de *D. melanogaster* no genoma do *T. cruzi*. Essas 4 seqüências foram identificadas como cisteína-peptidases de massa molecular predita em torno de 80 kDa. Nos ensaios de inibição com o MDL28170 foi possível observar a redução da proliferação das formas epimastigotas ao longo de 5 dias de cultura; e a redução significativa da viabilidade das formas tripomastigotas sanguíneas dos parasitos tratados com 25 µM do composto. O inibidor, adicionado nas concentrações de 6,25 à 25 µM, também foi capaz de diminuir de forma dose- e tempo-dependente o número de macrófagos parasitados e o número de parasitas interiorizados nos ensaios de interação com macrófagos peritoneais murinos. O MDL28170 em concentrações a partir de 12,5 µM teve ainda um efeito inibitório significativo sobre a adesão de formas epimastigotas ao epitélio intestinal de *Rhodnius prolixus*; assim como os anticorpos anti-calpaínas foram capazes de inibir significativamente a interação com o inseto vetor. Por fim, foi possível observar uma redução significativa no processo de diferenciação por metaciclogênese em meio TAU e alterações ultraestruturais em reservossomos, Golgi e membrana plasmática quando formas epimastigotas do *T. cruzi* foram tratadas com MDL28170. Embora mais estudos sejam necessários para melhor caracterizar moléculas similares às calpaínas no *T. cruzi*, o nosso trabalho acrescenta novos conhecimentos sobre as possíveis funções dessas moléculas e sobre a possibilidade de utilização de inibidores de calpaínas como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de compostos mais potentes e seletivos para o tratamento da doença de Chagas.

ABSTRACT

CALPAÍNAS EM *TRYPANOSOMA CRUZI*: PARTICIPAÇÃO NO CICLO DE VIDA, DIFERENCIAÇÃO E INFECTIVIDADE

Vítor Ennes Vidal

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Calpains constitute a large family of calcium-regulated cytosolic cysteine peptidases present in a broad range of organisms. Since these enzymes may participate in a variety of physiological processes, calpain inhibitors are under development for the treatment of human and infectious diseases. Previous works have shown the presence of a large and diverse family of calpains in trypanosomatids, but less is known about the specific functions of these molecules. In this context, since the current chemotherapy to treat Chagas' disease presents several side effects and can be ineffective, proteolytic inhibitors could be an alternative to the treatment of this disease. In the present work, we aimed to detect calpain-like molecules in *Trypanosoma cruzi* and to explore the effects of the calpain inhibitor III (MDL28170) on the growth, viability, differentiation process, ultrastructure and interaction of the *T. cruzi* with host cells *in vitro*. Our results show the cross-reactivity of molecules present on the cell surface of *T. cruzi* epimastigotes and anti-calpain antibodies raised against well characterized calpains from *Drosophila melanogaster*, *Homarus americanus* and *Trypanosoma brucei*. Furthermore, an 80 kDa reactive molecule was detected by Western blotting assays using the anti-*Dm*-calpain. Based on sequence analysis in GenBank, we identified 4 *T. cruzi* sequences that share the same conserved domain with the fragment of the *D. melanogaster* calpain that was employed to generate the anti-*Dm*-calpain antibody. All these 4 sequences were cysteine peptidases of predicted molecular mass around 80 kDa. Our results on the growth pattern of treated parasites showed that MDL28170 arrested the growth of epimastigote forms maintained for 5 days in culture; and significantly decreased the bloodstream trypomastigotes viability treated with 25 μ M. MDL28170 at concentrations ranging from 6,25 to 25 μ M was also capable of reducing the infection of murine macrophages and the number of internalized parasites in a dose- and time-dependent manner in the *T. cruzi*-macrophage interaction assay *in vitro*. In addition, MDL28170 at concentrations from 12 μ M on was also capable of reducing the number of bound *T. cruzi* epimastigotes on the luminal surface midgut of the insect vector *Rhodnius prolixus*; anti-calpain antibodies also significantly impaired this interaction. Finally, we observed a significant decrease in the metacyclogenesis process on TAU medium and ultrastructural disorganizations on reservosomes, Golgi and plasma membrane from *T. cruzi* epimastigote forms treated with MDL28170. Although more investigations may be necessary for better understanding the presence of calpain-like molecules in *T. cruzi*, our work add new insights into the possible functions of these molecules and into the possibility of exploring calpain inhibitors as a promising alternative to the development of more powerful an selective drugs to treat Chagas' disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

- µl- Microlitro
- µM- Micromolar
- BSA- Soro Albumina Bovina
- Ca⁺²- Íons cálcio
- CDPs- “Calcium Dependent Peptidases” (Peptidases Dependentes de Cálcio)
- DMEM- “Dubelco’s Modified Eagle Medium” (Meio Eagle Modificado por Dubelco)
- DMSO- Dimetilsulfóxido
- DNA- “Deoxyribonucleic acid” (Ácido Desoxirribonucléico)
- EC- Comitê de Nomenclatura Enzimática
- EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético
- EGTA- Ácido Etileno Glicol Tetracético
- FACS- “Fluorescence Activated Cell Sorting” (Separador de Células Ativado por Fluorescência)
- FITC- “Fluorescein Isothiocyanate” (Isotiocianato de Fluoresceína)
- gp63- Glicoproteína 63
- gp57/51- Cruzipaína
- GPI- Glicosilfosfatidilinositol
- h- Hora
- HEPES- Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1
- HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana
- IC50- Referente à concentração da droga que causa uma redução em 50% da sobrevivência dos parasitos em comparação à curva de crescimento controle
- IOC- Instituto Oswaldo Cruz
- IgG- Imunoglobulina G
- kDa- Kilodalton
- k-DNA- DNA do cinetoplasto
- M- Molar
- MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão
- min- Minuto
- MSP- “Major Surface Peptidase” (Principal Peptidase de Superfície)
- MTT- Bromidrato de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- mM- Milemolar
- NO- Óxido Nítrico
- PBS- Tampão Fosfato Salina
- pH- Potencial Hidrogeniônico
- PKDL- Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar
- PSP- “Promastigote Surface Peptidase” (Peptidase de Superfície de Promastigotas)
- RFLP- “Restriction Fragment Length Polymorfism” (Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição)

RNA- Ácido ribonucleico

SDS- “Sodium Dodecyl Sulfate” (Lauril Sulfato de Sódio)

SFB- Soro Fetal Bovino

sp.- Espécie

spp.- Várias espécies

v/v- Volume por Volume

I. INTRODUÇÃO

1. A Família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae pertence ao sub-reino Protozoa da ordem Kinetoplastida que compreende um grande número de parasitos eucariotos monoflagelados. Os microrganismos desta família compartilham características singulares, como a presença de uma mitocôndria única e ramificada que percorre todo o corpo celular e cujo DNA possui um arranjo único na natureza, formando o cinetoplasto. O DNA desta estrutura corresponde a 20-30 % do DNA total, é denominado kDNA e organizado em redes de cadeias circulares, concatenadas e compactas. Em muitos tripanossomatídeos, a posição relativa do cinetoplasto em relação ao núcleo varia de acordo com a forma evolutiva do parasito que muda de acordo com o ciclo de vida (MASLOV & SIMPSON, 1995). O glicossoma também é uma organela singular dessa família e está relacionado com o peroxissoma de organismos eucariotos superiores. Além de tornar a transformação de glucose em piruvato mais eficiente em tripanossomatídeos que em outros organismos eucariotos, já que compartimentaliza a via glicolítica (revisto por VICKERMANN, 1994), o glicossoma também possui outras funções relacionadas à biossíntese de pirimidinas, recuperação de purinas, síntese de éter-lipídios e β -oxidação de ácidos graxos (revisto por MICHELS *et al.*, 2000).

Outro componente marcante dos tripanossomatídeos é o fato de apresentarem um único flagelo locomotor, que pode estar livre ou próximo ao corpo celular (VICKERMAN & PRESTON, 1976). Neste caso, com o movimento flagelar esta área da membrana é puxada junto com o flagelo, dando a impressão da formação de uma membrana ondulante (SCHMIDT & ROBERTS, 1989). Este flagelo é composto basicamente por um axonema e um corpo paraxial, que emerge da bolsa flagelar e se encontra ancorado à célula pelos corpos basais associados à mitocôndria (revisto por LANDFEAR & IGNATUSHCHENKO, 2001). Em algumas espécies, o flagelo pode participar na adesão do microrganismo aos tecidos hospedeiros (VICKERMAN, 1994; VICKERMAN & TETLEY, 1990).

Nesta família, o citoesqueleto é caracterizado por microtúbulos subpeliculares que formam ligações cruzadas entre si e com a membrana plasmática garantindo a sustentação da célula (revisto por GULL, 1999). O citoesqueleto representa barreira importante ao transporte vesicular, logo o principal sítio de endocitose e exocitose de macromoléculas é a bolsa flagelar, uma vez que é uma das poucas regiões da membrana que não possui microtúbulos subpeliculares ligados (revisto por OVERATH *et al.*, 1997). No entanto, existe uma estrutura

responsável por processos de endocitose/exocitose, o citóstomo. Esta estrutura se apresenta como uma invaginação da membrana plasmática que pode atingir até a região do núcleo celular (DE SOUZA, 2008). A arquitetura celular de um tripanossomatídeo pode ser observada no esquema representativo da figura 1.

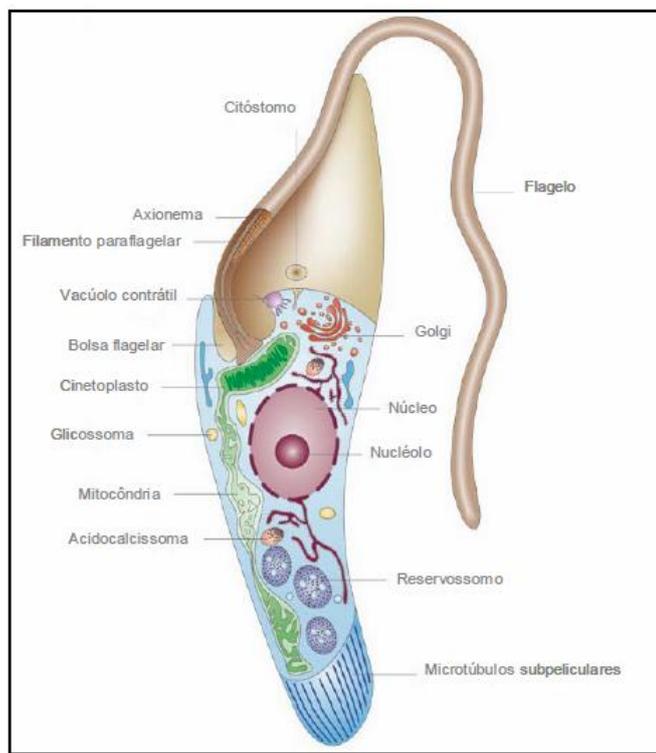


Figura 1: Representação esquemática da morfologia dos tripanossomatídeos (adaptado de DOCAMPO et al., 2005).

Atualmente, a família Trypanosomatidae é dividida em nove gêneros de acordo com as características morfológicas e a especificidade do hospedeiro: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Leishmania*, *Phytomonas*, *Rhynchoidomonas* e *Trypanosoma*. De acordo com o primeiro critério, a distinção dos gêneros é baseada nas formas evolutivas observadas para cada gênero, que incluem características como a morfologia do corpo celular, a presença ou ausência de “membrana ondulante” e de flagelo extracelular aparente, local de emergência do flagelo e posição do complexo formado pelo flagelo, bolsa flagelar, e cinetoplasto em relação ao núcleo (HOARE & WALLACE, 1966; JANOBY *et al.*, 1974; VICKERMAN & PRESTON, 1976; WALLACE, 1977; YOSHIDA *et al.*, 1978; VICKERMAN, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1997). Quanto ao hospedeiro, os tripanossomatídeos podem ser divididos em monoxênicos quando desenvolvem todo o seu ciclo de vida em apenas um hospedeiro (geralmente um invertebrado), ou heteroxênicos quando desenvolvem o seu ciclo de vida em hospedeiros diferentes (invertebrado e planta ou invertebrado e vertebrado). Porém, alguns estudos sugerem a criação de três novos gêneros

(*Wallaceina*, *Strigomonas* e *Angomonas*) para reagrupar os tripanossomatídeos de acordo com a sua filogenia (PODLIPAEV & ROKITSKAYA, 1999; BRANDÃO *et al.*, 2000; D'AVILA-LEVY *et al.*, 2004), reforçando a necessidade de uma revisão taxonômica na família Trypanosomatidae (Figura 2).

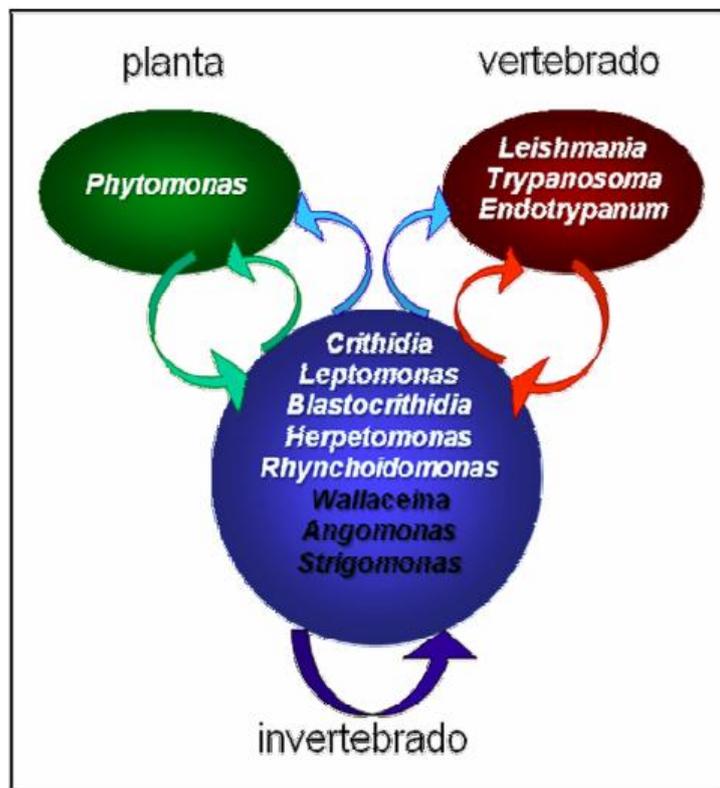


Figura 2: Relação espécie-hospedeiro dos tripanossomatídeos. Tripanossomatídeos heteroxênicos alternam entre hospedeiros invertebrados e vertebrados (setas vermelhas) ou plantas (setas verdes). O desenvolvimento dos parasitos monoxênicos ocorre em um único hospedeiro invertebrado (seta azul escura), embora tripanossomatídeos de insetos já tenham sido isolados de plantas e vertebrados (setas azuis claras). Os parasitos com nome em destaque (preto) representam os novos gêneros propostos (adaptado de SANTOS *et al.*, 2007).

2. A doença de Chagas

A história da descoberta da doença de Chagas se inicia no interior de Minas Gerais em abril de 1909, quando Carlos Chagas comunicou ao mundo a descoberta de uma nova doença humana, seu agente etiológico (o protozoário *Trypanosoma cruzi*) e o inseto que o transmitia (triatomíneo conhecido como “barbeiro”). As descobertas de Carlos Chagas, consideradas únicas na história da medicina, constituíram um marco na história da ciência e da saúde brasileira. Além da contribuição inovadora à medicina tropical, Carlos Chagas trouxe ao público a realidade sanitária e social do interior do país, chamando a atenção sobre a necessidade do combate as endemias do interior do país intimamente associadas à pobreza que estão presentes até os dias atuais (KROPF, 2010).

Epidemiologicamente, a doença de Chagas é prevalente em populações rurais, onde se encontram milhares de insetos vetores nas moradias de adobe, e estima-se que existam cerca de 12 a 14 milhões de pessoas infectadas em toda América Latina (DIAS, 2007). Notável esforço para se eliminar a transmissão domiciliar por *Triatoma infestans* foi realizado no Brasil durante as últimas décadas, passando o país a ser considerado livre desta modalidade de infecção pela Comissão Intergovernamental do Cone Sul (DIAS *et al.*, 2000). Entretanto, tal situação não considera importante os aspectos regionais. No Nordeste brasileiro, por exemplo, há espécies de triatomíneos silvestres que se adaptam muito bem às moradias e são atraídos pelas luzes das casas. A espécie predominante é *Triatoma brasiliensis*, e também existem outros vetores importantes do *T. cruzi* (DIAS *et al.*, 2000; BORGES-PEREIRA *et al.*, 2002).

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 importante. O fenômeno da migração rural em direção aos centros urbanos fez surgir a transmissão por transfusão sanguínea no Brasil, sendo que cerca de 70% dos indivíduos infectados estão vivendo nas cidades, o que torna o risco de transmissão por transfusão sanguínea muito alto, caso não haja rigoroso controle nos bancos de sangue. Embora menos comuns, podem ocorrer ainda a transmissão por acidente de laboratório e por leite materno (DIAS, 2007).

As principais formas de controle para a transmissão 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 (DIAS, 1986). Porém, recentemente ocorreram surtos de doença de Chagas com forma aguda e 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).

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 3). A iniciativa dos países do cone Sul em promoverem ações para controle do vetor foi bem sucedida, com a participação da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, como revisto por Schofield & Dias (1999). No entanto a iniciativa, como sua persistência, deve-se muito à participação ativa de cientistas, ao manterem junto aos governos a atenção voltada para o controle e prevenção da doença. No Brasil, com a progressiva melhora do Sistema Único de Saúde (SUS), houve avanços consideráveis em relação à atenção aos

pacientes chagásicos. Tanto no que se refere ao tratamento dos cardiopatas quanto às intervenções cirúrgicas e colocação de marca-passo em cardíacos, os resultados trouxeram maior conforto às pessoas portadoras das formas clínicas graves da doença. 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 a de acima de 45 anos. Deve-se ainda ressaltar que o diagnóstico precoce da doença é importante, pois há medicamentos eficazes para tratamento dos sintomas (NEVES *et al.*, 2005).



Figura 3: Distribuição da doença de Chagas pelo mundo. Os países endêmicos estão marcados em vermelho (adaptado de WHO, 2007).

A doença de Chagas tem uma fase aguda, de curta duração, que em alguns doentes progride para uma fase crônica. A fase aguda é geralmente assintomática, e tem uma incubação de uma semana a um mês após a picada. No local da picada, pode-se desenvolver uma lesão volumosa, o chagoma. Se a picada for perto do olho é frequente a conjuntivite com edema da pálpebra, também conhecido por sinal de Romana (Figura 5). Entre 20 a 60% dos casos agudos se transformam, em 2 a 3 meses, em portadores com parasitas sanguíneos continuamente, curando-se os restantes. No entanto, em todos os casos param os sintomas após cerca de dois meses. O caso crônico permanece assintomático por um período indeterminado. No entanto, neste período de bem-estar geral, o parasita se reproduz continuamente em baixos números, causando danos irreversíveis em órgãos como o sistema nervoso e o coração. No cérebro, há frequentemente formação de granulomas. Neste estágio a doença costuma levar ao óbito, mesmo com tratamento, geralmente devido à cardiomiopatia

(insuficiência cardíaca). No entanto, o tratamento pode aumentar o tempo e a qualidade de vida (NEVES *et al.*, 2005).



Figura 5: Criança com chagoma característico no olho direito e edema da pálpebra conhecida como sinal de Romaña. Extraído de <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7a/Chagoma.jpg>. Acessado em 15 de maio de 2010.

O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* pode ser realizado da seguinte forma: observação microscópica, onde há busca pelo parasita no sangue do paciente, o que é possível apenas na fase aguda após cerca de 2 semanas depois da picada; o xenodiagnóstico, onde o paciente é intencionalmente picado por barbeiros não contaminados e, quatro semanas depois, seu intestino é examinado em busca de parasitas; pela detecção do DNA do parasita por PCR (reação em cadeia da polimerase); e pela detecção de anticorpos específicos contra o parasita no sangue, que é útil nos casos crônicos, mas a distinção entre estes e a cura é difícil (NEVES *et al.*, 2005).

3. O *Trypanosoma cruzi*

O gênero *Trypanosoma* é um dos mais importantes dentro da família Trypanosomatidae por incluir uma série de espécies causadoras de doenças humanas importantes como o *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas; *Trypanosoma rhodesiense* e *Trypanosoma gambiense*, agentes da doença do sono; e de animais o *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma equinum* (revisto por DE SOUZA, 2009). Com base no comportamento do parasito nos seus hospedeiros,

principalmente no vetor, o gênero *Trypanosoma* foi dividido em dois grupos. O primeiro, chamado de *Stercoraria*, inclui tripanossomos que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, progredindo no sentido da porção intestinal com liberação de formas infectantes pelas fezes, onde temos o *T. cruzi* e o *T. lewisi*. O segundo, chamado de *Salivaria*, inclui tripanossomos que se desenvolvem inicialmente no tubo digestivo e que posteriormente atravessam o epitélio digestivo e atingem as glândulas salivares onde podemos encontrar as formas infectantes que são inoculadas mecanicamente. Neste grupo encontramos o *T. brucei*, *T. congolense* e *T. rangeli*. A grande complexidade no comportamento biológico dos tripanossomatídeos do gênero *Trypanosoma* levou à criação de alguns subgêneros. No caso do *T. cruzi* cabe mencionar que ele pertence ao subgênero *Schizotrypanum*, onde também estão incluídos outros tripanossomos encontrados principalmente em morcegos do velho e do novo mundo, como é o caso do *T. dionisii*, *T. vespertilionis*, *T. myoti*. Todos estes apresentam um ciclo evolutivo em culturas axênicas e de células muito semelhante ao do *T. cruzi* (revisto por HUGHES & PIONTKIVSKA, 2003).

Epidemiologicamente podem ser considerados três ciclos de transmissão vetorial do *T. cruzi*. 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. O terceiro ciclo é o peridoméstico, do qual 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). Mais de 130 espécies de triatomíneos representam potenciais vetores de *T. cruzi*, mas somente 5 espécies possuem particular importância na transmissão da doença de Chagas no Brasil (COURA & DIAS, 2009).

O ciclo de vida do *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado começa quando um animal de sangue quente se infecta pelo barbeiro (triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* ou *Rhodnius*) que elimina as formas tripomastigotas metacíclicas do parasito em suas fezes, durante ou logo após alimentar-se do sangue. Estas formas infectantes podem penetrar por machucados na pele provocados pelo ato de coçar, pelo orifício da picada do barbeiro ou ainda pelas mucosas, quando o homem, inadvertidamente, leva as mãos contaminadas aos olhos ou nariz. Logo após a penetração, os tripomastigotas metacíclicos são fagocitados por macrófagos, perdem o flagelo e a membrana ondulante, tornando-se amastigotas, forma sob a qual se reproduzem por divisão binária até que os macrófagos fiquem repletos de amastigotas. Os parasitos então re-adquirem o flagelo e a membrana ondulante, tornando-se tripomastigotas 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, 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 (revisto por TYLER & ENGMAN, 2001).

Em dado momento da infecção, os tripomastigotas sanguíneos são ingeridos por um novo repasto sanguíneo de outro triatomíneo que se alimenta de sangue humano, dando assim início a parte do ciclo no hospedeiro invertebrado. Portanto, 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 metacíclicos conforme migram em direção ao intestino posterior do triatomíneo estando prontas para iniciar uma nova infecção ao hospedeiro vertebrado (revisto por TYLER & ENGMAN, 2001). O ciclo de vida do *T. cruzi* pode ser visualizado na figura 4.

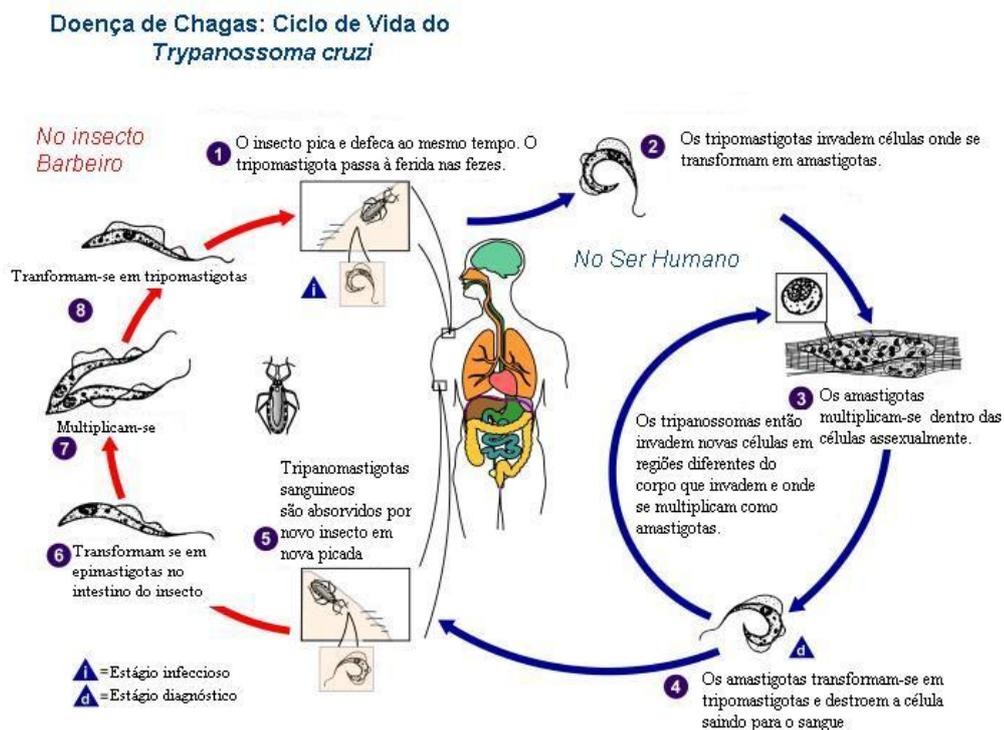


Figura 4: Representação esquemática do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Extraído de http://upload.wikimedia.org/Chagas_ciclo_de_doencas.jpg/300. Acessado em 15 de maio de 2010.

Diversas moléculas pertencentes ao *T. cruzi* e às suas células hospedeiras vêm sendo implicadas como tendo participação no processo de adesão, como as glicoproteínas, os

glicolípídeos e as proteínas tipo lectina. Uma das moléculas mais estudadas, presente na membrana plasmática de formas tripomastigotas (mas também em amastigotas, embora em menor quantidade), é uma proteína com atividade neuraminidásica e transialidásica. Esta última enzima remove resíduos de ácido siálico de glicoproteínas, glicolípídeos e oligosacarídeos presentes no meio e os transfere para moléculas aceptoras presentes na membrana plasmática das formas tripomastigotas. Dependendo da forma evolutiva do *T. cruzi* estudada, diferentes moléculas foram identificadas como participantes do processo de infecção da célula hospedeira. Nos tripomastigotas metacíclicos, por exemplo, a gp82, as moléculas semelhantes a mucinas e a gp90, todas ancoradas na membrana plasmática do parasita via âncora de glicosil fosfatidil inositol (GPI), reconhecem receptores nas células hospedeiras ainda não identificados e disparam a maquinaria de sinalização tanto no parasito quanto na célula hospedeira. Em seguida, após a entrada de formas tripomastigotas, a célula hospedeira ativa um processo de sinalização que leva a um aumento transiente dos níveis citoplasmáticos de cálcio, tanto no parasito quanto na célula hospedeira. Em células fagocíticas profissionais, como os macrófagos, ocorre ativação de tirosinas cinases, recrutamento de PI-3 cinase e actina para o local de entrada do parasito, o que demonstra que o principal mecanismo de entrada é por fagocitose e que é crucial a participação de moléculas das células hospedeiras. (revisado por CARVALHO, 2009). Outras enzimas, capazes de quebrar ligações peptídicas e conhecidas como peptidases, também desempenham uma série de funções críticas e essenciais para o estabelecimento da infecção e persistência do parasito, entre outras funções (VERMELHO *et al.*, 2007)

O *T. cruzi* é representado por um conjunto de populações que circulam em hospedeiros mamíferos e insetos vetores denominados isolados ou cepas que apresentam grande heterogeneidade de comportamento biológico como, por exemplo, diferentes graus de virulência para animais experimentais e humanos, variações na sensibilidade a drogas e tropismo tissular. A explicação para esta diversidade fenotípica reside no fato do *T. cruzi* ser um organismo diplóide com alta variabilidade genética entre seus diferentes isolados e que se multiplica predominantemente por divisão binária. Desta forma, o genoma de cada isolado do parasito evolui de forma independente. É interessante notar que a doença de Chagas também apresenta uma diversidade de apresentações clínicas (formas indeterminada, cardíaca e digestiva). Assim, um grande desafio para a comunidade científica vem sendo identificar marcadores genéticos dos isolados capazes de classificá-los em grupos discretos, visando sua caracterização do ponto de vista epidemiológico e de patogenia (revisado por CAMPBELL *et al.*, 2004). Ao longo dos anos, várias abordagens têm sido usadas para caracterizar a estrutura populacional do *T. cruzi*, visando à definição do número de subgrupos

relevantes. Assim, estes subgrupos receberam denominações diferentes, incluindo: zimodemas (MILES *et al.*, 1977, 1978, 1981; ROMANHA *et al.*, 1979), baseados no perfil eletroforético de isoenzimas utilizadas como marcadores; schizodemas (MOREL *et al.*, 1980); biodemas (ANDRADE & MAGALHÃES, 1996); clones (TIBAYRENC & AYALA, 1991); linhagens (SOUTO *et al.*, 1996); clados (KAWASHITA *et al.*, 2001); e, mais recentemente, unidades discretas de tipagem (DTUs) (TIBAYRENC, 2003) e haplótipos (HERRERA *et al.*, 2007). Portanto, em 23 de agosto de 2009 foi realizada uma reunião em Búzios (RJ-Brasil), que precedeu o XIII Congresso Internacional de Protistology, para padronização da nomenclatura deste parasito. Por consenso, a comissão de peritos reconheceu que a nomenclatura para cepas do *T. cruzi* deve ser classificada em seis DTUs, *T. cruzi* I-VI, e emitiu recomendações com justificações detalhadas e suas implicações (ZINGALES *et al.*, 2009).

4. Tratamento da doença de Chagas

O tratamento de escolha para a doença de Chagas é frequentemente através da administração de nitroimidazóis (benzimidazol) e de 5-nitrofuranos (nifurtimox). Entretanto, o nifurtimox não se encontra mais disponível comercialmente no Brasil e 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; há grande variação na susceptibilidade de isolados do parasito a ação destas drogas; e apresentam alto custo (FAIRLAMB, 2003; CAVALLI & BOLOGNESI, 2009; WILKINSON & KELLY, 2009; MCKERROW *et al.*, 2009; URBINA, 2010). O benzimidazol tem sido principalmente utilizado no tratamento de pacientes agudos e crônicos recentes, nos quais se observam resultados positivos médio de cura em torno de 80%, inclusive em crianças.

Drogas para o tratamento da doença de Chagas não são do 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 com dois problemas críticos: o tratamento de pacientes na fase crônica, e a ocorrência de novos casos agudos em algumas regiões da América Latina. 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 elas já foram submetidas a ensaios clínicos muito dispendiosos, ou através da determinação de um ou mais alvos específicos identificados em vias metabólicas importantes para o parasito (revisto por SOEIRO & DE CASTRO, 2009; URBINA, 2009).

Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado que o *T. cruzi*, como a maioria dos fungos e leveduras, requer esteróis específicos, conhecidos como ergosteróis, para sua viabilidade e proliferação celular em todas as fases do ciclo de vida. Assim, neste parasito, etapas da biossíntese de esteróis 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 (URBINA, 2002; URBINA & DOCAMPO, 2003). 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 (URBINA *et al.*, 1996, 1998, 2002; URBINA E DOCAMPO, 2003). Um estudo mais recente com posaconazol demonstrou que este composto pode erradicar formas amastigotas intracelulares do *T. cruzi* de cultura de cardiomiócitos e, ao mesmo tempo, permitir a reconstituição completa do citoesqueleto das células hospedeiras (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). Entre os demais 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, que são capazes de interferir na função do cinetoplasto em tripanossomatídeos (CATERINA *et al.*, 2008); o sistema glutationa/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 fosforibosiltransferase, 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, em especial a cruzipaina, cujos inibidores irreversíveis peptídicos tais como diazometilcetonas, fluorometilcetonas, alilsulfonas, vinilsulfonas e vinilsulfonamidas, vêm apresentando bons resultados no tratamento de infecções experimentais (revisto por MCKERROW *et al.*, 2009).

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 (revisto por SOEIRO & DE CASTRO, 2009).

5. As peptidases

As peptidases, proteases ou peptídeo-hidrolases (E.C. 3.4) são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, clivando assim proteínas ou fragmentos protéicos (BARRET, 1994; BARRET *et al.*, 2001). A clivagem proteolítica é um mecanismo comum de ativação ou inativação de enzimas que está envolvida principalmente na digestão e na coagulação sanguínea. Como uma molécula de água é utilizada no processo, as proteases pertencem ao grupo das hidrolases. Muitos microrganismos podem secretar peptidases para o meio externo com a finalidade de degradar proteínas, cujos produtos de hidrólise são fontes de carbono e nitrogênio para o seu crescimento (VERMELHO *et al.*, 2007).

As peptidases constituem uma grande família, podendo ser divididas em endopeptidases ou proteinases e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica; enquanto as exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N- ou C-terminal.. As exopeptidases que atuam na região amino-terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases); já aquelas que atuam na região carboxi-terminal livre liberam um único aminoácido (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases) (BOND & BUTLER, 1987). As endopeptidases podem também ser classificadas pela natureza química do seu sítio catalítico, podendo ser divididas em subclasses do tipo serina-, cisteína-, aspártico-, metalo-, treonina-, e glutâmico-peptidases. Algumas peptidases não se encaixam nestas subclasses e formam a subclasse 3.4.99, de mecanismo catalítico desconhecido (BARRET *et al.*, 2001). O esquema da classificação das peptidases pode ser observado na figura 6.

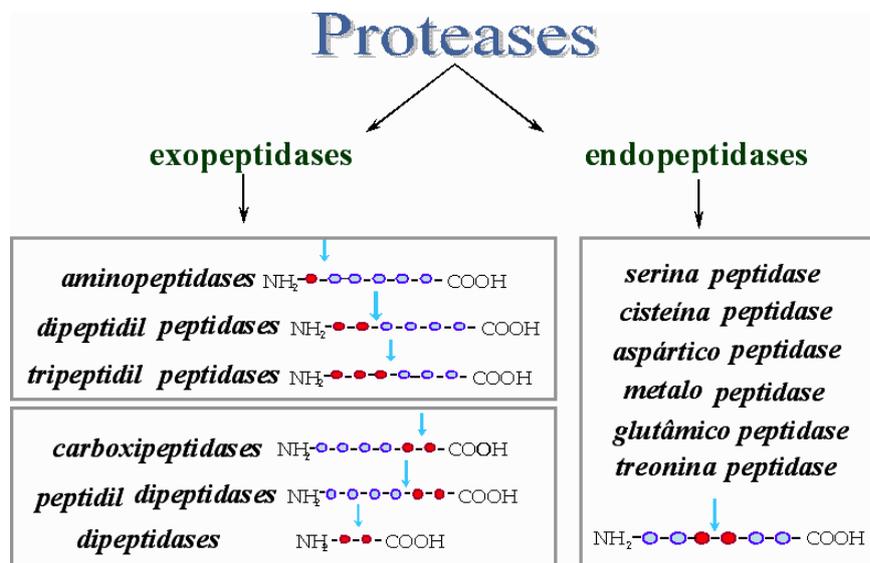


Figura 6: Esquema da classificação das peptidases quanto ao tipo de reação catalisada e a natureza química do sítio ativo (adaptado de BOND & BUTLER, 1987).

A ocorrência de proteases é comum a todos os organismos, e corresponde a 1-5% de seus conteúdos genéticos e compreendendo cerca de 2% do total de proteínas (BARRET *et al.*, 2003). Essas enzimas estão envolvidas numa grande variedade de reações metabólicas, da simples digestão de proteínas do alimento a cascatas altamente reguladas (a coagulação, a via do sistema complemento, as vias de apoptose, e a cascata ativadora da profenoloxidase nos invertebrados, por exemplo). Para viabilizar o controle de tais cascatas, algumas peptidases podem quebrar ligações peptídicas em sequências específicas de aminoácidos (proteólise limitada), ao passo que outras degradam o peptídeo integralmente (proteólise ilimitada). A clivagem específica de uma proteína pode tanto neutralizá-la, quanto permitir que ela assuma uma conformação ativa, o que pode servir de sinalização para ciclos celulares. As funções desempenhadas pelas peptidases podem ser inibidas por inibidores específicos de protease, dentro dos quais alguns possuem valores terapêuticos, o que atrai a atenção de inúmeros grupos dedicados a obter novas informações sobre essas enzimas (revisto por SOUTHAN, 2001).

O grupo extenso e heterogêneo formado pelas peptidases torna os critérios disponíveis insuficientes para classificar e aprimorar a informação oriunda nos estudos para a caracterização química e bioquímica dessas enzimas. Visando acompanhar os avanços da descoberta e caracterização das peptidases, foi criado o sistema MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), que agrupa as enzimas proteolíticas em famílias de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos. As famílias de mesma ancestralidade são, por sua vez, agrupadas em clãs, sendo este tipo de informação determinada pela estrutura terciária das

peptidases (BARRET *et al.*, 2003). Assim, as peptidases são agrupadas em famílias de acordo com a semelhança da sequência de aminoácidos do seu sítio catalítico em relação à enzima representativa da família, que por sua vez são agrupadas em seguida por clãs específicos, de acordo com as semelhanças na estrutura secundária, terciária e na ordem dos resíduos catalíticos ou sequências motivo em torno dos resíduos. As famílias são representadas por uma letra, que indica o mecanismo catalítico e um número. O clã é representado por duas letras: a primeira indica o tipo de mecanismo catalítico e a segunda é adicionada sequencialmente. As letras usadas são ‘A’ (aspártico), ‘C’ (cisteína), ‘M’ (metalo), ‘S’ (serina), ‘T’ (treonina), ‘G’ (glutâmico) ou ‘U’ (tipo desconhecido, do inglês, “*unknown*”) (BARRET *et al.*, 2001).

6. Peptidases no *Trypanosoma cruzi*

As peptidases desempenham uma série de funções básicas e essenciais no metabolismo e no processo de patogênese de diversos microrganismos, cujas doenças parasitárias representam grave problema de saúde global (revisito por MCKERROW *et al.*, 2006). Nos parasitos membros da família Trypanosomatidae, essas enzimas estão envolvidas em eventos cruciais do ciclo de vida destes parasitos, tais como a diferenciação e remodelação do parasito nas fases de seu ciclo de vida, ativação ou degradação de enzimas ou proteínas regulatórias e processamento nutricional de proteínas. Uma vez que os tripanossomatídeos são parasitos obrigatórios, as peptidases não poderiam deixar de estar associadas à invasão celular através da ruptura de células hospedeiras e degradação do citoesqueleto, participando assim do processo de interação parasito-hospedeiro. As peptidases também são de extrema relevância na prevenção da resposta imune do hospedeiro, uma vez que podem promover o escape e a modulação do sistema imunológico por degradação ou ativação de moléculas do sistema imune, como o sistema complemento e a coagulação sanguínea, além de serem responsáveis pela variabilidade antigênica do parasito (revisito por McKerrow *et al.*, 1993; Sajid & McKerrow, 2002).

Entre as seis classes principais de peptidases, as mais comumente detectadas nos tripanossomatídeos são as metalo- e as cisteína-peptidases (BRANQUINHA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2005; VILLALTA *et al.*, 2008). A cruzipaina é uma das principais proteases do *T. cruzi*. Esta enzima consiste de uma cisteína-peptidase também conhecida como gp57/51, que consiste em uma glicoproteína monomérica de 60 kDa altamente imunogênica e cuja atividade máxima pode ser observada em intervalos de pH 5 a 7,5 (MURTA *et al.*, 1990). Esta enzima é expressa em todas as formas evolutivas de todas as cepas e clones de *T. cruzi* até hoje testados, com os maiores níveis de atividade sendo detectados na forma

epimastigota (TOMAS & KELLY, 1996), e pode também ser detectada no meio extracelular, onde se acredita que sua forma secretada possa estar envolvida no processo de invasão de células hospedeiras (APARICIO *et al.*, 2004). A participação desta peptidase na invasão da célula hospedeira e no desenvolvimento intracelular foi primeiramente descrita através do uso de derivados de diazometano-peptidil, uma classe de inibidores irreversíveis da cisteína-peptidases (MEIRELLES *et al.*, 1992).

A cruzipaína possui homologia com a catepsina L de mamíferos, estando associada principalmente ao sistema endocítico-lisossomal e reservossomas em epimastigotas (MURTA *et al.*, 1990; SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990; SOARES *et al.*, 1992). Esta enzima também está presente na superfície de amastigotas e epimastigotas e na bolsa flagelar das três formas evolutivas (SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990). Várias funções já foram atribuídas à cruzipaína como: degradação protéica, aumento da metaciclogênese *in vitro* (BONALDO *et al.*, 1991; TOMAS *et al.*, 1997), invasão celular (SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990; MEIRELLES *et al.*, 1992; HARTH *et al.*, 1993, SCHARFSTEIN *et al.*, 2000; APARICIO *et al.*, 2004), multiplicação do parasito nas células do hospedeiro (MEIRELLES *et al.*, 1992), no escape do sistema imune (GRUPPI *et al.*, 1997; BENÍTEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2010) e em processos inflamatórios e ativação do sistema de morte (CAZZULO *et al.*, 2001).

Em *T. cruzi*, já foram identificadas glicoproteínas da família das cisteína-peptidases com massa molecular de 30 kDa que podem estar envolvidas em eventos celulares como a diferenciação nas células hospedeiras e transmissão intracelular de tripomastigotas (CAZZULO *et al.*, 1990; GARCIA *et al.*, 1998). Embora apresente maior atividade enzimática em epimastigotas, essas glicoproteínas estão presentes nas três formas evolutivas do parasito, apresentando similaridade da sua sequência N-terminal com a catepsina B de humanos, *Leishmania mexicana* e *Caenorhabditis elegans* (GARCIA *et al.*, 1998).

As proteases da classe das metalopeptidases também são amplamente encontradas nos tripanossomatídeos, inclusive no *T. cruzi* que possui uma metalopeptidase homóloga à gp63 da *Leishmania* (Tcgp63) (CUEVAS *et al.*, 2003). Esta glicoproteína de 60-65 kDa é abundantemente expressa em promastigotas de *Leishmania*, sendo de extrema importância no processo de patogênese da leishmaniose (revisado por YAO *et al.*, 2003). O *T. cruzi* tem 10 ou mais genes de gp63 ou moléculas homólogas à gp63 e sua expressão é aumentada na fase amastigota do parasito, indicando que esta enzima possa ter um papel na sobrevivência e desenvolvimento do *T. cruzi* no citoplasma da célula hospedeira (GRANDGENETT *et al.*, 2000). A Tcgp63 provavelmente está envolvida na infecção de células do hospedeiro vertebrado, uma vez que modificações pós-traducionais que ocorrem exclusivamente em

isoformas de tripomastigotas metacíclicos participam do processo de infecção experimental de mioblastos (KULKARNI *et al.*, 2009).

Outras peptidases como as pertencentes aos grupos serina e aspártico também têm sido identificadas em *T. cruzi* (BURLEIGH *et al.*, 1997; PAUGAM *et al.*, 2003; ALVES *et al.*, 2005; PINHO *et al.*, 2009). Porém, as aspártico-peptidases ainda não estão bem caracterizadas na família Trypanosomatidae. Este grupo de peptidases está dividido em várias famílias e geralmente funcionam em condições ácidas, o que limita a função das aspártico peptidases a alguns locais específicos nos diferentes organismos e as tornam menos abundante do que a de outros grupos de peptidases (DASH *et al.*, 2003). Apesar disso, estas enzimas têm sido isoladas e estudadas em uma ampla variedade de organismos, em vertebrados, fungos, plantas, vírus e até em bactérias (HILL & PHYLIP, 1997; JAMES, 1998; DASH *et al.*, 2003; TAKAHASHI *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2005; VALDIVIESO *et al.*, 2007; PINTI *et al.*, 2007). Recentemente, duas aspártico-peptidases foram identificadas e isoladas de formas epimastigotas do *T. cruzi*: a cruzipsina-I (CZP-I) e a cruzipsina-II (CZP-II), ambas com massa molecular em torno de 120 kDa. Estas enzimas tiveram uma alta atividade enzimática específica detectada, hidrolisando substrato de catepsina B, e sendo inibidas por inibidores específicos dessa classe de peptidases, como a pepstatina A. Contudo, as funções fisiológicas dessas enzimas ainda são desconhecidas e há a necessidade de novos estudos (PINHO *et al.*, 2009).

Outro grupo de peptidases encontradas no *T. cruzi* que necessita de mais investigações são as serina-peptidases. Uma dessas enzimas está intimamente relacionada com os membros da família prolil-oligopeptidase de serina-endopeptidases de mamíferos e, assim, é denominada oligopeptidase B (Tc-OP) (BURLEIGH *et al.*, 1997). Formas tripomastigotas do parasito mutantes de Tc-OP apresentam deficiência na mobilização de cálcio nas células de mamíferos, o que prejudica o estabelecimento da infecção *in vitro* e *in vivo* (CALER *et al.*, 1998). Outra serina-peptidase amplamente estudada no *T. cruzi* é uma prolil-oligopeptidase não-lisossomal secretada de 80 kDa conhecida como POP Tc80 (SANTANA *et al.*, 1997). Este enzima é encontrada em todas as formas evolutivas do ciclo evolutivo do parasito e tem alta especificidade para colágenos humanos tipo I e IV, o que sugere a participação da POP Tc80 na disseminação do parasito no hospedeiro (JOYEAU *et al.*, 2000), além de participar no processo de invasão celular (GRELLIER *et al.*, 2001; BASTOS *et al.*, 2005). Recentemente, uma nova serina-peptidase também extracelular foi isolada de epimastigotas. A nova enzima apresenta massa molecular de 75 kDa e sua localização intracelular sugere uma participação em eventos de proteólise nos reservossomas, embora possivelmente esta

seja secretada pela bolsa flagelar (SILVA-LOPEZ *et al.*, 2008). Portanto, peptidases secretadas para o meio extracelular podem funcionar como um mecanismo adaptativo importante durante o ciclo de vida dos microrganismos (MCKERROW *et al.*, 1993; MONOD *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2007).

7. As Calpaínas

A família das calpaínas consiste de um grupo heterogêneo de cisteína-peptidases com um amplo padrão de expressão, que inclui múltiplas isoformas ubíquas no organismo e de tecido específicos. Também denominadas CDPs (“Calcium Dependent Peptidases”), as calpaínas são proteases neutras dependentes de cálcio cujas suas duas principais isoformas, denominadas μ - e m-calpaínas, têm sido distinguidas com base nas diferenças de seus requerimentos micro- e milimolar para ativação *in vitro* por cálcio. Estas proteínas são formadas por duas subunidades, uma catalítica de 80 kDa de massa molecular e uma subunidade regulatória de 30 kDa. Ambas as subunidades contêm um domínio de ligação para cálcio do tipo calmodulina, sendo que nas células de animais, a subunidade menor nas isoenzimas é idêntica, enquanto que a subunidade maior apresenta identidade de sequência limitada (revisto por JOHNSON & GUTTMAN, 1997). A estrutura da m-calpaína é demonstrada na figura 7.

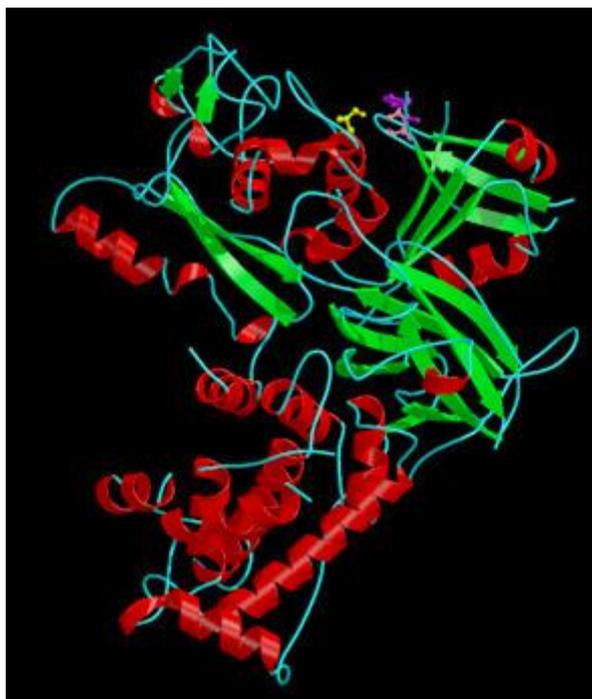


Figura 7: Representação esquemática da estrutura da mili-calpaína (m-calpaína)

Extraído de: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/structure?mid=C02.002>. Acessado em 24 de maio de 2010.

Apesar de ser tipicamente citosólica, as calpaínas têm sido descritas no espaço extracelular de vários tecidos, e foi demonstrado que ela é ativamente secretada pelas células (revisto por NISHIARA *et al.*, 2001). Uma vez que essas enzimas precisam de altas concentrações de cálcio para ativação *in vitro*, o papel fisiológico das calpaínas em eventos mediados por cálcio tem sido amplamente discutido. Portanto, a forma de ativação das calpaínas *in vivo* pode ser regulada por autoproteólise e outros fatores como ligação com fosfolípídeos, inibidores ou ativadores endógenos que diminuiriam a quantidade de cálcio requerida para ativação (revisto GOLL *et al.*, 2003). Além disso, estudos recentes demonstram que μ -calpaína, m-calpaína e calpaína 10 estão presentes nas mitocôndrias, onde desempenham papéis importantes em várias condições fisiopatológicas, incluindo fenômenos de morte por apoptose e necrose (revisto por KAR *et al.*, 2009)

As funções fisiológicas das calpaínas ainda não estão bem esclarecidas, uma vez que pouco se sabe a respeito da identidade de seus substratos *in vivo*. A existência dessas enzimas e de proteínas relacionadas numa ampla variedade de organismos sugere uma função básica e essencial em eventos fisiológicos celulares, tais como remodelação do citoesqueleto, modificação proteolítica de moléculas em eventos de sinalização celular, regulação da expressão gênica, degradação de substratos em eventos apoptóticos, proliferação e regulação do ciclo celular. As calpaínas desempenham um papel mais importante no processamento de

substratos, ativando-os através da remoção de domínios auto-inibitórios, do que na degradação completa das proteínas (revisto por CARAFOLI & MOLINARI, 1998; GOLL *et al.*, 2003; MARSHALL *et al.*, 2005; KAR *et al.*, 2009).

A grande variedade de funções fisiológicas das calpaínas está relacionada a diversos processos patológicos intimamente relacionados com a ação destas enzimas. A desregulação de sua atividade tem sido envolvida, principalmente, em diversas desordens neurológicas como o mal de Alzheimer, a doença de Huntington, doença de Parkinson e esclerose múltipla (revisto por SAEZ *et al.*, 2006). Em pacientes com Alzheimer, as calpaínas estão envolvidas em eventos moleculares que conduzem a hiperfosforilação de Tau, a principal proteína encontrada nos arranjos fibrilares (HIGUCHI *et al.*, 2005). Além disso, a atividade proteolítica das calpaínas sobre Tau e outras proteínas de neurofilamentos está relacionada com a morte celular por necrose observada nesta doença (PARK & FERREIRA, 2005). Na doença de Huntington, foi identificada a ação de calpaínas, além da participação de proteossomas e caspases. Neste caso, a ação das calpaínas gera fragmentos protéicos tóxicos que levam a danos neuronais (GAFNI & ELLERBY, 2002). O aumento no nível de marcadores da atividade de calpaínas *in vivo*, como os gerados pela clivagem da α II-espectrina, abundantes em neurônios, tem sido observado em condições de injúrias hipóxicas e isquêmicas do cérebro, coração e pulmões (VANDERKLISH & BAHR, 2000). Em outros processos patológicos como no câncer (ATENCIO *et al.*, 2000), na catarata (BISWAS, 2004) e nas infecções virais (UPLA *et al.*, 2008), a atividade desregulada das calpaínas também está associada (revisto por SAEZ *et al.*, 2006). Sendo assim, a participação das calpaínas em diferentes eventos celulares, o envolvimento em diversas doenças humanas, as características moleculares e o mecanismo de ação destas enzimas fazem com que estas se tornem interessantes alvos para o desenvolvimento de drogas.

Um avanço significativo no estudo de homólogos das calpaínas veio através do avanço das técnicas de manipulações genéticas que permitiram a descoberta destas moléculas em outros organismos e uma maior facilidade de determinação de suas funções. Através dessas análises, foi demonstrado, por exemplo, que o gene *tra-3* está envolvido na cascata de determinação do sexo em *Caenorhabditis elegans* (DEAR *et al.*, 1997). Enquanto que em *Drosophila melanogaster*, foi descoberto que a proteína Sol está envolvida com o desenvolvimento do sistema nervoso, uma vez que o gene *sol* defectivo leva a uma degeneração específica nos lobos óticos, resultando numa redução do tamanho dos lobos óticos e na ausência de certas classes de neurônios (KAMEI *et al.*, 1998). Também foi possível demonstrar que a adaptação a ambientes alcalinos no fungo *Aspergillus nidulans*

requer atividade da proteína PalB, que é homóloga à superfamília das calpaínas (revisito por SORIMACHI *et al.*, 1997; FRANZ *et al.*, 1999; SAEZ *et al.*, 2006). Nos protozoários *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*, agentes causadores da malária e toxoplasmose, respectivamente, foi observada a utilização de calpaínas das células hospedeiras para facilitar o escape do vacúolo parasitóforo e/ou membrana plasmática hospedeira. A imunodepleção ou a inibição da calpaína-1 da célula hospedeira impediu o escape de *P. falciparum*, e um efeito similar foi observado em *T. gondii* pela supressão ou deleção dos genes das calpaínas de fibroblastos (CHANDRAMOHANADAS *et al.*, 2009).

8. Calpaínas nos tripanossomatídeos

Estudos voltados para a descoberta de moléculas homólogas às calpaínas em microrganismos vêm descrevendo a presença de calpaínas na família Trypanosomatidae. O primeiro relato de atividade proteolítica relacionada com calpaínas em tripanossomatídeos ocorreu no gênero *Leishmania*, onde uma cisteína-peptidase dependente de cálcio foi detectada nas formas promastigotas de *L. donovani*. Esta enzima foi denominada caldonopaína devido à sua similaridade bioquímica com a família das calpaínas, embora a reação cruzada ou homologia com genes de outras calpaínas não tenha sido reportada (BHATTACHARYA *et al.*, 1993). Apesar da identidade da proteína não ter sido confirmada, posteriormente foi demonstrado que a atividade da caldonopaína facilitaria a invasão de macrófagos por *L. donovani* (DEY *et al.*, 2006).

O tripanossomatídeo cuja caracterização de homólogos de calpaínas está mais avançada é o *Trypanosoma brucei*. Uma proteína associada ao citoesqueleto (CAP5.5) com similaridade com a região catalítica das calpaínas foi identificada neste protozoário, entretanto, não foi verificado se a proteína apresentava atividade enzimática (HERTZ-FOWLER, *et al.*, 2001). A CAP5.5 é detectada exclusivamente nas formas procíclicas do parasito e foi, de fato, o primeiro homólogo de calpaína caracterizado em tripanossomatídeos. Posteriormente, o mesmo grupo descreveu em tripomastigotas metacíclicos a expressão aumentada de uma variante análoga desta proteína, denominada CAP5.5V. Neste trabalho foi demonstrado que 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). Mais recentemente, um estudo sobre a expressão e localização celular dos homólogos de calpaínas descritos no genoma do *T. brucei* demonstrou mais uma vez haver uma expressão diferenciada destas moléculas nas diferentes fases do ciclo de vida do parasito. Também foi

relatada a relação das modificações pós-traducionais com a localização celular dos homólogos de calpaínas expressos nas diferentes formas evolutivas (LIU *et al.*, 2010).

Após a caracterização da proteína CAP5.5 nas formas procíclicas do *T. brucei* (Hertz-Fowler *et al.*, 2001), Ersfeld e colaboradores (2005) mostraram a presença de uma grande e diversa família de proteínas relacionadas às calpaínas nos tripanossomatídeos *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*. Essas proteínas foram classificadas em cinco grupos com base em suas características estruturais. Os membros dos grupos 1 e 2 apresentam quatro domínios e são denominadas proteínas calpaína-like (CALPs), destacando-se por seus domínios N-terminal: enquanto o grupo 1 contém o domínio I^K, que é altamente conservado em tripanossomatídeos, o grupo 2 contém os domínios não-conservados I^H. A caracterização dessas sequências revelou que o domínio responsável pela atividade catalítica, o domínio II, está bem conservado, embora os resíduos de aminoácidos críticos para a atividade catalítica estejam alterados. Embora os sítios de ligação do cálcio também estejam ausentes no domínio IV, em ambos os grupos, os resíduos de aminoácidos que são essenciais para a ligação do cálcio dentro do domínio II em calpains de mamíferos estão conservados em algumas sequências desses protozoários. Os membros do grupo 3 são conhecidos como proteína de kinetoplastídeos relacionadas às calpaínas (SKCRPs – *saml1 kinetoplastid calpain related protein*), consistindo apenas do domínio I^K. Seis SKRCPs foram encontrados em *T. brucei*, nove em *T. cruzi* e dez em *L. major*, com um comprimento médio de cerca de 200 aminoácidos. Este domínio não mostrou semelhanças com outras proteínas bem caracterizadas e não há nenhuma indicação quanto à sua função. Os grupos 4 e 5 contêm sequências de calpaínas altamente divergentes ainda não estudadas: no grupo 4, as proteínas são caracterizadas pela presença de três repetições de domínios II e III, e no grupo 5 por repetições N-terminais dos domínios II e III (ERSFELD *et al.*, 2005).

Boa parte dos avanços no estudo das calpaínas nos tripanossomatídeos se deve ao sequenciamento do genoma desses microrganismos, que permitiu a identificação de diversas sequências com homologia às calpaínas (ERSFELD *et al.*, 2005). Em cepas de *L. donovani*, por exemplo, a análise da sequência de seis clones genômicos demonstrou a existência de diferenças na expressão de uma proteína tipo calpaína em isoladas de pacientes que haviam desenvolvido leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea pós-calazar (PKDL) quando comparada com pacientes que apresentavam o quadro original de leishmaniose visceral. O homólogo de calpaína identificado neste estudo é um polipeptídeo pequeno, de aproximadamente 14 kDa, similar ao encontrado em *T. brucei* (CAB95480) (SALOTRA *et al.*, 2006). Em seguida, foi reportado 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 esta proteína promove a apoptose induzida por antimoniais e previne a apoptose induzida pela miltefosina (VERGNES *et al.*, 2007).

No *T. cruzi*, até o momento, pouco foi descrito a respeito de moléculas homólogas às calpaínas. Através de análises proteômicas, um estudo recente identificou a presença de proteínas tipo calpaínas em cepas de *T. cruzi* resistentes ao benzonidazol. A expressão da proteína similar à calpaína identificada foi 21 vezes maior nas amostras de cepas resistentes selecionadas *in vivo*, enquanto que as cepas resistentes *in vitro* não apresentaram diferença na expressão desta proteína (ANDRADE *et al.*, 2008). Posteriormente, GIESE e colaboradores (2008) clonaram um gene pertencente à família das calpaínas em *T. cruzi*, denominado *TcCALPx11*, que corresponde a uma proteína hipotética de 80 kDa (XP_816697.1) específica das formas epimastigotas, submetidas ao estresse nutricional que precede a metaciclogênese. Nenhuma atividade proteolítica foi verificada para este homólogo de calpaína do *T. cruzi*, e a sua expressão diferenciada sugere que a proteína poderia estar exercendo um papel na resposta ao estresse e/ou na transdução de sinal durante o processo de diferenciação do parasito (GIESE *et al.*, 2008).

Nesse contexto, nosso grupo se envolveu no estudo de homólogos das calpaínas em tripanossomatídeos. D'AVILA-LEVY e colaboradores (2003) ao investigarem as proteínas secretadas para o meio extracelular de uma cepa apossimbiótica *Crithidia deanei* se depararam com uma cisteína-peptidase que migrava na faixa de 80 kDa. Este protease foi purificada e caracterizada como uma enzima neutra dependente de cálcio que poderia ser completamente inibida por E-64 e EGTA, apresentando assim características semelhantes à família das calpaínas. Outra evidência da relação desta enzima com a família das calpaínas foi obtida através da reação cruzada contra um anticorpo específico para uma calpaína de *Drosophila melanogaster* (anti-*Dm*-calpaína). Em um estudo voltado para a busca de calpaínas em *Leishmania amazonensis*, nosso grupo identificou uma molécula homóloga à calpaína na superfície celular de formas promastigotas reativa contra o anti-*Dm*-calpaína. No mesmo estudo pode-se observar o efeito do potente inibidor de calpaína III (MDL28170) sobre a taxa de multiplicação do parasito. Este inibidor foi capaz de promover notáveis alterações celulares, culminando com a morte do parasito (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006). Recentemente, PEREIRA e colaboradores (2009) também demonstraram a presença de uma proteína similar à calpaína de *D. melanogaster* em promastigotas de *Herpetomonas samuelpessoai*, a qual era modulada ao longo do processo de diferenciação celular neste tripanossomatídeo monoxênico. Sendo assim, uma melhor caracterização das calpaínas em

tripanosomatídeos monoxênicos e heteroxênicos poderá ajudar a determinar as funções destas moléculas na família Trypanosomatidae colaborando para um maior entendimento das funções desempenhadas por estas moléculas.

9. Inibidores Proteolíticos

Essenciais participantes de uma sequência extremamente regulada e orquestrada de eventos denominados de cascata proteolítica, as peptidases estão envolvidas na regulação de uma grande variedade de processos metabólicos e fisiológicos essenciais em todos os seres vivos. Estas enzimas estão envolvidas, por exemplo, em eventos como a coagulação sanguínea, a apoptose mediada por caspases, a cascata de reação das metalopeptidases de matriz (MMP) e a cascata do sistema complemento. Entretanto, a ativação desregulada das peptidases nestes eventos pode levar a graves patologias, como artrite, câncer, esclerose múltipla, osteoporose, doenças cardiovasculares, entre outras. Portanto, em vista da importância das peptidases, as indústrias farmacêuticas e a comunidade científica têm dedicado grandes esforços no estudo destas enzimas visando o desenvolvimento de drogas efetivas para o tratamento destas patologias (revisto por AMOUR *et al.*, 2004).

Além disso, as peptidases são fatores de virulência cruciais em um grande número de microrganismos, portanto, os inibidores proteolíticos têm sido explorados no controle e prevenção de infecções (MCKERROW *et al.*, 1993; ABAD-ZAPATERO *et al.*, 1996; PORTER & SCULLY, 1998; RAO *et al.*, 1998; MUNRO & HUBE, 2002; VERMELHO *et al.*, 2007). O caso de aplicação destes inibidores no tratamento de doenças infecciosas que mais atraiu a atenção dos pesquisadores consiste no uso dos inibidores de aspártico-peptidases do vírus da imunodeficiência humana (HIV) para o tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (HO *et al.*, 1995). Estes inibidores não só demonstraram eficiência contra a AIDS, como também foram capazes de reduzir drasticamente o número de infecções oportunistas nos pacientes (PALELA *et al.*, 1998). Portanto, outros inibidores de aspártico-peptidases vêm sendo desenvolvidos como possíveis agentes terapêuticos, como os inibidores da plasmepsina para o tratamento da malária, e os inibidores das SAPs (secreted aspartic peptidases) para o tratamento da candidíase (revisto por DASH *et al.*, 2003).

Nos tripanossomatídeos, a classe de peptidases que recebe maior atenção como possível alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos é a da cisteína-peptidase. Estas enzimas foram escolhidas porque possuem atividade proteolítica proeminente nos parasitos e atividade estágio-específica. Estudos com mutantes ou com inibidores de cisteína-peptidases revelaram que estas enzimas estão envolvidas com a virulência dos parasitos,

através da modulação da resposta imune do hospedeiro, diferenciação do parasito, invasão das células hospedeiras e sobrevivência (revisão por MOTTRAM *et al.*, 1998; VERMELHO *et al.*, 2007). Nesse contexto, inibidores irreversíveis da cruzipaina, que é a principal cisteína-peptidase do *T. cruzi*, tais como diazometilcetonas, fluorometilcetonas, alilsulfonas, vinilsulfonas e vinilsulfonamidas vêm sendo investigados como potenciais agentes quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas (revisão por SOEIRO & DE CASTRO, 2009). O inibidor que apresenta resultados mais promissores é o K777 (N-piperazinil-F-Ala-homoF-Ala-vinilsulfona-fenila), que tem sido utilizado no tratamento da infecção causada por *T. cruzi* em culturas de células e em modelos de camundongos que apresentavam doença de Chagas. Além disso, este inibidor pode ser administrado por via oral, e estudos toxicológicos mostraram que é significativamente seguro para uma terapia (ENGEL *et al.*, 1998a). O tratamento de camundongos infectados com o K777 levou à redução da carga parasitária e das lesões cardíacas, enquanto que em cães da raça Beagle foi observado uma regressão do dano do miocárdio induzido pela infecção por *T. cruzi* (BARR *et al.*, 2005).

Os inibidores proteolíticos podem ter efeito terapêutico seletivo em doenças de origem microbiana (SELZER *et al.*, 1999), apesar de existir uma relativa homologia entre as enzimas proteolíticas encontradas em tripanossomatídeos e em mamíferos (BARRETT *et al.*, 2001). Porém, as células do hospedeiro apresentam redundância de genes codificando atividade proteolítica, o que não ocorre nos parasitos, que aparentemente concentram o inibidor no seu citoplasma (SELZER *et al.*, 1999). Além disso, algumas das propriedades das peptidases dos tripanossomatídeos diferem significativamente das peptidases homólogas de mamíferos, o que facilita a busca por inibidores seletivos (revisão por SAJID & MCKERROW, 2002). Além disso, compostos eficientes devem ter uma boa afinidade de ligação, com alta seletividade entre as numerosas peptidases presentes nos sistemas biológicos para evitar efeitos colaterais graves (revisão por CAZZULO *et al.*, 2001). Portanto, inibidores de atividade proteolítica podem ser uma alternativa à terapia convencional em doenças causadas por protozoários.

Particularmente, as calpains chamam a atenção pelos extensos estudos que implicam o aumento desregulado da atividade destas enzimas num amplo espectro de importantes doenças e processos biológicos, o que justificam a existência de numerosos grupos de pesquisa dedicados ao estudo dessas enzimas. Nesse contexto, um grande esforço tem sido feito no campo de pesquisa para desenvolver um meio de identificar inibidores seletivos de calpains, uma vez que muitos destes também inibem outras cisteína-peptidases, serina-peptidases ou até mesmo o proteossomo. Os inibidores de calpains sintéticos podem ser subdivididos em peptídicos e não-peptídicos. Estes primeiros podem ser também subdivididos

em reversíveis (peptídeo-aldeídos e peptídeo acetamidas) e irreversíveis (peptídeo epóxidos), mas ambos compartilham o mesmo mecanismo de ação, que consiste na formação da ligação covalente entre o grupo tiol (-SH) da cisteína do sítio ativo e o centro eletrofílico do inibidor. Acredita-se que os inibidores reversíveis são mais apropriados, em virtude da distribuição ubíqua das diferentes isoformas das calpaínas e da sua inibição não-seletiva (revisto por SAEZ *et al.*, 2006). Um dos maiores desafios encontrados no desenvolvimento de inibidores de calpaína é a permeabilidade celular, que vem sendo resolvido, por exemplo, através da esterificação do grupo carboxil com os grupos lipofílicos durante a síntese química da molécula (DONKOR, 2000; CARRAGHER, 2006). Quanto à seletividade, os peptídeos epóxidos e aldeídos são relativamente mais seletivos para as cisteína-peptidases em comparação com as serina-peptidases, mas apresentam baixa seletividade para calpaínas sobre outras peptidases (Barret, 1994). Os peptídeos cetoamidas, como os derivados de morfolina (ieAK275, AK295), benzodioxothianzines (derivado do SJA-6017) e cromonas, são altamente específicos para calpaínas quando comparados com outras cisteína-peptidases, e correspondem a terceira geração de inibidores de calpaínas desenvolvidos para melhorar a potência, a permeabilidade celular e a seletividade (NEFFE & ABELL, 2005). A quarta geração de inibidores de calpaínas é constituída pelos inibidores não-peptídicos, que possuem uma maior estabilidade, seletividade e perfis farmacológicos que os inibidores peptídicos. Esta classe de compostos são inibidores reversíveis não-competitivos que não são dirigidos contra o sítio ativo da enzima, mas que interagem com domínios calpaínas relevantes para a sua ativação (CARRAGHER, 2006).

Apesar de todo o esforço voltado para o desenvolvimento de diversos inibidores das quatro gerações nos últimos anos, nenhum inibidor de calpaínas foi aprovado em todas as fases de triagem clínica, embora venham apresentando resultados promissores na experimentação animal (revisto por WANG *et al.*, 2006). Os quelantes de cálcio aprovados pela FDA, como o EDTA, já vem sendo utilizados para remoção de metais pesados em casos de envenenamento e em tratamentos de autismo e poderiam ser uma alternativa como inibidores de calpaínas, entretanto os recentes relatos de mortes associadas ao tratamento com esses compostos vem tornando sua utilização controversa (BROWN *et al.*, 2006; BAXTER & KRENZELOK, 2008). O inibidor de calpaínas utilizado neste estudo é MDL28170 (Z-Val-Phe-CHO), também conhecido como inibidor III de calpaínas. Este inibidor apresenta alta permeabilidade celular, um mecanismo de ação reversível e atua de forma competitiva se ligando ao sítio catalítico das calpaínas. A estrutura química do MDL28170 está representada na figura 8.

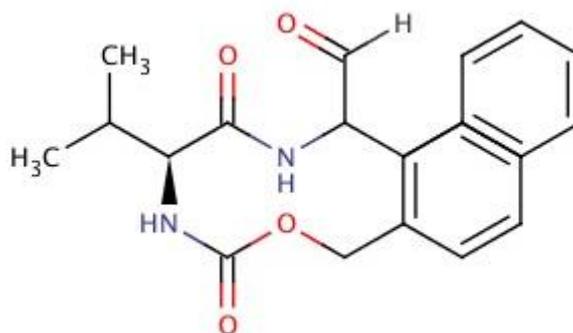


Figura 8: Estrutura química do inibidor de calpaínas MDL28170

Extraído de: http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/smi_summary?mid=J00044. Acessado em 24 de maio de 2010

Os inibidores proteolíticos disponíveis comercialmente e análogos, especificamente desenhados por modelagem molecular a partir do maior conhecimento bioquímico e estrutural das moléculas alvo, devem ser avaliados com o objetivo de se descobrir inibidores com curta duração de tratamento, de administração oral, mas potentes e com baixo custo para o tratamento da doença de Chagas.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral identificar moléculas similares às calpaínas em *Trypanosoma cruzi* e avaliar a influência do inibidor III de calpaínas sobre o ciclo de vida, diferenciação e infectividade destes flagelados.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta dissertação deram origem aos seguintes artigos:

1. Sangenito LS#, **Ennes-Vidal V**#, Marinho FA, Da Mota FF, Santos ALS, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH (2009) Arrested growth of *Trypanosoma cruzi* by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms. *Parasitology* 136(4):433-411. # Os autores contribuíram igualmente para este trabalho.
2. **Ennes-Vidal V**, Menna-Barreto RF, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM (2010) Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy: in press*.
3. **Ennes-Vidal V**, Menna-Barreto RF, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM (2010) MDL28170, a potent calpain inhibitor, affects *T. cruzi* metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. Submetido para publicação na revista eletrônica *Plos Neglected Tropical Diseases*.

Artigo 1: Arrested growth of *Trypanosoma cruzi* by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms

Sangenito LS#, **Ennes-Vidal V#**, Marinho FA, Da Mota FF, Santos ALS, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH.

Esses autores contribuíram igualmente para este trabalho.

Parasitology 136(4):433-411, 2009

Este primeiro artigo trata dos primeiros 4 objetivos da dissertação, onde pudemos identificar moléculas homólogas às calpaínas nas formas epimastigotas de diferentes linhagens do *Trypanosoma cruzi* e verificamos o efeito do inibidor III (MDL28170) de calpaínas sobre esses parasitos. A identificação das moléculas similares às calpaínas foi verificada através da reatividade cruzada dos anticorpos direcionados contra as calpaínas de *Drosophila melanogaster* e *Trypanosoma brucei*, observados por citometria de fluxo. O anti-*Dm*-calpaína também foi capaz de reagir contra uma proteína com massa molecular ao redor de 80 kDa no ensaio de Western Blotting. Quando analisamos a homologia existente entre proteínas do *T. cruzi* e a proteína utilizada para gerar o anticorpo anti-calpaína de *D. melanogaster*, nós pudemos observar que o parasita apresenta 4 seqüências com similaridade à calpaína do inseto em seu genoma, e massa molecular predita em torno de 80 kDa, o que reforça a possibilidade do anticorpo estar reconhecendo calpaínas no *T. cruzi*. O efeito do inibidor III de calpaínas (MDL28170) foi verificado em epimastigotas de três linhagens evolutivas diferentes do *T. cruzi*, com pequenas variações entre as mesmas. O inibidor teve um efeito tripanostático, uma vez que epimastigotas lavados e cultivados em novo meio livre de drogas retomam seu crescimento. Por fim, verificamos a queda na expressão da cruzipaina pelo ensaio de citometria de fluxo nos parasitos tratados com a concentração do IC₅₀ do MDL28170. Os resultados desse trabalho motivaram nosso grupo a continuar estudando a presença desses homólogos de calpaínas ainda pouco caracterizados no *T. cruzi* e os efeitos do inibidor de calpaínas sobre as diferentes formas evolutivas do parasito. A primeira autoria do artigo ficou dividida com um aluno colaborador do Laboratório de Bioquímica de Proteases do Instituto de Microbiologia da UFRJ, que desenvolveu um trabalho similar durante sua monografia, uma vez que ambos contribuíram igualmente nos resultados e na preparação do artigo.

Arrested growth of *Trypanosoma cruzi* by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms

L. S. SANGENITO¹#, V. ENNES-VIDAL²#, F. A. MARINHO¹, F. F. DA MOTA³,
A. L. S. SANTOS¹, C. M. D'AVILA-LEVY² and M. H. BRANQUINHA¹*

¹Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática e Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

(Received 14 November 2008; revised 26 December 2008 and 8 January 2009; accepted 9 January 2009)

SUMMARY

In this paper, we aimed to explore the effects of the calpain inhibitor III (MDL28170) and to detect calpain-like molecules (CALPs) in epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* isolate Dm28c. MDL28170 at 70 μM promoted a powerful reduction in the growth rate after 48 h. The IC_{50} value was calculated to be 31.7 μM . This inhibitor promoted an increase in the cellular volume, but not cell lysis, resulting in a trypanostatic effect. *T. cruzi* CALPs presented a strong cross-reactivity with anti-*Drosophila melanogaster* calpain and anti-cytoskeleton-associated protein from *Trypanosoma brucei* antibodies, and labelling was found mainly intracellularly. Furthermore, an 80 kDa reactive protein was detected by Western blotting assays. No significant cross-reactivity was found with anti-human brain calpain antibody. The expression of CALPs was decreased in cells kept for long periods in axenic cultures in comparison to a strain recently isolated from mice, as well as in MDL28170-treated cells, the latter being paralleled by an increased expression of cruzipain. Different levels of CALPs expression were also detected in distinct phylogenetic lineages, like Y strain (lineage TCI), Dm28c (TCII) and INPA6147 strain (Z3 zymodeme). These results may contribute for the investigation of the functions of CALPs in trypanosomatids.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, calpain, peptidase, inhibitor.

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is the aetiological agent of Chagas disease, also known as American trypanosomiasis. Chagas disease affects from 16 to 18 million people in the Americas, causing 21 000 deaths yearly and 40 million are at risk of infection throughout Central and South America (WHO, 2005). The life cycle of the parasite involves several stages of differentiation; in the mammalian host, the parasite has an obligate intracellular replicative form, the amastigote, and a non-replicative form, the bloodstream trypomastigote. The major forms present in the insect vector are also a replicative stage, the epimastigote, and a non-replicative stage, the infective metacyclic trypomastigote. The epimastigote form can be readily

obtained in axenic culture, and has been used for this reason in most biochemical studies performed on the parasite (Cazzulo *et al.* 2001).

Peptidases of microbial pathogens, including *T. cruzi*, have attracted the attention of many laboratories because of their roles in pathogenesis (Cazzulo *et al.* 2001; Vermelho *et al.* 2007), but less is known about the presence of a group of peptidases, the calpains. These enzymes constitute a large family of calcium-dependent cytosolic cysteine peptidases that have been characterized mainly in humans and that exist in 2 major isoforms, m-calpain and μ -calpain, which require millimolar and micromolar concentrations of Ca^{2+} , respectively, for their activation. The role of calpain remains poorly understood, but it may participate in a variety of cellular processes, including the rearrangement of cytoskeletal proteins, different signal transduction pathways and apoptosis (Goll *et al.* 2003). Calpain activation in humans seems to be increased during normal ageing and in muscular dystrophy, cataract, arthritis and Alzheimer's disease, and in many acute traumas. A variety of calpain inhibitors are under development and the potential clinical utility of these

* Corresponding author: Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Av. Carlos Chagas Filho, 373, Bloco I, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, 21941-902, Brazil. Tel: +55 21 2562 6743. Fax: +55 21 2560 8344. E-mail: mbranquinha@micro.ufrj.br

These authors contributed equally to the work.

inhibitors has been shown to treat Alzheimer's disease (Battaglia *et al.* 2003) and to minimize neuronal death after ischaemia (Hayes *et al.* 1998).

The presence of large numbers of calpain-related proteins (CALPs) in trypanosomatids has been revealed by some groups, although there are no data as yet on the specific functions of the calpain-like proteins in these microorganisms (Hertz-Fowler *et al.* 2001; Ramos *et al.* 2004; Ersfeld *et al.* 2005; Salotra *et al.* 2006; Vergnes *et al.* 2007; Andrade *et al.* 2008). Our group became involved in the study of these proteins though the purification of a proteolytically active CALP in the culture supernatant of the insect trypanosomatid *Crithidia deanei*, yet its function was not addressed (d'Avila-Levy *et al.* 2003). More recently, our group investigated the effect of calpain inhibitor III (MDL28170), a potent calpain inhibitor, on the growth of *Leishmania amazonensis*. This inhibitor promoted cellular alterations and arrested the cellular growth of the parasite, and a CALP was identified and detected on the cell surface of the flagellate (d'Avila-Levy *et al.* 2006a).

In this paper, we extended our studies on the presence of CALPs in trypanosomatids by investigating the inhibitory capability of MDL28170 against *T. cruzi*, aiming to show its effects on the growth and morphology of epimastigote forms. In addition, we have demonstrated the presence of calpain homologues in 3 distinct *T. cruzi* strains.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and cultivation

Epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* Dm28c (lineage TCII), Y (lineage TCI) and INPA 4167 (Z3 zymodeme) strains were grown in 3·7% brain heart infusion medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum at 28 °C for 4 days to reach late-log phase growth. Alternatively, epimastigote forms of Dm28c were obtained from the differentiation of trypomastigotes after a blood passage in mice; in this case, epimastigotes were kept for no more than 3 passages in the axenic culture.

Effects of the calpain inhibitor on growth rate and cell morphology

The effects of calpain inhibitor III (MDL28170; Z-Val-Phe-CHO; purchased from Calbiochem, San Diego, CA, USA) on epimastigotes of *T. cruzi* were assessed by a method similar to that previously described elsewhere (d'Avila-Levy *et al.* 2006a). Briefly, epimastigotes were counted using a Neubauer chamber and resuspended in fresh medium to a final concentration of 5×10^6 viable epimastigotes per ml. The viability was assessed by mobility and lack of staining after challenging with trypan blue. MDL28170 was added to the culture at

final concentrations in the 10–70 μM range (starting from a 5 mM solution in dimethylsulfoxide (DMSO) that was serially diluted in culture medium). A dilution of DMSO corresponding to that used to prepare the highest drug concentration was assessed in parallel. After incubation for 24, 48, 72 and 96 h at 28 °C, the number of viable, motile epimastigotes was quantified by counting the flagellates in a Neubauer chamber. Alternatively, parasites grown for 72 h in the absence and in the presence of the calpain inhibitor were washed 5 times in cold phosphate-buffered saline (PBS; 150 mM NaCl, 20 mM phosphate buffer, pH 7·2) prior to resuspension in a drug-free fresh medium and allowed to grow for another 72 h, in order to evaluate the trypanocidal or trypanostatic effect. The number of live epimastigotes was evaluated as well as cell morphology (after Giemsa staining) under optical microscopy at 24-h intervals (Mendonça-Filho *et al.* 2004). The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was evaluated after 72 h. This value was determined by linear regression analysis, by plotting the number of viable epimastigotes versus log drug concentration by use of Origin Pro 7.5 computer software.

Identification of CALPs by Western blotting

T. cruzi Dm28c cells were collected by centrifugation (500 $\text{g}/5 \text{ min}/4 \text{ }^\circ\text{C}$) and washed 3 times with cold PBS. Trypanosomes (10^8 cells) were resuspended in 100 μl of PBS and lysed by the addition of 1% SDS (Santos *et al.* 2006). The *Drosophila* extracts (kindly provided by Dr Alexandre Afranio Peixoto, FIOCRUZ, RJ, Brazil) were prepared in the extraction buffer (25 mM Hepes pH 7·2, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM β -mercaptoethanol and 250 mM sucrose). About 10 frozen flies were crushed, suspended with 200 ml of cold extraction buffer and homogenized in a Teflon/glass homogenizer with 10–12 strokes at 4 °C. The homogenate was carefully mixed and centrifuged at 100 000 g for 1 h at 4 °C. The supernatant was stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Protein concentration was determined by the method described by Lowry *et al.* (1951), using BSA as standard.

Immunoblot analysis was performed with total cellular extracts equivalent to 100 μg of protein, as previously described (d'Avila-Levy *et al.* 2005). The primary antibody used was a rabbit antiserum raised against *Drosophila melanogaster* calpain (anti-Dm-calpain; Emori and Saigo, 1994), at a dilution of 1:500. The secondary antibody used was peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG at a dilution of 1:25 000 followed by chemiluminescence immunodetection after reaction with ECL reagents (d'Avila-Levy *et al.* 2005). The relative molecular mass of the reactive polypeptide was calculated by comparison with the mobility of SDS-PAGE standards.

Flow cytometry and immunofluorescence microscopy for calpain detection

Epimastigotes (1×10^7 cells) used for these experiments were fixed at 4 °C in 0.4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.2) for 30 min, followed by extensive washing in the same buffer. Alternatively, the fixed cells were permeabilized by 0.01% Triton X-100 in PBS for 15 min at room temperature and then washed twice in PBS. The fixed and permeabilized cells maintained their morphological integrity, as verified by optical microscopic observation. After this step, the cells were incubated for 1 h at room temperature with a 1:500 dilution of the following polyclonal antibodies: rabbit anti-Dm-calpain polyclonal antibody (Emori and Saigo, 1994); anti-C21, raised against the whole molecule of human brain m-calpain (Grynspan *et al.* 1997); and anti-CAP5.5, raised against the cytoskeleton-associated protein from *Trypanosoma brucei* (Hertz-Fowler *et al.* 2001). Cells were then incubated for an additional hour with a 1:200 dilution of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled goat anti-rabbit IgG (d'Avila-Levy *et al.* 2006b). The cells were then washed 3 times in PBS and observed in a Zeiss epifluorescence microscope (Axioplan 2). Alternatively, the parasite-associated fluorescence was excited at 488 nm and quantified on a flow 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 analysed for log green fluorescence by using a single-parameter histogram.

Effects of the calpain inhibitor on peptidase expression

Epimastigotes (5×10^6 cells) of Dm28c were incubated with MDL28170 at the IC_{50} concentration for 24 h at 28 °C. Thereafter, cells were fixed and processed for flow cytometry analysis as previously described, employing a 1:500 dilution of the polyclonal antibodies anti-Dm-calpain and anti-cruzipain, the latter raised against the major cysteine peptidase of *T. cruzi* epimastigote forms (Cazzulo *et al.* 2001).

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate, in 3 independent experimental sets. The data were analysed statistically by means of Student's *t*-test using EPI-INFO 6.04 (Database and Statistics Program for Public Health) computer software. *P* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

Sequence data analysis

A search for Dm-calpain homologous proteins in *T. cruzi* was performed using the BlastP algorithm and the nr database at NCBI (GenBank). The theoretical molecular mass of homologous proteins was calculated using the ExpASY Server facilities (<http://expasy.org>). Identification of conserved domains was performed using the CD-Search Tool and Conserved Domain Database (CDD 27036 PSSMs) at NCBI.

RESULTS

The calpain inhibitor III (MDL28170) was added to *T. cruzi* clone Dm28c epimastigote forms in concentrations ranging from 20 to 70 μM , and the cellular growth was monitored for 4 days *in vitro*. Our results showed that MDL28170 arrested the growth in a dose-dependent manner (Fig. 1A). The lowest concentration of the drug (20 μM) presented a significant inhibitory effect only after 72 h of growth, but the remaining concentrations promoted reduced levels of growth that were statistically significant after 48 h (Fig. 1A). The calpain inhibitor at 50 μM decreased the growth rate by approximately 70–75% in the 48–96 h interval, and at 70 μM promoted a reduction in the cellular growth rate of around 91% after 48 h, and this ratio was also maintained up to 96 h of growth (Fig. 1A). Conversely, DMSO did not significantly affect the parasite growth behaviour (Fig. 1A). The same conditions performed for Dm28c were employed for the analysis of the effects of MDL28170 upon Y and INPA4167 strains, and similar profiles of growth inhibition were observed (data not shown). These strains were chosen to represent members of distinct *T. cruzi* lineages: TCI (Y strain), TCII (Dm28c) and Z3 zymodeme (INPA4167 strain). The IC_{50} was calculated for each strain, and similar values were detected: 31.7 μM (Dm28c), 34.3 μM (Y) and 37.4 μM (INPA4167).

The anti-trypanosomal activity of this inhibitor was reversible, since *T. cruzi* cells pre-treated for 72 h with the calpain inhibitor at 70 μM resumed growth when subcultured in a drug-free fresh medium (data not shown). Optical microscopy observations of *T. cruzi* Dm28c cells treated with the calpain inhibitor in the 20–70 μM range revealed, irrespective to the drug concentration, an increase in the cell volume, with the flagellates becoming round and some of them presenting no detectable flagellum (Fig. 1C, *b–i*), but no cell lysis was observed, corroborating the trypanostatic effect on the epimastigote growth. Cells cultured in the presence of DMSO at a dose used to dissolve the highest concentration of MDL28170 did not present any detectable morphological alterations (data not shown).

As demonstrated by flow cytometry and fluorescence microscopy analyses, the anti-Dm-calpain

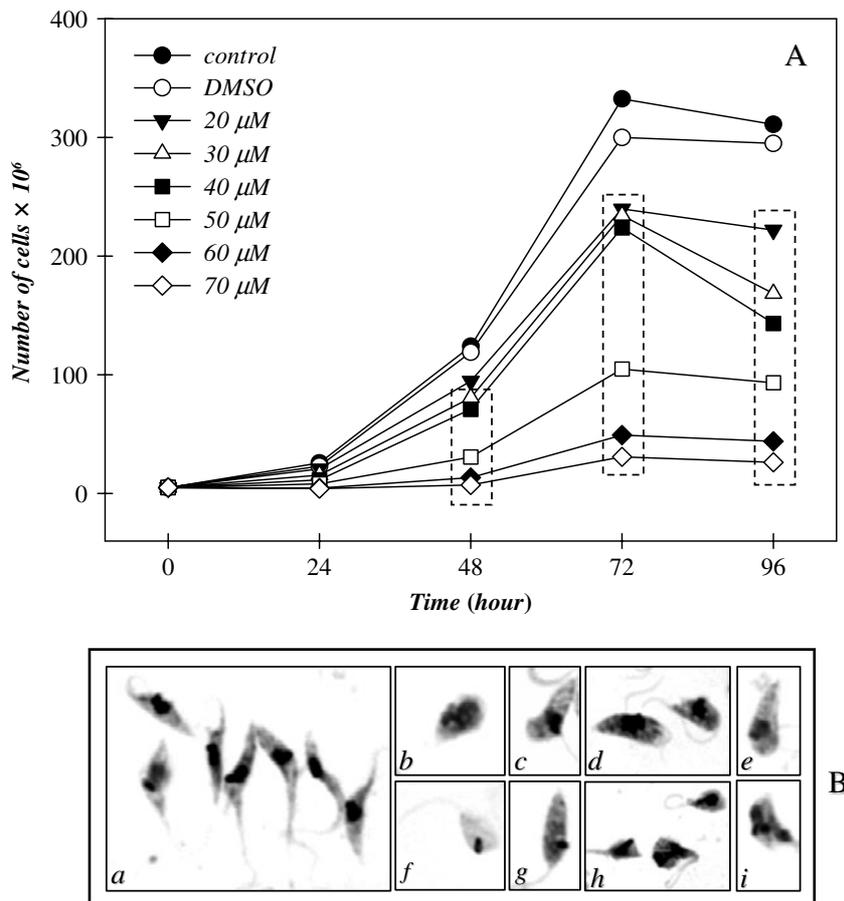


Fig. 1. Effect of calpain inhibitor III (MDL28170) on the growth rate and cellular morphology of *Trypanosoma cruzi* Dm28c. The growth pattern of the parasite was followed at 28 °C in the absence (control) or in the presence of MDL28170 (A) at concentrations ranging from 20 and 70 μ M. The inhibitor was added to the cultures at 0 h, and the cells were counted daily. DMSO, used as the drug diluent, did not interfere with growth behaviour. Data shown are the mean of 3 independent experiments performed in triplicate. The dashed boxes highlight growth rates significantly different from control (P values ≤ 0.05). (B) Microscopic observations of the viability of epimastigote forms when incubated in the absence or in the presence of MDL28170. Control cells were cultured in BHI medium (a). Cells cultured in the presence of MDL28170 at 20–70 μ M showed similar morphological alterations (b–i).

antibody was found to react with the cell surface of *T. cruzi* (Fig. 2A, B). In fixed/permeabilized cells, the antibody binding was stronger, being intensely detected in the whole cell body but not in the flagellum (Fig. 2A, B). In addition, a polypeptide band migrating at approximately 80 kDa was detected in the trypanosomatid cell lysate by cross-reactivity with the same antibody (Fig. 2A, inset). As a positive control, lysates of *D. melanogaster* cells presented a polypeptide with the same molecular mass that was recognized by anti-Dm-calpain antibody (Fig. 2A, inset).

Since we cannot exclude the possibility that the anti-Dm-calpain polyclonal antibody may cross-react with proteins unrelated to CALPs in *T. cruzi*, a search for homologues of *D. melanogaster* CALP in *T. cruzi* genome was performed. The fragment of the *D. melanogaster* protein CAA55297.1 that was employed to generate the antibody used in this work (Emori and Saigo, 1994) was compared in a

BlastP analysis with *T. cruzi* proteins found in GenBank data base (data not shown). The first 15 hits (homologues with e-value ranging from 2e-8 to 0.003) all corresponded to calcium-dependent cysteine peptidases and had their theoretical molecular mass determined, and 4 out of these 15 homologues presented a molecular mass around 80 kDa: XP_816697.1 (78.3 kDa), XP_803757.1 (80.8 kDa), XP_820102.1 (82.4 kDa) and XP_816696.1 (82.6 kDa). These 4 proteins presented only 2 conserved domains (cd00044 and pfam09149) and showed high similarity to each other, which indicates the possibility of being isoenzymes. The conserved domain cd00044 is shared with the fragment of the protein CAA55297.1, which supports the recognition of *T. cruzi* 80 kDa CALPS by the anti-Dm-calpain antibody.

Parasite cells, either grown in axenic cultures without passages *in vivo* or obtained after the differentiation of trypomastigotes recently isolated

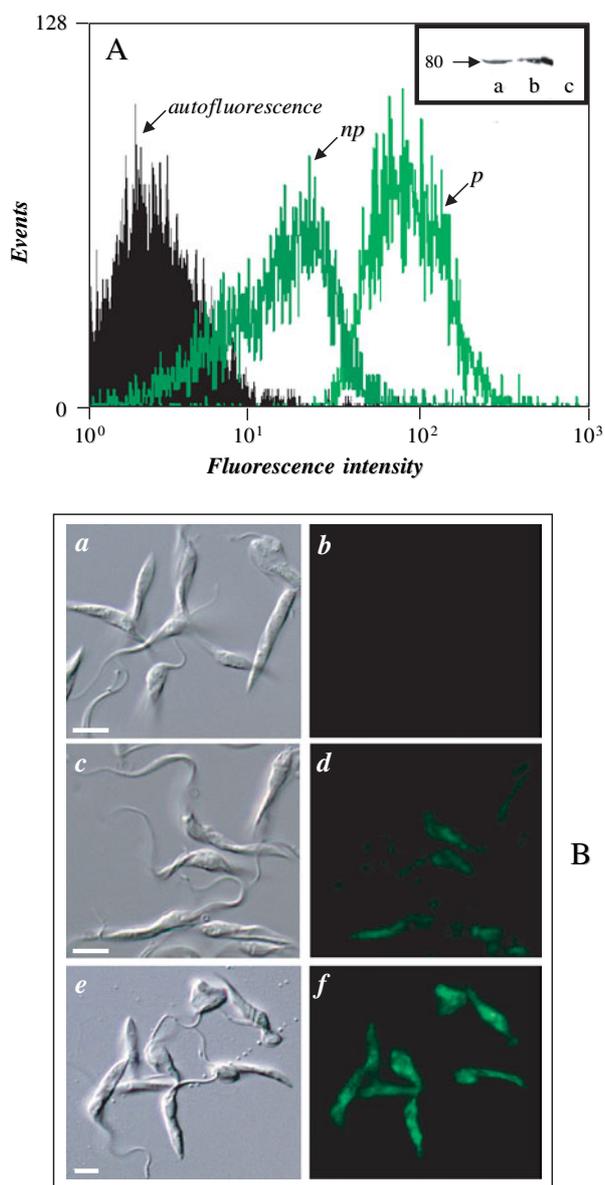


Fig. 2. Detection of cross-reactivity between a calpain-like protein from *Trypanosoma cruzi* Dm28c and *Drosophila melanogaster* calpain (Dm-calpain). (A) Flow cytometric analysis showing the anti-Dm-calpain antibody binding to *T. cruzi*. Paraformaldehyde-fixed cells were permeabilized (*p*) or not (*np*) with Triton X-100 and then incubated in the absence (autofluorescence) or in the presence of anti-Dm-calpain antibody at 1 : 500 dilution, in order to be analysed by flow cytometry. For simplicity, only the autofluorescence of non-permeabilized cells is shown, since the permeabilized cells presented similar values (data not shown). When treated only with the secondary-FITC antibody, both permeabilized and non-permeabilized cells generated similar curves to that observed in the autofluorescence of cells (not shown). Representative data of the analysis of 10 000 cells from 1 of 3 experiments are shown. The inset shows the Western blotting analysis of polypeptides from *T. cruzi* (lane a) and *D. melanogaster* cell extract (lane b) probed with anti-Dm-calpain antibody. In lane c, the blotted proteins from *T. cruzi* were incubated only with the secondary-peroxidase antibody, and no reactive

from infected mice, were processed for flow cytometric analysis using anti-Dm-calpain in order to estimate the influence of *in vitro* maintenance of *T. cruzi* Dm28c epimastigote forms upon the expression of CALPs. A decrease in the relative CALPs expression between newly isolated and *in vitro*-maintained cells did take place, as demonstrated in Fig. 3A. In addition, 2 anti-calpain antibodies with distinct specificities were also employed in order to detect the possible binding of different anti-calpain antibodies to calpain-like molecules of *T. cruzi* Dm28c: anti-C21, raised against the whole molecule of human brain m-calpain (Grynspan *et al.* 1997); and anti-CAP5.5, raised against the cytoskeleton-associated protein from *T. brucei* (Hertz-Fowler *et al.* 2001). In both cases, cells were fixed and permeabilized, or not, with Triton X-100. When anti-C21 antibodies were employed, there were no significant differences in labelling among fixed and permeabilized cells and the labelling itself is very close to the autofluorescence of cells, which indicates the lack of immunological similarity between human brain m-calpain and *T. cruzi* CALPs. Conversely, fixed/permeabilized *T. cruzi* cells showed an intense labelling with anti-CAP5.5; the antibody binding was drastically diminished when fixed cells were not permeabilized (Fig. 3B).

A flow cytometric analysis was also performed in order to compare the relative levels of expression of CALPs in *T. cruzi* strains belonging to different phylogenetic lineages. To accomplish this, anti-Dm calpain antibodies were employed in fixed and/or permeabilized cells from members of each parasite lineage. In the 3 strains studied, the permeabilization with Triton X-100 raised significantly the mean of fluorescence intensity (MFI) values, which indicates that CALPs are located mainly intracellularly but also on the cell surface. In addition, distinct levels of expression of CALPs were detected: higher levels (twice as many) were found for Y strain in comparison to Dm28c, and a reduced labelling was found in INPA4167 strain (Fig. 4).

We also aimed to assess whether the MDL28170-treated cells of Dm28c presented any change in the levels of expression of CALPs and cruzipain in comparison to non-treated cells. Flow cytometry

polypeptide was detected. The number on the left indicates the apparent molecular mass, expressed in kDa, of the reactive polypeptide. (B) Fluorescence microscopy showing the labelling of *T. cruzi* with anti-Dm-calpain antibody. Fixed cells (*a–d*) and fixed-permeabilized cells (*e, f*) were analysed under differential interferential contrast images (*a, c, e*) and immunofluorescence (*b, d, f*). Parasites treated only with the secondary antibody presented no fluorescence intensity (*b*). The bars represent 1 μ m.

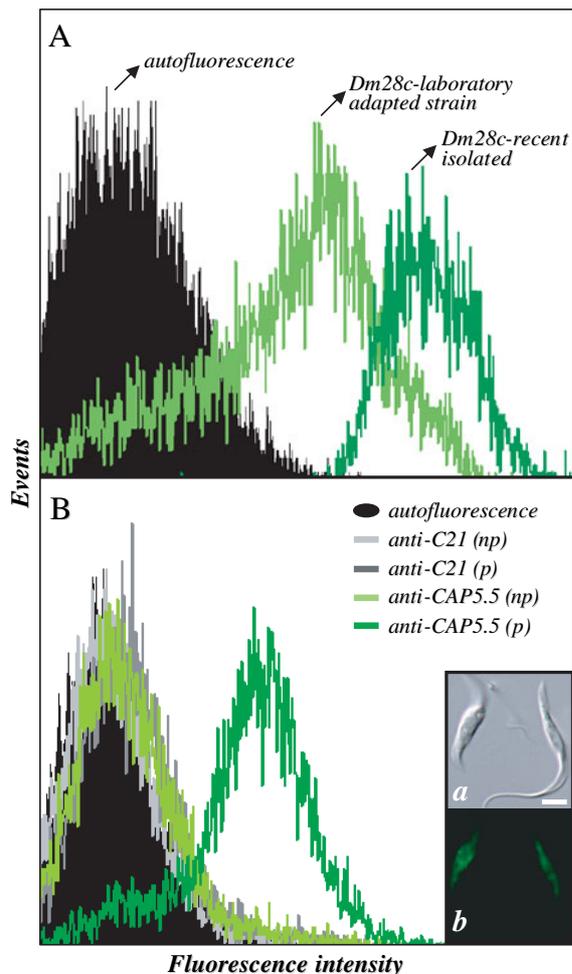


Fig. 3. Detection of binding of anti-calpain antibodies to *Trypanosoma cruzi* Dm28c epimastigote forms by flow cytometric analysis. (A) Cells regularly kept in BHI axenic culture (*Dm28c-laboratory adapted strain*) and cells obtained from the differentiation of trypomastigotes after a blood passage in mice (*Dm28c-recent isolated*) were fixed with paraformaldehyde and incubated in the absence (autofluorescence) or in the presence of anti-Dm-calpain antibody at 1 : 500 dilution. (B) Cells regularly kept in BHI axenic culture were fixed with paraformaldehyde, permeabilized (*p*) or not (*np*) with Triton X-100 and then incubated in the absence (autofluorescence) or in the presence of anti-C21 or anti-CAP5.5 antibodies at 1 : 500 dilution. Representative data of the analysis of 10 000 cells from 1 of 3 experiments are shown. The data from autofluorescence, fixed/permeabilized cells incubated with anti-C21 and fixed cells incubated with anti-CAP5.5 overlapped. The inset shows the fluorescence microscopy of *T. cruzi* permeabilized cells labelled with anti-CAP5.5 antibody. Note the fluorescence all over the cell body, but not in the flagellar region. The bar represents 1 μm .

analyses revealed that both peptidases had their expression altered significantly when parasites were subjected to the presence of the calpain inhibitor: a reduction in the contents of CALPs was paralleled by an increased expression of cruzipain (Table 1).

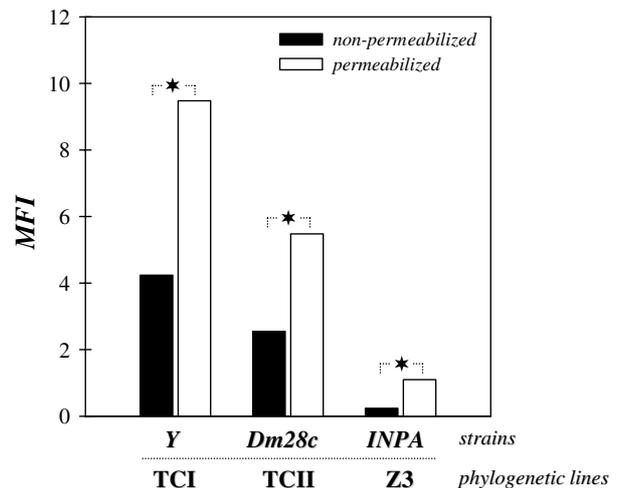


Fig. 4. The mean of the fluorescence intensity (MFI) calculated from the flow cytometric analysis of the anti-Dm-calpain antibody binding to *Trypanosoma cruzi* strains belonging to lineage TCI (Y strain), lineage TCII (Dm28c) and zymodeme Z3 (INPA4167 strain). Paraformaldehyde-fixed cells were permeabilized or not with Triton X-100 and incubated in the absence or in the presence of anti-Dm-calpain antibody at 1 : 500 dilution, and then analysed by flow cytometry. Representative data of the analysis of 10 000 cells from 1 of 3 experiments are shown. The asterisks highlight that MFI values from fixed and permeabilized cells are significantly different from each other (P values ≤ 0.05). Note that the MFI was also distinct among each strain.

DISCUSSION

In a previous study from our group, we showed that MDL28170, which is a potent, reversible and cell-permeable human calpain inhibitor (Rami *et al.* 1997), arrested the growth of *L. amazonensis* in a dose-dependent manner (d'Avila-Levy *et al.* 2006a). In this paper, a similar approach was employed in order to explore the effects of this calpain inhibitor upon *T. cruzi* growth and to establish the differences amongst both trypanosomatids with respect to the parasites' growth behaviour. Our results showed that the calpain inhibitor also arrested the growth of *T. cruzi* in a dose-dependent manner. When the IC_{50} values of MDL28170 for *T. cruzi* strains are compared to the calculated value for *L. amazonensis*, it is clear that the latter parasite, to which the IC_{50} value is 19 μM (d'Avila-Levy *et al.* 2006a), is more sensitive to MDL28170 than *T. cruzi*. These results are validated through the observation that the anti-trypanosomal activity of this inhibitor was reversible, while the anti-leishmanial activity of this compound at 25 μM is irreversible (d'Avila-Levy *et al.* 2006a). Similar optical microscopy observations (round-shaped cells) were described in other trypanosomatids when treated with cysteine peptidase inhibitors, due to osmotic stress caused by the peptidase inhibitor (Troeborg *et al.* 1999; Santos *et al.* 2006).

Table 1. Detection of binding of anti-Dm-calpain and anti-cruzipain antibodies to untreated and MDL28170-treated *Trypanosoma cruzi* Dm28c epimastigote forms by flow cytometric analysis

Antibodies	% Fluorescent cells		Statistics
	Control cells	MDL28170-treated cells	
Anti-Dm-calpain	25.4 ± 0.6	12.6 ± 1.1	$P \leq 0.01$
Anti-cruzipain	65.7 ± 2.4	98.0 ± 0.9	$P \leq 0.05$

Although MDL28170 is a relatively specific calpain inhibitor, it cannot be ruled out that this inhibitor acts on other cysteine peptidases to a lesser extent, mainly cathepsins B (Rami *et al.* 1997). Nevertheless, our results suggest that, as it occurs with *L. amazonensis* (d'Avila-Levy *et al.* 2006a), *T. cruzi* possesses molecules that share antigens with invertebrate calpain-related enzymes, which suggests that CALPs may be the major target of MDL28170. The cross-reactivity of anti-Dm calpain antibodies and trypanosomatid proteins was already detected in *C. deanei* extracellular calpain-like peptidase (d'Avila-Levy *et al.* 2003). Recently, our group has demonstrated that a CALP that cross-reacted with the same antibody was detected in both the cellular body and flagellum of *Herpetomonas samuelpessoai* promastigote cells, and its presence is enhanced in DMSO-induced paramastigote cells (Pereira *et al.* 2009). Based on sequence analyses, our study identified 4 *T. cruzi* CALPs of around 80 kDa that share the same conserved domain (cd00044) with the fragment of the protein CAA55297.1 that was employed to generate the anti-Dm-calpain antibody. For this reason, it is reasonable to presume that this antibody is capable of recognizing these 4 *T. cruzi* proteins. In this sense, it is already known that anti-Dm-calpain antibody does not recognize mammalian m-calpain and μ -calpain (Emori and Saigo, 1994). Recently, a member of the family of CALPs in *T. cruzi* was characterized (Giese *et al.* 2008). The gene encoding TcCALPx11 corresponds to the protein XP_816697.1 and it is epimastigote-specific, being expressed mainly in epimastigotes subjected to the nutritional stress that precedes metacyclogenesis. No proteolytic activity was detected for this 80 kDa protein, and its differential expression may suggest that this protein may have a role in the *T. cruzi* stress response and/or in signal transduction.

In this study, we have also presented evidence that the maintenance of *T. cruzi* in axenic culture for a long time led to a decrease in the expression of CALPs. It has been reported that the long-term maintenance of *T. cruzi* cells in axenic cultures can select subpopulations less virulent than the parental

strains, and the loss of virulence is associated with modification of the biological properties of this parasite that might lead to changes in the expression of some proteins (Contreras *et al.* 1998). Although a direct relationship between the expression of CALPs and parasite virulence cannot be established, our results raise the interesting possibility that this correlation might occur. Simultaneously, the absence of cross-reactivity between CALPs in *T. cruzi* and anti-human m-calpain is suggestive of substantial structural differences among these molecules. In this sense, Ersfeld *et al.* (2005) showed the presence of a large and diverse family of CALPs in *T. brucei*, *Leishmania major* and in *T. cruzi* displaying altered amino acid residues essential for catalytic activity and a moderate overall degree of sequence identity, which suggests that most CALPs do not have proteolytic activity. This large family exceeds the numbers found in most other organisms, which may point to organism-specific functions for these proteins.

Our results also indicate that CALPs in *T. cruzi* that cross-react with anti-CAP5.5 are located mainly in the intracellular milieu. CAP5.5 protein was the first characterized member of calpain-related genes in a trypanosomatid, specifically in *T. brucei* (Hertz-Fowler *et al.* 2001). This protein is characterized by the similarity to the catalytic region of calpain-type peptidases and it is detected exclusively in procyclic forms. CAP5.5 has been shown to be both myristoylated and palmitoylated, suggesting a stable interaction with the cell membrane through interactions with the underlying microtubule cytoskeleton as well. Interestingly, in our study the anti-CAP5.5 antibody labelled the whole cell body excluding the flagellum, as it occurs with *T. brucei*. Our results may indicate a possible correlation regarding the location of a subset of CALPs in both trypanosomes.

It is well established that many *T. cruzi* strains display a high level of biological divergence, which led to the development of many criteria for the grouping of these strains; early studies revealed substantial isozymic variability among isolates, defining 3 major groups or zymodemes – Z1, Z2 and Z3 (Miles *et al.* 1978). Subsequently, the use of DNA markers (Souto *et al.* 1996) proved the division of *T. cruzi* into 2 major phylogenetic lineages: lineage TCI (to which Z2 stocks belong) and lineage TCII (into which Z1 stocks fall). On the other hand, the position of Z3 zymodeme is still under review. In this sense, our results demonstrate a direct correlation between relative levels of CALP detection and *T. cruzi* strain classification, so it is possible that modulation in the expression of these proteins does take place. Nevertheless, the lineage-associated differences in CALPs expression must be confirmed by the use of a larger number of strains.

Fluctuations of the expression levels of CALPs were also observed when Dm28c cells were treated

for 24 h with MDL28170 at IC₅₀: reduced labelling was found in treated cells, and a simultaneous increase in cruzipain expression was detected. Cruzipain is the major cysteine peptidase in *T. cruzi*, being expressed at different levels by distinct parasite stages, and much evidence points to its participation in penetration into the host cell, escape from the immune system and in the differentiation processes (Cazzulo *et al.* 2001). The lethal effect of cruzipain inhibitors was due to inhibition of the auto-catalytic processing of the enzyme, leading to a decrease of its amount in lysosomes and its accumulation in the Golgi (Engel *et al.* 1998). Resistance of *T. cruzi* strains to cruzipain inhibitors is correlated with negligible levels of cruzipain activity and secretion of cruzipain precursors into the medium, with the concomitant upregulation of expression of a distinct 30 kDa cysteine peptidase (Engel *et al.* 2000; Yong *et al.* 2000). In this case, it was supposed that the metabolic needs for cruzipain may be partly compensated by the increased expression of the 30 kDa enzyme (Yong *et al.* 2000). Interestingly, overexpression of cruzipain in *T. cruzi* transfectants has been associated with enhanced metacyclogenesis but not with increased infectivity (Tomas *et al.* 1997). Collectively, these biochemical changes may demonstrate a correlation of the expression levels of cysteine peptidases in *T. cruzi*, and it is tempting to speculate that, as previously suggested by Yong *et al.* (2000), the overexpression of a certain cysteine peptidase may be necessary in order to titrate out the toxic levels of the inhibitor compound that is active against a different peptidase from the same class.

There are no data as yet on the specific functions of any CALPs in trypanosomatids. The investigation of changes in parasite gene expression between drug resistant/sensitive strains and in the up-regulation of virulence-related genes in infective forms has brought to the fore the involvement of calpain-like proteins in distinct processes in trypanosomatids (Salotra *et al.* 2006; Vergnes *et al.* 2007; Andrade *et al.* 2008). Life cycle-specific expression may also demarcate the search for specific functions of these CALPs (Saxena *et al.* 2003; Giese *et al.* 2008). Altogether, the results presented herein may contribute to the investigation of the presence and the functions of CALPs in trypanosomatids. The global analyses concerning the functions of these CALPs may provide new understandings on the mechanisms that gave rise to such a diverse family of proteins in these organisms.

This study was supported by MCT/CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FUIB (Fundação Universitária José Bonifácio), CEPG/UFRJ, FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). The authors are grateful to Dr Yasufumi Emori (Department of Biophysics and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of

Tokyo, Japan) for donating the anti-Dm-calpain, Dr Ralph Nixon (Department of Psychiatry and Program in Neuroscience, Harvard Medical School, USA) for donating the anti-C21 antibody, Dr Keith Gull (School of Biological Sciences, University of Manchester, UK) for donating the anti-CAP5.5 antibody and Dr Juan Jose Cazzulo (Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, Buenos Aires, Argentina) for donating the anti-cruzipain. The authors wish to thank Ana Carolina de Siqueira Couto de Oliveira (IMPPG, UFRJ, Brazil) for her technical assistance in the flow cytometry analysis and Dr Adeilton A Brandão (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) for supplying the INPA4167 strain used in this study.

REFERENCES

- Andrade, H. M., Murta, S. M. F., Chapeaurouge, A., Perales, J., Nirdé, P. and Romanha, A. (2008). Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. *Journal of Proteome Research* **7**, 2357–2367.
- Battaglia, F., Trinchese, F., Liu, S., Walter, S., Nixon, R. A. and Arancio, O. (2003). Calpain inhibitors, a treatment for Alzheimer's disease: position paper. *Journal of Molecular Neurosciences* **20**, 357–362.
- Cazzulo, J. J., Stoka, V. and Turk, V. (2001). The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharmacological Design* **7**, 1143–1156.
- Contreras, V. T., Lima, A. R. and Zorrilla, G. (1998). *Trypanosoma cruzi*: maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **93**, 753–760.
- d'Avila-Levy, C. M., Araújo, F. M., Vermelho, A. B., Soares, R. M. A., Santos, A. L. S. and Branquinha, M. H. (2005). Proteolytic expression in *Blastocrithidia culicis*: influence of the endosymbiont and similarities with the virulence factors of pathogenic trypanosomatids. *Parasitology* **130**, 413–420.
- d'Avila-Levy, C. M., Marinho, F. A., Santos, L. O., Martins, J. L. M., Santos, A. L. S. and Branquinha, M. H. (2006a). Antileishmanial activity of MDL28170, a potent calpain inhibitor. *International Journal of Antimicrobial Agents* **28**, 138–142.
- d'Avila-Levy, C. M., Dias, F. A., Nogueira de Melo, A. C., Martins, J. L., Lopes, A. H. C. S., Santos, A. L. S., Vermelho, A. B. and Branquinha, M. H. (2006b). Insights into the role of gp63-like proteins in lower trypanosomatids. *FEMS Microbiology Letters* **254**, 149–156.
- d'Avila-Levy, C. M., Souza, R. F., Gomes, R. C., Vermelho, A. B. and Branquinha, M. H. (2003). A novel extracellular cysteine proteinase from *Crithidia deanei*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **420**, 1–8.
- Emori, Y. and Saigo, K. (1994). Calpain localization changes in coordination with actin-related cytoskeletal changes during early embryonic development of *Drosophila*. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 25137–25142.
- Engel, J. C., Doyle, P. S., Palmer, J., Hsieh, I., Bainton, D. F. and McKerrow, J. H. (1998). Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure

- and function in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Cell Science* **111**, 597–606.
- Engel, J. C., Torres, C., Hsieh, I., Doyle, P. S. and McKerrow, J. H.** (2000). Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Cell Science* **113**, 1345–1354.
- Ersfeld, K., Barraclough, H. and Gull, K.** (2005). Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *The Journal of Molecular Evolution* **61**, 742–757.
- Giese, V., Dallagiovanna, B., Marchini, F. K., Pavoni, D. P., Krieger, M. A. and Goldenberg, S.** (2008). *Trypanosoma cruzi*: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **103**, 598–601.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. and Cong, J.** (2003). The calpain system. *Physiological Reviews* **83**, 731–801.
- Grynspan, F., Griffin, W. R., Cataldo, A., Katayama, S. and Nixon, R. A.** (1997). Active site-directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain Research* **763**, 145–158.
- Hayes, R. L., Wang, K. K., Kampfl, A., Posmantur, R. M., Newcomb, J. K. and Clifton, G. L.** (1998). Potential contribution of proteases to neuronal damage. *Drug News Perspectives* **11**, 215–222.
- Hertz-Fowler, C., Ersfeld, K. and Gull, K.** (2001). CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **116**, 25–34.
- Lowry, O. H., Roseborough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**, 264–275.
- Mendonça-Filho, R. R., Rodrigues, I. A., Alviano, D. S., Santos, A. L. S., Soares, R. M. A., Alviano, C. S., Lopes, A. H. C. S. and Rosa, M. S.** (2004). Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology* **155**, 136–143.
- Miles, M. A., Souza, A., Povoia, M., Shaw, J. J., Lainson, R. and Toyé, P. J.** (1978). Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature, London* **272**, 819–821.
- Pereira, F. M., Elias, C. G. R., d'Avila-Levy, C. M., Branquinha, M. H. and Santos, A. L. S.** (2009). Cysteine peptidases in *Herpetomonas samuelpessoai* are modulated by temperature and dimethylsulfoxide-triggered differentiation. *Parasitology* **136**, 45–54.
- Rami, A., Ferger, D. and Kriegelstein, J.** (1997). Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neuroscience Research* **27**, 93–97.
- Ramos, C. S., Franco, F. A. L., Smith, D. F. and Uliana, S. R. B.** (2004). Characterisation of a new *Leishmania META* gene and genomic analysis of the *META* cluster. *FEMS Microbiology Letters* **238**, 213–219.
- Salotra, P., Duncan, R. C., Singh, R., Raju, B. V. S., Sreenivas, G. and Nakhasi, H. L.** (2006). Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Microbes and Infection* **8**, 637–644.
- Santos, A. L. S., d'Avila-Levy, C. M., Dias, F. A., Ribeiro, R. O., Pereira, F. M., Elias, C. G., Souto-Pradón, T., Lopes, A. H., Alviano, C. S., Branquinha, M. H. and Soares, R. M. A.** (2006). *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. *International Journal for Parasitology* **36**, 47–56.
- Saxena, A., Worthey, E. A., Yan, S., Leland, A., Stuart, K. D. and Myler, P. J.** (2003). Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. *Molecular and Biochemical Parasitology* **129**, 103–114.
- Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A. and Zingales, B.** (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **83**, 141–152.
- Tomas, A. M., Miles, M. A. and Kelly, J. M.** (1997). Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *European Journal of Biochemistry* **244**, 596–603.
- Troeberg, L., Morty, R. E., Pike, R. N., Lonsdale-Eccles, J. D., Palmer, J. T., McKerrow, J. H. and Coetzer, T. H.** (1999). Cysteine proteinase inhibitors kill cultured bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Experimental Parasitology* **91**, 349–355.
- Vergnes, B., Gourbal, B., Gorard, I., Sundar, S., Drummel-Smith, J. and Ouellette, M.** (2007). 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. *Molecular Cell Proteomics* **6**, 88–101.
- Vermelho, A. B., Giovanni-de-Simone, S., d'Avila-Levy, C. M., Santos, A. L. S., Melo, A. C. N., Silva Jr, F. P., Bom, E. P. S. and Branquinha, M. H.** (2007). Trypanosomatidae peptidases: a target for drugs development. *Current Enzyme Inhibition* **3**, 19–48.
- World Health Organization** (2005). *Infectious Diseases Home Burdens and Trends*. Available from: <<http://www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm>>.
- Yong, V., Schmitz, V., Vannier-Santos, M. A., Lima, A. P. C. A., Lalmanach, G., Juliano, L., Gauthier, F. and Scharfstein, J.** (2000). Altered expression of cruzipain and a cathepsin B-like target in a *Trypanosoma cruzi* cell line displaying resistance to synthetic inhibitors of cysteine-proteinases. *Molecular and Biochemical Parasitology* **109**, 47–59.

Artigo 2: Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of
Trypanosoma cruzi *in vitro*

Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy: in press, 2010

Nosso segundo trabalho aborda os efeitos do inibidor III de calpaínas (MDL28170) sobre as formas clínicas relevantes do *Trypanosoma cruzi*, os amastigotas e os tripomastigotas sanguíneos, através de ensaios de interação com macrófagos peritoneais murinos *in vitro*. Primeiramente, demonstramos que o MDL 28170 é capaz de diminuir significativamente a viabilidade das formas tripomastigotas sanguíneos mantidas em cultura por 24 horas, e seu IC₅₀ calculado foi de 20,4 µM. Em seguida, pudemos verificar que o pré-tratamento dos tripomastigotas sanguíneos por 1 hora com concentrações crescentes de MDL28170 (6,25 – 50 µM) é capaz de inibir significativamente a infecção de macrófagos murinos em ensaios *in vitro*. Para verificar a toxicidade do inibidor de calpaínas aos macrófagos foi realizado um ensaio colorimétrico com MTT, que revelou que concentrações até 25 µM de MDL28170 não alteram a viabilidade dessas células hospedeiras. Portanto, passamos a verificar o efeito do inibidor de calpaínas sobre os macrófagos murinos previamente infectados *in vitro* e mantidos em cultura nas concentrações de 6,25 à 25 µM de MDL28170 por 24, 48 e 72 horas. Foi possível verificar uma redução significativa tanto do número de macrófagos infectados quanto do número de parasitos internalizados nas células infectadas de uma forma dose- e tempo-dependente em todas as concentrações testadas no experimento. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que os inibidores de calpaínas em desenvolvimento possam ser uma alternativa interessante para o tratamento da doença de Chagas, uma que sua eficácia seja confirmada. Toda abordagem experimental deste artigo foi desenvolvida por mim, com a colaboração do Dr. Rubem Menna-Barreto do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz e orientação dos demais autores.

Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*

Vítor Ennes-Vidal¹, Rubem F. S. Menna-Barreto², André L. S. Santos³, Marta H. Branquinha⁴
and Claudia M. d'Avila-Levy^{1*}

¹Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil; ²Laboratório de Biologia Celular, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil; ³Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil; ⁴Laboratório de Bioquímica de Proteases, Departamento de Microbiologia Geral, IMPPG, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author. Tel: +55-21-3865-8232; Fax: +55-21-2590-3495; E-mail: davila.levy@ioc.fiocruz.br

Received 26 February 2010; returned 7 April 2010; revised 13 April 2010; accepted 15 April 2010

Objectives: There is a general lack of effective and non-toxic chemotherapeutic agents for treating Chagas' disease. In the present work, we evaluated the *in vitro* activity of the calpain inhibitor MDL28170 against *Trypanosoma cruzi* relevant clinical forms.

Methods: The effect of MDL28170 on bloodstream trypomastigotes at different concentrations was assessed by counting the parasites in a Neubauer chamber, which allowed the determination of IC₅₀ values. Subsequently, parasite-macrophage interaction was assessed by two approaches: (i) peritoneal mouse macrophages were pre-infected with trypomastigotes for 3 h and then treated daily for 72 h with MDL28170; or (ii) bloodstream trypomastigotes were pre-treated with the calpain inhibitor for 1 h and then subjected to the infection assay.

Results: MDL28170 was capable of significantly reducing the viability of bloodstream trypomastigotes, presenting an IC₅₀/24 h value of 20.4 μM. Also, parasites pre-treated with the inhibitor, at subinhibitory drug concentrations, prior to macrophage infection presented a clear dose-dependent inhibition profile, where the inhibition increased from 20% to 50% (in relation to control) as MDL28170 concentration rose from 6.25 to 50 μM. In addition, macrophages experimentally infected with *T. cruzi* that were treated with the calpain inhibitor presented a significant reduction in the percentage of infection even at the lowest concentrations (6.25 μM).

Conclusions: These data may contribute to the study of the calpains in *T. cruzi* infection and add new *in vitro* insights into the possibility of exploiting calpains as promising targets to treat Chagas' disease.

Keywords: Chagas' disease, chemotherapy, proteases, peptidases, cysteine peptidases

Introduction

Trypanosoma cruzi is the aetiological agent of Chagas' disease, which affects over 16 million people, with more than 100 million exposed to the risk of infection.¹ The parasite life cycle involves several stages of differentiation: in the mammalian host, the intracellular amastigotes and the bloodstream trypomastigotes are the main evolutive forms, whereas the replicative epimastigote is the major form in the insect vector. To effectively combat the disease, a promising trypanocidal agent should impair parasite development in mammalian host cells with minimal side effects. Unfortunately, the currently accepted drugs for this disease, nifurtimox and benznidazole,

are still unsatisfying, due to their low efficacy and high toxicity.¹ In this context, several research groups have become involved in the study and identification of potential targets for the treatment of Chagas' disease;¹ particularly, our research group has invested in the study of trypanosomatid peptidases. The search for specific inhibitors of these enzymes is a reasonable strategy that might lead to the design of powerful chemotherapeutic agents against these pathogens.² One such enzyme is calpain, which is a calcium-regulated cytosolic cysteine peptidase whose role remains poorly understood. Nevertheless, some evidence indicates that it may be involved in crucial cellular functions, such as rearrangement of cytoskeletal proteins and protein cleavage in order to activate various receptors and

pro-enzymes.³ A variety of calpain inhibitors are under development and the potential clinical utility of these inhibitors has been shown in the treatment of neuromuscular and neurodegenerative diseases in which calpains have been shown to be up-regulated.³ By means of distinct biochemical and molecular approaches, our group⁴ and other researchers^{5,6} have described the presence of calpain-like proteins in *T. cruzi* epimastigote forms. In addition, a potent calpain inhibitor, designated MDL28170, impaired parasite growth and promoted morphological alterations of epimastigote forms;⁴ however, no data are available in relevant clinical forms of the parasite. Herein, we have evaluated the effect of MDL28170 on the viability and infectivity of *T. cruzi* trypomastigotes *in vitro*, as well as on amastigote intracellular development.

Methods

Effects of MDL28170 on *T. cruzi* trypomastigote viability

Bloodstream trypomastigote forms (Y strain) were obtained from infected albino Swiss mice at the peak of parasitaemia by differential centrifugation, and resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum. This suspension was incubated at 37°C for 24 h in the presence of increasing concentrations of MDL28170 (6.25–50 µM). Trypomastigote viable cells were counted in a Neubauer chamber, allowing the determination of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀/24 h).⁴ Experiments were carried out in accordance with the guidelines established by the FIOCRUZ Committee of Ethics for the Use of Animals (CEUA L-028/09).

Effects of MDL28170 on *T. cruzi*–macrophage interaction

Mouse peritoneal macrophages (6–8 weeks old) were collected from Swiss mice, and parasite–macrophage interaction was assessed by two approaches, as previously described.⁷ Briefly, the drug was added to the parasites either before (pre-treatment) or after (post-treatment) the interaction with macrophage cells, and the percentage of infection was determined as described elsewhere.⁷ The toxic effects of MDL28170 on mammalian cells were assessed by a dye-reduction assay employing 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT).⁷ All experiments were repeated at least three times in triplicate. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant by means of Student's *t*-test.

Results

The direct effect of the calpain inhibitor MDL28170 on bloodstream trypomastigote viability revealed an IC₅₀ after 24 h of 20.4 µM. DMSO at a dose used to dissolve the highest drug concentration presented no significant effect on parasite viability (data not shown). These results led us to investigate whether the calpain inhibitor might have any effect on the interaction between *T. cruzi* and macrophages. For this purpose, we performed experiments in which the bloodstream trypomastigote forms of the parasite were treated for 1 h, before the interaction, with MDL28170 at concentrations ranging from 6.25 to 50 µM. Under this experimental condition, the parasites maintained their viability, as judged by their morphology, motility and propidium iodide staining, in which >95% of the trypomastigotes were viable (data not shown). The drug presented a clear dose-dependent inhibition profile, where inhibition increased from 20% to 50% (in relation to control) as MDL28170 concentration

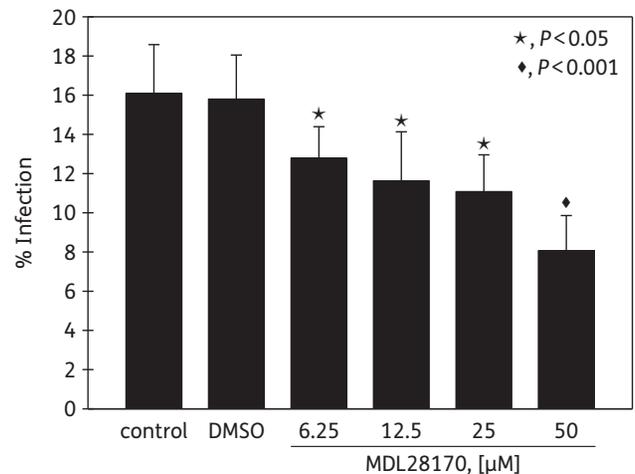


Figure 1. Effect of the pre-treatment of trypomastigotes with MDL28170 on the *T. cruzi*–macrophage interaction. The trypomastigotes were treated or not with increasing concentrations of MDL28170 (6.25–50 µM) for 1 h prior to macrophage–parasite interaction, then the cells were washed with PBS. DMSO corresponds to a dose used to dissolve the highest drug concentration. Parasites maintained their viability under this experimental condition (see text). Macrophages were then infected for 3 h at 37°C, the monolayers were washed with PBS to remove unbound parasites and the infection percentage was determined by light microscopy, counting 300 cells randomly in each duplicate coverslip. The results correspond to the mean of at least three independent experiments.

rose from 6.25 to 50 µM. DMSO at a dose equivalent to the highest concentration used to dissolve the drug did not promote any significant effect (Figure 1).

Given that the calpain inhibitor can interfere in the early steps of parasite infection, since the compound was added exclusively to *T. cruzi* trypomastigotes and that the interaction process was stopped after only 3 h, we resolved to investigate the association index of *T. cruzi* with macrophage cells during *in vitro* treatment for 24, 48 and 72 h with MDL28170. First of all, the toxicity of MDL28170 was determined on mouse peritoneal macrophages by the MTT assay. A significant deleterious effect was only observed at 50 µM (data not shown). Finally, we tested the effect of MDL28170 on *T. cruzi* interaction with macrophage cells after parasite invasion. For this purpose, untreated bloodstream trypomastigotes were allowed to interact with macrophages for 3 h, unbound parasites were washed away and the cultures were treated daily with MDL28170 at 6.25, 12.5 and 25 µM and followed for 24, 48 and 72 h. A clear time- and dose-dependent effect of the compound on the infection rate was observed, while the highest drug concentration (25 µM) was capable of reducing almost the entire infection after 72 h (Figure 2) resulting in a moderate 2- to 4-fold selectivity index. DMSO at a dose equivalent to the highest concentration used to dissolve the drug did not promote any significant effect (Figure 2).

Discussion

In the present study we demonstrated the effect of the calpain inhibitor MDL28170 on trypomastigotes and amastigotes, the

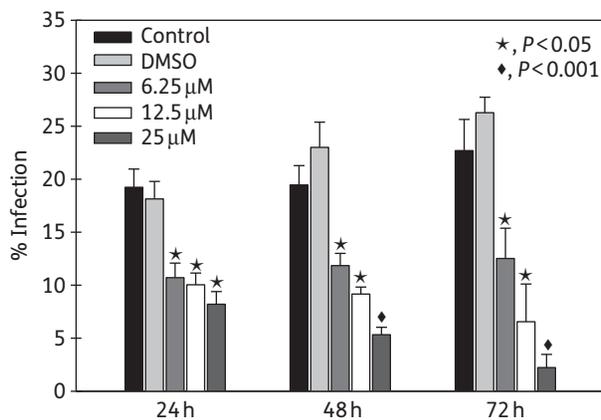


Figure 2. Susceptibility of intracellular parasites to MDL28170 in macrophages. Murine macrophages were infected with bloodstream trypomastigotes for 3 h at 37°C, unbound parasites were washed away and the cultures were treated daily with MDL28170 (6.25–25 μM), and followed for 24, 48 and 72 h. DMSO corresponds to the dose used to dissolve the highest drug concentration. The drug concentrations employed presented no toxic effect on the mammalian cells. Finally, the infection percentage was determined by light microscopy, counting 300 cells randomly in each duplicate coverslip. The results correspond to the mean of at least three independent experiments.

clinically relevant forms of *T. cruzi*. This compound is just one of the available calpain inhibitors screened for several human diseases that are believed to be calpain-associated disorders. Calpain activity in humans is tightly regulated by its natural and highly specific endogenous inhibitor calpastatin. Inappropriate regulation of the calpain–calpastatin proteolytic system is associated with several important human pathological disorders including muscular dystrophy, cancer, Alzheimer’s disease, neurological injury, ischaemia/reperfusion injury, atherosclerosis, diabetes and cataract formation.³ In this context, calpain inhibitors in advanced clinical trial steps could be an interesting alternative in the treatment of neglected diseases such as leishmaniasis and Chagas’ disease, once the effects of the drugs under development are confirmed.

Several studies have described the presence of calpain-related proteins in trypanosomatids. The first characterized member of the calpain-related genes was CAP5.5, a *Trypanosoma brucei* cytoskeleton protein associated with the cell membrane, which is detected exclusively in procyclic forms.⁸ In the last year, the same research group have revealed the presence of the paralogous protein CAP5.5V, which is present in bloodstream forms of the parasite and has analogous functions.⁹ In 2003, our research group purified a calcium-dependent cysteine peptidase of *Crithidia deanei* that showed cross-reactivity with antibodies generated against the *Drosophila melanogaster* calpain.¹⁰ More recently, we demonstrated the presence of calpain-like molecules and the effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the aetiological agents of Chagas’ disease and leishmaniasis.^{4,11} Nevertheless, *T. cruzi* clinically relevant forms—bloodstream trypomastigotes and amastigotes—have not been considered previously. Herein, we showed the efficacy of the calpain inhibitor against bloodstream trypomastigote forms and in the treatment of experimental infection of macrophages, without

displaying any relevant cytotoxic effect on mammalian host cells. Moreover, the treatment of trypomastigotes prior to macrophage infection also showed a significant effect on the infection rates. These results suggest that the inhibitor also interferes in the early steps of parasite internalization. Moreover, although MDL28170 is a relatively specific calpain inhibitor, it cannot be ruled out that it may act on other *T. cruzi* cysteine peptidases to a lesser level.

The functional roles of calpain-related proteins in *T. cruzi* remain an open question. The expression of a calpain-related protein from *T. cruzi* during nutritional stress preceding metacyclogenesis is 2.5 times higher than that observed in epimastigotes. However, the overexpression of this gene in transfected parasites induced no altered phenotype.⁵ Nevertheless, a proteomic analysis of *T. cruzi* resistance to benznidazole revealed that a calpain-like cysteine peptidase is exclusively detected in samples of the resistant phenotype.⁶ The effects of calpain inhibitors on trypanosomatids raise the interesting possibility of using these inhibitors to better understand the calpain functions in these parasites. Some studies dedicated to clarifying the functional mechanisms of *T. cruzi* proteins resorted to specific inhibitors as a methodological alternative. In this context, further studies assessing the effects of calpain inhibitors on the ultrastructure of the parasite and on the overall protein expression of treated parasites, through a proteomic approach, for instance, might help to shed some light on calpain function in trypanosomatids. These, together with molecular approaches, will probably unveil calpain functions and add new insights into the possibility of using calpain inhibitors as a promising alternative in the treatment of neglected diseases such as Chagas’ disease. Therefore, our results suggest that *T. cruzi* calpains could be a remarkable target for the development of potent and selective drugs.

Acknowledgements

We are grateful to Marcos Meuser and Michelle Fernandes for their excellent technical assistance.

Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPQ), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas’ disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; **97**: 3–24.
- 2 Vermelho AB, Giovanni-De-Simone S, d’Avila-Levy CM *et al*. Trypanosomatids and peptidases: a target for drug development. *Curr Enzyme Inhib* 2007; **3**: 19–48.
- 3 Carragher NO. Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Curr Pharm Des* 2006; **12**: 615–38.

- 4** Sangenito LS, Ennes-Vidal V, Marinho FA 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.
- 5** Giese V, Dallagiovanna B, Marchini FK et al. *Trypanosoma cruzi*: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; **103**: 598–601.
- 6** Andrade HM, Murta SMF, Chapeaurouge A et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. *J Proteome Res* 2008; **7**: 2357–67.
- 7** Santos LO, Marinho FA, Altoé EF et al. HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE* 2009; **4**: e4918.
- 8** 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.
- 9** Olego-Fernandez S, Vaughan S, Shaw MK et al. Cell morphogenesis of *Trypanosoma brucei* requires the paralogous, differentially expressed calpain-related proteins CAP5.5 and CAP5.5V. *Protist* 2009; **160**: 576–90.
- 10** d'Avila-Levy CM, Souza RF, Gomes RC et al. A novel extracellular cysteine proteinase from *Crithidia deanei*. *Arch Biochem Biophys* 2003; **420**: 1–8.
- 11** d'Avila-Levy CM, Marinho FA, Santos LO et al. Antileishmanial activity of MDL28170, a potent calpain inhibitor. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **28**: 138–42.

Artigo 3: MDL28170, a potent calpain inhibitor, affects *T. cruzi* metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*

Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM.

Submetido para publicação na revista eletrônica *Plos Neglected Tropical Diseases*, 2010

Nosso terceiro e último artigo desenvolvido durante esse dois anos de mestrado é focado nos 3 últimos objetivos desta dissertação: avaliar o efeito do inibidor III de calpaínas MDL28170 no processo de interação de epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* com o epitélio intestinal de *Rhodnius prolixus* em ensaios *in vitro*, na metaciclogênese induzida artificialmente e sobre a ultraestrutura. Contudo, não nos restringimos a responder apenas a essas perguntas, também avaliamos a reatividade cruzada de outros anticorpos anti-calpaínas, assim como o efeito desses anticorpos na interação de formas epimastigotas do *T. cruzi* com o epitélio intestinal de *R. prolixus*. Nossos resultados demonstraram que o MDL28170 é capaz de: reduzir significativamente a adesão dos epimastigotas ao epitélio do inseto vetor; diminuir de forma dose-dependente o processo de diferenciação de epimastigotas à tripomastigotas metacíclicos em meio TAU (triatomine artificial urine); e provocar desorganizações ultraestruturais nos reservossomos, no Golgi e na membrana plasmáticas das formas epimastigotas do *T. cruzi* tratadas por 72 horas com a concentração correspondente ao IC₅₀ calculado para este inibidor. Além disso, observamos também que os anticorpos anti-calpaínas capazes de reagir contra moléculas expressas na superfície de formas epimastigotas do *T. cruzi* são capazes de reduzir significativamente a adesão do parasito ao epitélio intestinal de *R. prolixus*, e que MDL28170 é capaz de diminuir de forma significativa a viabilidade de tripomastigotas sanguíneos mantidos em cultura por 24 horas. Dessa forma, nosso conjunto de dados sugere que as moléculas similares às calpaínas presentes no *T. cruzi* possam estar participando de eventos essenciais do ciclo de vida desse parasito, o que torna essas moléculas alvos interessantes para o desenvolvimento de inibidores menos tóxicos e mais seletivos para o tratamento da doença de Chagas. Os experimentos realizados nesse trabalho foram realizados por mim e pelo Dr. Rubem Menna-Barreto sobre a orientação dos demais autores.

1 MDL28170, a potent calpain inhibitor, affects *Trypanosoma cruzi*
2 metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to the luminal midgut
3 surface of *Rhodnius prolixus*

4
5 **Vítor Ennes-Vidal¹, Rubem F. S. Menna-Barreto², André L. S. Santos³, Marta H.**
6 **Branquinha⁴, Claudia M. d'Avila-Levy^{1*}.**

7
8 ¹*Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz*
9 *(IOC), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brazil;*

10 ²*Laboratório de Biologia Celular, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil;*

11 ³*Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, Departamento de*
12 *Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG),*
13 *Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil;*

14 ⁴*Laboratório de Bioquímica de Proteases, Departamento de Microbiologia Geral,*
15 *IMPPG, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil.*

16
17
18
19 * Corresponding author. Tel.: +5521 3865-8232; Fax: +5521 2590-3495

20 *E-mail address:* davila.levy@ioc.fiocruz.br, davila.levy@gmail.com (Claudia M.
21 d'Avila-Levy)

22
23
24 **Running title:** MDL28170 effects on *T. cruzi*

1 **Abstract**

2

3 **Background:** *Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas' disease. During the
4 parasite life cycle, several molecules are involved in the differentiation process and
5 infectivity, but less is known about which of them are key molecules. Peptidases are
6 relevant for crucial steps of *T. cruzi* life cycle, as such, it is conceivable that they may
7 participate in the metacyclogenesis and interaction with the invertebrate host.

8 **Methodology/Principal Findings:** In this paper, we have investigated the effect of the
9 calpain inhibitor MDL28170 on the attachment of *T. cruzi* epimastigotes to the luminal
10 midgut surface of *Rhodnius prolixus*, as well as on the metacyclogenesis process and
11 ultrastructure. In addition, we have analyzed the effect of anti-calpain antibodies on the
12 interaction of epimastigotes to the midgut surface of the insect. MDL28170 treatment
13 was capable of significantly reducing the number of bound epimastigotes to the luminal
14 surface midgut of the insect. Once the cross-reactivity of the anti-*Dm*-calpain was
15 assessed, it was possible to block calpain molecules by the antibody, leading to a
16 significant reduction in the capacity of adhesion to the insect guts by *T. cruzi*.
17 Moreover, the *in vitro* metacyclogenesis process was impaired by the calpain inhibitor
18 presenting a significant reduction in the number of metacyclic trypomastigotes. The
19 calpain inhibitor also demonstrated a direct effect against bloodstream trypomastigotes.
20 Ultrastructural analysis of epimastigotes treated with the calpain inhibitor revealed
21 disorganization in the reservosomes, Golgi and plasma membrane disruption.

22 **Conclusions/Significance:** The presence of calpain and calpain-like molecules in a
23 wide range of organisms suggests that these proteins could be necessary for basic
24 cellular functions. Herein, we demonstrated the effects of MDL28170 in crucial steps of
25 the *T. cruzi* life cycle, such as attachment to the insect midgut and metacyclogenesis, as
26 well as in parasite viability and morphology. Together with our previous findings, these
27 results help to shed some light on the functions of *T. cruzi* calpains. Considering the
28 potential roles of these molecules on the interaction with both invertebrate and
29 vertebrate hosts, it is conceivable to explore them as an alternative target to treat
30 Chagas' disease.

31

32 **Keywords:** Chagas' disease, *Trypanosoma cruzi*, invertebrate host, metacyclogenesis,
33 peptidases, calpain.

1 **Author's Summary**

2
3 Chagas' disease is one of the most important neglected diseases of Latin
4 America, caused by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*. Calpains are
5 cysteine peptidases, described in a broad range of organisms, which are believed to be
6 crucial in several basic cellular functions. In this sense, it is conceivable that calpain like
7 molecules present in *T. cruzi* may participate in metacyclogenesis and interaction with
8 the invertebrate host. Herein, we described the effects of the calpain inhibitor
9 MDL28170: on the adhesion of *T. cruzi* epimastigotes on the luminal midgut surface of
10 the insect vector *Rhodnius prolixus*; on the differentiation process of epimastigotes to
11 metacyclic trypomastigotes; on the viability of bloodstream trypomastigotes; and on the
12 ultrastructure of epimastigotes. Additionally, we demonstrated that anti-calpain
13 antibodies were also capable of reducing the attachment of the epimastigotes to the
14 insect gut. These data may contribute for the study of the functions of *T. cruzi* calpains
15 and add new insights into the possibility of using calpain inhibitors in treating parasitic
16 infections, since they interfere in key parts of the parasite life cycle.

17 18 **Introduction**

19
20 Chagas' disease is a neglected tropical disease, which remains a major health
21 problem in Latin America. Over eight million people are infected with this disease and
22 an estimated of 14,000 people die as a consequence of the infection every year [1]. The
23 etiological agent *Trypanosoma cruzi* undergoes profound morphological changes during
24 its development in a complex life cycle involving mammalian and invertebrate hosts.
25 The protozoa life cycle comprises three major morphological stages: epimastigotes,
26 trypomastigotes, and amastigotes [2]. During the infection of the invertebrate host, a
27 hemipteran insect of the Reduviidae order, non-infectious epimastigotes adhere to the
28 insect host midgut, begin to proliferate and differentiate (metacyclogenesis process) into
29 metacyclic trypomastigotes, which are non-proliferative forms that are able to infect a
30 mammalian host [3]. The adhesion to the luminal midgut surface of the insect appears to
31 be necessary for the metacyclogenesis, but there is a general lack of information about
32 which molecules are implicated in this process [3,4]. In this context, peptidases, a class
33 of hydrolytic enzymes responsible for breaking the peptides bonds - has attracted the

1 attention of our research group because of their role in several crucial steps of the life
2 cycle of the trypanosomatid parasites [5]. Among *T. cruzi* different peptidases that we
3 considered, the calpains have been presenting interesting finds and seem to be a
4 remarkable target for the development of an alternative target to treat Chagas' disease
5 and leishmaniasis [6,7,8].

6 Calpains constitute a large family of calcium-regulated cytosolic cysteine
7 peptidases that have been characterized mainly in humans and whose role still remains
8 poorly understood [9]. Some evidence indicates that these enzymes may participate in a
9 variety of cellular processes, including the rearrangement of cytoskeletal proteins,
10 different signal transduction pathways and apoptosis. In this context, a variety of
11 calpain inhibitors are under development and the potential clinical utility of these
12 compounds have been shown mainly in the treatment of neurodegenerative disorders
13 [10,11,12,13]. In this sense, a classical study employing whole genome analyses
14 showed the presence of a large and diverse family of calpains in *Trypanosoma brucei*,
15 *Leishmania major* and *T. cruzi* [14]. Some years before, the same group had already
16 characterized the first trypanosomatid calpain-like protein in procyclic forms of *T.*
17 *brucei* [15]. In addition, our group described the presence of calpain-related proteins in
18 *T. cruzi* epimastigote forms and the effects of the calpain inhibitor III (MDL28170) on
19 growth, viability and infectivity [7,8]. However, more studies are necessary to better
20 understand the involvement of the calpain homologues in the life cycle of *T. cruzi*.

21 Here, we have conducted a study to investigate the effect of the calpain inhibitor
22 MDL28170 on the attachment of *T. cruzi* epimastigotes to the luminal midgut surface of
23 *Rhodnius prolixus*, as well as on the metacyclogenesis process and ultrastructure. In
24 addition, we have analyzed the effect of anti-calpain antibodies on the interaction of
25 epimastigote forms to the midgut surface of the insect.

27 **Methods**

29 *Ethics Statement*

30 The experiments were carried out in accordance with the guidelines established
31 by the FIOCRUZ Committee of Ethics for the Use of Animals (CEUA L-028/09).

33 *Chemicals*

1 The calpain inhibitor III, MDL28170 (carbobenzoxy-valylphenylalaninal; Z-Val-
2 Phe-CHO), was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Stock solutions of
3 the drug (5 mM) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO).

6 *Parasite culture*

7 Epimastigote forms of *T. cruzi* were grown in 3.7% brain heart infusion medium
8 (BHI), containing hemin and folic acid and supplemented with 10% heat-inactivated
9 fetal bovine serum, at 28 °C for 4 days to reach late-log phase growth. For the following
10 experiments, epimastigotes were collected, washed three times in 0.15 M NaCl, 0.01 M
11 phosphate-buffer pH 7.2 (PBS) and immediately used. The Y strain of *T. cruzi* was used
12 in all experiments except for the metacyclogenesis assay, in which the Dm28c strain is
13 the best characterized model for in vitro differentiation [16].

15 *Insects*

16 *Rhodnius prolixus* were reared and maintained as previously described [17].
17 Briefly, fifth-instars larvae were starved for 30 days after the last ecdysis and then
18 allowed to feed on rabbit blood through a membrane feeder. Ten days after the feeding,
19 insects were dissected; the posterior midguts were then removed, longitudinally
20 sectioned and washed three times in PBS to expose their luminal surfaces. After the
21 washing, the tissue fragments were processed as described below. The insects were
22 obtained from the insectary of the Laboratório Nacional e Internacional de Referência
23 em Taxonomia de Triatomíneos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

25 *Identification of calpain homologues by flow cytometry and fluorescence microscopy*

26 Epimastigotes (1×10^7 cells) from the Y strain used for these experiments were
27 fixed at 4 °C in 0.4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.2) for 30 min, followed by
28 extensive washing in the same buffer. The fixed cells maintained their morphological
29 integrity, as verified by optical microscopic observation. After this step, the cells were
30 incubated for 1 h at room temperature with a 1:100 dilution of the anti-calpain
31 antibodies. Cells were then incubated for an additional hour with a 1:200 dilution of
32 fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled goat anti-rabbit IgG [18]. The cells were
33 then washed 3 times in PBS and observed in a Zeiss epifluorescence microscope
34 (Axioplan 2). Alternatively, the parasite associated fluorescence was excited at 488 nm

1 and quantified on a flow cytometer (FACSCalibur, BD Bioscience, USA) equipped with
2 a 15 mW argon laser emitting at 488 nm. Non-treated cells and those treated with the
3 secondary antibody alone were run in parallel as controls. Each experimental population
4 was then mapped by using a two-parameter histogram of forward-angle light scatter
5 versus side scatter. The mapped population (n=10,000) was then analyzed for log green
6 fluorescence by using a single parameter histogram. The calpain antibodies tested were:
7 a rabbit antiserum raised against *Drosophila melanogaster* calpain (anti-Dm-calpain)
8 [19], anti-C21, anti-C23 or anti-C24 raised against the whole molecule, the cysteine
9 active site and the histidine active site, respectively, of human brain m-calpain [20],
10 anti-CAP5.5, raised against the cytoskeleton-associated protein from *Trypanosoma*
11 *brucei* [15], and anti-CDPIIb and anti-Ha-CalpM raised against *Homarus americanus*
12 calpains [21,22].

13

14 *In vitro inhibition of T. cruzi-Rhodnius interaction*

15 Live epimastigote forms (Y strain) were resuspended in 200 µl of fresh BHI to a
16 density of 1×10^7 cells and treated with the calpain inhibitor for 1 h with sub-inhibitory
17 concentrations (6.25–50 µM) and washed in PBS. Under this experimental condition,
18 the parasite maintains their viability, as previously described [7]. Dilutions of DMSO
19 corresponding to those used to prepare the drug solution were assessed in parallel for
20 control. Alternatively, the parasites were incubated for 1 h with anti-calpain antibodies,
21 or rabbit pre-immune sera, at 1:1000 dilution. After that, binding of protozoa to insect
22 gut was performed as described elsewhere. Briefly, the parasites were incubated for 20
23 min at 28°C with *R. prolixus* dissected posterior midguts that were sliced open
24 longitudinally. Subsequently, the explanted midguts were spread onto glass slides to
25 count the number of attached parasites per epithelial cells. The experiment was
26 performed three times independently, for each experimental group 4 insect midguts
27 were used and 100 epithelial cells were counted randomly.

28

29 *In vitro inhibition of T. cruzi metacyclogenesis*

30 For *in vitro* differentiation, epimastigotes (clone Dm28c) in the stationary phase
31 of growth were incubated for 2 h at 28°C in triatomine artificial urine (TAU) medium
32 (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 8 mM phosphate buffer pH
33 6.0) at a density of 5×10^8 cells/ml. The parasites at a dilution of 1:100 were further
34 incubated for 96 h in TAU3AAG medium (TAU supplemented with 10 mM L-proline,

1 50 mM L-sodium glutamate, 2 mM L-sodium aspartate, and 10 mM D-glucose) in
2 culture flasks [16]. For inhibition assays, epimastigotes were incubated in the presence,
3 or absence (control), of increasing concentrations of MDL28170 (6.25–50 μ M) in
4 TAU3AAG medium. Culture supernatants were collected after 24, 48, 72, and 96 h of
5 incubation in TAU3AAG medium and the number of epimastigotes and metacyclic
6 trypomastigotes was determined by cell counting in a Neubauer chamber. Under this
7 experimental condition, the parasite maintains their viability, as previously described
8 [7]. These morphological stages can be easily differentiated on morphological grounds
9 by light microscopy, since epimastigotes are broader and have a quite rigid body, while
10 trypomastigotes are slimmer and present a vigorous wavy movement of the whole body.
11 Three independent experiments were performed in triplicate and a DMSO dilution
12 corresponding to highest drug concentration was assessed in parallel.

13

14 *Effects of MDL28170 on T. cruzi trypomastigotes viability*

15

16 Bloodstream trypomastigote forms, obtained from infected albino Swiss mice at the
17 peak of parasitemia by differential centrifugation, were resuspended in Dulbecco's
18 modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum (DMEM). This
19 suspension was incubated at 37°C for 24 h in the presence of increasing concentrations
20 of MDL28170 (6.25–50 μ M). Viability was assessed by mobility and lack of staining
21 after challenge with trypan blue. Dilutions of DMSO corresponding to those used to
22 prepare the drug solutions were assessed in parallel. Thereafter, the number of viable
23 motile trypomastigotes was quantified by counting the flagellates in a Neubauer
24 chamber.

25

26 *Transmission electron microscopy*

27 Briefly, epimastigotes from the Y strain (5×10^6 cells/ml) were treated with the
28 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of MDL28170, as previously determined [7] for 72
29 h in BHI medium at 28°C. Afterwards, the parasites were fixed with 2.5%
30 glutaraldehyde in 0.1 M Na-cacodylate buffer (pH 7.2) at room temperature for 40 min
31 at 25°C and post-fixed with a solution of 1% OsO_4 , 0.8% potassium ferricyanide and
32 2.5 mM $CaCl_2$ in the same buffer for 20 min at 25°C [23]. The cells were dehydrated in
33 an ascending acetone series and embedded in PolyBed 812 resin. Ultrathin sections

1 were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in Jeol JEM1011
2 transmission electron microscope.

3 4 **Results**

5
6 The presence of calpain-like molecules in epimastigote forms of *T. cruzi* Y strain
7 was accessed by flow cytometry assay and fluorescence microscopy analyses using a
8 panel of antibodies raised against different calpains. The antibodies anti-*Dm*-Calpain,
9 anti-CDPIIb, anti-*Ha*-CalpM and anti-CAP5.5 were capable of strongly binding to *T.*
10 *cruzi* cells (Fig. 1A), while anti-C21, anti-C23 and anti-C24 did not recognize epitopes
11 on the parasite cell surface (data not shown). However, no cross-reactive of the
12 antibodies with trypomastigote forms were observed in the same analyses (data not
13 shown). Fluorescence microscopy analyzes corroborated the surface distribution of
14 calpain-related molecules in epimastigote forms of *T. cruzi* (Fig. 1B).

15 In order to assess a potential function for calpain-like molecules in *T. cruzi*, we
16 have performed binding assays with parasites previously treated with the anti-*Dm*-
17 calpain antibody, at a concentration that did not promote cell agglutination. The
18 blockage of calpain molecules by the antibody led to a significant reduction ($P < 0.01$)
19 in the capacity of adhesion to the insect guts by *T. cruzi* by approximately 50% (Fig. 2),
20 similar results were obtained with the other antibodies (data not shown). On the other
21 hand, parasites treated with the pre-immune serum adhered to the guts at a rate similar
22 to that of the control ($P < 0.05$) (Fig. 2). Some studies dedicated to clarify the functional
23 mechanisms of *T. cruzi* proteins resorted to specific inhibitors as a methodological
24 alternative [6,7,8,24,25]. In this sense, we performed binding assays with parasites
25 previously treated with MDL28170, a potent calpain inhibitor. The compound reduced
26 significantly the number of parasites adhered to the insect luminal midgut surface in all
27 drug concentrations tested (6.25–50 μ M). At the highest doses 25 and 50 μ M, the
28 adhesion rate was approximately 0.6 epimastigotes per midgut cell while the control
29 was about 1.4 (Fig. 2), which represents a reduction of 65%. DMSO at a dose
30 equivalent to the highest concentration used to dissolve the drug did not promote any
31 significant effect on the parasite adhesion (Fig. 2).

32 These results led us to investigate whether the *T. cruzi* MDL28170 might have
33 any effect on the metacyclogenesis process. For this purpose, we performed

1 experiments in which late-log phase epimastigotes from the Dm28c clone were
2 submitted to the differentiation assay, and treated or not for 4 days with MDL28170 at
3 concentrations ranging from 6.25 to 50 μ M. Under this experimental condition the
4 parasites maintained their viability, as judged by their morphology and motility in
5 which the density of live parasites was approximately the same as the control (data not
6 shown). It should also be pointed out that MDL28170 has a trypanostatic effect on *T.*
7 *cruzi*, since cells pre-treated for 72 h with the calpain inhibitor even at 70 μ M resumed
8 growth when subcultured in a drug-free fresh medium [7]. Finally, the metacyclogenesis
9 assay revealed that the drug presents a time and dose-dependent inhibition profile, since
10 in cultures without MDL28170 the number of metacyclic trypomastigotes increased
11 over time, whereas MDL28170 treatment inhibited the differentiation process almost to
12 50% in the highest drug concentration. DMSO at a dose equivalent to the highest
13 concentration used to dissolve the drug did not interfere in the metacyclogenesis (Fig.
14 3). Furthermore, we decided to evaluate the direct effect of the MDL28170 on
15 bloodstream trypomastigotes viability *in vitro* after 24 h of treatment at 37°C. The
16 inhibitor at 25 μ M powerfully reduced parasite viability at about 63% in comparison to
17 control (Fig. 4). Bloodstream trypomastigotes cultured in the presence of DMSO at a
18 dose used to dissolve the highest drug concentration presented no significant effect (Fig.
19 4).

20 Given that the calpain inhibitor can reduce the growth of epimastigote forms
21 with a trypanostatic effect [7], interfere in the parasite adhesion to the insect midgut and
22 in the differentiation process of epimastigotes to metacyclic trypomastigotes, we
23 decided to investigate the ultrastructural effects of MDL28170 against the epimastigote
24 forms, by transmission electron microscopy. For this purpose, the morphology of non-
25 treated cells (Fig. 5a-b) was compared with the ultrastructure of parasites treated for 72
26 h with 34 μ M of MDL28170 (Fig. 5c-g). Results showed an important injury to the
27 reservosomes (Fig. 5c-e), plasma membrane (Fig. 5d,g) and Golgi (Fig. 5f,g).
28 Reservosomes and Golgi were severely affected, showing a washed-out appearance
29 with loss of organelles' electron density and complete disruption of their membranes.

30

31

32 **Discussion**

33

1 Over the past few years some studies have described the presence of calpain-
2 related proteins in trypanosomatids. At first, a classical study employing whole genome
3 analyses showed the presence of a large and diverse family of calpains in *T. brucei*, *L.*
4 *major* and *T. cruzi* [14]. In this sense, our group became involved in the study of these
5 enzymes though the report of the expression of calpain-like molecules and the effects of
6 the calpain inhibitor MDL28170 against the etiological agents of Chagas' disease and
7 leishmaniasis [6,7,8]. In the present study, we demonstrated that MDL28170 also
8 inhibited *T. cruzi* adhesion to the insect gut, arrested the metacyclogenesis process,
9 reduced the bloodstream trypomastigote viability and promoted significant
10 ultrastructural effects on reservosomes and Golgi of epimastigote forms. In addition, it
11 was shown the cross-reactivity of the anti-calpain antibodies (anti-*Dm*-calpain, anti-
12 CDPIIb, anti-*Ha*-CalpM and anti-CAP5.5) with epimastigote cells of the parasite, and
13 their ability to impair parasite adhesion to the midgut surface of *R. prolixus in vitro*.

14 As peptidases are known to be responsible for several physiological processes,
15 they became a remarkable target for the development of therapeutic agents to treat
16 infectious disease. In this context, *T. cruzi* peptidases have attracted the attention of
17 many laboratories because of their roles in pathogenesis of Chagas' disease [5]. The
18 calpain inhibitor MDL28170 impaired significantly the adhesion rate of epimastigotes
19 to the midgut of *R. prolixus in vitro* suggesting that calpain-like molecules could play an
20 important role in this part of the parasite life cycle. Although MDL28170 is relatively a
21 specific calpain inhibitor, it cannot be ruled out that it may act on other *T. cruzi* cysteine
22 peptidases to a lesser [26]. Nevertheless, the anti-calpain antibodies were also capable
23 of significantly reducing the number of bound parasites to the luminal midgut surface of
24 the insect host.

25 Little is known about which molecules are relevant for the interaction of *T. cruzi*
26 with the invertebrate host. Our group has been studying some peptidases believed to be
27 essential in this part of the cycle of trypanosomatids, like gp63 and cruzipain [17,27].
28 The gp63 homologues found in lower trypanosomatids seem to be indispensable for the
29 nutrition of these parasites as well as in the binding to the insect epithelial cells.
30 Interestingly, gp63 is predominantly expressed in the insect stage of *Leishmania*, and in
31 all insect and plant trypanosomatids examined so far [17]. Furthermore, we
32 demonstrated that when *Phytomonas serpens* cells were pre-treated with either cysteine
33 peptidase inhibitors or anti-cruzipain antibody, a significant reduction of the interaction
34 with explanted salivary glands of the phytophagous insect *Oncopeltus fasciatus* was

1 observed [27]. In *T. cruzi*, it has been shown that glycoinositolphospholipids (GIPLs)
2 are one of the components involved in the adhesion of epimastigote cells to the luminal
3 insect midgut surface and may be one of the determinants of parasite infection in the
4 insect vector [28]. Moreover, it was also shown that a *gp72* knockout of *T. cruzi*
5 displayed a reduced number (less than 1% compared to control) of parasites released in
6 feces of the insect vector *Triatoma infestans* [29]. The dramatically reduced survival of
7 the mutant may be due to either the lack of GP72 itself, or to the altered properties of
8 the flagellum in this mutant that may be critical for establishment in the insect vector
9 [30].

10 The metacyclogenesis process consists in the differentiation of non-infectious *T.*
11 *cruzi* epimastigotes into pathogenic metacyclic trypomastigotes. During this process,
12 epimastigotes adhere to the epithelium of the insect midgut before transforming into
13 metacyclic trypomastigotes [2]. The adhesion is thought to be a pre-requisite for
14 differentiation to the infective form, but less is known about how epimastigote adhesion
15 triggers the differentiation process after the nutritional stress [31]. Our findings from *T.*
16 *cruzi in vitro* metacyclogenesis triggered by an artificial nutritional stress in TAU and
17 TAU 3AAG medium showed that the calpain inhibitor impaired the differentiation
18 process and then decreased the number of metacyclic trypomastigotes without a
19 significantly decrease in the total number of parasites. This result was expected, since
20 previous studies have shown that cysteine peptidases are required during the
21 metacyclogenesis process [31,32]. Despite the toxic effects of MDL28170 against the
22 epimastigote forms previously described [7], it was verified that this inhibitor has
23 reversible effects and just arrested the parasite growth but not exterminate all the
24 epimasgitotes. However, the calpain inhibitor may also act directly inhibiting
25 epimastigote binding to the substrate, since the *in vitro* binding to the insect midgut was
26 substantially inhibited by MDL28170. The inhibitor could also act directly in the
27 viability of the differentiate cells in the presence of the inhibitor, since MDL28170 is
28 toxic against *T. cruzi* bloodstream trypomastigote cells [8]. Nevertheless, no
29 trypanocidal effect has already been demonstrated against metacyclic trypomastigotes to
30 date.

31 Finally, our ultrastructural data demonstrated severe effects of MDL28170 in the
32 reservosomes and Golgi, which showed a washed-out appearance with loss of
33 organelles electrondensity and complete disruption of their membranes. These results
34 indicate that the calpain inhibitor strongly affect *T. cruzi* epimastigote forms, and since

1 the reservosomes are essential for the differentiation process, it may suggest that
2 MDL28170 interfered in the metacyclogenesis, [32,33]. Moreover, a recent proteomic
3 analysis showed the presence of calpain-like molecules in a purified fraction of
4 reservosomes [34]. Similar ultrastructural alterations were observed in epimastigotes
5 treated with inhibitors from the major cysteine peptidase of *T. cruzi*, the cruzipain [35].
6 The cysteine peptidase inhibitor was capable of modifying the intracellular localization
7 of cruzipain and induced its accumulation in peripheral dilations of Golgi cistern, these
8 abnormalities were followed by distention of endoplasmatic reticulum and nuclear
9 membranes [35]. Taken together, the present results indicate that *T. cruzi* calpains may
10 be essential proteins involved in the differentiation and infectivity of epimastigote forms
11 of the parasite.

12 It has been almost ten years since the first calpain-like protein CAP5.5 was
13 characterized in *T. brucei* [15]. Since then, our group has been studying calpains
14 homologues from lower trypanosomatids, like *Crithidia deanei* [36] and *Herpetomonas*
15 *samuelpessoai* [37], and form *L. amazonensis* [6] and *T. cruzi* [7,8]. In the latter, it was
16 shown, by a distinct research group, that a calpain-related mRNA is expressed 2.5-times
17 more in epimastigotes under nutritional stress, which precedes the metacyclogenesis,
18 than in epimastigotes in complete medium [38]. Also, a proteomic analysis of *T. cruzi*
19 cells resistant to benznidazole revealed that a calpain-like cysteine peptidase is
20 exclusively detected in samples of the resistant phenotype [39]. Our first report in *T.*
21 *cruzi* demonstrated that epimastigote forms have molecules that share antigens with
22 invertebrate calpain-related enzymes, such as *D. melanogaster* calpain. These molecules
23 are distributed in distinct phylogenetic lineages of the parasite, and also, the calpain
24 inhibitor MDL28170 arrested the growth of *T. cruzi* in a dose-dependent manner [7].
25 Simultaneously, the absence of cross-reactivity between calpain-like molecules in *T.*
26 *cruzi* and anti-human m-calpain is suggestive of substantial structural differences
27 among these molecules, as previously described [14]. Here, we extended our findings
28 showing that the cross-reactivity between *T. cruzi* epitopes and antibodies raised against
29 *T. brucei* CAP5.5, and two calpains from American lobster *Homarus americanus*.

30 More recently, we investigated the trypanocidal effect of MDL28170 in the
31 trypomastigote and amastigote forms of *T. cruzi* by parasite-macrophage interaction
32 assays. The parasites pre-treated with the inhibitor presented a clear dose-dependent
33 inhibition of the interaction process. In addition, macrophages experimentally infected
34 with *T. cruzi* that were treated with the calpain inhibitor presented a significant

1 reduction of the percentage of the infection and in the number of internalized parasites
2 [8]. Herein, we reported the cross-reactivity of distinct anti-calpain antibodies to *T.*
3 *cruzi* epimastigote cells and that these antibodies are capable of impairing the parasite
4 attachment to the insect midgut *in vitro*. It was also reported the effects of MDL28170
5 on *T. cruzi-R. prolixus in vitro* interaction assay, on bloodstream trypomastigote
6 viability, on the metacyclogenesis process and on the ultrastructure of epimastigote
7 forms. Although more studies are necessary for better understanding the functional role
8 of calpain-related proteins in *T. cruzi*, our work adds new insights into the possible
9 functions of these calpain homologues, and into the possibility of using calpain
10 inhibitors as a promising alternative in the treatment of Chagas' disease.

11

12 **Acknowledgments**

13

14 This study was supported by MCT/CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento
15 Científico e Tecnológico), FUJB (Fundação Universitária José Bonifácio), CEPG/UFRJ,
16 FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de
17 Janeiro) and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). The funders had no role in study
18 design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.
19 The authors are grateful to Dr. Yasufumi Emori (Department of Biophysics and
20 Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Tokyo, Japan) for donating the anti-*Dm*-
21 calpain, Dr. Ralph Nixon (Department of Psychiatry and Program in Neuroscience,
22 Harvard Medical School, USA) for donating the anti-C21, anti-C23 and anti-C24
23 antibodies, Dr. Keith Gull (School of Biological Sciences, University of Manchester, UK)
24 for donating the anti-CAP5.5 antibody and Dr. Donald M. Mykles (Department of
25 Biology, Cell and Molecular Biology Program and Program in Molecular, Cellular and
26 Integrative Neurobiology, Colorado State University, USA) for donating the anti-CDPIIb
27 and anti-*Ha*-CalpM.

28

29 **Author Contributions**

30

31 Conceived and designed the experiments: VEV RFSMB ALS MHB CMdL.
32 Performed the experiments: VEV RFSMB. Analyzed the data: VEV RFSMB ALSS

1 MHB CMdL. Contributed reagents/materials/analysis tools: RFSMB ALSS MHB
2 CMdL. Wrote the paper: VEV CMdL.

3

4 **References**

5

6 1. Drugs for Neglected Diseases initiative (2010). New agreement signed to join forces
7 to tackle Chagas disease. DNDi. Available from: <[http://www.dndi.org/press-](http://www.dndi.org/press-releases/673-new-agreement-to-tackle-chagas-disease.html)
8 [releases/673-new-agreement-to-tackle-chagas-disease.html](http://www.dndi.org/press-releases/673-new-agreement-to-tackle-chagas-disease.html)> Accessed 2010 Apr 15.

9

10 2. De Souza W (1984) Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Int Rev Cytol 86: 197-283

11

12 3. Azambuja P, Ratcliffe NA, Garcia ES (2005) Towards an understanding of the
13 interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect
14 host *Rhodnius prolixus*. An Acad Bras Cienc 77: 397-404.

15

16 4. Bonaldo MC, Souto-Padrón T, De Souza W, Goldenberg S (1988) Cell-substrate
17 adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. J Cell Biol 106: 349-1358.

18

19 5. Vermelho AB, Giovanni-de-Simone S, d'Avila-Levy CM, Santos ALS, Melo ACN,
20 *et al.* (2007) Trypanosomatidae peptidases: a target for drugs development. Curr Enz
21 Inhib 3: 19-48.

22

23 6. d'Avila-Levy CM, Marinho FA, Santos LO, Martins JLM, Santos ALS, *et al.* (2006)
24 Antileishmanial activity of MDL28170, a potent calpain inhibitor. Int J Antimicrob
25 Agents 28: 138-142.

26

27 7. Sangenito LS, Ennes-Vidal V, Marinho FA, Da Mota FF, Santos ALS, *et al.* (2009)
28 Arrested growth of *Trypanosoma cruzi* by the calpain inhibitor MDL28170 and
29 detection of calpain homologues in epimastigote forms. Parasitology 136: 433-441.

30

31 8. Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM
32 (2010) Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of
33 *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. J Antimicrob Chemother [Epub ahead of print].

- 1
- 2 9. Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol*
3 *Rev* 83: 731-801.
- 4
- 5 10. Ray SK, Hogan EL, Banik HL (2003) Calpain in the pathophysiology of spinal cord
6 injury: neuroprotection with calpain inhibitors. *Brain Res Rev* 42: 169-185.
- 7
- 8 11. Lescop C, Herzner H, Siendt H *et al.* (2005) Novel cell-penetrating alpha-keto-
9 amide calpain inhibitors as potential treatment for muscular dystrophy. *Bioorg Med*
10 *Chem Lett* 15: 5176-5181.
- 11
- 12 12. Araújo-Couto L, Sampaio MN, Hokoc JN *et al.* (2004) Calpain inhibitor 2 prevents
13 axonal degeneration of opossum optic nerve fibers. *J Neurosci Res* 77: 410-419.
- 14
- 15 13. Saatman KE, Murai H, Bartus RT *et al.* (1996) Calpain inhibitor AK295 attenuates
16 motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *Proc Natl*
17 *Acad Sci* 93: 3428-3433.
- 18
- 19 14. Ersfeld K, Barraclough H, Gull K (2005) Evolutionary relationships and protein
20 domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *J*
21 *Mol Evol* 61: 742-757.
- 22
- 23 15. Hertz-Fowler C, Ersfeld K, Gull K (2001) CAP5.5, a life-cycle-regulated,
24 cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related
25 proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 116: 25-34.
- 26
- 27 16. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S (1985) *In vitro*
28 differentiation of cruzi under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol* 16:
29 315-327.
- 30
- 31 17. Azambuja P & Garcia ES (1997) Care and maintenance of triatomine colonies. In:
32 Crampton JM, Beard CB, Loid C. (Eds.) *Molecular Biology of Insect Disease Vectors:*
33 *a Methods Manual*. Chapman and Hall, London, pp. 56-64.
- 34

- 1 18. Santos ALS, Branquinha MH, D'Avila-Levy CM (2006) The ubiquitous gp63-like
2 metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *An Acad Bras*
3 *Cienc* 78: 687-714.
- 4
- 5 19. Emori Y & Saigo K (1994) Calpain localization changes in coordination with actin-
6 related cytoskeletal changes during early embryonic development of *Drosophila*. *J Biol*
7 *Chem* 269: 25137-25142.
- 8
- 9 20. Grynspan, F, Griffin WR, Cataldo A, Katayama S, Nixon RA (1997) Active site-
10 directed antibodies identify calpain II as an early-appearing and pervasive component of
11 neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Brain Res* 763: 145-158.
- 12
- 13 21. Beyette JR, Emori Y, Mykles DL (1997) Immunological analysis of two calpain-
14 like Ca²⁺-dependent proteinases from lobster striated muscles: relationship to
15 mammalian and *Drosophila* calpains. *Arch Biochem Biophys* 337: 232-8.
- 16
- 17 22. Yu X & Mykles DL (2003) Cloning of a muscle-specific calpain from the American
18 lobster *Homarus americanus*: expression associated with muscle atrophy and restoration
19 during moulting. *J Exp Biol* 206: 561-75.
- 20
- 21 23. Meirelles RMS & Soares MJ (2001) Quick fixation of eukaryotic cell suspensions
22 for routine transmission electron microscopy. *Acta Microscopica* 10:19-22.
- 23
- 24 24. Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V (2001) The major cysteine proteinase of *Trypanosoma*
25 *cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Current Pharm Des* 7: 1143-
26 1156.
- 27
- 28 25. Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM *et al.* (1992) Inhibitors of
29 the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the
30 intracellular development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *J Mol Biochem Parasitol* 52:
31 175-184.
- 32
- 33 26. Rami A, Ferger D, Krieglstein J (1997) Blockade of calpain proteolytic activity
34 rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci Res* 27: 93-97.

- 1
- 2 27. Santos ALS, d'Avila-Levy CM, Dias FA, Ribeiro RO, Pereira FM *et al.* (2006)
- 3 *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure
- 4 and host adhesion. *Int J Parasitol* 36: 47-56.
- 5
- 6 28. Nogueira NF, Gonzalez MS, Gomes JE, de Souza W, Garcia ES *et al.* (2007)
- 7 *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the
- 8 luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. *Exp Parasitol* 116: 120-8.
- 9
- 10 29. Basombrío MA, Gómez L, Padilla AM, Ciaccio M, Nozaki T *et al.* (2002) Targeted
- 11 Deletion of the gp72 gene decreases the infectivity of *Trypanosoma cruzi* from mice
- 12 and insect vectors. *J Parasitol* 88: 489-493.
- 13
- 14 30. De Jesus AR, Cooper R, Espinosa M, Gomes JE, Garcia ES *et al.* (1993) Gene
- 15 deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp72 in the insect
- 16 and mammalian stages of the life cycle. *J Cell Sci* 106: 1023-33.
- 17
- 18 31. Figueiredo RCBQ, Rosa DS, Soares MJ (2000) Differentiation of *Trypanosoma*
- 19 *cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by
- 20 nutritional stress. *J Parasitol* 80: 1213-1218.
- 21
- 22 32. Figueiredo RCBQ, Steindel M, Soares MJ (1994) The reservosomes of epimastigote
- 23 forms of *Trypanosoma cruzi*: occurrence during *in vitro* cultivation. *Parasitology* 80:
- 24 517-522.
- 25
- 26 33. Duschak VG, Barboza M, García GA, Lammel EM, Couto AS, *et al.* (2006) Novel
- 27 cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasitology* 132: 345-355.
- 28
- 29 34. Sant'Anna C, Nakayasu ES, Pereira MG, Lourenço D, de Souza W, *et al.*
- 30 (2009) Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. *Proteomics* 7:
- 31 1782-94.
- 32

- 1 35. Engel JC, Doyle PS, Palmer J, Hsieh I, Bainton DF et al. (1998) Cysteine protease
2 inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. J Cell
3 Sci 111: 597-606.
- 4
- 5 36. d'Avila-Levy CM, Souza RF, Gomes RC, Vermelho AB, Branquinha MH (2003) A
6 novel extracellular calcium-dependent cysteine proteinase from *Crithidia deanei*. Arch
7 Biochem Biophys 420: 1-8.
- 8
- 9 37. Pereira FM, Elias CG, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos ALS (2009)
10 Cysteine peptidases in *Herpetomonas samuelpessoai* are modulated by temperature and
11 dimethylsulfoxide-triggered differentiation. Parasitology 136: 45-54.
- 12
- 13 38. Giese V, Dallagiovanna B, Marchini FK, Pavoni DP, Krieger MA et al. (2008)
14 *Trypanosoma cruzi*: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds
15 of stress. Mem Inst Oswaldo Cruz 103: 598-601.
- 16
- 17 39. Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirdé P et al. (2008)
18 Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. J Proteome Res 6:
19 2357-67.

20

21 **FIGURE LEGENDS**

22

23 **Figure 1. Detection of cross-reactivity between a calpain-like protein from**
24 ***Trypanosoma cruzi* Y strain and anti-calpain antibodies.** (A) Flow cytometric
25 analysis showing the anti-calpain antibodies binding to *T. cruzi* epimastigote forms.
26 Paraformaldehyde-fixed cells were incubated in the absence (autofluorescence) or in
27 the presence of 4 anti-calpain antibodies: anti-*Dm*-calpain, anti-CDPIIb, anti-*Ha*-
28 CalpM and anti-CAP5.5 (1:100 dilution) and analyzed by flow cytometry. When
29 treated only with the secondary-FITC antibody, cells generated similar curves to that
30 observed in the autofluorescence of cells (data not shown). Representative data of the
31 analysis of 10000 cells from 1 of 3 experiments are shown. (B) Fluorescence
32 microscopy showing the labeling of *T. cruzi* with the anti-*Dm*-calpain antibody. Fixed
33 cells were analyzed under differential interferential contrast images (a, c) and

1 immunofluorescence (b, d). Parasites treated only with the secondary antibody
2 presented no fluorescence intensity (b). The bars represent 1 μm .

3
4 **Figure 2. Effect of MDL28170 and anti-calpain antibody in the interaction process**
5 **between *T. cruzi* and explanted guts of *Rhodnius prolixus*.** Epimastigotes (1.0×10^7
6 cells) were treated for 30 min at 28 °C with increasing concentrations of MDL28170
7 (6.25 to 50 μM), or incubated for 1 h with the anti-calpain (1:100) or the pre-immune
8 serum (1:100) in 200 μl of BHI. The data from DMSO represents the concentration
9 present in the highest dose of the drug. The viability of the parasites was not affected by
10 the treatments used in this set of experiments. Then, parasites were washed, and
11 incubated for 20 min at 28°C with *R. prolixus* dissected posterior midguts that were
12 sliced open longitudinally. Subsequently, the explanted midguts were spread onto glass
13 slides to count the number of attached parasites per epithelial cells. For each
14 experimental group 4 insect midguts were used, and 100 epithelial cells were counted
15 randomly. The results are shown as the mean \pm standard error of the mean of three
16 independent experiments.

17
18 **Figure 3. Effect of MDL28170 on *T. cruzi* metacyclogenesis *in vitro*.** Epimastigotes
19 from the stationary phase of growth (5.0×10^8 cells) were incubated in TAU3AAG
20 medium for 96 h to induce cellular differentiation to metacyclic trypomastigotes.
21 Parasites were treated with increasing concentrations of MDL28170 (6.25 to 50 μM).
22 The data from DMSO represents the concentration present in the highest dose of the
23 drug. At each time point, culture supernatants were collected and the number of
24 epimastigotes and metacyclic trypomastigotes was determined by cell counting in a
25 Neubauer chamber. The results correspond to the mean of three independent
26 experiments performed in triplicate.

27
28 **Figure 4. *In vitro* efficacy of MDL28170 on *T. cruzi* bloodstream trypomastigotes**
29 **viability.** Bloodstream trypomastigote forms obtained from Swiss mice (5.0×10^6 cells)
30 were treated with increasing concentrations of MDL28170 (6.25 to 50 μM) for 24 h.
31 The data from DMSO represents the concentration present in the highest dose of the
32 drug. Thereafter, viable parasites were counted by trypan blue exclusion and mobility.

1 The results are expressed in viability percentage in relation to control. The results
2 correspond to the mean of three independent experiments performed in triplicate.

3

4 **Figure 5. Ultrastructural effects of MDL28170 in *T. cruzi* epimastigotes.** (a,b)

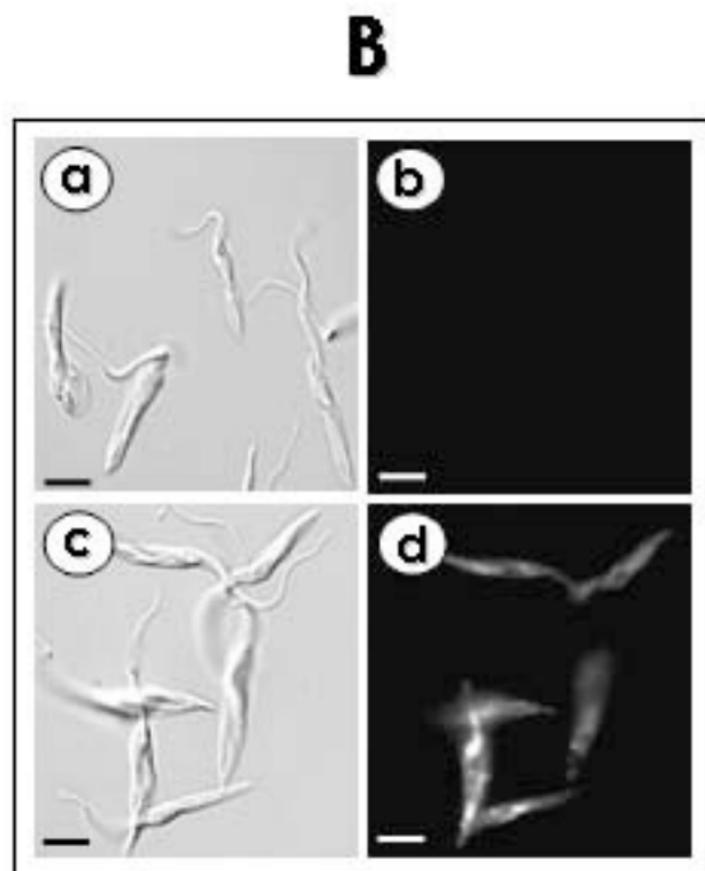
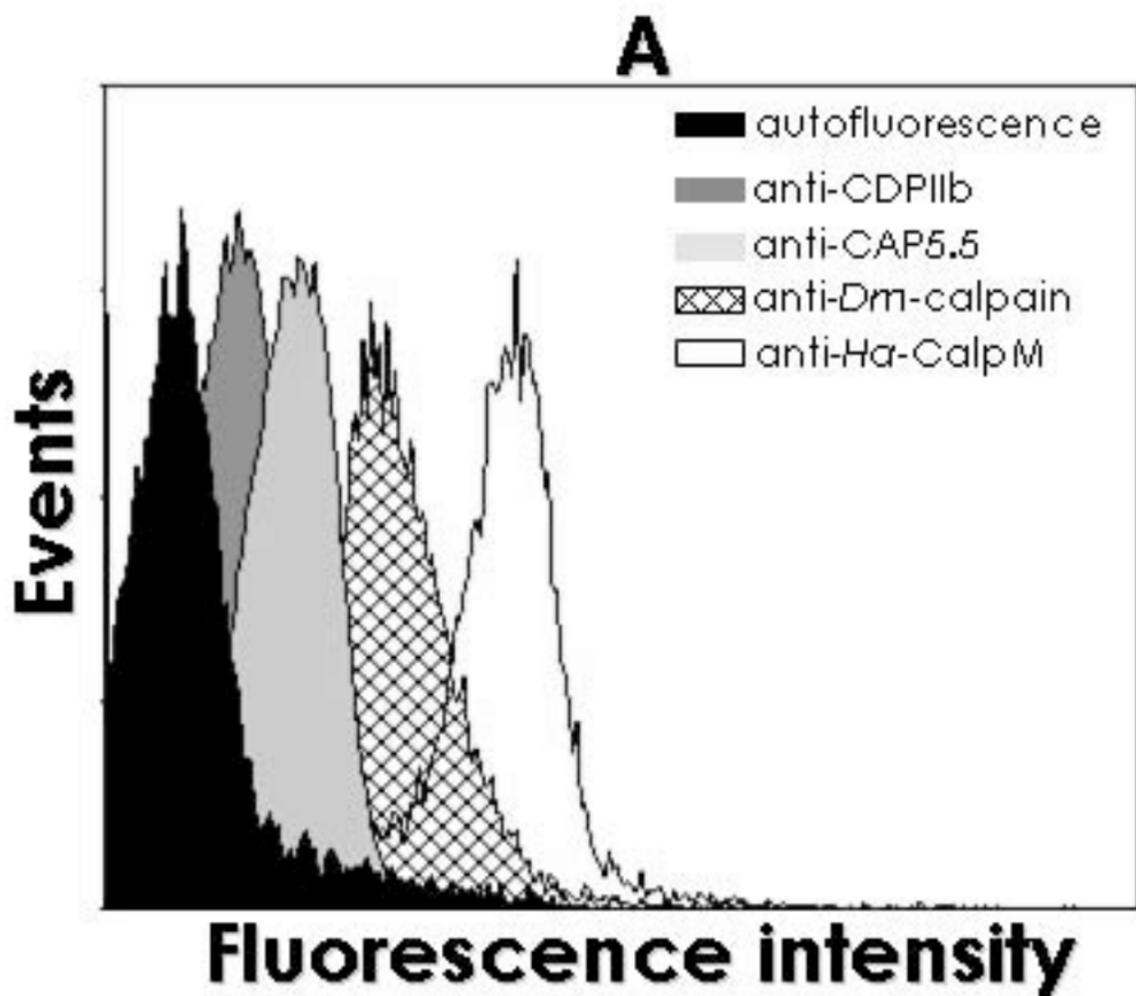
5 Control parasites showing typical elongated morphology with normal kinetoplast (K),

6 mitochondrion (M), nucleus (N) and Golgi (G). (c-g) The treatment of epimastigotes

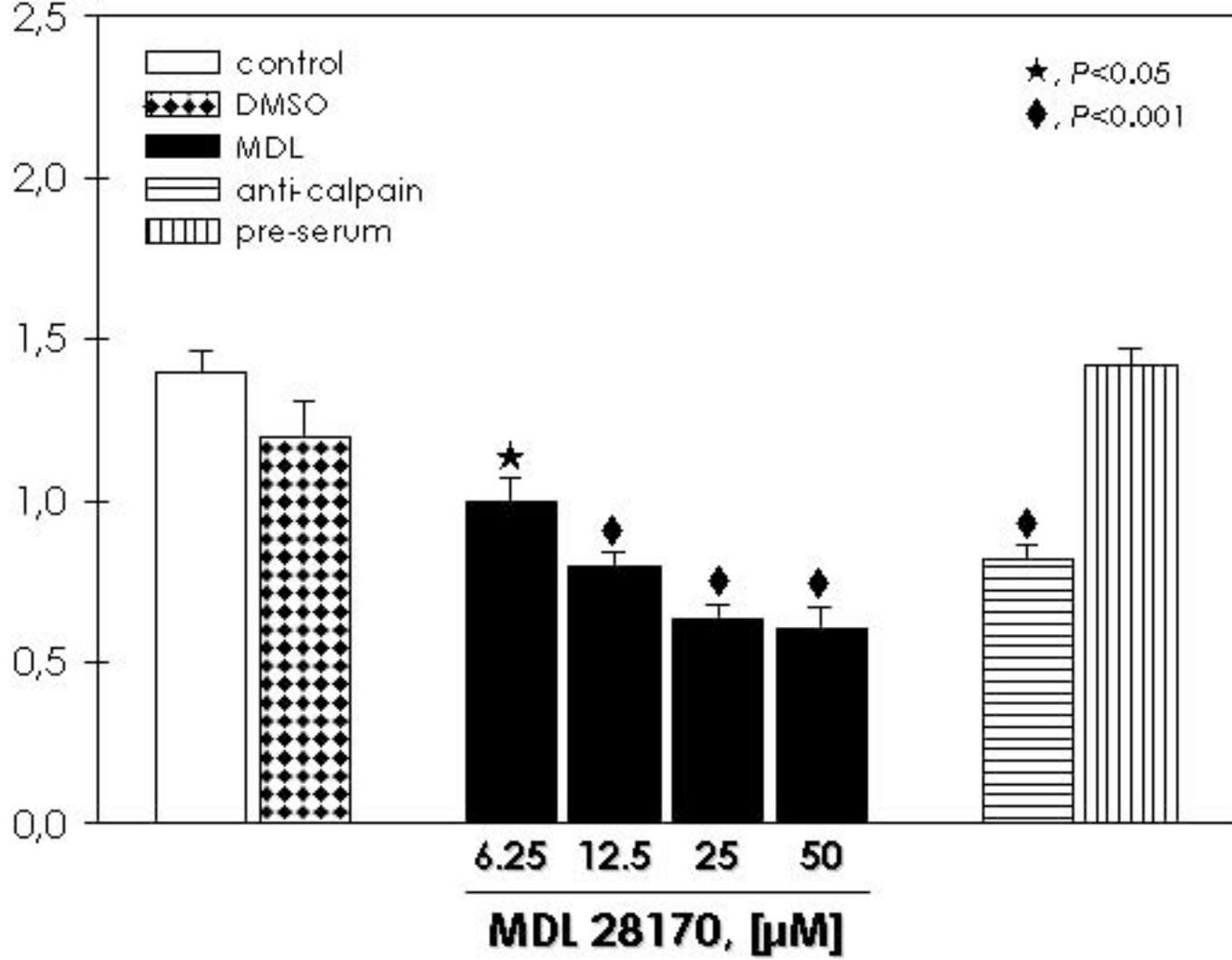
7 with 34 μ M of the inhibitor for 72 h led to an extensive disorganization in the

8 reservosomes (asterisks), plasma membrane alterations (arrows) as well as to the

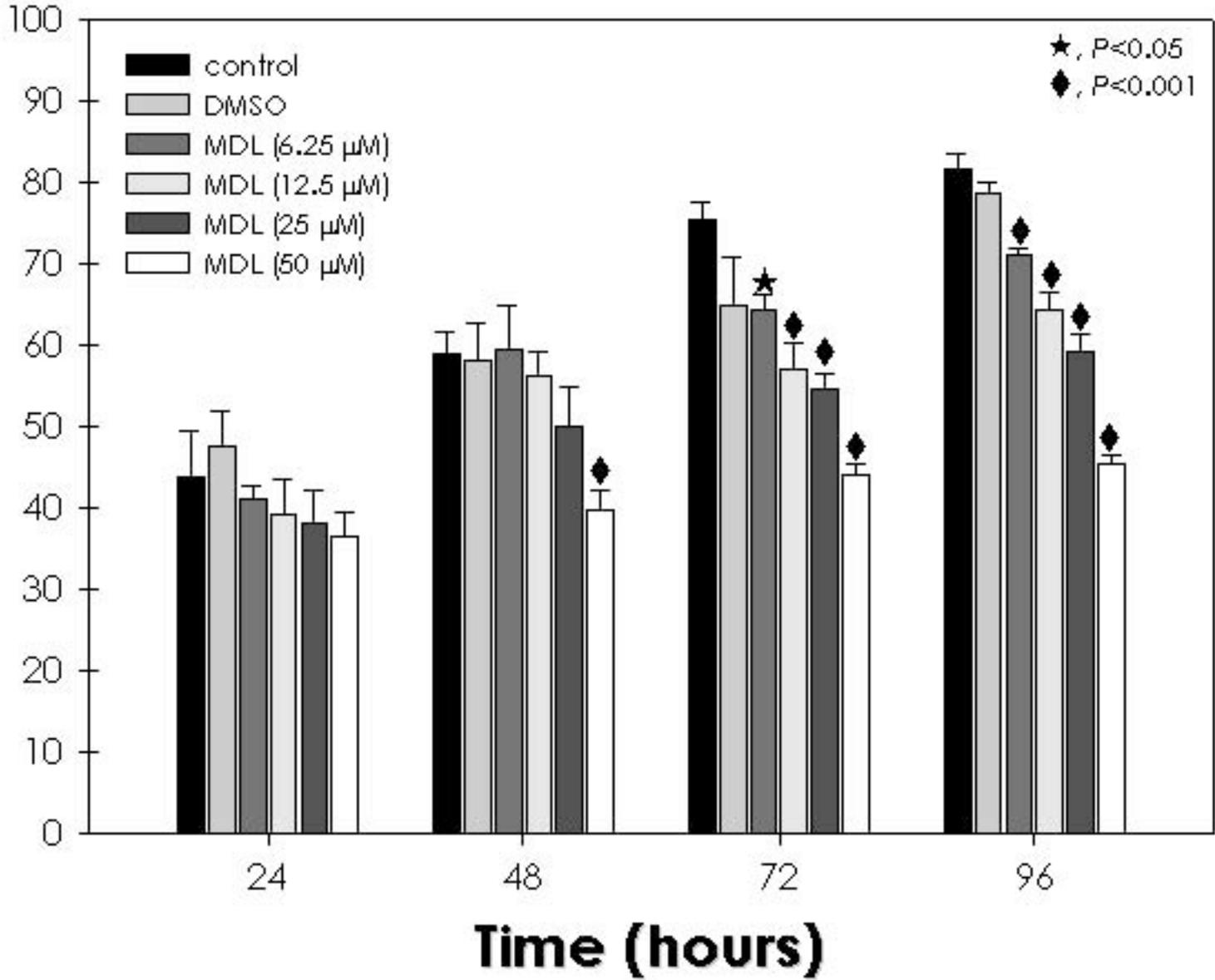
9 disruption of Golgi cisternae (stars). Bars = 0.5 μ m.



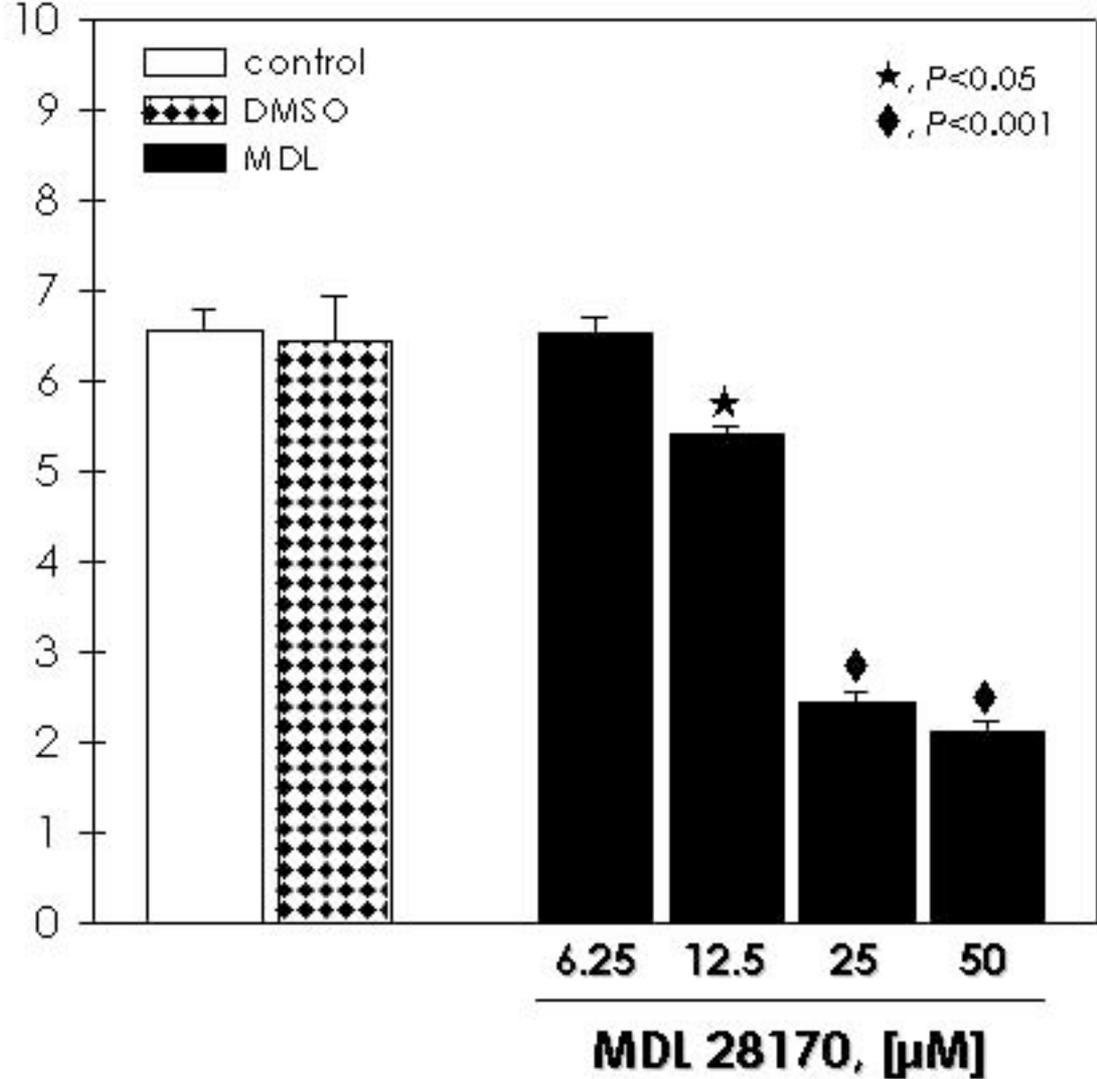
Parasites/epithelial cell

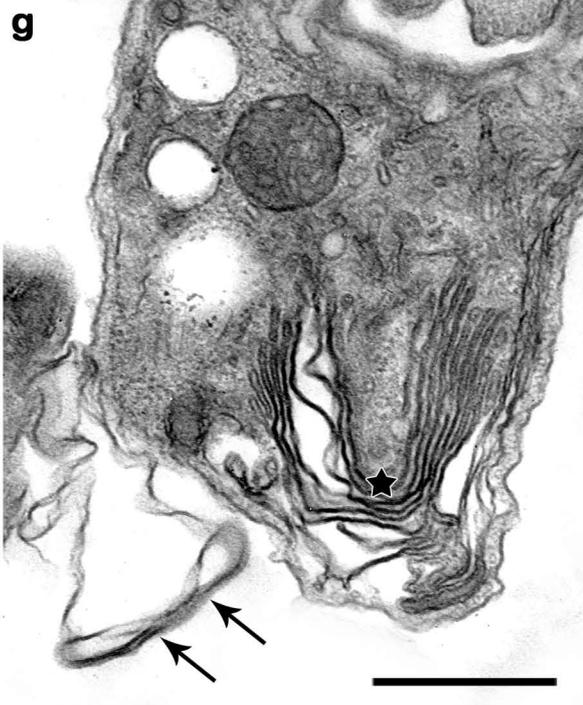
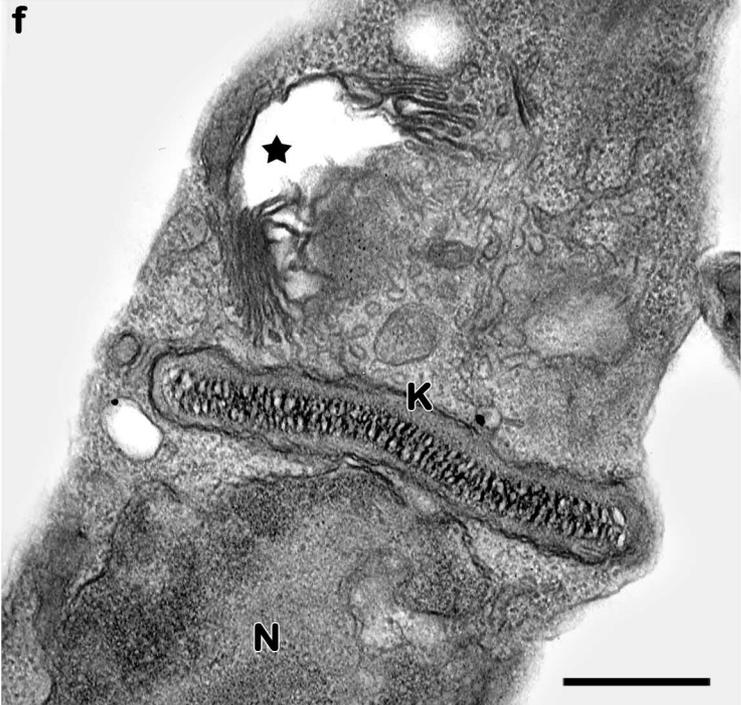
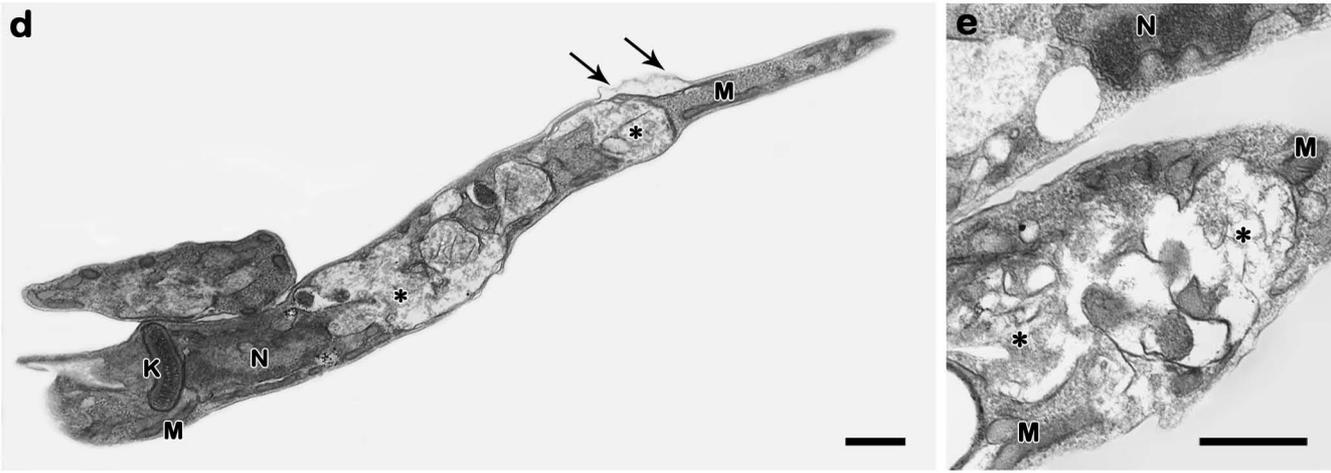
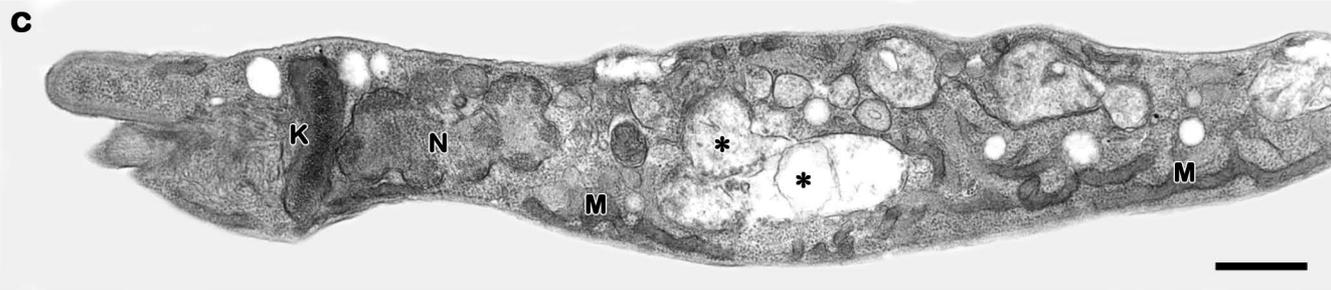
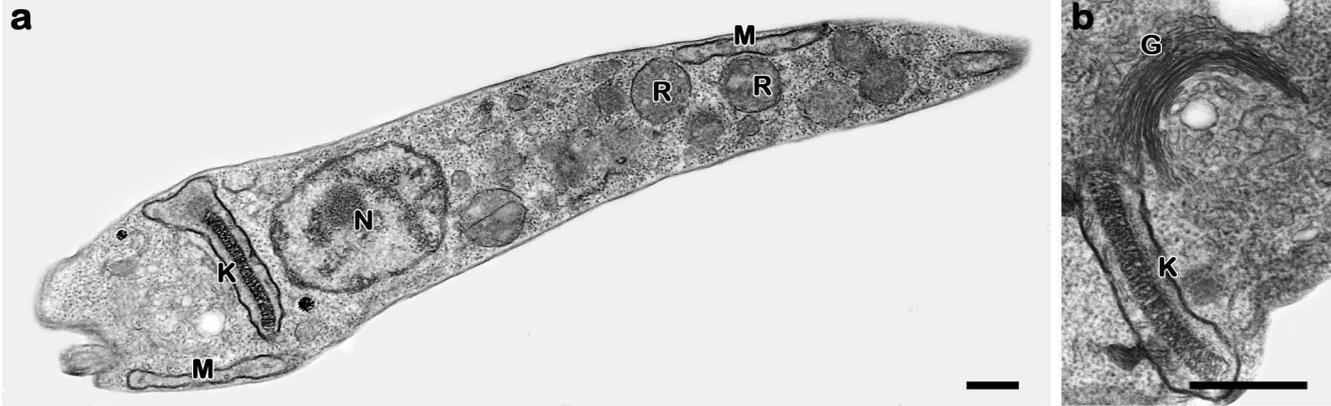


% Metacyclic trypanastigote



Number of cells $\times 10^6$





IV. DISCUSSÃO

Entre os protozoários, os tripanossomatídeos constituem um grupo de parasitos uni-flagelados caracterizados pela presença do cinetoplasto, DNA mitocondrial único em sua estrutura, função e modo de replicação (VICKERMAN, 1994; DE SOUZA *et al.*, 2009). Uma fração desses parasitos se especializou de forma a parasitar o homem, como o *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da doença do sono Africano; o *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas ou tripanossomíase americana, e as diferentes espécies do gênero *Leishmania*, responsáveis por um amplo espectro de manifestações clínicas que variam de cutâneas e mucocutânea à leishmaniose visceral (HANDMAN, 1999; MATTHEWS, 2005; DE SOUZA, 2002). Apesar dos grandes avanços no combate às doenças infecciosas no século passado, esses parasitas continuam a constituir um fardo social e econômico sobre as sociedades humanas, particularmente nos países em desenvolvimento. Nesse sentido, há uma ausência de agentes quimioterápicos eficazes para o tratamento de doenças causadas por esses protozoários. A atual terapia é limitada a algumas drogas de toxicidade inaceitável, de difícil administração e com falhas no tratamento, cujo aumento na resistência tem se tornado um grave problema (FAIRLAMB, 2003; CAVALLI & BOLOGNESI, 2009, WILKINSON & KELLY, 2009; MCKERROW *et al.*, 2009; URBINA, 2010). Novos medicamentos devem ser desenvolvidos e, diante desta necessidade, foram realizados diversos testes baseados na utilização de compostos escolhidos através de estudos que identifiquem alvos metabólicos do parasito, ou escolhidos empiricamente. Além disso, a expressão variável das proteínas pelos diferentes estágios do ciclo de vida desses tripanossomatídeos, que se alternam entre hospedeiros vertebrados e invertebrados e por cepas distintas, deve ser considerada quando os novos alvos terapêuticos são avaliados.

Com a recente publicação do genoma completo de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*, foi possível descobrir uma grande família de proteínas similares às calpaínas na família Trypanosomatidae (ERSFELD *et al.*, 2005), o que abriu a possibilidade de explorar um novo alvo terapêutico. Ersfeld e colaboradores (2005) encontraram um total de 18 seqüências de que podem codificar proteínas similares às calpaínas em *T. brucei*, 27 em *L. major*, e 24 em *T. cruzi*. Outros estudos vêm relatando a presença de proteínas similares às calpaínas nos tripanossomatídeos. A primeira proteína homóloga à calpaína caracterizada foi a CAP5.5, que consiste de uma proteína do citoesqueleto associada à membrana celular do *T. brucei*. Esta proteína de massa molecular em torno de 80 kDa é detectada apenas nas formas procíclica

desse parasito (HERTZ-FOWLER *et al.*, 2001). No ano passado, o mesmo grupo revelou a presença de uma proteína com funções análogas à CAP5.5 que está presente na forma sanguínea do parasita, a CAP5.5 V (OLEGO-FERNANDEZ *et al.*, 2009). Nesse contexto, nosso grupo purificou uma cisteína-peptidase dependente de cálcio em *C. deanei* que apresenta reatividade cruzada com anticorpos produzidos contra a calpaína de *D. melanogaster* (D'AVILA LEVY *et al.*, 2003). Mais recentemente, demonstramos a presença de moléculas similares às calpaínas reativas contra o mesmo anticorpo e os efeitos do inibidor MDL28170 contra *L. amazonensis* (D'AVILA LEVY *et al.*, 2006).

No presente trabalho, uma abordagem semelhante foi utilizada para verificar a presença de moléculas similares às calpaínas, avaliar os efeitos do inibidor III de calpaínas (MDL28170) sobre as diversas etapas do ciclo de vida do *T. cruzi* e estabelecer as diferenças de susceptibilidade entre os tripanossomatídeos já estudados. Portanto, em princípio, nós identificamos por análises de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e Western blotting moléculas similares às calpaínas reativas contra o anticorpo anti-calpaínas de *D. melanogaster* nas formas epimastigotas do parasito. No ensaio de Western blotting, o polipeptídeo reconhecido apresentou uma massa molecular ao redor de 80 kDa, assim como observado em *C. deanei* (D'AVILA LEVY *et al.*, 2003) e *L. amazonensis* (D'AVILA LEVY *et al.*, 2006). Quando testamos anticorpos anti-calpaínas de *T. brucei* e *Homarus americanus* também verificamos reatividade cruzada pela citometria de fluxo, mas não identificamos bandas reativas no Western Blotting. Nesse contexto, baseado em análises de sequências de DNA, nosso estudo identificou 4 sequências do *T. cruzi* capazes de gerar proteínas com massa molecular predita em torno de 80 kDa que compartilham o mesmo domínio conservado (cd00044) com o fragmento da proteína CAA55297.1, que foi empregado para gerar o anticorpo anti-*Dm*-calpaína (EMORI & SAIGO, 1994). Por esta razão, é possível presumir que este anticorpo é capaz de reconhecer pelo menos uma das 4 proteínas do *T. cruzi*. É importante destacar que o anti-*Dm*-calpaína não reconhece a m-calpaína e a μ -calpaína de humanos (EMORI & SAIGO, 1994). Entretanto, não foi possível verificar reatividade cruzada nos ensaios utilizando os anticorpos anti-calpaínas com epítomos das formas tripomastigotas sanguíneas. Recentemente, um membro da família das calpaínas do *T. cruzi* foi caracterizado (GIESE *et al.*, 2008). O gene que codifica a proteína TcCALPx11 corresponde à proteína XP_816697.1 que é epimastigota-específico, sendo expresso principalmente em epimastigotas submetidos ao estresse nutricional precedendo a metaciclogênese. Nenhuma atividade proteolítica foi detectada para a proteína clonada expressa em vetor heterólogo, e sua expressão diferencial sugere que esta proteína possa ter uma participação na resposta ao

estresse do *T. cruzi* ou na transdução de sinal, que culmina com o processo de metaciclogênese.

Simultaneamente, a ausência de reatividade cruzada entre os homólogos de calpaína em *T. cruzi* e os anticorpos gerados contra a m-calpaína humana sugere diferenças estruturais entre essas moléculas. Nossos resultados mostraram que as moléculas similares às calpaínas do *T. cruzi* que reagem com o anticorpo anti-CAP5.5 estão localizadas principalmente no meio intracelular. A proteína CAP5.5 é caracterizada pela semelhança com a região catalítica das peptidases homologas às calpaínas, sendo detectada apenas nas formas procíclicas do *T. brucei*. A CAP5.5 tem domínios que permitem a ligação ao ácido palmítico e ao ácido mirístico, sugerindo uma estável interação com a membrana celular e com os microtúbulos do citoesqueleto. Curiosamente, como ocorrido com o *T. brucei*, em nosso estudo o anticorpo anti-CAP5.5 marcou o corpo celular, com exceção do flagelo. Os resultados podem indicar uma possível correlação entre a localização dessas calpaínas em ambos os tripanossomas.

Neste trabalho, foram apresentadas evidências de que a manutenção do *T. cruzi* em cultura axênica por um longo período leva a uma diminuição na expressão de moléculas similares às calpaínas, e que a passagem em camundongo restaura os níveis de expressão. Nesse contexto, Contreras e colaboradores (1998) reportaram que a manutenção do *T. cruzi in vitro* pode selecionar subpopulações menos virulentas do que as cepas parentais, e que a perda dessa virulência está associada com modificações das propriedades biológicas do parasito. Essas modificações podem levar a mudanças no perfil protéico, como as observadas nos ensaios de Western blotting com anticorpos dirigidos contra extratos brutos das formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* (CONTRERAS *et al.*, 1998). Contudo, a direta relação entre a expressão de moléculas similares às calpaínas e a virulência não pode ser estabelecida, embora os resultados levantem a possibilidade de que isso possa ocorrer.

Sabe-se atualmente que diversas cepas do *T. cruzi* apresentam um alto nível de divergência biológica, o que levou ao desenvolvimento de vários critérios para o agrupamento das cepas; estudos iniciais revelaram variabilidade substancial de isoenzimas entre os isolados, definindo 3 grupos principais ou zimodemas - Z1, Z2 e Z3 (MILES *et al.*, 1978; 1981). Recentemente, uma comissão para padronização de nomenclatura se reuniu e reconheceu que a nomenclatura para cepas do *T. cruzi* deve ser classificada em seis DTUs, *T. cruzi* I-VI, e emitiu recomendações com justificações detalhadas e suas implicações (ZINGALES *et al.*, 2009). Por outro lado, a posição do zimodema Z3 ainda precisa ser revisto. Nesse contexto, nossos resultados demonstram a direta correlação entre os relativos níveis na detecção de moléculas similares às calpaínas e a classificação das cepas do *T. cruzi*,

o que torna possível que a modulação na expressão dessas proteínas seja detectada. No entanto, as diferenças na expressão das moléculas similares às calpaínas nas diferentes linhagens precisam ser confirmadas pelo uso de um maior número de cepas.

Nossos resultados mostraram que o inibidor de calpaínas diminuiu a proliferação do *T. cruzi*, assim como observado anteriormente pelo nosso grupo com *L. amazonensis* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006). Quando comparados os valores de IC₅₀ para o MDL28170, podemos observar que *L. amazonensis* é mais sensível ao MDL28170 do que as cepas do *T. cruzi*, uma vez que seu valor de IC₅₀ é 19 µM (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006). Estes resultados são confirmados pelo efeito reversível do inibidor sobre o *T. cruzi*, enquanto a atividade anti-leishmanicida desse composto a 25 µM foi irreversível (D'AVILA LEVY *et al.*, 2006). A observação de células arredondadas na microscopia óptica também foi descrita em outros tripanossomatídeos quando tratados com inibidores de cisteína-peptidases, devido ao estresse osmótico causado pelo inibidor (TROEBERG *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2006b). Contudo, nossos resultados sugerem que, assim como ocorrido com *L. amazonensis* (D'AVILA LEVY *et al.*, 2006), o *T. cruzi* possui moléculas similares às calpaínas de invertebrados, o que indica que as calpaínas possam ser o alvo principal do MDL28170. Recentemente, nosso grupo demonstrou que moléculas similares às calpaínas, com reatividade cruzada com o ani-*Dm*-calpaínas foram encontradas no flagelo e no corpo celular das formas promastigotas de *Herpetomonas samuelpessoai*, e sua presença é intensificada nas células paramastigotas induzidas por DMSO (PEREIRA *et al.*, 2009).

Este composto é apenas um dos muitos inibidores da calpaínas sendo testados para diversas doenças fisiológicas humanas associadas à desregulação das calpaínas (SAEZ *et al.*, 2006). As doenças neurodegenerativas constituem um campo onde esses inibidores têm sido extensivamente estudados. Estudos em modelo murino têm demonstrado que os inibidores de calpaínas são capazes de impedir a morte neuronal, e como consequência melhorar o funcionamento neurológico e os distúrbios motores causados por lesões na medula espinhal (RAY *et al.*, 2003), distrofias musculares (LESCOP *et al.*, 2005), pela doença de Alzheimer (HIGUCHI *et al.*, 2005) e por lesões cerebrais provenientes de traumas (SAATMAN *et al.*, 1996; ARAUJO-COUTO *et al.*, 2004). Outros estudos demonstraram ainda que os inibidores de calpaínas são compostos promissores no tratamento de outras doenças, como câncer, isquemia, catarata, algumas infecções virais ou mesmo nos processos de inflamação e dor (ATENCIO *et al.*, 2000; CUZZOCREA *et al.*, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2003; ROBERTSON *et al.*, 2005; CARRAGHER, 2006; DE CLERCQ, 2006). Neste contexto, os inibidores de calpaínas em desenvolvimento podem ser uma alternativa

interessante no tratamento de doenças negligenciadas, como as leishmanioses e a doença de Chagas, uma vez que o efeito desses inibidores seja validado. Além disso, estes inibidores podem ser modificados quimicamente para melhorar sua afinidade de ligação para as calpaínas do *T. cruzi*.

Oscilações nos níveis de expressão das moléculas similares às calpaínas foram observadas quando os epimastigotas do clone Dm28c do *T. cruzi* foram tratados por 24 horas com o MDL28170 na concentração do IC₅₀: uma redução na marcação com o anticorpo anti-Dm-calpaína foi detectada, enquanto que simultaneamente foi observado um aumento na expressão da cruzipaína. A cruzipaína é a principal cisteína-peptidase encontrada no *T. cruzi*, sendo expressa em diferentes níveis nos diferentes estágios do ciclo evolutivo do parasito, e diversas evidências apontam sua participação na penetração no hospedeiro vertebrado, no escape do sistema imune e nos processos de diferenciação (CAZZULO *et al.*, 2001). O efeito letal dos inibidores de cruzipaína deve-se à inibição do processo catalítico da enzima, levando à redução de sua quantidade nos lisossomos e seu acúmulo no Golgi (ENGEL *et al.*, 1998b). A resistência de cepas do *T. cruzi* aos inibidores de cruzipaína é correlacionada com os pequenos níveis de atividade da cruzipaína e secreção dos seus precursores no meio, e com a concomitante regulação positiva de expressão de uma cisteína-peptidase distinta de 30 kDa (ENGEL *et al.*, 2000; YONG *et al.*, 2000). Neste caso, foi suposto que a falta da cruzipaína pode ser compensada pelo aumento da expressão da enzima de 30 kDa (YONG *et al.*, 2000). Interessantemente, a regulação positiva da cruzipaína em transfectantes do *T. cruzi* tem sido associada à metaciclologênese intensificada, mas não com o aumento da infectividade (TOMAS *et al.*, 1997). Coletivamente, essas mudanças bioquímicas podem demonstrar a correlação da expressão dos níveis de cisteína-peptidases no *T. cruzi*, e pode-se especular que, como previamente sugerido por Yong e colaboradores (2000), a regulação positiva de uma determinada cisteína-peptidase pode ser necessária para remover os níveis tóxicos de um inibidor que é ativo contra outra cisteína-peptidase, como as moléculas similares às calpaínas detectadas.

No presente trabalho, nós mostramos a eficácia do MDL28170 contra os tripomastigotas sanguíneos e no tratamento da infecção experimental de macrófagos, sem que este inibidor apresente qualquer efeito citotóxico relevante para as células do hospedeiro nas concentrações testadas. Além disso, o tratamento dos tripomastigotas antes da infecção dos macrófagos murinos também apresentou uma redução significativa sobre as taxas de infecção. Estes resultados sugerem que o inibidor também interfere em etapas iniciais da internalização do *T. cruzi*. Entretanto, embora MDL28170 seja um inibidor específico de

calpaínas, existe a possibilidade do inibidor estar atuando de forma indireta e inespecífica em outras cisteína-peptidases do *T. cruzi*, como as catepsinas B (RAMI *et al.*, 1997).

As peptidases são conhecidas por participarem de forma essencial em diversos processos fisiológicos, o que as tornam um interessante alvo para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças infecciosas. Nesse contexto, as peptidases do *T. cruzi* têm atraído a atenção de muitos laboratórios devido a sua participação na patogênese da doença de Chagas (VERMELHO *et al.*, 2007). O inibidor de calpaínas MDL28170 demonstrou-se capaz de diminuir significativamente a taxa de adesão dos epimastigotas ao intestino médio do inseto vetor, o que sugere que as moléculas similares às calpaínas poderiam desempenhar um importante papel nessa etapa do ciclo de vida do parasito. Corroborando esses dados, o anticorpo anti-*Dm*-calpaína também demonstrou-se capaz de reduzir significativamente o número de parasitos aderidos ao intestino médio do inseto. Até hoje, pouco se sabe sobre as moléculas que são relevantes para a interação do *T. cruzi* com o hospedeiro invertebrado. Nosso grupo vem estudando algumas peptidases que podem ser essenciais nessa etapa do ciclo de vida dos tripanossomatídeos, como a gp63 e a cruzipaína (SANTOS *et al.*, 2006a, b). Os homólogos de gp63 encontrados pelo nosso grupo nos tripanossomatídeos inferiores parecem ser indispensáveis para a nutrição desses parasitos, bem como na ligação às células epiteliais do inseto de seus insetos hospedeiros. Curiosamente, a gp63 é predominantemente expressa nos promastigotas presentes no inseto vetor das leishmanias, e em todos os tripanossomatídeos de insetos e plantas analisados até o momento (SANTOS *et al.*, 2006a). Além disso, nós demonstramos que, quando células de *Phytomonas serpens* são pré-tratadas com inibidores de cisteína-peptidases ou com o anticorpo anti-cruzipaína, há uma redução significativa na interação deste parasito com as glândulas salivares extraídas do inseto *Oncopeltus fasciatus* (SANTOS *et al.*, 2006b). No *T. cruzi*, foi demonstrado que os glicoinositolfosfolípídeos (GIPLs) constituem um dos componentes necessários para a adesão dos epimastigotas à parede intestinal do inseto vetor, o que sugere que os GIPLs possam ser essenciais no processo de infecção do inseto pelo *T. cruzi* (NOGUEIRA *et al.*, 2007). Além disso, outro estudo demonstrou que um *T. cruzi* deficiente de gp72 apresenta um número reduzido (menos de 1% em relação ao controle) de parasitos liberados nas fezes do *Triatoma infestans* (BASOMBRIIO *et al.*, 2002). Entretanto, a reduzida sobrevivência do mutante pode ser em virtude tanto da falta de GP72 em si, ou da deficiência das propriedades do flagelo quase ausente desse mutante, que pode ser essencial para o estabelecimento da infecção no inseto vetor (DE JESUS *et al.*, 1993).

O processo de metaciclo gênese consiste na diferenciação das formas epimastigotas não-infecciosas do *T. cruzi* em tripomastigotas metacíclicos patogênicos. Durante esse processo, os epimastigotas aderem ao epitélio do intestino do inseto e em seguida se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (DE SOUZA, 1984). Acredita-se que a adesão constitui um pré-requisito para a diferenciação para a forma infecciosa, mas pouco se sabe sobre como a adesão dos epimastigotas desencadeia o processo de diferenciação após o estresse nutricional (FIGUEREDO *et al.*, 2000). Nossos resultados demonstraram que o MDL28170 prejudica o processo de metaciclo gênese induzido artificialmente pelo estresse nutricional em meio TAU, diminuindo o número de tripomastigotas metacíclicos do *T. cruzi* após 4 dias de indução da diferenciação. Esse resultado era esperado, uma vez que estudos anteriores demonstraram que as cisteína-peptidases são essenciais durante o processo de metaciclo gênese (FIGUEREDO *et al.*, 1994, 2000). No entanto, o inibidor de calpaínas também pode estar atuando diretamente através da inibição da adesão dos epimastigotas ao substrato, uma vez que também demonstramos que a adesão ao intestino médio do inseto é inibida por MDL28170. Alternativamente, o inibidor pode atuar diretamente na viabilidade das células capazes de diferenciar ainda na presença do inibidor. Como demonstramos, MDL28170 também é tóxico contra tripomastigotas sanguíneos do *T. cruzi*.

No *T. cruzi*, já foi demonstrado por outro grupo que a expressão de um RNA mensageiro de um gene relacionado às calpaínas é 2,5 vezes maior em epimastigotas em estresse nutricional precedente à metaciclo gênese, que em epimastigotas em meio de cultura rico em nutrientes (GIESE *et al.*, 2008). Além disso, através de uma abordagem empregada para a identificação de novos alvos terapêuticos, uma análise proteômica de cepas do *T. cruzi* resistentes ao benzonidazol e os nifurtimox revelou que uma cisteína-peptidase similar à calpaína é exclusivamente detectada em amostras com fenótipo de resistência *in vivo* (ANDRADE *et al.*, 2008). Interessantemente, nenhuma proteína regulada positivamente em comum esteve presente nas três amostras analisadas, provavelmente devido à grande variabilidade genética do parasito, que leva a susceptibilidades distintas para estes compostos (SOUTO *et al.*, 1996).

Por fim, nossos resultados ultraestruturais demonstraram que o inibidor MDL28170 levou a uma desorganização em reservossomos e Golgi das formas epimastigotas, com perda da eletrodensidade das organelas e ruptura completa de suas membranas. O extenso efeito sobre reservossomos reforça os dados de inibição da metaciclo gênese, uma vez que os reservossomos são organelas essenciais para o processo de diferenciação (FIGUEREDO *et al.*, 1994; DUSCHAK *et al.*, 2006). Além disso, uma análise proteômica recente demonstrou a

presença de uma molécula similar à calpaína em uma fração purificada de reservossomos (SANT'ANNA *et al.*, 2009). Danos ultraestruturais similares foram observados em epimastigotas tratados com inibidores de cruzipaína, sendo este capaz de modificar a localização intracelular dessa enzima, induzir a dilatação periférica das cisternas do Golgi, além de distender o retículo endoplasmático e a membrana nuclear do parasito (ENGEL *et al.*, 1998b). Dessa forma, esses resultados apontam que as calpaínas do *T. cruzi* provavelmente são proteínas essenciais envolvidas na diferenciação e infectividade das formas epimastigotas do parasita.

As funções desempenhadas pelas proteínas similares às calpaínas do *T. cruzi* ainda não foram esclarecidas. O efeito causado pelo MDL28170 nos tripanossomatídeos levanta a interessante possibilidade de usar inibidores de calpaínas para melhor compreender as funções dessas moléculas nesses parasitos. Alguns estudos dedicados a elucidar os mecanismos funcionais de proteínas do *T. cruzi* recorreram a inibidores específicos ou anticorpos como uma alternativa metodológica (MEIRELLES *et al.*, 1992; BASTOS *et al.*, 2005). Neste contexto, outros estudos que possam avaliar os efeitos de inibidores de calpaínas sobre a expressão total de proteínas dos parasitos tratados, através de uma abordagem proteômica, por exemplo, podem nos ajudar a melhor compreender as funções das calpaínas nos tripanossomatídeos. Esses estudos, juntamente com abordagens moleculares, provavelmente serão capazes de revelar as funções das calpaínas e adicionar novos dados sobre a possibilidade de utilização desses inibidores como uma alternativa para o tratamento de doenças negligenciadas.

Contudo, nesse trabalho nós demonstramos, primeiramente, que as formas epimastigotas do *T. cruzi* possuem moléculas que compartilham antígenos com homologia às calpaínas já bem caracterizadas em invertebrados, tais como a calpaína de *D. melanogaster*. Estas moléculas puderam ser verificadas em diferentes linhagens filogenéticas do parasito, e sua inibição com o inibidor da calpaínas MDL28170 reduziu a proliferação de formas epimastigotas do *T. cruzi* de forma dose-dependente. Simultaneamente, a ausência de reatividade cruzada entre as moléculas similares às calpaínas do *T. cruzi* contra anticorpos gerados contra a m-calpaína humana sugere diferenças estruturais entre essas moléculas, como descrito anteriormente (ERSFELD *et al.*, 2005). Posteriormente, nós evidenciamos também a reatividade cruzada entre epítomos do *T. cruzi* contra anticorpos produzidos contra a calpaína de *T. brucei*, a CAP5.5, e duas calpaínas de *Homarus americanus*, a CDPIIb e a CalpM. Nós também demonstramos o efeito tripanocida do MDL28170 contra as formas amastigotas e tripomastigotas sanguíneos do *T. cruzi* durante a interação do parasito com

macrófagos peritoneais murinos. Os parasitos pré-tratados com MDL28170 apresentaram uma inibição dose-dependente no processo de interação. Além disso, o tratamento de macrófagos experimentalmente infectados com *T. cruzi* com o inibidor de calpaínas foi capaz de reduzir significativamente o percentual de infecção e o número de parasitos internalizados. MDL28170 foi capaz também de diminuir a adesão das formas epimastigotas do parasito ao intestino de *R. prolixus* em ensaios *in vitro*; diminuir o processo de diferenciação por metaciclogênese induzido artificialmente em meio TAU; e provocar alterações ultraestruturais das formas epimastigotas do parasito tratado. Por fim, verificamos também que anticorpos anti-calpaínas são capazes de impedir a fixação do parasita à parede intestinal de *R. prolixus* em ensaios *in vitro*.

Uma vez que a atividade desregulada de membros da família das calpaínas está envolvida em uma grande variedade de processos biológicos e doenças humanas, esta família de peptidases tem um importante potencial terapêutico; e, assim, grandes esforços têm sido empregados no desenvolvimento de inibidores seletivos para as calpaínas (SAEZ *et al.*, 2006). Embora mais estudos sejam necessários para melhor caracterizar moléculas similares às calpaínas no *T. cruzi*, o nosso trabalho acrescenta novos conhecimentos sobre as possíveis funções dessas moléculas e sobre a possibilidade de utilização de inibidores de calpaínas como uma alternativa promissora no tratamento da doença de Chagas. Nesse sentido, as peptidases representam um alvo interessante, uma vez que podem bloquear funções cruciais desempenhadas pelo parasito no seu ciclo de vida e na interação com seus hospedeiros (SAJID & MCKERROW 2002). Apesar do MDL28170 apresentar alta especificidade para as calpaínas, não podemos descartar a possibilidade de ação inespecífica sobre outras cisteína-peptidases. Porém, se considerarmos sua ação específica e seletiva, os dados apresentados nesta dissertação sugerem que as calpaínas são moléculas cruciais em diversas etapas do ciclo de vida do *T. cruzi*, como viabilidade, ultraestrutura, proliferação, invasão e sobrevivência em células do hospedeiro vertebrado, metaciclogênese, adesão às células do hospedeiro invertebrado. Portanto, as calpaínas do *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.

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho conclui que:

1. As formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* possui moléculas similares às calpaínas capazes de reagir contra anticorpos anti-calpaínas de organismos onde estas moléculas estão melhor caracterizadas;
2. O genoma do *T. cruzi* apresenta sequências com alto grau de identidade à sequência gênica correspondente à proteína utilizada para gerar o anticorpo anti-*Dm*-calpaína;
3. As formas epimastigotas recém-diferenciadas de tripomastigotas obtidos de camundongos infectados apresentam uma maior expressão das moléculas similares às calpaínas reativas contra o anti-*Dm*-calpaína que os epimastigotas mantidos em cultura por um longo período;
4. O inibidor de calpaínas MDL28170 é capaz de inibir significativamente a proliferação das formas epimastigotas do *T. cruzi* e diminuiu a viabilidade das formas tripomastigotas sanguíneas obtidas de camundongos infectados;
5. Há pequenas variações na expressão das moléculas similares às calpaínas reativas ao anti-*Dm*-calpaína nas diferentes linhagens filogenéticas do *T. cruzi*;
6. O MDL28170 é capaz de diminuir significativamente a infecção de macrófagos peritoneais murinos por tripomastigotas sanguíneos e o número de parasitos internalizados nos macrófagos infectados mantidos por 3 dias em cultura;
7. Os anticorpos anti-calpaínas e o inibidor MDL28170 foram capazes de inibir significativamente a adesão de epimastigotas ao epitélio intestinal de *Rhodnius prolixus* em ensaios *in vitro*;
8. O MDL28170 é capaz de inibir significativamente a diferenciação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos pelo processo de metaciclogênese induzido artificialmente em meio TAU;
9. As formas epimastigotas do *T. cruzi* tratadas com MDL28170 apresentaram alterações ultraestruturais em reservossomos, Golgi e membrana plasmática.

VI. BIBLIOGRAFIA

- ABAD-ZAPATERO C, GOLDMAN R, MUCHMORE SW, HUTCHINS C, STEWART K, NAVAZA J, PAYNE CD, RAY TL. Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: implications for the design of antifungal agents. *Protein Sci*, 5, 640-652, 1996.
- ALVES CR, CORTE-REAL S, BOURGUIGNON SC, CHAVES CS, SARAIVA EM. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation *in vitro*. *Exp Parasitol*, 109 (1), 38-48, 2005.
- AMOUR A, BIRD M, CHAUDRY L, DEADMAN J, HAYES D, KAY C. General considerations for proteolytic cascades. *Biochem. Soc Trans*, 32, 15-16, 2004.
- ANDRADE HM, MURTA SM, CHAPEAUROUGE A, PERALES J, NIRDE P, ROMANHA AJ. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. *J Proteome Res*, 7(6), 2357-2367, 2008.
- ANDRADE SG, MAGALHAES JB. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop*, 30(1), 27-35, 1996.
- APARICIO IM, SCHARFSTEIN J, LIMA AP. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infect Immun*, 72(10), 5892-5902, 2004.
- ARAUJO-COUTO L, SAMPAIO-NARCISO M, HOKOÇ JN, BLANCO-MARTINEZ AM. Calpain inhibitor 2 prevents axonal degeneration of opossum optic nerve fibers. *J. Neurosci Res*, 77, 410-419, 2004.
- ATENCIO IA, RAMACHANDRA M, SHABRAM P, DEMERS GW. Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines. *Cell Growth Differ*, 11(5), 247-253, 2000.
- BARNABE C, NEUBAUER K, SOLARI A, TIBAYRENC M. *Trypanosoma cruzi*: presence of the two major phylogenetic lineages and of several lesser discrete typing units (DTUs) in Chile and Paraguay. *Acta Trop*, 78, 127-137, 2001.
- BARNARD DL, HUBBARD VD, BURTON J, SMEE DF, MORREY JD, OTTO MJ, SIDWELL RW. Inhibition of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus

(SARSCoV) by calpain inhibitors and β -D-N4-hydroxycytidine. *Antivir Chem Chemother*, 15, 15-21, 2004.

BARR SC, WARNER KL, KORNREIC BG, PISCITELLI J, WOLFE A, BENET L. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(12), 5160-5161, 2005.

BARRET AJ. Classification of Peptidases. In: *Meth. Enzymol.* Academic Press, Inc., California, 244, 1-15, 1994.

BARRET AJ, RAWLINGS ND, O'BRIEN EA. The *MEROPS* database as a protease information system. *J Struct Biol*, 134, 95-102, 2001.

BARRET AJ, TOLLE DP, RAWLINGS ND. Managing peptidases in the genomic era. *Biol Chem*, 384, 873-82, 2003.

BASOMBRIO MA, GOMEZ L, PADILLA AM, CIACCIO M, NOZAKI T, CROSS GA. Targeted deletion of the gp72 gene decreases the infectivity of *Trypanosoma cruzi* for mice and insect vectors. *J Parasitol*, 88(3), 489-493, 2002.

BASTOS IM, GRELLIER P, MARTINS NF, CADAVID-RESTREPO G, DE SOUZA-AULT MR, AUGUSTYNS K. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem J*, 388, 29-38, 2005.

BAXTER AJ & KRENZELOK EP. Pediatric fatality secondary to EDTA chelation. *Clin Toxicol (Phila)*, 46(10), 1083-4, 2008.

BENITEZ-HERNANDEZ I, MENDEZ-ENRIQUEZ E, OSTOA P, FORTOUL T, RAMIREZ JA, STEMPIN C. Proteolytic cleavage of chemokines by *Trypanosoma cruzi*'s cruzipain inhibits chemokine functions by promoting the generation of antagonists. *Immunobiology*, 215(5), 413-426, 2010.

BHATTACHARYA J, DEY R, DATTA SC. Calcium dependent thiol protease caldonopain and its specific endogenous inhibitor in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*, 126, 9-16, 1993.

BISWAS S, HARRIS F, SINGH J, PHOENIX DA. The in vitro retardation of porcine cataractogenesis by the calpain inhibitor, SJA6017. *Mol Cell Biochem*, 26, 169-173, 2004.

BONALDO MC, D'ESCOFFIER LN, SALLES JM, GOLDENBERG S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Exp Parasitol*,73(1), 44-51, 1991.

BOND JS & BUTLER PE. Intracellular proteases. *Annu Rev Biochem*, 56, 333-364, 1987.

BORGES-PEREIRA J, CASTRO JA, CAMPOS JH, NOGUEIRA JDE S, 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*, 35(4), 315-322, 2002.

BRANDÃO AA, MIRANDA A, DEGRAVE WM, SOUSA MA. The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implicaitons. *Parasitol Res*, 86 (10), 809-12, 2000.

BRANQUINHA MH, VERMELHO AB, GOLDENBERG S, BONALDO MC. Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*, 43(2), 131-135, 1996.

BROWN MJ, WILLIS T, OMALU B, LEIKER R. Deaths resulting from hypocalcemia after administration of edetate disodium: 2003-2005. *Pediatrics*, 118(2), 534-6, 2006.

BURLEIGH BA, CALER EV, WEBSTER P, ANDREWS NW. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. *J Cell Biol*,136(3), 609-620, 1997.

CALER EV, VAENA DE AVALOS S, HAYNES PA, ANDREWS NW, BURLEIGH BA. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J*, 17, 4975-4986, 1998.

CAMPBELL DA, WESTENBERGER SJ, STURM NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med*, 4(6), 549-562, 2004.

CARAFOLI E & MOLINARI M. Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Comm.*, 247, 193-203, 1998.

CARRAGHER NO. Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Curr Pharm Des*, 12, 615-638, 2006.

CARVALHO TMU. Adesão, reconhecimento, sinalização e invasão. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=119>. Acessado em: 26/05/2010.

- CATERINA MC, PERILLO IA, BOIANI L, PEZAROGLO H, CERECETTO H, GONZALEZ M. Imidazolidines as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem*, 16(5), 2226-2234, 2008.
- CAVALLI A & BOLOGNESI ML. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J Med Chem*, 52(23), 7339-7359, 2009.
- CAZZULO JJ, HELLMAN U, COUSO R, PARODI AJ. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues. *Mol Biochem Parasitol*, 38, 41-48, 1990.
- CAZULLO JJ, STOKA V, TURK V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des*, 7(12), 1143-56, 2001.
- CHANDRAMOHANADAS R, DAVIS PH, BEITING DP, HARBUT MB, DARLING C, VELMOUROUGANE G. Apicomplexan parasites co-opt host calpains to facilitate their escape from infected cells. *Science*, 5928, 794-797, 2009.
- CONTRERAS VT, DE LIMA AR, ZORRILLA G. *Trypanosoma cruzi*: maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(6), 753-760, 1998.
- COTTEN M & WEBER JM. The adenovirus protease is required for Virus entry into host cells. *Virology*, 213, 494-502, 1995.
- COURA JR & DIAS J.C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104 (1), 31-40, 2009.
- CUEVAS IC, CAZZULO JJ, SANCHEZ DO. gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. *Infect Immun*, 71(10), 5739-5749, 2003.
- CUZZOCREA S, MCDONALD MC, MAZZON E, SIRIWARDENA D, SERRAINO I, DUGO L. Calpain inhibitor I reduces the development of acute and chronic inflammation. *Am J Pathol*, 157(6), 2065-2079, 2000.
- 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*, 420, 1-8, 2003.

- D'AVILA-LEVY CM, ARAÚJO FM, VERMELHO AB, BRANQUINHA MH, ALVIANO CS, SOARES RM, SANTOS ALS. Differential lectin recognition of glycoproteins in choanomastigote-shaped trypanosomatids: taxonomic implications. *FEMS Microbiol Lett*, 16, 231(2),171-6, 2004.
- 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*, 28(2), 138-142, 2006.
- DA SILVA-LOPEZ RE, MORGADO-DIAZ JA, DOS SANTOS PT, GIOVANNI-DE-SIMONE S. Purification and subcellular localization of a secreted 75 kDa *Trypanosoma cruzi* serine oligopeptidase, 107(2), 159-167, 2008.
- DASH C, KULKARNI A, DUNN B, RAO M. Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 38, 89-119, 2003.
- DEAR N, MATENA K, VINGRON M, BOEHM T. A new subfamily of vertebrate calpains lacking a calmodulin-like domain: implications for calpain regulation and evolution. *Genomics*, 45, 175-184, 1997.
- DE CLERCQ E. Potential antivirals and antiviral strategies against SARS coronavirus infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 4(2), 291-302, 2006.
- DE FREITAS JM, AUGUSTO-PINTO L, PIMENTA JR, BASTOS-RODRIGUES L, GONCALVES VF, TEIXEIRA SM. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*, 2(3), e24, 2006.
- DE JESUS AR, COOPER R, ESPINOSA M, GOMES JE, GARCIA ES, PAUL S. Gene deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein GP72 in the insect and mammalian stages of the life cycle. *J Cell Sci*, 106, 1023-1033, 1993.
- DE SOUZA W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol*, 86, 197-283, 1984.
- DE SOUZA W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm*, 8(4), 269-285, 2002.
- DE SOUZA W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103(4), 313-325, 2008.
- DE SOUZA W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 89-100, 2009.

- DEY R, BHATTACHARYA J, DATTA SC. Calcium-dependent proteolytic activity of a cysteine protease caldonopain is detected during *Leishmania* infection. *Mol Cell Biochem*, 281(1-2), 27-33, 2006.
- DIAS JC. The Brazilian Chagas' Disease Control Programme in 1986. *Rev Soc Bras Med Trop*, 19(3), 129-133, 1986.
- DIAS JC. Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad Saude Publica*, 16, 43-59, 2000.
- DIAS JC. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad Saude Publica*, 23, 13-22, 2007.
- DONKOR IO. A survey of calpain inhibitors. *Curr Med Chem*, 7(12), 1171-1188, 2000.
- DUSCHAK VG, BARBOZA M, GARCIA GA, LAMMEL EM, COUTO AS, ISOLA EL. Novel cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Parasitology*, 132, 345-355, 2006.
- EMORI Y & SAIGO K. Calpain localization changes in coordination with actin-related cytoskeletal changes during early embryonic development of *Drosophila*. *J Biol Chem*, 269(40), 25137-42, 1994.
- ENGEL JC, DOYLE PS, HSIEH I, MCKERROW JH. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med*, 188(4), 725-734, 1998a.
- ENGEL JC, DOYLE PS, PALMER J, HSIEH I, BAINTON DF, MCKERROW JH. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci*, 111, 597-606, 1998b.
- ENGEL JC, TORRES C, HSIEH I, DOYLE PS, MCKERROW JH. Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci*, 113, 1345-1354, 2000.
- ERSFELD K, BARRACLOUGH H, GULL K. Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *J Mol Evol*, 61(6), 742-757, 2005.
- FAIRLAMB AH. Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends Parasitol*, 19, 488-494, 2003.

- FIGUEIREDO RC, STEINDEL M, SOARES MJ. The reservosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: occurrence during in vitro cultivation. Parasitol Res, 80(6), 517-522, 1994.
- FIGUEIREDO RC, ROSA DS, SOARES MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. J Parasitol, 86(6), 1213-1218, 2000.
- FRANZ T, VINGRON M, BOEHM T, DEAR TN. Capn7: a highly divergent vertebrate calpain with a novel C-terminal domain. Mamm Genome, 10(3), 318-321, 1999.
- GAFNI J.& ELLERBY LM. Calpain activation in Huntington's disease. J Neurosci, 22, 4842-4849, 2002.
- GARCIA MP, NOBREGA OT, TEIXEIRA AR, SOUSA MV, SANTANA JM. Characterisation of a *Trypanosoma cruzi* acidic 30 kDa cysteine protease. Mol Biochem Parasitol, 91(2), 263-272, 1998.
- 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, 103(6), 598-601, 2008.
- GOLL DE, THOMPSON VF, LI H, WEI W, CONG J. The calpain system. Physiol Ver, 83, 731-801, 2003.
- GRANDGENETT PM, COUGHLIN BC, KIRCHHOFF LV, DONELSON JE. Differential expression of GP63 genes in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, 110(2), 409-415, 2000.
- GRELLIER P, VENDEVILLE S, JOYEAU R, BASTOS IM, DROBECQ H, FRAPPIER F. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. J Biol Chem, 276(50), 47078-47086, 2001.
- GRUPPI A, CERBAN FM, VOTTERO-CIMA E. Exoantigens from *Trypanosoma cruzi* contain cruzipain. Acta Trop, 63, 141-149, 1997.
- GULL K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. Annu Rev Microbiol, 53, 629-655, 1999.
- HANDMAN E. Cell biology of *Leishmania*. Adv Parasitol, 44, 1-39, 1999.

- HARTH G, ANDREWS N, MILLS AA, ENGEL JC, SMITH R, MCKERROW JH. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 58(1), 17-24, 1993.
- HEBY O, PERSSON L, RENTALA M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. *Amino Acids*, 33(2), 359-366, 2007.
- HERRERA C, BARGUES MD, FAJARDO A, MONTILLA M, TRIANA O, VALLEJO GA. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol*, 7(4), 535-539, 2007.
- 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*, 116, 25-34, 2001.
- HIGUCHI M, IWATA N, SAIDO TC. Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions. *Biochem Biophys Acta*, 1751, 60-67, 2005.
- HILL J & PHYLIP LH. Bacterial aspartic proteinases. *FEBS Lett*, 409(3), 357-360, 1997.
- HO DD, NEUMANN AU, PERELSON AS, CHEN W, LEONARD JM, MARKOWITZ M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 373(6510), 123-126, 1995.
- HOARE CA & WALLACE FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*, 212, 1385-1386, 1966.
- HUGHES AL & PIONTKIVSKA H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Mol Biol Evol*, 20(4), 644-652, 2003.
- JAMES M. Structure and function of aspartic protease: retroviral and cellular enzymes. Plenum Press New York, 1998.
- JANOVY JR, LEE KW, BRUMBAUGH JA. The differentiation of *Herpetomonas megaseliae*: ultrastructural observations. *J Protozool*, 21, 53-59, 1974.
- JOHNSON GVW & GUTTMAN RP. Calpains: inact and active? *BioEssays*, 19, 1011-1018, 1997.

JOYEAU R, MAOULIDA C, GUILLET C, FRAPPIER F, TEIXEIRA AR, SCHREVEL J. Synthesis and activity of pyrrolidinyl- and thiazolidinyl-dipeptide derivatives as inhibitors of the Tc80 prolyl oligopeptidase from *Trypanosoma cruzi*. Eur J Med Chem, 35(2), 257-266, 2000.

KAMEI M, WEBB GC, YOUNG IG, CAMPBELL HD. SOLH, a human homologue of the *Drosophila melanogaster* small optic lobes gene is a member of the calpain and zinc-finger gene families and maps to human chromosome 16p13.3 near CATM (cataract with microphthalmia). Genomics, 51(2), 197-206, 1998.

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, 482, 66-76, 2009.

KAWASHITA SY, SANSON GF, FERNANDES O, ZINGALES B, BRIONES MR. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. Mol Biol Evol, 18(12), 2250-2259, 2001.

KROPF SP. História da doença de Chagas: ciência, saúde e sociedade. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=171>. Acessado em: 21/05/2010.

KULKARNI MM, OLSON CL, ENGMAN DM, MCGWIRE BS. *Trypanosoma cruzi* GP63 proteins undergo stage-specific differential posttranslational modification and are important for host cell infection. Infect Immun, 77(5), 2193-2200, 2009.

LANDFEAR SM, IGNATUSHCHENKO M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol, 115, 1-17, 2001.

LESCOP C, HERZNER H, SIENDT H, BOLLIGER R, HENNEBOHLE M, WEYERMANN P. Novel cell-penetrating alpha-keto-amide calpain inhibitors as potential treatment for muscular dystrophy. Bioorg Med Chem Lett, 15(23), 5176-5181, 2005.

LIU W, APAGYI K, MCLEAVY L, ERSFELD K. Expression and cellular localisation of calpain-like proteins in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol, 169, 20-26, 2010.

MARSHALL C, HITMAN GA, PARTRIDGE CJ, CLARK A, MA H, SHEARER TR. Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells. Mol Endocrinol, 19, 213-224, 2005.

- MASLOV DA & SIMPSON L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol Today*, 1, 30-32, 1995.
- MATTHEWS KR. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*, 118, 283-290, 2005.
- MCKERROW JH, SUN E, ROSENTHAL PJ, BOUVIER J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol*, 47, 821-853, 1993.
- MCKERROW JH, CAFFREY C, KELLY B, LOKE P, SAJID M. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol*, 1, 497-536, 2006.
- MCKERROW JH, DOYLE PS, ENGEL JC, PODUST LM, ROBERTSON SA, FERREIRA R. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 263-269, 2009.
- MEIRELLES MN, JULIANO L, CARMONA E, SILVA SG, COSTA EM, MURTA AC. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol Biochem Parasitol*, 52(2), 175-184, 1992.
- MICHELS PAM, HANNAERT V, BRINGAUND F. Metabolic aspects of glycosomas in trypanosomatidae – new data and views. *Parasitol Today*, 16, 482- 89, 2000.
- MILES MA, TOYE PJ, OSWALD SC, GODFREY DG. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 71(3), 217-225, 1977.
- MILES MA, SOUZA A, POVOA M, SHAW JJ, LAINSON R, TOYE PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, 272(5656), 819-821, 1978.
- MILES MA, CEDILLOS RA, POVOA MM, DE SOUZA AA, PRATA A, MACEDO V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet*, 1(8234), 1338-1340, 1981.
- MONOD M, CAPOCCIA S, LÉCHENNE B, ZAUGG C, HOLDOM M, JOUSSON O. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol*, 292(5-6), 405-19, 2002.
- MOREL C, CHIARI E, CAMARGO EP, MATTEI DM, ROMANHA AJ, SIMPSON L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction

endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci USA, 77(11), 6810-6814, 1980.

MORRIS MI. Posaconazole: a new oral antifungal agent with an expanded spectrum of activity. Am J Health Syst Pharm, 66(3), 225-236, 2009.

MOTTRAM JC, BROOKS DR, COOMBS GH. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. Curr Opin Microbiol, 1, 455-460, 1998.

MUNRO CA & HUBE B. Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy. Trends Microbiol, 4, 173-177, 2002.

MURTA AC, PERSECHINI PM, PADRON TDE S, DE SOUZA W, GUIMARAES JA, SCHARFSTEIN J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. Mol Biochem Parasitol, 43(1), 27-38, 1990.

NAKAMURA M, MIYASHITA H, YAMAGUCHI M, SHIRASAKI Y, NAKAMURA Y, INOUE J. Novel 6-hydroxy-3-morpholinones as cornea permeable calpain inhibitors. Bioorg Med Chem, 11(24), 5449-5460, 2003.

NEFFE AT & ABELL AD. Developments in the design and synthesis of calpain inhibitors. Curr Opin Drug Discov Devel, 8(6), 684-700, 2005.

NEVES PD, MELO LA, LINARDI PM, VITOR WAR. *Typanosoma cruzi* e doença de Chagas Em: Parasitologia humana. 11^a ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

NISHIARA H, NAKAGAWA Y, ISHIKAWA H, OHBA M, SHIMIZU K, NAKAMURA T. Matrix vesicles and media vesicles as nonclassical pathways for 111 the secretion of m-calpain from MC3T3-E1 cells. Biochem Biophys Res Comm, 285, 845-853, 2001.

NOBREGA AA, GARCIA MH, TATTO E, OBARA MT, COSTA E, SOBEL J. Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil. Emerg Infect Dis, 15(4), 653-655, 2009.

NOGUEIRA NF, GONZALEZ MS, GOMES JE, DE SOUZA W, GARCIA ES, AZAMBUJA P. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. Exp Parasitol, 116(2), 120-128, 2007.

- 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*, 160(4), 576-590, 2009.
- OVERATH P, STIERHOF YD, WIESE M. Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol*, 7, 27-33, 1997.
- PALELLA FJ, JR., DELANEY KM, MOORMAN AC, LOVELESS MO, FUHRER J, SATTEN GA. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*, 338(13), 853-860, 1998.
- PARK SY & FERREIRA A. The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J Neurosci*, 25, 5365-5375, 2005.
- PAUGAM A, BULTEAU AL, DUPOUY-CAMET J, CREUZET C, FRIGUET B. Characterization and role of protozoan parasite proteasomes. *Trends Parasitol*, 19(2), 55-59, 2003.
- PEREIRA FM, ELIAS CGR, D'AVILA-LEVY CM, BRANQUINHA MH, SANTOS ALS. Cysteine peptidases in *Herpetomonas samuelpeessoai* are modulated by temperature and dimethylsulfoxide-triggered differentiation. *Parasitology*, 136, 45-54, 2009.
- PINHO RT, BELTRAMINI LM, ALVES CR, DE-SIMONE SG. *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of aspartyl proteases. *Exp Parasitol*, 122(2), 128-133, 2009.
- PINTI M, ORSI CF, GIBELLINI L, ESPOSITO R, COSSARIZZA A, BLASI E, PEPPOLONI S, MUSSINI C. Identification and characterization of an aspartyl protease from *Cryptococcus neoformans*. *FEBS Lett*, 581 (20), 3882-6, 2007.
- PODLIPLAEV SA & ROTISKAYA TA. Classification of isolates of insect's trypanosomatids: isoenzymes analysis. *Parasitology*, 25, 250-256, 1999.
- PORTER SR & SCULLY C. HIV topic update: protease inhibitor therapy and oral health care. *Oral Dis*, 4, 159-163, 1998.
- RAMI A, FERGER D, KRIEGLSTEIN J. Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci Res*, 27, 93-97, 1997.

- RAO MB, TANKSALE AM, GHATGE MS, DESHPANDE VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 597- 635, 1998.
- RAY SK, MATZELLE DD, SRIBNICK EA, GUYTON MK, WINGRAVE JM, BANIK NL. Calpain inhibitor prevented apoptosis and maintained transcription of proteolipid protein and myelin basic protein genes in rat spinal cord injury. *J Chem Neuroanat*, 26(2), 119-124, 2003.
- ROBERTSON LJ, MORTON JD, YAMAGUCHI M, BICKERSTAFFE R, SHEARER TR, AZUMA M. Calpain may contribute to hereditary cataract formation in sheep. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(12), 4634-4640, 2005.
- ROMANHA AJ, DA SILVA PEREIRA AA, CHIARI E, KILGOUR V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp Biochem Physiol B*, 62(2), 139-142, 1979.
- SAATMAN KE, MURAI H, BARTUS RT, SMITH DH, HAYWARD NJ, PERRI BR, MCINTOSH TK. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 3428-3433, 1996.
- SAEZ ME, RAMIREZ-LORCA R, MORON FJ, RUIZ, A. The therapeutic potential of the calpain family: new aspects (Review). *Drug Discov Today*, 11(19- 20), 917-23, 2006.
- SAJID M & MCKERROW JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*, 120, 1-21, 2002.
- SALOTRA P, DUNCAN RC, SINGH R, RAJU BVS, SREENIVAS G, NAKHASI HL. Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Microb Infect*, 8, 637-644, 2006.
- SANTANA JM, GRELLIER P, SCHREVEL J, TEIXEIRA AR. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J*, 325, 129-137, 1997.
- SANT'ANNA C, NAKAYASU ES, PEREIRA MG, LOURENCO D, DE SOUZA W, ALMEIDA IC. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. *Proteomics*, 9(7), 1782-1794, 2009.
- SANTOS ALS, ABREU CM, ALVIANO CS, SOARES RMA. Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. *Parasitology*, 130, 79-88, 2005.

SANTOS ALS, BRANQUINHA MH, D'AVILA-LEVY CM. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *An Acad Bras Cienc*, 78, 687-714, 2006a.

SANTOS ALS, D'AVILA-LEVY CM, DIAS FA, RIBEIRO RO, PEREIRA FM, ELIAS CG, SOUTO-PADRÓN NT, LOPES AH, ALVIANO CS, BRANQUINHA MH, SOARES RMA. *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. *Int J Parasitol*, 36, 47–56, 2006b.

SANTOS ALS, D'AVILA-LEVY CM, ELIAS CGR, VERMELHO AB, BRANQUINHA MH. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microb Infect*, 9, 15-921, 2007.

SCHARFSTEIN J, SCHMITZ V, MORANDI V, CAPELLA MM, LIMA AP, MORROT A. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med*, 192(9), 1289-1300, 2000.

SCHMIDT GD & ROBERTS LS. Kinetoplastida: Trypanosomes and their kin. In: *Foundations of Parasitology* 4th ed., Times Mirror/Mosby College Publishing, p. 53-80, 1989.

SCHOFIELD CJ & DIAS JC. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv Parasitol*, 42, 1-27, 1999.

SELZER PM, PINGEL S, HSIEH I, UGELE B, CHAN VJ, ENGEL JC., BOGYO M, RUSSELL DG, SAKANARI JA, MCKERROW JH. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 11015-11022, 1999.

SILVA DT, DE NAZARETH SLDMM, ALMEIDA D, URBINA JA, PEREIRA MC. Cytoskeleton reassembly in cardiomyocytes infected by *Trypanosoma cruzi* is triggered by treatment with ergosterol biosynthesis inhibitors. *Int J Antimicrob Agents*, 27(6), 530-537, 2006.

DA SILVA-LOPEZ RE, MORGADO-DÍAZ JA, DOS SANTOS PT, GIOVANNI-DE-SIMONE S. Purification and subcellular localization of a secreted 75 kDa *Trypanosoma cruzi* serine oligopeptidase. *Acta Trop*, 107(2), 159-67, 2008.

SOARES MJ, SOUTO-PADRON T, DE SOUZA W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci*, 102, 157-167, 1992.

- SOEIRO MN & DE CASTRO SL. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets*,13, 105-121, 2009.
- SORIMACHI H, ISHIURA S, SUZUK, K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J*, 328, 721-732, 1997.
- SOUTHAN C. A genomic perspective on human proteases as drug targets. *Drug Discov Today*, 6(13), 681-688, 2001.
- SOUTO RP, FERNANDES O, MACEDO AM, CAMPBELL DA, ZINGALES B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, 83(2), 141-152, 1996.
- SOUTO-PADRON T, CAMPETELLA OE, CAZZULO JJ, DE SOUZA W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J Cell Sci*, 96, 485-490, 1990.
- STRACHER A, KESNER L, CARVER T, BARTON NW. Ceptor Corporation. Treatment of traumatic or degenerative neurologic, otologic or ophthalmologic diseases with targeted protease inhibitors. World patent WO2005/108353, 2006.
- TAKAHASHI S, OGASAWARA H, HIWATASHI K, HORI K, HATA K, TACHIBANA T, ITOH Y, SUGIYAMA T. A novel D-aspartyl endopeptidase from *Paenibacillus* sp. B38: purification and substrate specificity. *J Biochem*, 139 (2), 197-202, 2006.
- TEIXEIRA MMG, TAKATA CSA, CONCHON I, CAMPANER M, CAMARGO EP. Ribosomal and kDNA markers distinguish two subgroups of *Herpetomonas* among old species and new trypanosomatids isolated from flies. *J. Parasitol*, 83, 58-65, 1997.
- TERANISHI F, LIU ZQ, KUNIMATSU M, IMAI K, TAKEYAMA H, MANABE T, SASAKI M, OKAMOTO T. Calpain is involved in the HIV replication from the latently infected OM10.1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 303, 940-946, 2003.
- TIBAYRENC M & AYALA FJ. *Trypanosoma cruzi* populations: more clonal than sexual. *Parasitol Today*, 3(6), 189-190, 1987.
- TIBAYRENC M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis*, 2(1),12, 2003.

TOMAS AM & KELLY JM. Stage-regulated expression of cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* is independent of the level of RNA1. *Mol Biochem Parasitol*, 76, 91-103, 1996.

TOMAS AM, MILES MA, KELLY JM. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. *Eur J Biochem*, 244(2), 596-603, 1997.

TROEBERG L, MORTY RE, PIKE RN, LONSDALE-ECCLES J D, PALMER J T, MCKERROW JH, COETZER TH. Cysteine proteinase inhibitors kill cultured bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp Parasitol*, 91, 349–355, 1999.

TYLER KM & ENGMAN DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol*, 31, 472-481, 2001.

UPLA P, MARJOMAKI V, NISSINEN L, NYLUND C, WARIS M, HYYPIA T. Calpain 1 and 2 are required for RNA replication of echovirus 1. *J Virol*, 82(3), 1581-1590, 2008.

URBINA JA, PAYARES G, MOLINA J, SANOJA C, LIENDO A, LAZARDI K. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science*, 273(5277), 969-971, 1996.

URBINA JA, PAYARES G, CONTRERAS LM, LIENDO A, SANOJA C, MOLINA J. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(7), 1771-1777, 1998.

URBINA JA. Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des*, 8(4), 287-295, 2002.

URBINA JA & DOCAMPO R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*, 19(11), 495-501, 2003.

URBINA JA. New advances in the management of a long-neglected disease. *Clin Infect Dis*, 49(11), 1685-1687, 2009.

URBINA JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*, 115, 55-68, 2010.

VALDIVIESO E, DAGGER F, RASCÓN A. *Leishmania mexicana*: identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. *Exp Parasitol*, 116 (1), 77- 82, 2007.

- VANDERKLISH PW & BAHR BA. The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int J Exp Pathol*, 81, 323-339, 2000.
- VERGNES B, GOURBAL B, GORARD 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 Proteom*, 6, 88–101, 2007.
- VERMELHO AB, DE SIMONE G, D'AVILA-LEVY CM, SANTOS ALS, MELO ACN, SILVA JRFP, BON EPS, BRANQUINHA MH. Trypanosomatidae Peptidases: A Target for Drugs Development. *Curr Enz Inhib*, 3, 19-48, 2007.
- VICKERMAN K & PRESTON TM. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In: *Biology of the kinetoplastida*. Academic Press, New York, 1, 35-130, 1976.
- VICKERMAN K & TETLEY L. Flagellar surfaces of parasitic protozoa and their roles in attachment. In: *Cilliary and flagellar membranes* (Edited by Bloodgood R.A.) Plenum Press, New York, 267-304, 1990.
- VICKERMAN K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int J Parasitol*, 24, 1317-1331, 1994.
- VILLALTA F, MADISON MN, KLESHCHENKO YY, NDE PN, LIMA MF. Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. *Front Biosci*, 13, 3714-3734, 2008.
- WALLACE FG. Development stages of trypanosomatids flagellates: a new terminology revisited. *J Protozool*, 3, 51-56, 1977.
- WANG KK, LARNER SF, ROBINSON G, HAYES RL. Neuroprotection targets after traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol*, 19(6), 514-9, 2006.
- WENCK MA, MEDRANO FJ, EAKIN AE, CRAIG SP. Steady-state kinetics of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta*, 1700, 11-18, 2004.
- WILKINSON SR & KELLY JM. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev Mol Med*, 11, e31, 2009.
- 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*, 132, 1-16, 2003.

YONG V, SCHMITZ V, VANNIER-SANTOS MA, DE LIMA AP, LALMANACH G, JULIANO L. 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*, 109, 47-59, 2000.

YOSHIDA N, JANKEVICIUS JV, ROITMAN I, CAMARGO EP. Enzymes of the ornithine-arginine metabolism of trypanosomatids of the genus *Herpetomonas*. *J Protozool*, 25, 550-555, 1978.

ZINGALES B, ANDRADE SG, BRIONES MR, CAMPBELL DA, FERNANDES O. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051-1054, 2009.