

ALEXANDRA LENA GALETOVIC CARABANTES

**Organização e expressão dos genes H49/calpaína que codificam um antígeno
imunodominante de *Trypanosoma cruzi***

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para a obtenção
do título de Doutor em Ciências pelo
programa de pós-graduação em
Microbiologia e Imunologia**

São Paulo

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALEXANDRA LENA GALETOVIC CARABANTES

**Organização e expressão dos genes H49/calpaína que codificam um antígeno
imunodominante de *Trypanosoma cruzi***

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo para a obtenção do título de
Doutor em Ciências pelo programa
de pós-graduação em Microbiologia e Imunologia**

Orientador:

Prof. Dr. José Franco da Silveira Filho

Co-orientador:

Profa. Dra. Márcia Regina Machado do Santos

São Paulo

2009

Galetović Carabantes, Alexandra Lena

Organização e expressão dos genes H49/calpaína que codificam um antígeno imunodominante de *Trypanosoma cruzi*.

/Alexandra Lena Galetović Carabantes. – São Paulo, 2009.
xviii, 172f.

Tese(Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós Graduação em Microbiologia e Imunologia.

Titulo em inglês: Organization and expression of genes H49/calpain that encode an immunodominant antigen of *Trypanosoma cruzi*

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Antígeno imunodominante. 3. Calpaína. 4. Cisteína peptidase. 5. Organização genômica.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Clara Lucia Barbieri Mestriner

Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

ALEXANDRA LENA GALETOVIC CARABANTES

**Organização e expressão dos genes H49/calpaína que codificam um antígeno
imunodominante de *Trypanosoma cruzi***

Presidente da banca:

Prof. Dr. José Franco da Silveira Filho

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Érika Suzuki de Toledo

Profa. Dra. Maria Julia Manso Alves

Profa. Dra. Narcisa Leal da Cunha -e- Silva

Prof. Dr. Paulo César Cotrim

Trabalho realizado na Disciplina de Parasitologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com auxílios financeiros concedidos pelos Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e *Ministerio de Planificación de Chile* (MIDEPLAN).

Labor Omnia Vincit
(*Publius Vergilius Maro*)

Dedicatória

Ao saudoso artista-pintor Alejandro Galetović Mladinić, meu “Papito” amado pelo imenso amor, preocupação, por seu apoio incondicional e por me ensinar o maravilhoso mundo da pintura e fotografia que tanto amou.

A minha mãe por todo amor, preocupação e apoio dedicado.

Ao Milton pelo enorme amor, ajuda, paciência, por ser meu suporte e estar presente em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Franco da Silveira Filho pela orientação, exaustiva correção desta tese e a contribuição em minha formação acadêmica.

À Profa. Dra. Márcia Regina Machado do Santos pela amabilidade, carinho, conselhos, disponibilidade e valiosa ajuda na correção do trabalho.

Aos professores da disciplina de Parasitologia: Dra. Clara Lúcia Barbiéri Mestriner, Dr. Michel Pinkus Rabinovitch, Dra. Nobuko Yoshida e Dr. Renato Arruda Mortara, que de maneira direta ou indireta contribuíram para minha formação, seja por seu exemplo de trabalho e dedicação como também pela contribuição na minha formação que obtive nas suas disciplinas.

Aos Professores, Dr. Hernán Sagua, Dr. Iván Neira, Dr. Jorge González e especialmente ao Dr. Jorge Araya do Departamento de Parasitologia da Universidade de Antofagasta-Chile pela amizade, apoio, incentivo e conselhos.

Aos Professores Alex Quaas, Carmen Aravena, e Jorge Escobar e aos alunos da Unidade de Bioquímica da Universidad de Antofagasta, pelas conversas, apoio e carinho. Especialmente aos professores Benito Gómez e Héctor Olivares por seus conselhos, incentivo e amizade.

À Professora Elvira Moreno pela ajuda, conselhos e facilidades outorgadas na finalização da tese.

Aos prezados colegas do laboratório: Daniela, Danielle, Ethel, Fábio, Luciana, Marjorie, Michelle, Nadini, Paulo, Renata Baida, Renata Souza, Roberto e Tamiris pelo carinho, amizade e ajuda sempre que precisei. Os passeios culturais, as pizzas (sobretudo as de chocolate!!! Adorei!!!), os almoços, as compras na 25 e JP, as conversas e por fazer esforço para entender meu portunhol. Obrigada por tudo!!! Estarão sempre em minhas melhores lembranças, sentirei muitas saudades de vocês!!!

Ao Esteban, pela valiosa ajuda nas imagens de fluorescência, enorme paciência para procurar por aquele “parasita fotogênico”, ajuda sempre que precisei e as saudosas conversas sobre o Chile.

Aos funcionários Adalton, Adilson, Cidinha, Dona Fátima, Lima e especialmente a Sandra como esquecer “Bom dia Alexandra minha filha!!! Você está boa?” (em alto e bom som), aos colegas dos diferentes laboratórios da Disciplina de Parasitologia e ao pessoal técnico Simone, Solange e ao Henrique pela amabilidade e inúmeras conversas sobre atualidade e história do Brasil. Agradeço a acolhida, carinho, amizade e ajuda outorgada.

À Mércia e a Regiane, da Secretaria de Pós-Graduação, pela ajuda e disposição em todo momento e pelos incontáveis atestados para apresentar na Polícia Federal.

Aos saudosos amigos e familiares em especial a tia María Galetović por suas sábias palavras e enorme carinho, e ao meu prezado amigo Juan Eissmann Hauser por todo carinho, alegria e amizade que sempre me dedicou.

Aos meus primos Doris e José Martinić Galetović, Mario Antonio e Claudio Galetović pela preocupação, ajuda, carinho e apoio em todo momento.

A familiares e amigos do Chile, especialmente a Etelvina, tio David, à família Urrutia-Salinas, Estela, Lalito, Paty, Toño, Virginia, Maria Teresa, Jorge e Paola pela preocupação, amizade e carinho. Como também à família Sepúlveda-Miranda pela acolhida, carinho e enorme ajuda durante minha estadia no Brasil.

Ao meu primeiro professor de ciências no ensino fundamental Alfonso García, pela dedicação, empolgação, amizade, incentivo e amor pela ciência que plantou em seus alunos nas aulas e na Academia Científica. Minha profunda admiração e agradecimento por seu importante trabalho com crianças.

Ao auxílio financeiro concedido pelo Governo do Chile pela “Beca Presidente de la República – MIDEPLAN” para minha manutenção e a FAPESP, CAPES e CNPq pelos reagentes e insumos utilizados nesta tese.

E a todos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que não foram citados, muito obrigado pela sua colaboração.

Sumário

Lista de figuras.....	xi
Lista de tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas.....	xv
Resumo.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Descoberta da doença de Chagas.....	2
1.1.1 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	3
1.1.2 A doença de Chagas.....	5
1.2 O antígeno imunodominante H49 de <i>T. cruzi</i>	6
1.2.1 Isolamento do clone recombinante H49.....	6
1.2.2 Organização genômica e expressão do gene H49.....	7
1.2.3 Utilização do antígeno recombinante H49 no sorodiagnóstico da doença de Chagas... 8	
1.2.4 Localização subcelular do antígeno H49: associação ao citoesqueleto do <i>T. cruzi</i> 8	
1.3 Estrutura do flagelo de tripanossomas.....	9
1.3.1 FAZ (<i>Flagellar Attachment Zone</i>): zona de adesão flagelar.....	9
1.3.2 Axonema, estrutura paraflagelar (PFR) e interação com FAZ.....	10
1.3.3 Proteínas de membrana do flagelo de tripanossoma.....	11
1.3.4 Funções do flagelo.....	12
1.4 Projeto genoma de <i>T. cruzi</i> : associação da seqüência H49 com calpaínas.....	13
1.5 Calpaínas.....	14
1.5.1 Classificação das calpaínas.....	14
1.5.2 Localização subcelular das calpaínas.....	17
1.5.3 Substratos das calpaínas.....	18
1.5.4 Ativação das calpaínas.....	18
1.5.5 Calpaínas em tripanossomatídeos.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Cepas e clone de <i>T. cruzi</i>	24
3.2 Meio de cultura para parasitas, bactérias e leveduras.....	24
3.3 Soluções e tampões.....	25
3.4 Extração de ácidos nucléicos.....	26
3.4.1 Extração DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	26
3.4.2 Preparação de blocos de agarose com DNA cromossômico.....	27
3.4.3 Extração de DNA de YAC (<i>Yeast Artificial Chromosome</i>).....	27
3.4.4 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (<i>mini prep</i>).....	28
3.4.5 Extração de RNA de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	29
3.5 Separação de ácidos nucléicos por eletroforese.....	29
3.5.1 DNA.....	29
3.5.2 Eletroforese em campo pulsado (<i>Pulsed Field Gel Eletroforese-PFGE</i>).....	29
3.5.3 RNA.....	30
3.6 Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	30
3.7 Síntese de cDNA pela técnica de RT-PCR.....	31
3.7.1 PCR de cDNA com Platinum [®] <i>Taq</i> DNA polimerase.....	31
3.8 Amplificação e clonagem de fragmentos de interesse em vetores de clonagem e expressão.....	32
3.8.1 Amplificação de fragmentos de interesse por PCR.....	32
3.8.2 Ligação de produtos de PCR no plasmídeo pGEM [®] -T.....	34

3.8.3	Ligação dos produtos de PCR H49 degenerado/calpaína e domínio II catalítico (Cys-Pc) no plasmídeo pGEX-3X.....	34
3.9	Transformação de <i>E. coli</i> DH5- α	35
3.10	Seqüenciamento dos insertos dos clones recombinantes	35
3.11	Digestão do DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	35
3.12	Transferência de ácidos nucleicos para filtros de náilon	36
3.13	Purificação dos insertos a serem utilizados como sonda radioativa	36
3.14	Marcação de DNA por incorporação de fósforo radioativo [α ³² P]-dCTP.....	36
3.15	Hibridação de membrana de náilon com a sonda radiativa [α ³² P] dCTP.....	37
3.16	Expressão proteínas recombinantes GST-calpaína e GST-H49	38
3.16.1	Expressão em pequena escala	38
3.16.2	Expressão em larga escala	38
3.17	Purificação de proteínas recombinantes.....	39
3.17.1	Purificação da proteína recombinante GST-calpaína de gel de poliacrilamida.....	39
3.17.2	Purificação da proteína recombinante GST- H49 degenerado calpaína de gel de poliacrilamida	39
3.17.3	Purificação da proteína recombinante GST-H49 por cromatografia de afinidade	40
3.18	Imunização de coelhos Nova Zelândia com proteína recombinante	40
3.19	Imunização de camundongos Balb/c com proteína recombinante	41
3.20	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	41
3.21	Purificação de anticorpos	42
3.21.1	Adsorção de soro de coelho	42
3.21.2	Imunopurificação de anticorpos do soro de camundongo.....	42
3.22	Eletroforese de proteínas - Eletroforese SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)	43
3.23	Dosagem da concentração de proteínas	43
3.24	Extração de proteínas de citoesqueleto de <i>T. cruzi</i>	43
3.25	Western blotting.....	44
3.25.1	Transferência de proteínas a membrana de nitrocelulose.....	44
3.25.2	Immunoblot utilizando os anticorpos policlonais de coelho para H49 e calpaína.....	44
3.26	Preparação de lâminas para imunofluorescência indireta	45
3.26.1	Fixação de parasitas	45
3.26.2	Preparação lâmina imunofluorescência: incubação com anticorpos e montagem.....	45
3.26.3	Preparação lâmina de citoesqueleto de epimastigotas para imunofluorescência.....	46
3.27	Aquisição de imagens de imunofluorescência	46
3.28	Análise no banco de dados NCBI e Gene DB	46
3.28.1	Caracterização do gene H49 e suas regiões flanqueadoras com ferramentas de bioinformática	46
3.28.2	Alinhamento múltiplo dos domínios II (Cys-Pc) e III das calpaínas identificadas em <i>T. cruzi</i> e inferência filogenética	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Identificação dos genes H49/calpaína por análise bioinformática	49
4.1.1	Identificação de repetições H49 no genoma de <i>T. cruzi</i> (clone CL Brener)	49
4.1.2	A sequência H49 faz parte de sequências de calpaínas no clone CL Brener	52
4.1.3	Localização e contexto genômico dos genes H49/calpaína no clone CL Brener	55
4.1.4	Identificação dos genes calpaínas no clone CL Brener	58
4.1.5	Comparação dos domínios II (Cys-Pc) e III das calpaínas identificadas no genoma do clone CL Brener.....	58
4.2	Identificação dos genes de H49/calpaína por PCR e clonagem gênica	63
4.2.1	Amplificação por PCR em DNA genômico do clone CL Brener.....	63

4.2.2 Amplificação por RT-PCR de seqüências H49/calpaína em cDNA de formas epimastigotas de CL Brener	65
4.2.3 Amplificação por PCR em megafragmentos genômicos de <i>T. cruzi</i> em vetor YAC (<i>Yeast Artificial Chromosome</i>).....	67
4.3 Análise da organização dos genes H49/calpaína e calpaína por hibridização em Southern blotting e Chromoblotting.....	69
4.3.1 <i>Southern blotting</i> : hibridização com as sondas H49/calpaína e calpaína.....	69
4.3.2 <i>Southern blotting</i> : hibridização com sonda contendo a repetição H49 degenerada e calpaína	72
4.3.3 Localização cromossômica do gene H49/calpaína	74
4.4 Caracterização das proteínas H49/calpaínas de <i>T. cruzi</i>	76
4.4.1 Expressão proteína recombinante H49.....	76
4.4.2 Expressão proteína recombinante calpaína A (domínio catalítico Cys-Pc)	76
4.4.3 Expressão proteína recombinante calpaína B (H49 degenerado/calpaína)	77
4.4.4 Purificação das proteínas H49, calpaína e H49 deg-calpaína em fusão com GST.....	84
4.4.5 Reatividade de soros policlonais anti-calpaína A, anti-calpaína B e anti-H49	85
4.4.6 Reatividade do soro anti-GST em extrato de proteínas de <i>T. cruzi</i>	87
4.4.7 Reatividade dos anticorpos policlonais anti-H49, anti-calpaína A e anti-calpaína B com epimastigotas da cepa G e do clone CL Brener	88
4.4.8 Localização celular das proteínas H49, Calpaína A e Calpaína B por imunofluorescência indireta em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	91
4.4.9 Localização das proteínas H49 e calpaína em citoesqueleto de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por imunofluorescência indireta	96
4.4.10 Imunofluorescência indireta com marcadores da região FAZ, estrutura paraflagelar e membrana flagelar em epimastigotas do clone CL Brener	99
4.4.11 Imunofluorescência indireta de marcadores para FAZ, estrutura paraflagelar e membrana flagelar em mutantes da GP72	103
5 DISCUSSÃO.....	108
5.1 Estrutura e organização dos genes H49/calpaína	109
5.2 Expressão e localização celular das proteínas H49/calpaínas	116
5.3 Modelo e função das proteínas H49/calpaína em <i>T. cruzi</i>	120
Referências.....	126
Abstract	
ANEXO I	
ANEXO II	
ANEXO III	
ANEXO IV	

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	4
Figura 2. Organização genômica do gene H49 nas cepas CL e G de <i>T. cruzi</i>	7
Figura 3. Localização do antígeno H49 em citoesqueleto de <i>T. cruzi</i> por Microscopia Imunoelétrica.....	9
Figura 4. Corte transversal de citoesqueleto de <i>T. brucei</i> (imagem de microscopia eletrônica).....	13
Figura 5. Representação esquemática das duas subunidades de calpaína humana.....	16
Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de ativação de calpaína humana.....	19
Figura 7. Classificação de calpaínas-like em tripanossomatídeos.....	20
Figura 8. Dispersão de seqüências H49 no genoma do clone CL Brener segundo a porcentagem de identidade (% id).....	51
Figura 9. Consulta no NCBI usando a repetição de 68 aa do H49.....	52
Figura 10 Distribuição dos genes H49-calpaína em <i>scaffolds</i> e contigs do clone CLBrener de <i>T. cruzi</i>	53
Figura 11. Representação esquemática dos genes H49/calpaína.....	54
Figura 12. Representação esquemática do contexto genômico onde estão localizados os genes H49/calpaína.....	56
Figura 13. Representação esquemática do contexto genômico onde estão localizados os genes H49/calpaína.....	57
Figura 14. Alinhamento do domínio Cys-Pc das calpaínas de <i>T. cruzi</i>	60
Figura 15. Alinhamento do domínio III das calpaínas de <i>T. cruzi</i>	61
Figura 16. Alinhamento da região contendo os domínios II (Cys-Pc) e III das proteínas H49/calpaínas de <i>T. cruzi</i>	61
Figura 17. Reconstrução filogenética do domínio Cys-Pc para calpaínas classificadas como calpaína cisteína peptidase e calpaína-like cisteína peptidase.....	62
Figura 18. Amplificação por PCR de seqüências H49/calpaína no DNA genômico de epimastigotas do clone CL Brener.....	64
Figura 19. Amplificação por RT-PCR de seqüências H49/calpaína em cDNA de epimastigotas do clone CL Brener.....	66
Figura 20. Amplificação por PCR em megafragmentsos genômicos de <i>T. cruzi</i> clonados em vetor YAC.....	68
Figura 21. Digestão de DNA genômico de epimastigotas do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> e hibridização com sondas H49/calpaína.....	71
Figura 22. Hibridização do DNA genômico epimastigotas do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> com sonda da repetição H49 degenerada-calpaína (não Cys-Pc).....	73
Figura 23. <i>Chromoblotting</i> (epimastigotas clone CL Brener).....	75
Figura 24. Expressão da proteína recombinante GST/H49.....	79
Figura 25. Construção calpaína A: região da calpaína (Cys-Pc) expressa em fusão com GST.....	80
Figura 26. Expressão da proteína recombinante de GST/calpaína A.....	81
Figura 27. Construção calpaína B: região H49 degenerado/calpaína expressa em fusão com GST.....	82
Figura 28. Expressão da proteína recombinante de GST/calpaína B.....	83
Figura 29. Purificação da proteína recombinante GST-H49.....	84
Figura 30. Purificação das proteínas recombinantes Calpaína A (Cys-Pc) e Calpaína B (H49 degenerado/calpaína em fusão com GST).....	85
Figura 31. Reatividade dos soros anti-calpaína e H49 com as proteínas recombinantes....	86

Figura 32. Reatividade do soro anti-calpaína B com a proteína recombinante H49.....	87
Figura 33. Reatividade do soro anti-GST com extratos de <i>T. cruzi</i>	88
Figura 34. <i>Western blotting</i> mostrando a reatividade dos anticorpos anti-H49 e anti-calpaína A com extratos protéicos do clone CL Brener e cepa G.....	89
Figura 35. <i>Western blotting</i> mostrando a reatividade dos anticorpos anti-calpaína B com as frações solúvel e insolúvel de epimastigotas da cepa G.....	90
Figura 36. Localização celular da calpaína A (domínio catalítico Cys-Pc) por imunofluorescência em epimastigotas do clone CL Brener.....	91
Figura 37. Localização celular das repetições H49 por imunofluorescência em epimastigotas do clone CL Brener.....	92
Figura 38. Localização celular das repetições H49 por imunofluorescência em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos da cepa G.....	93
Figura 39. Imunofluorescência calpaína A e H49.....	94
Figura 40. Localização celular da calpaína B por imunofluorescência em epimastigotas do clone CL Brener.....	95
Figura 41. Localização das proteínas H49 e calpaína A em citoesqueleto de epimastigotas do clone CL Brener obtido por lise com Triton X-100.....	96
Figura 42. Localização das proteínas H49 e calpaína A em citoesqueleto de epimastigotas do clone CL Brener obtido por lise com Nonidet P-40 (NP-40).....	97
Figura 43. Localização das proteínas H49 e calpaína B em citoesqueleto de epimastigotas do clone CL Brener obtido por lise com NP-40.....	98
Figura 44. Localização das calpaínas A e B em citoesqueleto de epimastigotas do clone CL Brener obtido por lise com NP-40.....	99
Figura 45. Imunofluorescência com um marcador específico (anticorpo monoclonal 4D9) da estrutura FAZ de <i>T. cruzi</i>	101
Figura 46. Imunofluorescência com marcador de flagelo (CBP, <i>Calcium Binding Protein</i>) de <i>T. cruzi</i>	102
Figura 47. Imunofluorescência com marcador da região paraflagelar (anticorpo monoclonal 1B10) do flagelo de <i>T. cruzi</i>	103
Figura 48. Localização das proteínas H49 e calpaína A em mutantes do gene GP72 por microscopia de epifluorescência.....	105
Figura 49. Localização das proteínas H49 e calpaína B em mutantes do gene GP72 por microscopia de epifluorescência.....	105
Figura 50. Localização da proteína H49 e de componentes da região FAZ em mutantes do gene GP72 por microscopia de epifluorescência.....	106
Figura 51. Localização das proteínas H49 e CBP (<i>Calcium Binding Protein</i>) em mutantes do gene GP72 por microscopia de epifluorescência.....	106
Figura 52. Localização da proteína H49 e de componentes da estrutura paraflagelar em mutantes do gene GP72 por microscopia de epifluorescência.....	107
Figura 53 Sobreposição dos contigs na região contendo a repetição H49 conservada.....	115
Figura 54. Modelo localização e função H49/calpaína (repetições conservadas).....	124
Figura 55. Modelo localização e função H49/calpaína (repetições degeneradas).....	125
Figura II-1. Digestão in silico de scaffolds do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> e hibridização com sonda domínio catalítico Cys-Pc da calpaína (1.000 pb).	II-2
Figura II-2. Digestão in silico de scaffolds do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> e hibridização com sonda H49.....	II-3
Figura II-3. Digestão in silico de scaffolds do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> e hibridização com sonda H49 conservada/calpaína.....	II-4

Figura II-4. Digestão in silico de scaffolds do clone CL Brener de <i>T. cruzi</i> e hibridização com sonda H49 degenerado-calpaína (1.000 pb).....	II-5
Figura III.1. Seqüência de calpaína (Cys-Pc) amplificada por PCR em DNA genômico...	III-2
Figura III.2. Seqüência de H49 degenerado/calpaína amplificada por PCR em DNA genômico.....	III-3
Figura III.3. Seqüência de calpaína (Cys-Pc) amplificada por PCR em cDNA.....	III-4
Figura III.4. Seqüência de H49 degenerado/calpaína amplificada por PCR em cDNA.....	III-5
Figura III.5. Seqüência de H49 conservado/calpaína amplificada por PCR em cDNA.....	III-6
Figura IV.1. Localização celular das repetições H49 por imunofluorescência em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos da cepa G.....	IV-2

Lista de tabelas

Tabela 1. Regiões amplificadas de calpaína e H49.....	33
Tabela 2. Número de alinhamentos segundo identidade e E-value para cada programa do BLAST.....	50
Tabela I.1. Calpaínas <i>like</i> cisteína peptidases identificadas no Projeto Genoma de <i>T. cruzi</i>	I-2
Tabela I.2. Calpaínas cisteína peptidases identificadas no Projeto Genoma de <i>T. cruzi</i>	I-3
Tabela I.3. Sequências H49 não associadas à calpaínas identificadas no Projeto Genoma de <i>T. cruzi</i>	I-4

Lista de abreviaturas

aa	Aminoácido
AEBSF	4- <i>fluoreto de 2-aminoetil benzeno</i> -sulfonil
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
Ci	Curie (1Ci=37 x 10 ¹⁰ desintegrações/segundo)
cpm	Contagens por minuto
dATP	Desoxiadenosina-trifosfato
dCTP	Desoxicitidina-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina-trifosfato
DAPI	4' -6-diamidino-2- <i>fenilindol</i>
DNase	Desoxirribonuclease
DEPC	Dietil pirocarbonato
DO	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimidina-trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetra-acético
E-64	Transepoxisuccinil- L-leucil-amido (4-guanidino) butano
FITC	Fluoresceína isotiocianato
g	Aceleração da gravidade (m/s ²)
GST	Glutathiona S-transferase
h	hora
IPTG	Isopropil 2-β-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobase
kDa	quilodalton
LB	Meio de cultura Lúria-Bertani
LIT	Infusão de fígado com triptose
mA	mili-ampere
min	minuto
Mb	megabase
MOPS	Acido 3-N-Morfolino Propano Sulfônico
NP-40	Nonidet P-40
PBS	Tampão Fosfato Salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PFGE	Eletroforese de campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis)
PIPES	Piperazina-1,4-bis (ácido 2-etano sulfônico)
PMSF	Fluoreto de parametilsulfonil
rpm	Revoluções por minuto
RNAse	Ribonuclease
RT-PCR	Reação da Transcriptase Reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia
s	segundo
SDS	N-dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SSC	Tampão citrato de sódio
TELT	Tris Edta Lítio Triton (X-100)
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
Tris	Tris hidroximetil-aminometano
v	volume

V volts
X-Gal 5-bromo 4-cloro 3 indolil β -D-galactopiranosídeo

Resumo

Em nosso laboratório foi isolado um clone recombinante de *T. cruzi*, denominado H49, que codifica repetições de 68 aminoácidos (aa) dispostas em tandem. Estas repetições são encontradas em um antígeno imunodominante de aproximadamente 240 kDa que está envolvido na ligação do flagelo ao corpo do parasita, conhecida como zona FAZ. Este trabalho relata a caracterização da estrutura do gene e da proteína H49. Buscas no banco de dados de *T. cruzi* utilizando o algoritmo BLAST revelaram que as repetições de 68 aa são encontradas em uma região central de oito calpaínas-like cisteínas peptidases. Em duas dessas, as repetições H49 são altamente conservadas e organizadas em tandem. Nas outras seis calpaínas-like encontradas, as repetições eram degeneradas e podem ser separadas por pequenas seqüências não repetitivas. Essas proteínas apresentaram domínios característicos de cisteínas proteinases cálcio-dependente, como Cys-Pc e Calpain_III. A associação entre as seqüências H49 e calpaína foi confirmada por amplificação por PCR e análises de clones de YAC utilizando oligonucleotídeos específicos para amplificar regiões específicas de calpaína e repetições H49. O *locus* H49 foi mapeado no clone CL Brener utilizando uma sobreposição de clones de YAC. A associação da repetição H49 e calpaínas nos YACs foi demonstrada por PCR e por análise de restrição. Corroborando com dados obtidos, a análise por “chromoblot” revelou que as sondas H49 e calpaína hibridizam com as mesmas bandas cromossômicas. Nossos dados indicam que as repetições H49 fazem parte de um subgrupo de genes da calpaína e, portanto, denominados H49/calpaína. Recentemente uma nova família de proteínas associadas ao citoesqueleto foi descrita em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania*. Estas proteínas são caracterizadas por sua similaridade com a região catalítica da calpaína, assim como pela presença de seqüências de aminoácidos repetidas em tandem que apresentam similaridade de 30-40% com a repetição H49. Esses resultados sugerem que a aquisição da calpaína, contendo repetições pelos tripanossomatídeos (talvez por fusão de genes) foi um evento tardio na evolução dessa família de proteínas.

Para avaliar a ocorrência e a distribuição subcelular da proteína H49/calpaína em epimastigotas, diferentes domínios da calpaína e da repetição de 68 aa foram expressas em bactérias, as proteínas foram purificadas e utilizadas na imunização de coelhos e camundongos. Os anticorpos policlonais purificados foram utilizados para estudar a organização e distribuição subcelular das repetições de 68 aa e calpaína em *T. cruzi*. Em “immunoblotting”, anticorpos contra o domínio calpaína e contra as repetições de 68 aa reagiram com uma proteína de 240 kDa presente no extrato total de epimastigotas. Anticorpos anti-calpaína reagiram com bandas adicionais de

aproximadamente 170, 60 e 56 kDa que correspondem a calpaínas sem as repetições de 68 aa. Análise de imunofluorescência revelou que a proteína H49/calpaína está localizada apenas na região de adesão entre o corpo celular e o flagelo. A calpaína, além de ser encontrada no flagelo, também é encontrada no citoplasma. Além disso, a H49/calpaína associada ao citoesqueleto co-localizou com marcadores da zona de adesão flagelar (FAZ).

Domínios repetitivos da H49/calpaína contem alfa hélices (“helix-turn-helix”) que poderiam estar organizadas em uma estrutura enovelada em uma estrutura “coiled-coil”. Sugerimos que as proteínas H49/calpaína formariam um homodímero que poderia ligar a membrana do flagelo à membrana do corpo celular na zona de adesão flagelar.

1.1 Descoberta da doença de Chagas

No ano de 1907, Carlos Chagas (1879-1934) foi chamado a participar de uma campanha de combate à malária no estado de Minas Gerais, onde estava sendo construída a Estrada de Ferro Central do Brasil. Chagas foi informado da presença de um inseto hematófago, encontrado nas frestas e buracos das casas da região, comumente conhecido como barbeiro porque costumava picar o rosto das pessoas enquanto dormiam. Chagas, ao examinar o intestino dos insetos e o sangue de vários animais domésticos da região, observou a presença de formas flageladas de um protozoário que denominou de *Trypanosoma cruzi* em homenagem ao seu professor Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, 2009).

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

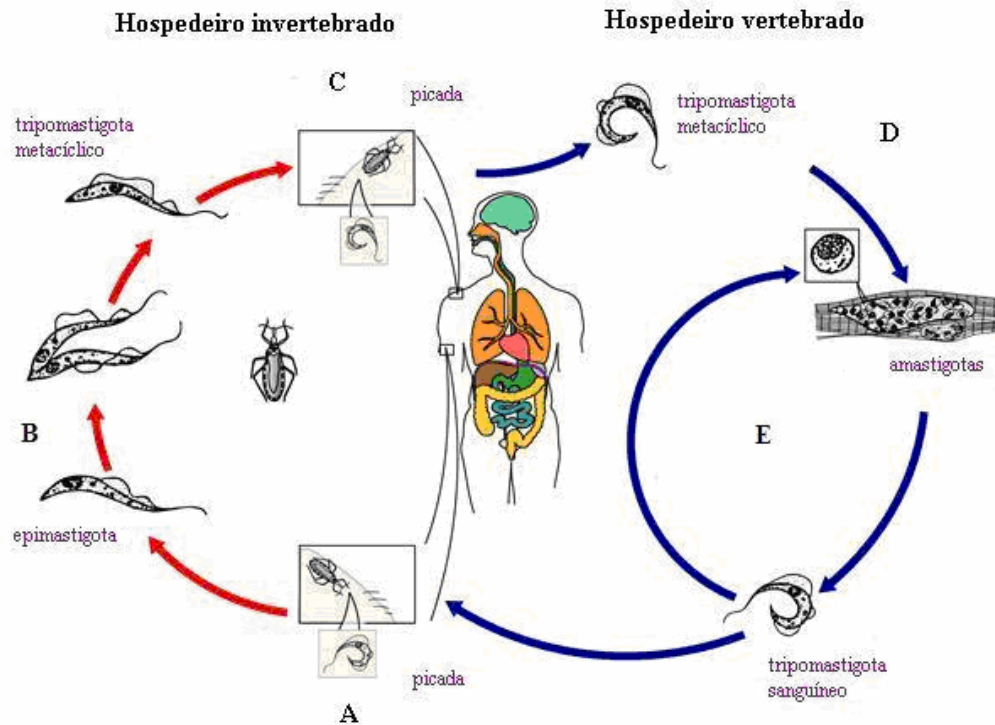
Chagas publicou em 1909 um resumo de sua importante descoberta no *Bulletin de la Societé de Pathologie Exotique*, o trabalho completo foi publicado na Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz em português e em alemão no mesmo ano (FIOCRUZ, 2009). A descrição de uma nova doença parasitária teve repercussão mundial, que consagrou a Carlos Chagas como um dos mais importantes pesquisadores brasileiros do século XX, recebendo importantes prêmios e o reconhecimento internacional, também foi indicado para o Prêmio Nobel.

O grande mérito do trabalho científico de Carlos Chagas foi identificar o agente etiológico, o vetor, o hospedeiro vertebrado, os reservatórios domésticos e silvestres do parasita. Fez descrição detalhada de todos os aspectos da doença que mais tarde levaria seu nome. Com base na sua pesquisa Carlos Chagas descreveu o ciclo do *T. cruzi* que está mostrado na figura 1.

1.1.1 Ciclo de vida do *T. cruzi*

O ciclo de vida de *T. cruzi* envolve dois hospedeiros, um vertebrado (mamífero) e outro invertebrado (triatomíneo), nos quais são encontrados diferentes formas do parasita. As formas replicativas são denominadas epimastigotas e amastigotas e as não replicativas de tripomastigotas sanguíneos e metacíclicos (Fig. 1).

O ciclo começa quando o inseto vetor alimenta-se de sangue com tripomastigotas sanguíneos de um hospedeiro mamífero infectado. Na porção proximal do intestino do barbeiro, os tripomastigotas sanguíneos se diferenciam em epimastigotas. Em seguida, no intestino posterior, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (formas infecciosas) que são liberados na urina e fezes do inseto no local da picada e podem penetrar pela pele e mucosas do hospedeiro vertebrado. Os tripomastigotas metacíclicos infectam diversos tipos celulares, no interior da célula se diferenciam em formas amastigotas que se multiplicam por divisão binária e se diferenciam em tripomastigotas. Estas formas são liberadas na corrente sanguínea, podendo infectar outras células ou ser ingeridas pelo triatomíneo completando o ciclo.



Modificado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi*.

O inseto alimenta-se de sangue com formas tripomastigotas sanguíneas do mamífero infectado (A). As formas tripomastigotas diferenciam-se em epimastigotas no intestino do triatomíneo (B). Epimastigotas aderem à parede do intestino e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos que são eliminadas nas fezes e urina no local da picada, penetrando pela pele e mucosa do hospedeiro vertebrado (C). As formas tripomastigotas sanguíneas infectam células na região da picada e diferenciam-se em formas amastigotas. No interior das células multiplicam-se por divisão binária (D). Os amastigotas diferenciam em tripomastigotas que são liberadas na corrente sanguínea, podendo infectar outras células ou ser ingeridos pelo triatomíneo completando o ciclo (E).

1.1.2 A doença de Chagas

O *T. cruzi*, protozoário flagelado da família *Trypanosomatidae*, é o agente etiológico da doença de Chagas ou tripanossomíase americana. O parasita pode ser transmitido ao homem pela picada de um inseto hematófago infectado, por via placentária (Chagas congênito), transfusão sanguínea ou doação de órgãos de indivíduos infectados, por alimentos contaminados e por acidentes de laboratório (FIOCRUZ, 2009).

Cerca de 28 milhões de pessoas na América Latina correm o risco de contrair a doença. Em 21 países onde a doença é endêmica, o número de pessoas infectadas é de 8 milhões. O número de novos casos ao ano por transmissão vetorial e por Chagas congênito é de 41.200 e 14.385, respectivamente (TDR/WHO, 2007).

A transmissão da doença pelo vetor hematófago (família *Reduviidae*, subfamília *Triatominae*) é um dos alvos no combate à doença. Em áreas rurais endêmicas na Colômbia, Bolívia, Argentina (região do Chaco), Peru e México, as condições de moradia são ainda precárias que favorece a permanência do inseto e o risco de infecção. Iniciativas, apoiadas pela OMS/TDR, envolvendo os países afetados do Cone Sul (INCOSUL), do Pacto Andino (IPA), da América central (IPCA), do México e da Amazônia (AMCHA), têm sido efetivas no controle da transmissão vetorial da doença. Uruguai, Chile e Brasil foram declarados livres da transmissão vetorial da doença em 1997, 1999 e 2006, respectivamente.

Recentemente, devido às freqüentes migrações da população, foram identificados casos da doença em lugares não endêmicos, como Estados Unidos e Europa. Esse fato tem gerado grande preocupação devido à falta de triagem nos bancos de sangue nesses países, a doença de Chagas poderia tornar-se uma doença de distribuição global (TDR/WHO, 2007).

A doença de Chagas pode manifestar-se de maneira aguda ou crônica. A fase aguda é caracterizada por febre, edema e vermelhidão na região da picada, e presença de parasitas no sangue. A fase crônica é em geral assintomática, dura anos e estima-se que 30% dos indivíduos infectados desenvolverão cardiopatias, dilatação do esôfago e cólon. Na fase crônica geralmente não é possível observar parasitas no sangue, portanto, o diagnóstico é sorológico, acompanhado de exames clínicos.

No tratamento da fase aguda são utilizados os quimioterápicos nifurtimox (Lampit[®], Bayer) ou benzonidazol (Rochagan[®], Roche), que apresentam efeitos tóxicos para o homem (WHO, 2002). Organizações de saúde e governos dos países afetados têm exercido pressão sob as indústrias farmacêuticas para garantir a fabricação, mesmo limitada, dos medicamentos. A partir do ano 2009, será fabricada em Brasil, uma versão pediátrica do benzonidazol pelo laboratório farmacêutico Lafepe (Pernambuco). O medicamento será distribuído a preço de custo na América Latina com apoio da Iniciativa para Doenças Negligenciadas DNDi (*Drugs for Neglected Diseases Initiative*).

1.2 O antígeno imunodominante H49 de *T. cruzi*

Na década de 90 foi isolado e caracterizado um antígeno imunodominante, denominado de H49, que está presente em todas as formas do ciclo de vida do parasita (Cotrim *et al.*, 1990). A seguir, relataremos informações existentes sobre o isolamento, expressão e localização celular do antígeno H49.

1.2.1 Isolamento do clone recombinante H49

Uma biblioteca de expressão de DNA genômico da cepa G de *T. cruzi* foi construída no fago λ gt11. A triagem dos clones recombinantes foi feita com soros de pacientes chagásicos crônicos. O clone recombinante denominado H49 foi selecionado por apresentar forte reatividade com esses soros (Cotrim *et al.*, 1990). Outros laboratórios, utilizando a mesma técnica de triagem, isolaram clones recombinantes (clone 1, cepa Miranda; FRA, cloneDM28c; JL7, cepa CL) que apresentam identidade de 88% ao nível de aminoácidos com o antígeno H49 (Ibanez *et al.*, 1988; Lafaille *et al.*, 1989; Levin *et al.*, 1989), sugerindo que este antígeno é conservado entre diferentes cepas de *T. cruzi*.

A análise do clone recombinante de H49 mostrou que ele é composto de aproximadamente quatro repetições de 68 aminoácidos altamente conservadas e dispostas em tandem. A sequência em nucleotídeos do clone genômico H49 está disponível no GenBank sob o número de acesso L09564 (Cotrim *et al.*, 1995).

1.2.2 Organização genômica e expressão do gene H49

A organização do gene H49 foi estudada por hibridização em *Southern blot* com o DNA genômico de diferentes cepas de *T. cruzi*. Utilizando enzimas de restrição com sítios de reconhecimento internos e fora da repetição foram identificadas duas bandas de ~20 kb na cepa G e duas bandas de 20 kb e 9,7 kb na cepa CL (Fig. 2). A hibridização em *dot-blot* quantitativo indicou a presença de duas a três cópias do gene de H49 por genoma haplóide nas cepas G e CL (Cotrim *et al.*, 1995).

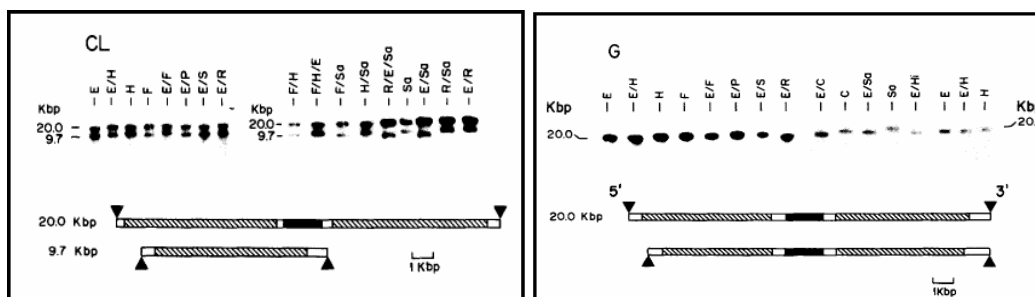


Figura 2. Organização genômica do gene H49 nas cepas CL e G de *T. cruzi*.

O DNA genômico das cepas G e CL foi digerido com diferentes enzimas de restrição e hibridizados com a sonda do H49. As setas indicam sítios de restrição, as regiões achuriadas e em preto correspondem às repetições H49 e regiões intergênicas, respectivamente (Cotrim *et al.*, 1995). Enzimas: E, *EcoRI*; H, *HaeIII*; F, *HinfI*; P, *PstI*; S, *SmaI*; R, *RsaI*; C, *CfoI*; Sa, *SalI*.

A análise em *northern blot* com RNA mensageiro de formas epimastigotas de diferentes cepas de *T. cruzi* mostrou que o transcrito H49 tem aproximadamente 8Kb (Cotrim *et al.*, 1990). Este tamanho está de acordo com os resultados obtidos por *western blot* com extratos de epimastigotas da cepa G de onde foi visto que anticorpos contra a proteína recombinante H49 reagiram com uma proteína nativa de alto peso molecular (>300 kDa) (Cotrim *et al.* 1990, 1995).

O mapeamento dos genes de H49 nos cromossomos de *T. cruzi* foi realizado por hibridização com os cromossomos do parasita separados por electroforese de campo pulsado. O gene H49 foi mapeado em uma banda cromossômica de 2,3 Mb nas cepas CL e G, e uma banda de 2,6 Mb na cepa CL (Santos *et al.*, 1999). O gene H49 foi também isolado em uma biblioteca de YAC (*Yeast Artificial Chromosome*) construída com DNA de formas epimastigotas do clone CL Brener (Santos *et al.*, 1999).

1.2.3 Utilização do antígeno recombinante H49 no sorodiagnóstico da doença de Chagas

O antígeno H49 é facilmente detectado por soros de pacientes chagásicos em “dot blot” contendo lisados de bactérias infectadas com o fago recombinante H49. Houve reação positiva com 99% dos soros de pacientes chagásicos crônicos provenientes de áreas endêmicas (Cotrim *et al.*, 1990).

O inserto do clone H49 foi subclonado no vetor de expressão pGEX e a proteína H49 expressa, purificada e utilizada em testes de ELISA (*Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay*). O antígeno H49 reagiu com 84% dos soros de pacientes chagásicos crônicos, 58% com soro de pacientes em fase aguda e 56% com pacientes com Chagas congênito. Não foi observada reação positiva no teste de ELISA com soros de pacientes com outras doenças parasitárias como malária, esquistossomose, infecção por *T. rangeli* e *Leishmania*. Assim, o antígeno H49 foi proposto para diagnóstico de pacientes em fase crônica, mas não foi recomendado para ser utilizado em banco de sangue (Paranhos-Bacalla *et al.*, 1994).

Recentemente vários antígenos recombinantes de *T. cruzi* (H49, B13, 1F8 e JL7) foram combinados em um único teste chamado de mix-ELISA para o sorodiagnóstico da doença de Chagas. A principal vantagem do teste é a elevada sensibilidade (99,7%) e especificidade (98,6%), este último devido à ausência de reatividade cruzada com soros de pacientes com outras doenças parasitárias (Umezawa *et al.*, 2003).

1.2.4 Localização subcelular do antígeno H49: associação ao citoesqueleto do *T. cruzi*

Estudos de imunofluorescência indireta com anticorpos anti-H49 em tripomastigotas metacíclicos das cepas Y, CL e Tulahuen mostraram que a proteína H49 apresenta localização flagelar, enquanto em parasitas intracelulares foi observado um padrão pontual próximo da região onde o flagelo emerge do corpo (Cotrim *et al.*, 1990). Pela técnica de imunoeletromicroscopia foi visto que o H49 está localizado na região de contacto entre o flagelo e o corpo de parasitas intracelulares, em células HeLa (Cotrim *et al.*, 1995). Utilizando esta técnica em preparações de citoesqueleto de formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas e de cultura de tecido (Fig. 3) foi visto que o antígeno H49 nativo está localizado na região de

adesão do flagelo ao corpo do parasita conhecida como FAZ (*Flagellar Attachment Zone*) associada ao citosqueleto do parasita (Cotrim *et al.*, 1990).

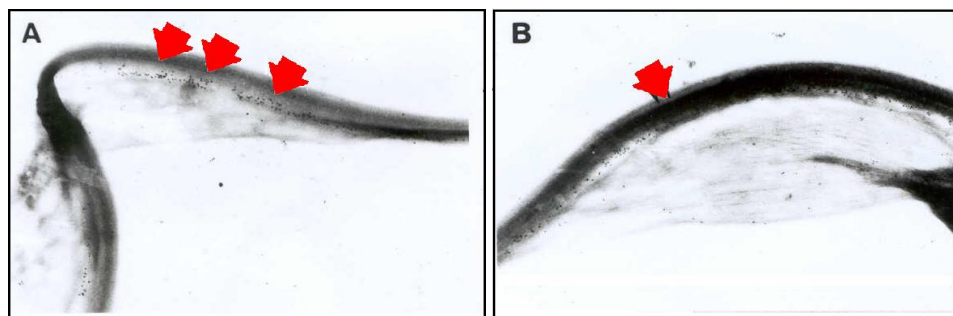


Figura 3. Localização do antígeno H49 em citosqueleto de *T. cruzi* por Microscopia Imunoelétrica. A) Citoesqueleto de epimastigota B) Citoesqueleto de tripomastigota metacíclico. As setas vermelhas indicam a localização do H49 entre o flagelo e o citosqueleto. Fonte: (Cotrim *et al.*, 1990).

1.3 Estrutura do flagelo de tripanossomas

O flagelo de *T. cruzi* e *T. brucei* emerge da bolsa flagelar, a maior parte do mesmo fica aderida ao corpo celular e somente uma pequena parte fica livre na região anterior do parasita. A aderência do flagelo ao corpo do parasita define uma região especializada denominada de FAZ (*Flagellar Attachment Zone*). Internamente, o flagelo é constituído pelo axonema e estrutura paraflagelar (PFR- *Paraflagellar Rod*) e externamente está recoberto pela membrana plasmática (Gull, 1999; Kohl *et al.*, 1999).

1.3.1 FAZ (*Flagellar Attachment Zone*): zona de adesão flagelar

Em *T. brucei*, a FAZ é composta de duas estruturas: um filamento eletrodense citoplasmático e quatro microtúbulos situados imediatamente à esquerda do filamento. Os microtúbulos são muito estáveis, associados do retículo endoplasmático liso e permanecem após tratamento com detergente (Gull, 1999; Bastin *et al.*, 2000). O filamento citoplasmático e os microtúbulos interagem com a membrana plasmática por meio de proteínas formando uma complexa estrutura (Lacomble *et al.*, 2009). Atualmente, a composição molecular detalhada dos componentes de FAZ não é conhecida (Vaughan *et al.*, 2008).

As proteínas encontradas em FAZ são muito imunogênicas, com massa molecular elevada (>200 kDa) e compostas por repetições de aminoácidos (Gull, 1999). Em *T. cruzi*, algumas das proteínas de FAZ são: gp72, antígeno H49 (FRA) e proteínas de grande massa molecular (700-2.500 kDa), localizadas internamente ao corpo do parasita (Cooper *et al.*, 1993; Ruiz-Moreno *et al.*, 1995; Bisaggio *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2006). Acredita-se que as proteínas de FAZ tenham função estrutural, por microscopia eletrônica são observadas estruturas de junção entre o citoplasma e a membrana plasmática do corpo e do flagelo (Ruiz-Moreno *et al.*, 1995; de Souza, 2007; Lacomble *et al.*, 2009).

Recentemente foi identificada em *T. brucei* uma proteína de FAZ localizada internamente ao corpo do parasita, constituída por repetições de 14 aminoácidos e de elevada massa molecular, denominada FAZ1. A inibição da síntese da proteína por RNA de interferência gerou parasitas com o flagelo não aderido ao corpo e problemas na citocinese, sugerindo que o FAZ participa da morfogênese do parasita (Vaughan *et al.*, 2008).

Por outro lado, a glicoproteína GP72 de *T. cruzi*, localizada na superfície do parasita e no bolso flagelar, também tem sido associada ao FAZ. Supõe-se que a GP72 interage na zona de aderência entre o flagelo e o corpo celular, embora, os detalhes desta interação ainda não tenham sido caracterizados (Cooper *et al.*, 1993).

A inibição da expressão do gene GP72 mostrou fenótipo alterado com o flagelo descolado do corpo, houve perda de motilidade e diminuição na capacidade da sobrevivência no vetor *Triatoma infestans*. Em *T. brucei*, a proteína homóloga GP72 é a glicoproteína FLA1, que parece ser essencial, a julgar-se pelo fato de que a deleção de ambos os alelos inviabiliza o parasita (Nozaki *et al.*, 1996; LaCount *et al.*, 2002)

1.3.2 Axonema, estrutura paraflagelar (PFR) e interação com FAZ

O axonema apresenta o clássico sistema de microtúbulos “9 + 2” (9 pares de microtúbulos periféricos e 2 microtúbulos centrais) com proteínas que se ligam aos microtúbulos, tais como: braços de dineína, radial *spoke* e nexina. A estrutura paraflagelar (PFR) acompanha o axonema desde que o flagelo sai da bolsa flagelar até o extremo distal, na região anterior do parasita (Fig. 4). Em corte transversal do flagelo, a estrutura paraflagelar está organizada em três domínios

bem definidos denominados proximal, intermediário e distal por sua posição relativa ao axonema (Gull, 1999).

A interação entre a PFR e FAZ, ocorre por meio de filamentos que ligam o domínio proximal do PFR à face interna da membrana do flagelo que faz parte do FAZ. O domínio proximal se liga por meio de filamentos ao axonema, dificultando a purificação da estrutura paraflagelar (Kohl *et al.*, 1999; Bastin *et al.*, 2000).

Estudo da interação do flagelo ao corpo celular durante o ciclo celular de *T. brucei* com anticorpos anti-FAZ e anti-PFR mostrou que essas estruturas organizam-se em diferentes pontos durante o ciclo celular. Em primeiro lugar, tem-se a organização do filamento do FAZ, seguindo-se o axonema e PFR. O filamento citoplasmático alonga-se a uma velocidade menor que as estruturas internas do flagelo (axonema e PFR) que crescem sincrônicamente. Supõe-se que quando o filamento citoplasmático atinge cerca de 1,4 μm ocorre a aderência do flagelo ao corpo celular (Kohl *et al.*, 1999).

1.3.3 Proteínas de membrana do flagelo de tripanossoma

A membrana plasmática do *T. brucei* possui três regiões bem definidas: a membrana do flagelo, do corpo celular e da região da bolsa flagelar. Na membrana da bolsa flagelar são encontrados os receptores de transferrina e LDL. Três proteínas estão presentes na membrana flagelar: adenilato ciclase, proteína ligadora de cálcio (FCaBP) e uma isoforma (ISO1) do transportador de glicose em *Leishmania* (Landfear e Ignatushchenko, 2001).

A proteína ligadora de cálcio de *T. cruzi* FCaBP (24 kDa) está associada à membrana plasmática do flagelo por meio de acilação com ácido palmítico e ácido mirístico de resíduos de cisteína e glicina, respectivamente. A substituição na região N-terminal dos aminoácidos glicina, e cisteína por alanina resulta na distribuição da proteína pelo corpo do parasita, indicando que essa região é necessária e suficiente para a localização flagelar da proteína (Godsel e Engman, 1999).

Em *T. cruzi*, a adenilato ciclase dependente de cálcio, presente na membrana do flagelo, interage com a estrutura paraflagelar, sugerindo possível participação na transdução de sinal (D'Angelo *et al.*, 2002). O receptor de transferrina, LDL e transportador de glicose estão

localizados na membrana da bolsa flagelar e participam da nutrição celular (Landfear e Ignatushchenko, 2001).

1.3.4 Funções do flagelo

O flagelo está envolvido na motilidade celular, na invasão de células hospedeiras, e sinalização intracelular atuando como um sensor ambiental (Vaughan e Gull, 2003).

Estudos das proteínas PFRA e PFRC sugerem que a PFR está envolvida no movimento do flagelo. Pela técnica de RNA de interferência em *T. brucei*, a expressão da proteína PRFA foi parcialmente inibida. A análise por microscopia eletrônica dos mutantes mostrou a presença de uma estrutura paraflagelar rudimentar com perda da motilidade dos parasitas pararam de nadar (Gull, 1999; Bastin *et al.*, 2000). Recentemente, Broadhead *et al.* (2006) mostrou que a inibição de expressão de proteínas localizadas no flagelo por RNAi inibe a motilidade flagelar, necessária para a viabilidade de formas sanguíneas de *T. brucei*.

Acredita-se que o flagelo do tripanossoma atua como sensor ambiental em resposta às mudanças nos níveis de cálcio intracelular. Proteínas que se ligam a cálcio participam na transdução de sinais no flagelo. Como exemplo podemos citar a calmodulina (Tryp-CaM), que interage com a PFR em *T. brucei* (Ridgley *et al.*, 2000) e FCaCBP de *T. cruzi* que sofre mudanças conformacionais em resposta ao cálcio. Com a diminuição do cálcio, a proteína dissocia-se da membrana seqüestrando os grupos acil (palmitoil e miristoil) que permitem sua associação à membrana do flagelo. Ainda não foi desvendada a via de sinalização na qual participam essas proteínas (Buchanan *et al.*, 2005).

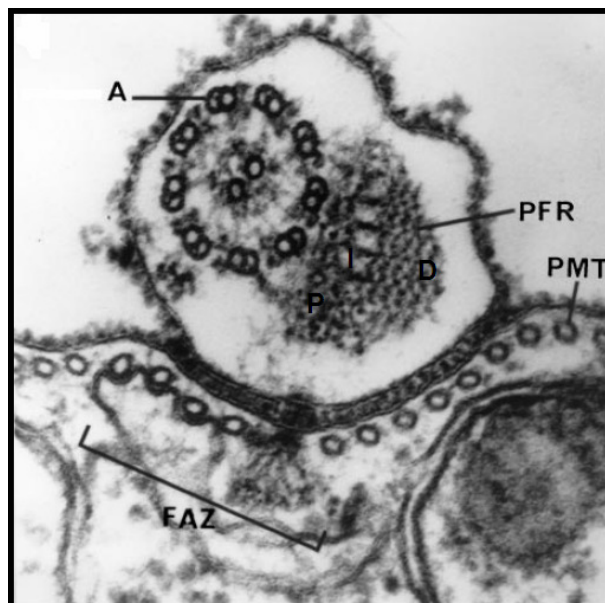


Figura 4. Corte transversal de citoesqueleto de *T. brucei* (imagem de microscopia eletrônica). Estão mostrados a região FAZ (*Flagellar Attachment Zone*), os Microtúbulos subpeliculares (PMT) e os componentes básicos do flagelo: Axonema (A) e a estrutura paraflagelar (PRF-*Paraflagellar rod*) que pode ser dividida em três domínios: proximal (P), intermediário (I) e distal (D) definido por sua posição relativa ao axonema. Fonte: Gull (1999).

1.4 Projeto genoma de *T. cruzi*: associação da seqüência H49 com calpaínas

Os dados gerados pelo projeto genoma do clone CL Brener de *T. cruzi* estão disponíveis no banco de dados do GenBank, sob o número de acesso AAHK00000000, no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. A montagem do genoma de *T. cruzi* gerou 5.489 *scaffolds* contendo 8.740 *contigs* equivalente a cerca de 110 Mb (genoma diplóide). O número de genes por genoma haplóide foi estimado em 12.000. Os genes foram agrupados em famílias, sendo a família das transialidases (TS), proteínas de superfície associadas à mucina (MASP) e mucinas as mais representativas, com 1.430, 1.377 e 863 membros, respectivamente. Outra família de genes com 20 membros é a das cisteínas peptidases (El-Sayed *et al.*, 2005a).

A análise do banco de dados pelo algoritmo blastp com a repetição de 68 aminoácidos do antígeno H49 (número de acesso GenBank: L09564) identificou a repetição do H49 inserida em seqüências de proteínas classificadas como calpaínas-*like*, que correspondem às cisteínas peptidases e calpaínas-*like* cisteína peptidases de *T. cruzi*.

1.5 Calpaínas

Guroff (1964) descreveu pela primeira vez na fração solúvel de cérebro de rato uma proteinase neutra ativada por cálcio. Anos depois, outra proteinase semelhante foi purificada em músculo de frango. Esta enzima era inibida por leupeptina, um conhecido inibidor de papaína, catepsina B e tripsina (Ishiura *et al.*, 1978). Posteriormente, as proteinases neutras encontradas em diversos tecidos e organismos foram denominadas de calpaínas, devido a sua similaridade estrutural com papaína e por serem ativadas por cálcio (Sorimachi e Suzuki, 2001).

As calpaínas são cisteína peptidases ativadas por cálcio e as isoformas denominadas micro e mili-calpaína são heterodímeros formados por uma subunidade maior (catalítica) e uma subunidade menor (regulatória). As enzimas μ -calpaína e m-calpaína são ativadas *in vitro* por concentrações de cálcio micro e milimolar, respectivamente. Elas coexistem com um inibidor endógeno específico para calpaínas denominado de calpastatina (Goll *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2004).

As calpaínas têm suscitado grande interesse por estar relacionadas com doenças degenerativas em músculo e cérebro. Além disso, são as únicas enzimas descritas na literatura que possuem simultaneamente atividade catalítica, ligam-se a cálcio e participam em diversos processos como transdução de sinais, migração celular, apoptose e remodelamento do citoesqueleto (Hosfield *et al.*, 1999). A seguir são apresentados dados sobre a classificação, localização, estrutura, função, substratos e ativação de calpaína.

1.5.1 Classificação das calpaínas

1.5.1.1 Classificação segundo a atividade enzimática

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

O clã CA inclui todas as famílias de peptidases com estrutura similar à papaína. No clã CA encontra-se a família de endopeptidase C2, na qual pertencem as calpaínas. As enzimas desse clã apresentam a tríade catalítica Cys, His, Asn (ou Asp). Sabe-se que o resíduo Gln anterior na seqüência à tríade catalítica é importante porque auxilia na estabilização do centro eletrofílico da enzima (Moldoveanu *et al.*, 2002).

1.5.1.2 Classificação segundo a estrutura

As calpaínas têm sido classificadas de acordo com sua estrutura como calpaínas clássicas (típicas) e não clássicas (atípicas).

Calpaínas clássicas: proteínas que apresentam o domínio catalítico (Cys-Pc) e cinco motivos *EF-hand* no extremo C-terminal. Exemplos calpaína 1 (μ -calpaína), calpaína 2 (m-calpaína) e calpaína-3 (p94) de humanos (Ono *et al.*, 1998a; 1998b; Croall e Ersfeld, 2007). As calpaínas 1 e 2 são ubíquas enquanto que as calpaínas p94 e nCL-2 são tecido específicas, encontrando-se em músculo e estomago, respectivamente (Sorimachi *et al.*, 1994).

Strobl *et al.* (2000) e Sorimachi e Suzuki (2001) com base na estrutura primária e dados de cristalografia identificaram nas calpaínas de mamífero, micro e mili-calpaína, possuem duas subunidades: a maior catalítica (80 kDa) e a menor regulatória (28 kDa). A similaridade entre a subunidade maior nas mili e micro-calpaínas é de 55-65%, enquanto a subunidade menor é idêntica em ambas as calpaínas. A subunidade maior ou catalítica foi dividida em 4 domínios. A figura 5 mostra o esquema das subunidades da calpaína com seus respectivos domínios.

-Domínio I: região de 18-20 aminoácidos localizada na região N-terminal que forma uma α -hélice importante para a atividade e ativação das calpaínas.

-Domínio II (ou domínio catalítico-Cys-Pc): apresenta similaridade com outras cisteína peptidases como papaína e catepsina B, H e L, na vizinhança dos aminoácidos que formam parte da tríade catalítica (Cys, His, Asn) (Ono *et al.*, 1998a). O domínio II ou catalítico é por sua vez dividido em dois subdomínios IIa e IIb. O resíduo de Cys da tríade está no domínio IIa enquanto que os resíduos His e Asn estão no subdomínio IIb. No domínio II foram identificados dois sítios de ligação a cálcio.

-Domínio III: o terceiro domínio denominado *C2 like* possibilita a interação entre os domínios II e IV. O domínio III pode participar como sítio de ligação a fosfolipídios e regulação. A estrutura tridimensional deste domínio é similar ao domínio C2 encontrado em proteína quinase C e sinaptotagminas.

-Domínio IV: apresenta cinco motivos *EF-hand* que são sítios de ligação a cálcio que apresentam alta similaridade com calmodulina. A interação do quinto motivo *EF-hands* com o domínio VI da subunidade menor possibilita a formação de heterodímero.

A subunidade menor regulatória das calpaínas foi subdividida em dois domínios:

-Domínio V: formado por um aglomerado de resíduos de glicina.

- Domínio VI: apresenta alta similaridade com o domínio IV, portanto, é também um domínio calmodulina-*like*.

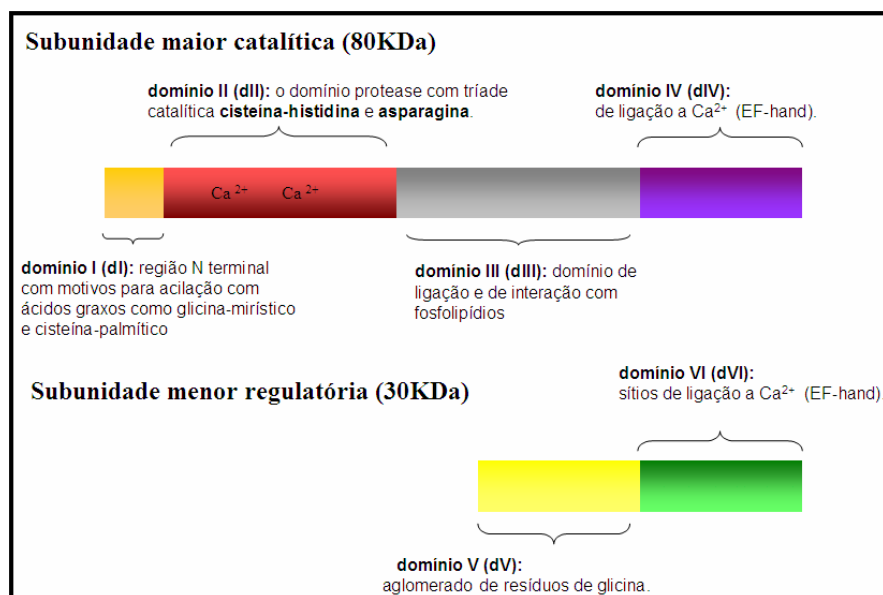


Figura 5. Representação esquemática das duas subunidades de calpaína humana. Modificado de (Khorchid e Ikura, 2002).

Calpaínas não clássicas: também denominadas de *calpain-like proteins* possuem os domínios I e II, mas não apresentam o domínio IV das calpaínas típicas (Croall e Ersfeld, 2007).

Uma característica relevante das calpaínas é sua diversidade estrutural. Os genes das calpaínas são produtos da fusão de vários genes como *C2-like*, *5EF-hand*, *SOLH* (*small optic lobe homology*), *PBH*, *cluster* de glicina, domínios transmembrana e dedos de zinco encontrados em calpaínas de diversos organismos, por exemplo, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Tetrahymena thermophila* e *T. brucei* (Sorimachi e Suzuki, 2001; Croall e Ersfeld, 2007).

Em animais, plantas, fungos e bactérias existem polipeptídeos com significativa similaridade ao domínio catalítico das calpaínas típicas. Algumas calpaínas de mamíferos, nematódos e tripanossomatídeos não apresentam o domínio catalítico (Cys-Pc), mas apresentam similaridade com as calpaínas na região N-terminal, portanto, são classificadas como calpaínas-*like* (Ersfeld *et al.*, 2005). Também foram identificadas calpaínas sem a tríade catalítica intacta (Cys-His-Asn), o resíduo de Cys pode ser substituído por Lys, mas não sabemos se essas calpaínas possuem atividade proteásica (Sorimachi e Suzuki, 2001).

1.5.2 Localização subcelular das calpaínas

As enzimas micro e mili-calpaína são principalmente intracelulares, associadas ao citoesqueleto e à membrana plasmática (Goll *et al.*, 2003). Um estudo com células de mamífero mostrou que a localização de microcalpaína foi citosólica, em volta do núcleo. Devido ao aumento de cálcio intracelular por tratamento das células com o ionóforo ionomicina, a microcalpaína foi redistribuída, encontrada preferencialmente na membrana plasmática (Gil-Parrado *et al.*, 2003).

Tonami *et al.* (2007) mostraram que uma das 14 calpaínas de mamíferos, denominada de calpaína 6, expressa durante embriogênese e que não possui a tríade catalítica intacta, está associada ao citoesqueleto. Foi sugerido que a interação de calpaína 6 com microtúbulos é por meio do domínio III. A expressão de calpaína 6 foi inibida com RNAi, observando-se alterações na organização da actina, motilidade celular e na estabilização de microtúbulos em células de mamífero. Por outro lado, a imunolocalização em miofibrilas de músculo esquelético de bovino mostrou que calpaína 1 está localizada dentro dos sarcômeros, no centro da banda I e na periferia da linha Z (Raynaud *et al.*, 2005).

1.5.3 Substratos das calpaínas

Os principais substratos *in vitro* das calpaínas são proteínas do citoesqueleto, especialmente as envolvidas em interações entre a membrana plasmática e citoesqueleto (talina, vinculina, espectrina, filamina, banda 4.1a, banda 4,1b ezrina), filamentos intermediários (desmina e vismentina), quinases, fosfatases, proteínas associadas à membrana incluindo receptores e proteínas que formam canal iônico e fatores de transcrição (Goll *et al.*, 2003).

Outras proteínas relacionadas à motilidade celular degradadas pela calpaína incluem a miosina (subunidade de 210 kDa), troponina e tropomiosina (Goll *et al.*, 2003). A calpaína cliva a miosina-Va em um sítio região a jusante da região PEST, em cérebro de rato *in vitro*, na presença de cálcio (Casaletti *et al.*, 2003).

As calpaínas destacam-se por exercer proteólise limitada sobre proteínas alvo, elas acabam modificando seus substratos em vez de degradá-los, por isso são consideradas de enzimas moduladoras (Suzuki e Sorimachi, 1998; Ono *et al.*, 1998a; Sorimachi e Suzuki, 2001)

1.5.4 Ativação das calpaínas

O estudo do mecanismo de ativação e regulação das calpaínas *in vivo* é importante para estabelecermos a função destas enzimas. Estudos *in vitro* mostraram que os requerimentos de cálcio pelas μ e m-calpaínas (~10-50 μ M e ~300-500 μ M, respectivamente) são diferentes dos encontrados *in vivo* (<1 μ M), sugerindo que existe um mecanismo de regulação das calpaínas com a participação de moléculas ativadoras endógenas. O mecanismo de regulação ainda não é bem entendido e, tampouco, foram identificadas as moléculas ativadoras (Hosfield *et al.*, 1999).

O modelo de ativação das calpaínas de Suzuki e Sorimachi (1998), propõem que em resposta ao aumento de cálcio intracelular, a calpaína é translocada à membrana expondo seus resíduos hidrofóbicos interagindo com fosfolipídios e cálcio (Fig. 6). A ativação acontece na membrana pela autólise numa pequena região na porção N-terminal de ambas as subunidades, como resultado as subunidades de 80 e 30 kDa são dissociadas, a subunidade maior (catalítica) torna-se ativa e hidrolisa substratos na membrana e no citosol após ser liberada da membrana (Suzuki *et al.*, 2004).

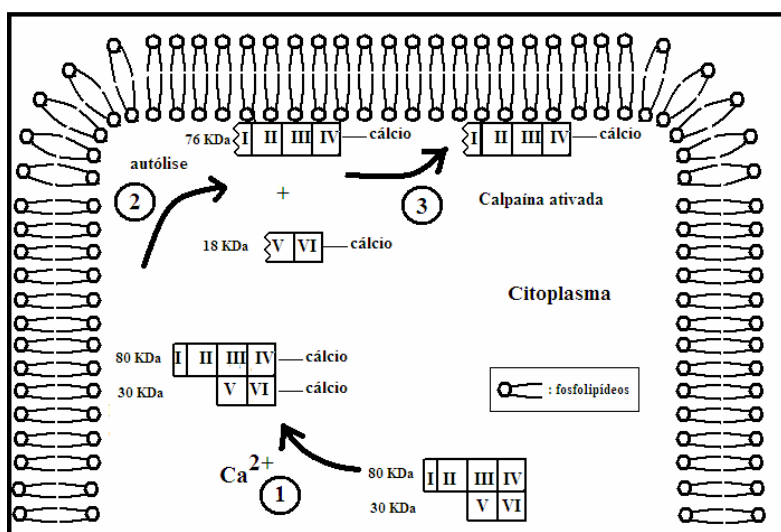


Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de ativação de calpaína humana. 1) O cálcio intracelular liga-se às duas subunidades de calpaína citosólica (domínios II, III, IV e VI). 2) A calpaína é translocada para a membrana e interage com fosfolípidios, acontece autólise na região do N-terminal das duas subunidades e dissociação. 3) A subunidade maior da calpaína encontra-se ativa, hidrolisa substratos na membrana e no citosol. No esquema, a membrana plasmática foi representada somente com fosfolípidios. Modificado de (Suzuki e Sorimachi, 1998; Suzuki *et al.*, 2004).

1.5.5 Calpaínas em tripanossomatídeos

Em *T. brucei*, *Leishmania major* e *T. cruzi* foram identificadas 18, 27 e 24 seqüências de calpaína-like analisando-se o banco de dados do genoma de cada organismo. O domínio catalítico está bem conservado, mas a tríade catalítica não está intacta. Na região N-terminal de algumas dessas calpaínas existem motivos de acilação de ácidos graxos indicando possível associação à membrana plasmática. As calpaínas analisadas não possuem na região C-terminal o domínio IV com motivos *EF-hands* das calpaínas típicas (Ersfeld *et al.*, 2005).

Ersfeld *et al.* (2005) classificou as calpaínas dos tripanossomatídeos em 5 grupos com base a seus domínios estruturais (Fig. 7). No grupo 1 estão as calpains semelhantes às calpains típicas, elas apresentam região N-terminal própria de tripanossomatídeos, com motivos de acilação por ácidos graxos, os domínios II e III e região C-terminal que não liga cálcio. No grupo 2, a região N-terminal não apresenta similaridade com a mesma região dos grupos 1 e 3, mas estão presentes os mesmos domínios estruturais que no grupo 1. No grupo 3, as regiões N e C-terminal são curtas. O grupo 4 possui calpains com domínios II e III repetidos 3 vezes e uma região com repetições dispostas em tandem que apresenta estrutura secundária do tipo *coiled-*

coil. No grupo 5 são identificados os domínios II e III, uma região com repetições e porção N-terminal similar ao grupo 3.

<i>Grupo</i>	<i>Domínios</i>
1	I ^K II III C
2	I ^H II III C
3	I ^K
4	II III II III R II III C
5	R II C

Figura 7. Classificação de calpaínas-like em tripanossomatídeos.

As calpaínas-like foram classificadas em grupos (1-5) de acordo com seus domínios estruturais. I^K: domínio específico de tripanossomatídeos, I^H: domínio heterogêneo, R: seqüência repetitiva, C: domínio C terminal. Segundo: Ersfeld *et al.* (2005).

Recentemente foi identificada uma calpaína de *T. cruzi*, expressa durante metaciclo genese. A proteína foi localizada no citoplasma, não possui a tríade catalítica intacta, a cisteína foi substituída por um resíduo de serina, não apresenta potenciais sítios de acilação, mas apresenta possíveis sítios de fosforilação. Por *immunoblotting* a calpaína foi detectada principalmente na fração solúvel, após tratamento com detergente, mas também na fração insolúvel. Não foi detectada atividade catalítica em géis de gelatina, assim foi sugerido um papel na transdução de sinais (Giese *et al.*, 2008).

Os genes calpaína estão arranjados em *clusters*, com várias cópias de genes idênticos (paralogs) dispostos em tandem. Em *T. brucei*, *Leishmania* e *T. cruzi* foram identificados 7, 10 e 12 genes de calpaínas (Ersfeld *et al.*, 2005).

A proteína CAP 5.5, uma calpaína-like, foi encontrada associada ao citoesqueleto de *T. brucei*. A proteína foi definida como estágio específica dado que foi encontrada em formas procíclicas não em formas sanguíneas. Também é palmitoilada e miristoilada, sugerindo interação com a membrana celular. A CAP 5.5 não apresenta o domínio IV e a tríade catalítica C, H, N foi substituída por S, Y, N (Hertz-Fowler *et al.*, 2001).

OBJETIVOS

O nosso laboratório tem-se dedicado ao estudo de genes de *T. cruzi* que codificam antígenos imunodominantes de interesse clínico e biológico. O estudo de genes relacionados com a doença (patogenicidade, resposta imune) ou com a biologia do parasita (virulência, função estrutural) pode gerar informações importantes no controle do parasita ou no tratamento da doença. Além disso, os fenótipos resultantes da ação destes genes podem ser detectados e estudados com mais facilidade.

O antígeno nativo H49 é uma proteína gigante (aproximadamente 300 kDa), presente em todas as formas evolutivas do parasita. Apresenta localização celular bastante específica, situando-se entre o corpo celular e o flagelo, sugerindo que este antígeno tenha função estrutural. Além disso, o antígeno H49 é um importante imunógeno do *T. cruzi*, sendo reconhecido por uma grande porcentagem dos pacientes chagásicos crônicos. Em diferentes avaliações foi possível comprovar o potencial do antígeno H49 no sorodiagnóstico da doença de Chagas (Franco da Silveira *et al.*, 2001; Ponce *et al.*, 2005).

O clone recombinante H49 é composto por repetições de 204 pares de bases dispostas em tandem que codificam repetições de 68 aminoácidos (Cotrim *et al.*, 1990). Com o advento do Projeto Genoma de *T. cruzi* identificamos a sequência completa do gene H49. Verificamos que as repetições H49 estão associadas aos genes classificados como “*calpain-like cysteine peptidases*”. Por esta razão que o gene H49 será designado como gene H49/calpaína.

Objetivos

- Determinar a estrutura e organização dos genes H49/calpaína.
- Estudar a expressão dos genes H49/calpaína, a localização celular e função biológica da proteína H49/calpaína.

Para alcançar os objetivos propostos pretendemos:

- Identificar e caracterizar as sequências H49/calpaínas disponíveis no GenBank e Tritryp Gene DB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>) com ferramentas de bioinformática.
- Identificar e caracterizar as sequências H49/calpaínas no contexto genômico: localização cromossômica, análise de megafragmentos genômicos clonados em vetor YAC e perfis de restrição em *T. cruzi*.
- Analisar a expressão das sequências H49/calpaínas por RT/PCR
- Gerar anticorpos policlonais contra os diferentes domínios das proteínas H49/calpaína
- Determinar a distribuição celular das proteínas H49/calpaína por imunofluorescência e “*immunoblotting*”

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas e clone de *T. cruzi*

Cepa G: Cepa isolada de *Didelphis marsupialis* na região amazônica, Brasil (Yoshida, 1983).

CL Brener: clone da cepa CL escolhido como clone de referência do Projeto Genoma de *T. cruzi* (Zingales *et al.*, 1997) proveniente da cepa CL isolada de *Triatoma infestans* no Rio Grande do Sul, Brasil (Brener e Chiari, 1963).

3.2 Meio de cultura para parasitas, bactérias e leveduras

Parasitas:

Formas epimastigotas de *T. cruzi* eram mantidas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) contendo infusão de fígado 5g/L, triptose 5 g/L, NaCl 4 g/L, KCl 0,4 g/L, fosfato de sódio 8 g/L, glicose 2 g/L, hemina 10 g/L e 10 g/L soro fetal bovino (inativado), pH 7,2, por 5 a 7 dias a 28°C sem agitação.

Bactérias:

As bactérias de *Escherichia. coli* DH5 α e BL21 eram mantidas em meio LB líquido (*Luria Bertani*) contendo 1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, pH 7,2, ou em placas de Petri com meio LB sólido (LB líquido com 1,5% de ágar bacteriológico). Meio LB com ampicilina na concentração final de 0,1 mg/mL era utilizado para seleção das bactérias recombinantes.

Leveduras:

As leveduras recombinantes (*Saccharomyces cerevisiae*) contendo o vetor pYAC-4 com DNA de *T. cruzi* eram cultivadas em meio seletivo AHC (*Acid hydrolyzed casein*) líquido (0,67% base nitrogenada de levedura sem aminoácidos, 1% casaminoácidos, 0,01% adenina, 0,2% glicose, pH 5,8) ou sólido (AHC líquido era adicionado 2% de bacto-agar). As leveduras eram cultivadas em 15 mL de meio seletivo AHC por 72 h a temperatura ambiente com agitação constante.

3.3 Soluções e tampões

Soluções extração DNA plasmidial:

Solução A: 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA, 50 mM glicose.

Solução B: 0,2 M NaOH, 1% SDS.

Solução C: 3 M acetato de potássio, 5 M ácido acético glacial.

Água DEPC:

Água destilada com 0,1% de dietil pirocarbonato e autoclavada.

Tampões:

PBS 1X: 0,13 M NaCl, 2 mM NaH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, pH 7,2.

Tampão de corrida: 25 mM Tris, 0,19 M glicina, 0,1% SDS.

Tampão de ligação 2X (Rapid ligation buffer-Promega): 60 mM Tris-HCl (pH 7,8), 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% PEG (Polietilenoglicol).

Tampão PCR 10X: 20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl.

Tampão de lise TELT: 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 62,5 mM EDTA (pH 9,0), 2,5 M LiCl, 4% Triton X-100.

Tampão de lise NDS: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM EDTA, 1% Sarcosil, 1 mg/mL Proteinase K.

TBE 1X: 89 mM Tris ; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA (pH 8,3).

Tampão de transferência: 2,5 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20% metanol.

TE: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA .

MOPS 10X: 0,1 M acetato de sódio, 10 mM EDTA, 0,4 M MOPS (pH 7,0).

Tampão de síntese de cDNA 5X: 250 mM Tris-acetato (pH 8,4), 375 mM acetato de potássio, 40 mM acetato de magnésio.

Tampões de amostra DNA, RNA e proteínas:

Tampão de amostra DNA (loading-buffer) 6x: 30% glicerol, 0,25% xileno cianol, 0,25% azul de bromofenol, 10 mM EDTA.

Tampão de amostra para RNA: 50 µL de MOPS 10x, 250 µL de formamida deionizada, 90 µL de formaldeído 37% e 39 µL de tampão de amostra DNA (6X).

Tampão de amostra proteína: 62 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol e 0,01% azul de bromofenol.

Tampão amostra DNA para seqüência 5X: 25 mM EDTA, pH 8,0, 50 mg/mL *Blue Dextran*.

Soluções transferência e hibridização DNA

Soluções para transferência de DNA de géis de agarose para filtros de náilon:

Depuração: 0,25 M HCl.

Denaturação: 0,5 M NaOH, 1 M NaCl.

Neutralização: 1 M Tris-HCl, (pH 8,0), 0,6 M NaCl.

SSC 20X: 3 M NaCl, 0,3 M citrato de sódio, pH 7,0.

Solução Denhardt's (50X): 1% Ficoll, 1% Polivinil-Pirrolidona, 1% BSA.

Solução de hibridização: Denhardt's 5X, SSC 5X, Formamida 50%, 100 µg/mL DNA de esperma de salmão, 0,1% SDS e 10 µL/mL tRNA.

Soluções para lavagem dos filtros após hibridização:

solução 1: (2X SSC, 0,2% SDS e 0,1% NaPi)

solução 2: (1X SSC, 0,2% SDS, 0,1% NaPi)

solução 3: (0,1X SSC, 0,1% SDS, 0,1% NaPi)

3.4 Extração de ácidos nucleicos

3.4.1 Extração DNA genômico de *T. cruzi*

A cultura de epimastigotas foi centrifugada a 2.455 x g por 7 min, o sobrenadante descartado o precipitado lavado três vezes com 20 mL PBS por centrifugação a 2.455 x g por 7 min. Finalmente o precipitado foi ressuspenso em 1 mL de PBS. Alíquotas de 10 µL de parasitas foram diluídos de 1/1000 ou 1/500 em PBS contendo 2% de formaldeído e o número de células estimado em câmara de Neubauer.

Cerca de 1×10^8 parasitas eram ressuspendidos cuidadosamente em 150 µL de TELT + 15 µL RNase (10 mg/mL) e incubados 45 min a 37 °C. Após a incubação era adicionado o dobro de volume de uma mistura fenol/clorofórmio (1:1). A mistura era homogeneizada por inversão com movimentos fortes, incubada a temperatura ambiente durante 5 min. A separação das fases era obtida por centrifugação 10 minutos a 17.400 x g.

A fase aquosa era transferida para outro tubo onde eram adicionados 2,5 a 3 volumes de etanol. Os tubos eram suavemente invertidos e armazenados a -20 °C por 12 horas ou alternativamente 15 min a -70 °C. Após este período os tubos eram centrifugados a 17.400 x g por 10 min a 4 °C. O precipitado era lavado com 500 µL de etanol 70% gelado, o sobrenadante era descartado e o material seco a 37 °C. O precipitado seco era ressuscitado em 50 µL de TE (pH 8,0). A qualidade do material era analisada num gel de agarose ao 0,8%. O DNA era quantificado a 260 nm de acordo com a seguinte relação 50 µg de DNA/mL equivale a 1 unidade de densidade óptica e armazenado a -20 °C.

3.4.2 Preparação de blocos de agarose com DNA cromossômico

As formas epimastigotas de *T. cruzi* eram lavados 3 vezes por centrifugação a 1.600 x g por 5 min com tampão PBS 1X. Cerca 10⁸ parasitas/mL eram homogeneizados em 1 mL agarose LMT 2% (*low melting temperature*). A seguir, 100 µL da suspensão celular eram colocados em molde de plástico, obtendo-se 10⁷ parasitos/bloco. A agarose era solidificada colocando-se os blocos sobre gelo.

Os blocos de agarose eram incubados em solução de lise NDS por 16 h a 56°C e, então, equilibrados em 30 mL de tampão TE lavados 3 vezes por 30 min a 56°C. Os blocos eram estocados em 0,5 M EDTA pH 8,0 a 4°C ou submetidos à eletroforese de campo pulsado (PFGE) segundo descrito no item 3.5.2.

3.4.3 Extração de DNA de YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)

As leveduras recombinantes eram cultivadas por 72 h em 15 mL de meio AHC a temperatura ambiente com agitação de 200 rpm no agitador *BIG Bill digital (Thermolyne)*, em seguida eram centrifugadas a 1.880 x g por 15 min. As células eram ressuscitadas em 500 µL de solução contendo 40 mM EDTA e 90 mM β-mercaptoetanol, centrifugadas a 1.300 x g por 10 min, o precipitado resuscitado em 500 µL de solução de lise (1 M D-sorbitol, 1 mM EDTA 3 mM DTT (ditiotreitól) e 100 U/mL de liticase) e incubado por 1 h a 37°C. A seguir, o material era centrifugado a 1.300 x g por 10 minutos e o precipitado resuscitado em 200 µL de solução de lise A (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 5 mM β-mercaptoetanol). A

seguir, eram adicionados 200 µL de solução de lise B (50 mM Tris- HCl pH 7,4, 1 M NaCl, 50 mM EDTA e 2% SDS) e o material foi homogeneizado gentilmente.

O DNA foi extraído com 400 µL fenol/clorofórmio (1:1); e 400 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), centrifugando-se a 14.800 x g por 15 min para separação das fases orgânica e aquosa. O DNA presente na fase aquosa era precipitado pela adição de 400 µL de isopropanol, incubação a -70°C por 15 min e centrifugação 14.800 x g por 20 min. O precipitado era ressuspenso em 50 µL de água destilada autoclavada contendo RNase A (10 mg/mL) e incubado por 2 h a 37°C. O DNA era reprecipitado pela adição de 0,1 V de acetato de sódio 3M, pH 5,8, e 2V de etanol e centrifugação a 17.400 x g por 15 min. O precipitado era ressuspendido em 50 µL de tampão TE e a concentração do DNA determinada por absorbância a 260 nm. O DNA do YAC corresponde a cerca de 1/100 do DNA total presente na preparação (Santos, 1998).

3.4.4 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (*mini prep*)

E. coli DH5α transformadas com plasmídeo eram cultivadas em 3 mL de LB contendo ampicilina (0,1 mg/mL) durante 16 h sob agitação constante a 37°C. As células eram centrifugadas a 2.455 x g por 10 min. O precipitado era ressuspendido em 100 µL de solução A em presença de 20 µL de RNase (10 mg/mL) e transferido para tubo de microcentrifuga. A seguir, eram adicionados 200 µL de solução B e incubação por 5 min a temperatura ambiente. Após a incubação, eram adicionados 200 µL de solução C, a amostra homogeneizada por inversão 8 vezes e incubada por 30 min no gelo. A suspensão era centrifugada a 10.300 x g por 15 min a 4°C e 600 µL do sobrenadante eram transferidos para um novo tubo de microcentrifuga.

O DNA do plasmidial era precipitado com 450 µL de isopropanol a temperatura ambiente por 5 min e centrifugação a 10.300 x g por 10 min a 4°C. A seguir, o precipitado foi lavado por centrifugação por 5 min a 10.300 x g a 4°C com 500 µL de etanol 70% gelado. O precipitado era seco a 37°C e ressuspendido em 36 µL de água destilada autoclavada. A integridade do DNA era avaliada num gel de agarose 0,8%.

3.4.5 Extração de RNA de epimastigotas de *T. cruzi*

Cerca de 1×10^8 células eram homogeneizadas em 1 mL de *Trizol*[®] (Invitrogen) e incubadas durante 5 min a temperatura ambiente. Para cada 1 mL de *Trizol* eram adicionados 200 µL de clorofórmio, a mistura era homogeneizada por vortex durante 15 s e centrifugada a 12.000 x g durante 15 min a 4°C. O RNA presente na fase aquosa foi precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol e incubação a temperatura ambiente durante 10 min. Após esse período a mistura era centrifugada a 12.000 x g durante 10 min a 4°C. O sobrenadante era descartado e o precipitado lavado por centrifugação a 7.500 x g durante 5 min com etanol 75% preparado em água tratada com DEPC (Diethyl pirocarbonato). Finalmente, o precipitado era seco, ressuspenso em 30 µL de H₂O tratada com DEPC e armazenado a -20°C para posterior análise. O RNA era quantificado por absorvância a 260 nm, considerando que 1A_{260 nm} corresponde a 40 µg/mL de RNA.

3.5 Separação de ácidos nucléicos por eletroforese

3.5.1 DNA

As amostras de DNA eram separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X, seguindo-se incubação em brometo de etídeo numa concentração final de 0,5 µg/mL. As amostras eram aplicadas em tampão de amostra para DNA. As corridas eletroforéticas eram feitas a voltagem constante de 80 V. Os fragmentos de bacteriófago λ (23-0,5 Kb) e φ X174 (1.300-72 pb), obtidos pela digestão com *Hind* III e *Hae* III, respectivamente, foram utilizados como referência de tamanho molecular.

3.5.2 Eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Eletroforese*-PFGE)

Para a separação das bandas cromossômicas foi utilizado o aparelho Gene Navigator[™] System (Pharmacia). O gel era preparado com agarose Seakem (FMC-Bioproducts) 1,1% em TBE 0,5X. A corrida eletroforética, duração de 132 h, foi processada sob voltagem constante de 80 V a 13°C. As condições de corrida foram: pulsos homogêneos (N/S, L/O) de 90 s por 30 h, 200 s por 30 h, 350 s por 24 h, 500 s por 24 h e 800 s por 24 h.

Os cromossomos de *Hansenula winguei* 3,03-1,05 Mb (*Pulsed Field standard BIORAD*) foram utilizados como referência de tamanho. Após a eletroforese, o gel era incubado em solução contendo 10 µg/ml de brometo de etídeo, analisado sob luz ultravioleta, fotografado no sistema da KODAK *digital science (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120)* e transferido para filtro de náilon para ser hibridado com sonda radioativa (item 3.15).

3.5.3 RNA

O RNA era submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% . Alíquotas de 0,8 g de agarose era dissolvida em 84,6 mL de água tratada com DEPC autoclavada. A seguir, eram adicionados 10 mL tampão MOPS 10X e 5,4 mL de 37% formaldeído quando a agarose atingia a temperatura de 56°C. As amostras de RNA antes de serem aplicadas no gel eram pré-incubadas por 15 min a 68°C em tampão de amostra para RNA e colocadas imediatamente no gelo.

A corrida eletroforética era feita sob voltagem constante de 80 V em tampão de corrida MOPS 1X. Como referência de tamanho molecular foi utilizado RNA (10-0,5 kb) da Invitrogen.

3.6 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

As reações de PCR eram preparadas em volume final de 50 µL contendo 38 µL de água destilada autoclavada, 1µL de dNTPs 10 mM (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 2µL de MgCl₂ 50 mM, 5 µL de tampão de PCR 10X, 1 µL oligonucleotídeo iniciador senso 100 pmoles/µL, 1 µL oligonucleotídeo iniciador anti-senso 100 pmoles/µL, 1 µL DNA 120 ng/µL e 1 µL *Taq* polimerase (1 U/µL).

Na reação de PCR foi utilizado o termociclador da marca Perkin Elmer *Applied Biosystems Gene Amp[®] PCR System 9700*. Primeiramente era feita a desnaturação do DNA a 94°C por 5 min, seguindo-se a amplificação por 35 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 59°C, 1 min a 72°C e extensão a 72°C por 7 min. Após a amplificação, os produtos do PCR eram analisados num gel de agarose (0,8 a 1%).

3.7 Síntese de cDNA pela técnica de RT-PCR

A síntese de cDNA usando como molde o RNA total foi feita de acordo com as instruções do kit *ThermoScript*TM RT-PCR System (Invitrogen). Em um tubo eram adicionados 4 µL de RNA 1,2 µg/µL (tratado com DNase), 1 µL de iniciador oligo₂₀ (50 µM), 2µL dNTPs mix 10 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), e água tratada com DEPC autoclavada para um volume final de 12 µL. A seguir, o RNA era denaturado a 68°C por 3 min e incubado no gelo. Em outro tubo eram adicionados 4 µL de tampão de síntese de cDNA 5X, 1 µL DTT 0,1 M, 1 µL RNaseOUTTM (40 U/µL), 1 µL *ThermoScript*TM RT (Transcriptase reverse) 15 U/µL (Invitrogen), e água tratada com DEPC para um volume final de 8 µL. O volume de ambas reações foi transferido para um novo tubo (volume final 20 µL) e incubada 60 min a 50°C para reação de síntese de cDNA. Após esse período, a reação foi interrompida incubando-se a amostra a 85°C por 5 min. O tubo com o cDNA era armazenado a -20°C. Finalmente, alíquotas de cDNA (2 µL) eram utilizadas em reação de PCR usando Platinum[®] *Taq* DNA polimerase (Invitrogen).

3.7.1 PCR de cDNA com Platinum[®] *Taq* DNA polimerase

A amplificação de diferentes fragmentos em cDNA era feita adicionando num tubo os seguintes componentes: 5µL de tampão de PCR 10X sem MgCl₂, 1,5 µL MgCl₂ 50 mM, 1µL dNTPmix 10 mM, 1µL iniciador senso 10 µM, 1µL iniciador antisenso 10 µM, 0,4 µL Platinum[®] *Taq* DNA polimerase (5U/µL), 2µL cDNA e 38,1 µL de água DEPC.

O termociclador era programado como descrito no item 3.6 levando-se em conta o T_m dos diferentes iniciadores (ver tabela 1). O tubo controle continha todos os componentes descritos acima exceto o cDNA que foi substituído por 2 µL RNA (1,2 µg/µL) tratado com 1 µL de DNase. Após o término da reação de PCR o produto da reação era analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e os fragmentos de interesse purificados do gel com o kit *Wizard*[®] *SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

3.8 Amplificação e clonagem de fragmentos de interesse em vetores de clonagem e expressão

3.8.1 Amplificação de fragmentos de interesse por PCR

A partir das seqüências de proteínas calpains-*like* disponíveis no Banco de dados do NCBI, foram sintetizados oligonucleotídeos iniciadores para amplificar diferentes regiões de interesse. Na tabela 1 são indicadas as regiões amplificadas, características dos oligonucleotídeos (nome, seqüência, Temperatura de fusão (T_m), posição dentro da seqüência) e tamanho do amplicon a partir das seqüências de calpaína e H49.

Os produtos de PCR de três regiões de interesse: H49 degenerado/calpaína, domínio II catalítico (Cys-Pc), e H49 conservado/calpaína foram clonados no vetor de clonagem *pGEM®-T* (Promega) ou de expressão pGEX-3X (GE-Amersham), depois seqüenciados com o *kit Big Dye* (*Applied Biosystem*) e utilizados como sondas em hibridizações com o DNA de *T. cruzi*.

Como indicado na Tabela 1 os oligonucleotídeos Ca1 e Ca2 e H49calpex1 e H49calpex2, com sítios de restrição para *Bam* HI e *Eco* RI, foram utilizados na amplificação das seguintes regiões: domínio II catalítico (Cys-Pc) e H49 degenerado/calpaína que foram clonados no vetor de expressão pGEX-3X. As proteínas recombinantes destas regiões foram denominadas de “calpaína A” e “calpaína B”, respectivamente.

As repetições de 204 pb do gene H49 clonados em pGEX está disponível em nosso laboratório (Paranhos-Bacalla *et al.*, 1994). Os plasmídeos foram seqüenciados para confirmar a identidade da seqüência e a fase no caso do vetor de expressão.

Tabela 1: Regiões amplificadas de calpaina e H49

Região de interesse	Nome do oligonucleotídeo (Senso-Antisenso)	Seqüência do oligonucleotídeo (5' a 3')	T _m (°C)	Locus tag/XML	Posição do oligonucleotídeo (nucleotídeos)	Amplicon (pb)
H49 degenerado-calpaina	Calp520(1)-	Calp520(1): GCG AGC AAG ATC AGT GCC CT	60,2		4156-4175	500
	H49deg(1)	H49deg(1): CGT GTC CAG CCG AAG GAT GTC	60,3		4681-4701	
	H49deg(2)-	H49deg(2): GCT TGC GCA GGA ACG ACT GAG	61,9		8253-8273	500
	Calp520(2)	Calp520(2): CTG CCT GCA GGG CAT ACA GCT	61,9	Tc00.1047053506721.30	8774-8794	
	*H49calpex(1)-	H49calpex(1): CAT GGA TCC GCA TGG CCG AGG AT	63,7		3382-3393	1037
	H49calpex(2)	H49calpex(2): CGC GAA TTC GCT CCT TGG CAA GC	63,5		4407-4419	
Calpaina Dominio catalítico (Cys-Pc)	Tc1- Tc2	Tc1: GGC GGA GGA GTG GCC ACG T Tc2: CGC CAG AACTGT GCC GAC C	65,4 61,6		1961-1979 2443-2462	500
	*Ca1- Ca2	Ca1: ATC GGA TCC GCA TGG CGG AGG AG Ca2: GCC GAA TTC GCC AAG CCT GTC TG	76,0 73,0	Tc00.1047053511441.10	1960-1971 2989-3002	1042
	H49(3) - Tc10(2)	H49 (3): GCT CGA CGA CGA CAG CGA CTT Tc10(2): TGC GCC AAC TCA TGC ACA CGG	61,8 61,9	Tc00.1047053511441.10	972-992 1490-1510	600
	Tc3- H49(2)	Tc3: GCG CGA CCC GAG ACG GAA GG H49(2): CGC TGT CGT CGA GCG GC	65,5 65,8	Tc00.1047053505985.9 L09564	2187-2207 279-298	2000

Regiões amplificadas de calpaina e H49. São indicadas as regiões amplificadas, características dos oligonucleotídeos (nome, seqüência, Temperatura de fusão (T_m), posição dos oligonucleotídeos senso e antisenso na seqüência e tamanho do amplicon com base nas seqüências XM de calpaina e H49.

(*) Os oligonucleotídeos Ca1-Ca2 e H49calpex(1)-H49calpex(2) utilizados para expressar as proteínas Calpaina A e Calpaina B possuem sítios de restrição para *Bam* HI e *Eco* RI mostrados em azul e verde respectivamente.

3.8.2 Ligação de produtos de PCR no plasmídeo pGEM®-T

Os produtos de PCR eram ligados no vetor de clonagem *pGEM®-T easy vector* (Promega). Em um tubo eram adicionados 5 µL de 2X tampão de ligação T4 DNA ligase, 1µL do vetor (50 ng/µL), 1 a 3 µL do produto do PCR, 1µL T4 DNA ligase 3U/ µL e água deionizada para o volume final de 10 µL. A seguir, o tubo era incubado por 12 h a 16°C.

3.8.3 Ligação dos produtos de PCR H49 degenerado/calpaína e domínio II catalítico (Cys-Pc) no plasmídeo pGEX-3X

O produto de PCR do domínio II (Cys-Pc) e H49 degenerado/calpaína de *T. cruzi* foram clonados no vetor de expressão pGEX-3X. Tanto o vetor de expressão quanto o produto de PCR foram digeridos por separado com *Bam* HI e *Eco* RI como descrito a seguir: cerca de 1,5 µg do vetor e 9 µL do produto de PCR eram digeridos com 1µL de cada uma das enzimas *Eco* RI (10 U/ µL) e *Bam* HI (10 U/ µL), 3 µL tampão de reação REACT[®] 3 10X (500 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM MgCl₂, 1000 mM NaCl) e água destilada autoclavada para volume final de 30 µL.

A digestão era processada a 37°C por 16 h. Após esse período, o DNA era precipitado pela adição de 2,5X volume de etanol e acetato de sódio (concentração final de 0,3M) e centrifugação a 10.300 x g a 4°C por 10 min. O DNA era ressuspendido em 30 µL de água destilada autoclavada e analisado em gel de agarose ao 0,8%.

A reação de ligação foi processada na presença de 2 µL do tampão ligação 5X (250 mM Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25% polietilenoglicol), 1 µL vetor pGEX-3X 50 ng/µL (digerido), 6 µL do produto de PCR (digerido) e 1 µL T4 DNA ligase (100 U) por 16 h a 16°C. O volume total da reação de ligação (10 µL) era utilizado na transformação de bactérias DH5-α competentes.

3.9 Transformação de *E. coli* DH5- α

Bactérias competentes de *E. coli* DH5 α (100 μ L) foram transformadas com DNA plasmidial (50-100 ng do DNA) em um tubo de microcentrifuga estéril. As bactérias eram incubadas em gelo durante 1h, e em seguida, submetidas a choque térmico a 42 °C por 2 min e novamente incubadas no gelo por mais 10 min. Após a adição de 250 μ L de meio de cultura LB, as células eram incubadas com agitação por 1 hora a 37 °C. Em seguida, eram adicionados 40 μ L de 2% X-Gal e as bactérias plaqueadas em LB sólido contendo ampicilina (0,1 mg/mL) e 0,2 mM IPTG (Isopropil- β -galactosídeo) e incubadas a 37°C durante 18 h.

3.10 Seqüenciamento dos insertos dos clones recombinantes

A reação de seqüência foi processada com o kit *Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction* (Applied Biosystem). Em um tubo eram colocados 2 μ L do reagente *Big dye*, 1,6 pmol de oligonucleotídeo (senso ou anti-senso) adequados para os vetores *pGEM®-T easy* ou *pGEX-3X*, 2 μ L de DNA (500 ng), 1 μ L tampão 5X (400 mM Tris-HCl (pH 9,0), 10 mM MgCl₂) em um total de 10 μ L de reação. A reação de PCR foi processada no termociclador *Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 9700* (Perkin Elmer) como descrito a seguir: desnaturação do DNA a 96°C por 5 min, seguindo-se a amplificação em 25 ciclos de 96°C, 20 s, 50°C, 10 s e 60°C por 4 min.

Após a reação de PCR, o DNA era precipitado adicionando-se 100 μ L de etanol 80 % e incubando-se no escuro a 20°C durante 12 h. A seguir, centrifugava-se a 17.400 x g durante 20 min, descartava-se o sobrenadante, e o precipitado era lavado com etanol 70 % duas vezes, centrifugando-se a 17.400 x g durante 10 min. O precipitado era seco a 37°C, ressuspenso em 2,5 μ L de tampão de amostra para seqüência (*Applied Biosystem*) e submetido a uma corrida eletroforética no aparelho *ABI-Prism 377* (*Applied Biosystem*).

3.11 Digestão do DNA genômico de *T. cruzi*

O DNA genômico de *T. cruzi* foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI*, *KpnI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *RsaI* e *Hinfl*. A mistura de reação continha 6 μ L de DNA genômico (equivalente

a 10 µg DNA), 3 µL tampão de reação 3X de cada uma das enzimas fornecido pelo fabricante, 1µL enzima restrição (10 U/µL) e 20 µL de água destilada autoclavada. A seguir, a mistura, era incubada durante 16 h a 37°C. O volume total da digestão (30 µL) era aplicado em gel de agarose 0,8 % com tampão TBE 1X a 80 V. Após a corrida eletroforética, o gel foi fotografado utilizando o sistema da KODAK *digital science (Electrophoresis Documentation and Analysis System 120)* e os fragmentos de DNA transferidos para filtro de náilon para hibridização com sonda radioativa (item 3.15).

3.12 Transferência de ácidos nucléicos para filtros de náilon

A transferência do DNA do gel de agarose para a membrana de náilon Hybond-N (Amersham) era feita em o aparelho *Vacu gene XL* (Pharmacia). O gel era colocado sobre uma membrana de náilon e tratado com as seguintes soluções: depuração por 30 min, denaturação por 30 min, neutralização por 30 min e SSC 20X por 2 h. Finalmente, a fixação do DNA ao filtro de náilon era feita por exposição à luz ultravioleta (150 m Joules) no aparelho *GS Gene Linker™ UV chamber* (Bio Rad). A membrana de náilon transferido era estocada a -20°C até o momento do uso.

3.13 Purificação dos insertos a serem utilizados como sonda radioativa

Os insertos clonados no vetor de clonagem *pGEM®-T easy vector* (Promega) liberados por meio da digestão com enzima de restrição *EcoRI* ou *EcoRV* (Invitrogen). Os insertos eram separados gel de agarose 0,8% e o fragmento de interesse purificado do gel com auxílio do kit *Wizard SV Gel and PCR clean-up system* (Promega) e marcado radioativamente como descrito a seguir:

3.14 Marcação de DNA por incorporação de fósforo radioativo [α -³²P]-dCTP

Os insertos interesse marcados radioativamente com α -³²P[CTP], utilizando-se o kit de *random primers (RadPrime DNA Labeling System)*(Invitrogen). Cerca de 100 ng de DNA em 20 µL de água destilada era denaturado durante 5 min a 100°C incubado imediatamente em gelo. A

seguir, mantendo-se o tubo no banho de gelo, eram adicionados 2 μL de dNTPs (1 mM), 15 μL da mistura de random *primers*, 1 μL DNA polimerase fragmento de Klenow (3U/ μL), 5 μL [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP 50 μCi e 3 μL de água destilada autoclavada. A reação era incubada durante uma hora a 25 $^{\circ}\text{C}$. Após este período eram adicionados 5 μL de *stop buffer* (0,5 M EDTA pH 8,0), 10 μL acetato de sódio 3M (pH 5,4), 250 μL de etanol absoluto e 10 μL DNA de esperma de salmão (10 mg/mL). A mistura era homogeneizada suavemente e incubada a - 70 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 min. A seguir, o DNA marcado radioativamente era precipitado por centrifugação a 17.400 x g por 30 min, o precipitado era seco e ressuspendido em 100 μL de tampão TE. A radioatividade incorporada na sonda era quantificada por espectrometria de cintilação colocando-se 1 μL da sonda radiativa sobre papel filtro dentro de um frasco de vidro com 10 mL do líquido para cintilação Eco Lume TM (INC Biomedicals). A determinação era feita no aparelho *Liquid Scintillation Analyzer 1600 TR* (Packard-Canberra Company).

3.15 Hibridação de membrana de náilon com a sonda radiativa [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP

A membrana contendo o DNA era colocada dentro de um tubo cilíndrico de vidro vedado da *Techne* (Cambridge U.K) e incubada 1 h a 42 $^{\circ}\text{C}$ com 50 mL de solução de hibridação no forno de hibridação *Techne Hybridiser HB-1D*. A seguir 100 μL da sonda radiativa era incubada durante 7 min a 100 $^{\circ}\text{C}$ e adicionada a 30 mL de solução de hibridação. A membrana era incubada por 16 h a 42 $^{\circ}\text{C}$ no forno de hibridação sob agitação constante.

Após a hibridação, a solução era descartada e o filtro lavado com a solução 1 por 30 min a 42 $^{\circ}\text{C}$, a seguir solução 2 por 30 min a 56 $^{\circ}\text{C}$ e finalmente com a solução 3 por mais 30 min a 56 $^{\circ}\text{C}$. Após as lavagens, a membrana era colocada sobre papel filtro, envolta num filme plástico e exposta a um filme de raios X (*KODAK Biomax MS Film*) em cassette com tela intensificadora a -70 $^{\circ}\text{C}$ de 3 a 10 dias. Após a exposição, o filme era tratado com soluções de revelação e fixação (Exsil MX da Silpachem Ltda) e lavado com água.

A membrana de náilon pode ser reutilizada quando tratada por 30 min a 90 $^{\circ}\text{C}$ em uma solução 0,1% de SDS e exposta novamente em filme de raios X para confirmar a eliminação da sonda radiativa.

3.16 Expressão proteínas recombinantes GST-calpaína e GST-H49

3.16.1 Expressão em pequena escala

Uma colônia isolada de bactérias de *E.coli* (DH5 α ou BL21) contendo o plasmídeo de expressão em fase com o inserto de interesse (calpaína ou H49) era cultivada em 3 mL de LB líquido contendo ampicilina (0,1 mg/mL) a 37°C durante 16 h sob agitação constante. As bactérias eram diluídas 1/10, crescidas durante 2 h ou até atingir densidade óptica (DO_{550nm}=0,5). A seguir, as bactérias eram induzidas com 1 mM de IPTG durante 3 h, centrifugadas a 1.381 x g e o precipitado ressuscitado em 150 μ L de tampão de amostra para eletroforese SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). A expressão da proteína em fusão com GST era analisada num gel de poliacrilamida 10% comparando o perfil eletroforético com extratos de células DH5 α não transformadas. A expressão da proteína em fusão também foi confirmada por *Western blotting*, usando o anticorpo monoclonal de camundongo anti-GST (Sigma) na diluição de 1/8000.

3.16.2 Expressão em larga escala

Uma colônia de bactéria, testada previamente em pequena escala, era inoculada em 100 mL de LB contendo ampicilina (0,1 mg/mL) e cultivada durante 16 h a 37°C sob agitação constante. A seguir, 100 mL de suspensão celular eram inoculados em 900 mL de LB ampicilina (0,1 mg/mL), cultivado por 1-2 h a 37°C até atingir a fase de crescimento exponencial (DO_{550nm}=0,5). Após esse período acrescentava-se IPTG para concentração final de 1 mM e incubava-se por 3 h a 37°C sob agitação constante. As células eram precipitadas por centrifugação a 2.603 x g por 15 minutos a 4 °C.

As bactérias eram ressuscitadas em 20 mL de PBS/Triton X-100 (1%), lisozima (4 mg/mL) e PMSF (1 mM) e incubadas no gelo por 10 min. Posteriormente, as bactérias eram submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e banho a 37°C. A seguir, centrifugadas a 17.210 x g durante 15 min.

Para avaliação da expressão, alíquotas do precipitado e sobrenadante eram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%). Como referência de massa molecular utilizou-se o padrão da Sigma SDS-6H (miosina-205 kDa; galactosidase-116 kDa; fosforilase B-97 kDa; albumina sérica 66-kDa; ovoalbumina 45-kDa e anidrase carbônica 29-kDa).

3.17 Purificação de proteínas recombinantes

3.17.1 Purificação da proteína recombinante GST-calpaína de gel de poliacrilamida

A proteína recombinante GST-calpaína foi homogeneizada em tampão de amostra para proteínas 1X e separada por eletroforese em gel de poliacrilamida (6%) a 120 V. Para extração da proteína, o gel era incubado por 10 min com 250 mM KCl gelado, a proteína recombinante visualizada como uma banda branca, que era recortada do gel, lavada duas vezes com água destilada e incubada 10 min a -70 C. A seguir, o fragmento do gel contendo a banda macerado, transferido para um tubo de 15 mL e incubada com 5 mL de solução 50 mM Tris HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA, 1mM PMSF, 50 mM NaCl em agitador (Rotamix RS-Heto) durante 16 h, a temperatura ambiente.

A suspensão acrilamida/proteína era centrifugada a 900 x g por 3 min para eliminar a acrilamida. A proteína recombinante era dialisada contra solução 10 mM de NH_4HCO_3 , durante 16 h a 4°C sob agitação constante. Após esse período, a amostra era dialisada primeiro duas vezes contra água destilada e depois duas vezes contra tampão PBS a 4°C sob agitação constante. Após esse período, para concentrar a amostra de proteína, o saco de diálise era recoberto com açúcar. Finalmente a amostra era avaliada num gel de eletroforese SDS-PAGE (10%) e armazenada a -20C.

3.17.2 Purificação da proteína recombinante GST- H49 degenerado calpaína de gel de poliacrilamida

A proteína recombinante GST-H49 degenerado/calpaína foi separada por eletroforese SDS-PAGE (6%) a 120 V. Tal como descrito acima, a banda de interesse era cortada do gel após visualização com KCl, lavada e armazenada a -70 C por 10 min. A seguir, a banda era macerada, transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada com 0,5 mL de solução contendo 50

mM Tris HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA, 1mM PMSF, 50 mM NaCl em agitador (Rotamix RS-Heto) durante 2 h, a temperatura ambiente (Hager e Burgess, 1980).

A amostra era centrifugada a 900 x g por 5 minutos. A seguir, a uma alíquota de 100 µL da amostra eram adicionados, 400 µL de metanol, 100 µL clorofórmio e 300 µL de água destilada, e homogeneizados por 15 s em *vortex* (Vari-Whirl Mixer-VWR). A mistura era incubada por 2 min a -70°C e a seguir centrifugada a 10.300 x g por 10 min. O sobrenadante era removido, deixando a interfase protéica. A solução da proteína, era lavada com 300 µL de metanol para eliminar o SDS e centrifugada a 10.300 x g por 5 min. Finalmente, o precipitado era lavado com 500 µL de metanol:acetona (1:1) por centrifugação a 10.300 x g por 5 min. A proteína recombinante purificada era ressuspensa em tampão 50 mM Tris HCl (pH 8,0) e armazenada a -20°C (Hager e Burgess, 1980).

3.17.3 Purificação da proteína recombinante GST-H49 por cromatografia de afinidade

O sobrenadante obtido conforme descrito acima (item 3.16.2) era diluído 2X em PBS/Triton X-100 (1%). Para cada 20 mL desta mistura, adicionou-se 0,7 mL da resina de Glutathione-Sepharose (GE-Amersham), previamente lavada e equilibrada com PBS/Triton X-100 (0,1%). A suspensão foi mantida a temperatura ambiente por 1 h, sob agitação em baixa rotação. Após esse período, a suspensão era centrifugada a 500 x g por 5 min, o sobrenadante descartado e a resina com a proteína ligada era lavada 4 vezes com PBS a 500 x g por 5 min. A proteína GST-H49 foi eluída com 2 mL de solução 10 mM glutathione reduzida, 50 mM Tris (pH 8,0) e 120 mM NaCl. Uma alíquota de 10 µL do eluato era analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10 %.

3.18 Imunização de coelhos Nova Zelândia com proteína recombinante

A imunização dos coelhos foi feita pelo Biotério Paulistec. Coelhos da linhagem Nova Zelândia fêmeas com peso entre 2.200 a 2.500 Kg foram utilizados neste estudo. Cada animal foi inoculado por via subcutânea com 4 doses de 100 µg de proteína recombinante em fusão com GST, diluída em 500 µL de tampão PBS 1X. A primeira inoculação foi feita com o adjuvante

completo de Freund e as restantes inoculações com intervalo de tempo de 15 dias, foram com o adjuvante incompleto de Freund. O título dos anticorpos foi dosado por ELISA duas a quatro semanas após a última imunização.

3.19 Imunização de camundongos Balb/c com proteína recombinante

Camundongos Balb/c fêmeas com um a dois meses de idade foram utilizados neste trabalho. Cada animal era inoculado, por via intraperitoneal, com 4 doses de proteína recombinante, em um intervalo de tempo de 7 dias. Cada dose continha 30 µg de proteína recombinante em fusão com GST e o adjuvante (3 mg de hidróxido de alumínio) no volume final de 250 µL de tampão PBS 1X. Após uma semana da última dose o animal era sacrificado e o título dos anticorpos era dosado por ELISA.

3.20 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Placas de poliestireno (*Corning 3590*) foram sensibilizadas com 200 ng/poço da proteína recombinante de interesse diluída em tampão 0,05 M carbonato/bicarbonato de sódio pH 9,6, em um volume final de 50 µL/poço durante 16 h a 4°C. A seguir, os poços eram lavados duas vezes com 100 µL de PBS/Tween 0,05 % e bloqueados com PBS/leite 5 % em volume de 100 µL/poço durante 1 hora a temperatura ambiente. Após esse período, eram adicionados 100 µL/poço de soro de camundongo ou de coelho, diluído 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200 em PBS/leite 5 % durante 1 h a temperatura ambiente, os poços eram lavados 5 vezes com PBS/Tween 0,05 %, seguindo-se incubação por 1 h com anticorpo anti-camundongo (*Anti-mouse IgG* da Sigma A-O168) ou anti-coelho (*Anti-rabbit IgG* da Sigma A-8275) conjugado a peroxidase diluído 1:1000.

Depois da incubação, o conjugado era descartado, os poços lavados cinco vezes com PBS/Tween 5 % e a placa era batida sobre um papel toalha para remover resquícios da solução de lavagem. A seguir, eram colocados 100 µL/poço de uma solução contendo o substrato O-fenilenodiamina (OPD) durante 10 min. Por ultimo, a reação era bloqueada pela adição de 50 µL/poço de 4 N H₂SO₄ e a absorbância determinada em leitor de ELISA (*Labsystems Multiskan MS type 352*) a 492 nm.

3.21 Purificação de anticorpos

3.21.1 Adsorção de soro de coelho

E. coli DH5 α foram cultivadas em 100 mL de meio LB e as células coletadas por centrifugação a 1.912 x g por 10 min. A suspensão bacteriana era então sonicada até completa lise das bactérias, conforme exame no microscópio óptico. O extracto bacteriano foi ressuspenso em 3 mL de solução contendo 10 mM Tris HCl (pH 7,5) e uma mistura de inibidores de protease (*Protease Inhibitor Cocktail*, P 8215, Sigma) na diluição de 1/500, adicionando-se antissoro de interesse. A adsorção dos soros foi realizada em agitador (Rotamix RS-Heto) por 12 h. Finalmente, os soros adsorvidos eram centrifugados a 1.600 x g por 10 min e o sobrenadante armazenado a 4 ou a -20°C.

3.21.2 Imunopurificação de anticorpos do soro de camundongo

As proteínas recombinantes H49 e calpaína eram separadas por eletroforese SDS-PAGE (10%), transferidas para membrana de nitrocelulose e coradas com 0,1% Ponceau. A membrana era bloqueada com PBS/leite 5% por 1 h a temperatura ambiente. A membrana era incubada com o soro de interesse por 2 h a temperatura ambiente. A seguir, a membrana era lavada com solução contendo 0.1 M ácido bórico, 0.5 M NaCl, e 0.05% Tween 20 por 1 h trocando-se a solução cada 15 min.

A parte da membrana na qual está localizada a proteína recombinante era recortada e os anticorpos ligados eram eluídos com solução de 0,15 M NaCl e 0.1 M glicina pH 2,6 por 2 min. Após a eluição, a solução era neutralizada com 0.5M Tris HCl (pH 8,0) a temperatura ambiente. Os anticorpos imunopurificados eram armazenados a 4°C a -20°C (Cotrim, 1992).

3.22 Eletroforese de proteínas - Eletroforese SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)

As proteínas eram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Após a corrida eletroforética, os géis eram transferidos para membrana de nitrocelulose (item 3.25.1) ou corados com *Coomassie blue* e secos a 65°C por uma hora em papel filtro no secador (*Slab Gel Dryer Model SE 1160, Pharmacia Biotech*).

3.23 Dosagem da concentração de proteínas

A quantificação das proteínas foi feita por método de Bradford baseado na reatividade de proteínas básicas com o reagente Coomassie em ácido fosfórico (Bradford, 1976). Utilizou-se o reagente comercial da Bio-Rad (*Assay Dye Reagent Concentrate*) e como padrão albumina sêrica bovina (BSA) (200 µg/mL). Foi construída uma curva de calibração com BSA entre 0 a 4 µg proteína.

3.24 Extração de proteínas de citoesqueleto de *T. cruzi*

Cerca de 2×10^6 epimastigotas eram lavados 3 vezes em PBS a 1.600 x g por 5 min a 4°C e mantidos em gelo. Ao precipitado celular eram adicionados 50 µL de tampão de lise contendo 150 mM NaCl, 80 mM PIPES (pH 7,2), 1 mM MgCl₂, 3 mM EGTA, 1% Triton X-100 e inibidores de proteases (*Protease Inhibitor Cocktail*, P 8215, Sigma). A mistura de inibidores foi empregada na diluição de 1/1000. A composição e concentração final da mistura de inibidores da Sigma é de 0,1 mM AEBSF; 0,5 mM 1, 10-Phenanthroline; 2,2 µM Pepstain; 1,4 µM E-64.

A suspensão celular era mantida por 10 min no gelo. Após a lise, a suspensão era centrifugada (1.600 x g, 5 min, 4° C), e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em 100 µL do mesmo tampão de lise. O precipitado era lavado novamente com 500 µL do tampão de lise. Finalmente, o precipitado (fração de citoesqueleto) era homogeneizado em tampão de amostra para eletroforese de proteínas 1X.

3.25 Western blotting

3.25.1 Transferência de proteínas a membrana de nitrocelulose

Proteínas do citoesqueleto, extraídas de 2×10^6 parasitas da cepa G e do clone CL Brener, eram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose HybondTM –ECLTM (Amersham). A transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana era feita no aparelho *Trans-Blot*[®] *Cell* (Bio-Rad) do seguinte modo: montou-se no suporte do aparelho um sanduíche, colocando na ordem espuma, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro e espuma ficando o gel no pólo negativo e a membrana no pólo positivo. A transferência das proteínas foi feita a amperagem constante de 250 mA, por 2 h com o tampão de transferência (1,44 % Glicina 0,3 % Tris-Base e 20 % metanol).

A membrana foi corada com 0,1% Ponceau S (preparado em ácido acético 10%) para verificar a transferência das proteínas. O corante era removido por lavagem com água destilada e a membrana bloqueada com PBS/leite (5%) por 1 h a temperatura ambiente ou alternativamente por 16 h a 4°C.

3.25.2 Immunoblot utilizando os anticorpos policlonais de coelho para H49 e calpaína

As membranas previamente bloqueadas como descrito acima eram incubadas com o anticorpo policlonal de coelho anti-calpaína ou anti-H49. Os anticorpos foram diluídos em PBS-leite 5% e usados na diluição de 1/200 e 1/4000 anti-calpaína e anti-H49, respectivamente. A membrana era incubada na solução de anticorpo por 1 h à temperatura ambiente, no agitador Rotamix RS (Heto). Após esse período, a membrana era lavada com PBS-Tween 0,05% 3 vezes de 15 minutos. A seguir, o anticorpo Ig G anti-coelho (Sigma) conjugado à peroxidase, diluído 1/4000 em PBS-leite 5%, foi incubado com a membrana por 1 hora a temperatura ambiente com agitação. Após a incubação a membrana era lavada em PBS-Tween 0,05% por 3 vezes de 15 min e revelada por quimioluminescência usando o kit *ECL plus Western blotting detection system* (GE) e hiperfilme (*Amersham Hyperfilm*TM ECL-GE).

3.26 Preparação de lâminas para imunofluorescência indireta

3.26.1 Fixação de parasitas

Formas epimastigotas do clone CL Brener eram centrifugadas a 900 x g por 5 min, o sobrenadante era descartado e o precipitado de células era lavado com PBS 1X duas vezes a 900 x g por 5 min. A seguir, os parasitas eram fixados com paraformaldeído 2% e incubados a temperatura ambiente durante 30 min. Após esse período, as células eram centrifugadas 900 x g por 5 min, o precipitado lavado duas vezes com tampão PBS a 900 x g por 5 min e ressuspenso em 500 µL de PBS. Alíquotas de 10 µL da suspensão era examinada ao microscópio para estimar a quantidade de parasitas. Uma vez ajustada à diluição desejada, 10 µL eram depositados nos poços das lâminas. Finalmente, as lâminas eram secas a temperatura ambiente e estocadas a -20°C.

3.26.2 Preparação lâmina imunofluorescência: incubação com anticorpos e montagem

A lâmina com parasitas fixados era lavada várias vezes usando uma piseta com tampão PBS, o excesso de PBS era eliminado cuidadosamente com lenço de papel. A seguir, em câmara úmida (algodão umedecido com água, colocado num recipiente de plástico fechado) incubava-se, por 1 h, o anticorpo de interesse (anti-H49 ou anti-calpaína) diluído 1/20, 1/80, 1/100 ou 1/200 em PBS/soro 10%. Após a incubação, a lâmina era lavada com tampão PBS.

Depois era adicionada, em cada poço, uma solução contendo: DAPI 1 mM diluído 1/80 e o anticorpo de coelho ou camundongo conjugado a FITC ou Texas Red (Calbiochem), numa diluição de 1/50 ou 1/80 em PBS/soro 10%, a lâmina era incubada por mais 1 h a temperatura ambiente, sempre em câmara úmida e na ausência da luz. Após esse período, eram realizadas 3 lavagens com PBS durante 5 minutos e adicionava-se em cada poço 3 µL de meio de montagem (p-fenildiamina em glicerina tamponada), depois colocava-se cuidadosamente, a lamínula (24 x 50 mm, espessura 0,13-0,16 mm) sobre a lâmina de fluorescência, evitando formas bolhas e selando pelas bordas com esmalte de unhas transparente (Colorama).

Os poços a serem permeabilizados eram incubados por 5 min com solução de PBS-0,1% Triton X-100, antes da aplicação do primeiro anticorpo. Para cada lâmina foi realizado o controle utilizando soro anti GST (coelho ou camundongo).

3.26.3 Preparação lâmina de citoesqueleto de epimastigotas para imunofluorescência

Formas epimastigotas do clone CL Brener eram depositados nos poços da lâmina de fluorescência e incubados em câmara úmida por 30 min. Em seguida, a lâmina era lavada 3 vezes com tampão PBS. A seguir, a lâmina era colocada sobre gelo e adicionava-se por poço 20 µL da solução de lise (150 mM NaCl, 80 mM PIPES (pH 7,2), 1 mM MgCl₂, 3 mM EGTA, (0.5-1%) NP-40, 0,1 mM AEBSF; 0,5 mM 1, 10-Phenanthroline; 2,2 µM Pepstain; 1,4 µ M E-64).

A lise celular foi confirmada por análise em microscópio óptico (Nikon Alphaphot-2 YS2). Os citoesqueletos eram fixados com 2% paraformaldeído, durante 1 h a temperatura ambiente. A lâmina era armazenada em câmara úmida a 4°C com solução de bloqueio (soro 10%) até ser usada em imunofluorescência.

3.27 Aquisição de imagens de imunofluorescência

As lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência Nikon E600 acoplada à câmara digital Nikon DXM 1200F, usando o software ACT-1. As imagens geradas foram processadas nos programas *Image J* e *Adobe Photoshop 7.0*.

3.28 Análise no banco de dados NCBI e Gene DB

3.28.1 Caracterização do gene H49 e suas regiões flanqueadoras com ferramentas de bio-informática

Um banco de dados compilado contendo seqüências de *T. cruzi* foi construído analisando seqüências do GenBank (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank>), GeneDB (<http://www.genedb.org>) e do “The Institute for Genomic Research” (TIGR). Os algoritmos BLAST (*Basic Local Alignment*

Search Tool): blastn, blastp, blastx e tblastn (Altschul *et al.*, 1990) foram utilizados contra esse banco de dados nas buscas por seqüências de nucleotídeos e aminoácidos similares às repetições H49 (GenBank L09564). As buscas por similaridade contra o banco de dados compilado localmente foi realizada utilizando o algoritmo BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

A procura, identificação e extração das cópias completas da repetição H49 foram feitas utilizando um *script* PERL específico carregado com uma expressão regular descrevendo a repetição. A anotação e saída gráfica da repetição H49 e das regiões flangeadoras foram executadas utilizando-se o programa Artemis (Rutherford *et al.*, 2000) (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis>). Os *scripts* PERL desenvolvidos foram utilizados para analisar e formatar as buscas por similaridade. Os alinhamentos foram atualizados em janeiro de 2009 usando a versão de BLAST 2.2.19 foram selecionados aqueles alinhamentos com um E-value entre $[0-1 \times 10^{-3}]$.

No banco de dados do NCBI, a consulta com as palavras chaves “(calpain OR calpain-like) AND *T. cruzi* CL Brener” foi utilizada na identificação de seqüências de calpaínas associadas ou não à repetição.

3.28.2 Alinhamento múltiplo dos domínios II (Cys-Pc) e III das calpaínas identificadas em *T. cruzi* e inferência filogenética

O alinhamento múltiplo global dos domínios II (Cys-Pc) e III das calpaínas identificadas em *T. cruzi* foi realizado utilizando o algoritmo ClustalX (Thompson *et al.*, 1994) seguido de inspeção visual e ajuste manual com SeaView (Galtier *et al.*, 1996) (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>) e GeneDoc <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>.

A análise filogenética foi realizada utilizando o programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). As árvores filogenéticas foram geradas pelo método de Neighbor-joining e construídas utilizando um modelo igual de entrada com um “bootstrap” de 5.000 replicas.

RESULTADOS

4.1 Identificação dos genes H49/calpaína por análise bioinformática

4.1.1 Identificação de repetições H49 no genoma de *T. cruzi* (clone CL Brener)

As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da repetição H49 (números de acesso L09564 e AAA99049 respectivamente) foram comparadas com as sequências geradas no projeto genoma do clone CL Brener, depositadas no GenBank. O alinhamento foi feito com o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) considerando como consulta (*query*) a unidade de repetição (204 pb ou 68 aa) ou a sequência do clone H49 com 4,8 repetições (978 pb ou 326 aa). Os alinhamentos foram atualizados em janeiro de 2009 usando a versão de BLAST 2.2.19.

Na tabela 2 estão mostrados o número de alinhamentos segundo identidade e o E-value para cada programa do BLAST (blastp, blastx, blastn, tblastn e tblastx¹). As sequências H49 foram caracterizadas com base no número de pares de base e identidade com a sequência H49 (L09564 ou AAA99049). Foram selecionados aqueles alinhamentos com E-value entre [0-1E-3], com o objetivo de não considerar alinhamentos ao acaso.

Com os dados obtidos por tblastn com uma unidade de repetição H49 e valor de E-value entre [0-1E-3] foi construído o gráfico de dispersão das sequências do H49 no genoma de CL Brener (Fig. 8A). O gráfico mostra a existência de grupos de sequências H49 claramente diferenciados que apresentam porcentagens de identidade inferior ou superior a 80. Os grupos com identidade superior a 80% foram classificados arbitrariamente como H49 “conservado” e os outros grupos, com identidade inferior a 80% como H49 “degenerado”. O histograma (Fig. 8B) mostra que o maior número de sequências H49 (61/84) identificadas por tblastn possuem identidade entre 40-60%. A denominação H49 conservado e H49 degenerado será utilizada no transcorrer desta tese.

¹ **blastx**: utiliza como objeto de busca uma sequência de nucleotídeos traduzida nas 6 fases de leitura possíveis e compara contra o banco de dados de proteína.

tblastn: utiliza como objeto de busca uma sequência de aminoácidos e compara contra o banco de dados de sequências de nucleotídeos traduzidas nas 6 fases de leitura possíveis.

tblastx: utiliza como objeto de busca uma sequência de nucleotídeos traduzida nas 6 fases de leitura possíveis e compara contra um banco de dados de nucleotídeos traduzidos nas 6 fases de leitura.

Tabela 2 – Número de alinhamentos segundo identidade e E-value para cada programa do BLAST.

Programa	Query	Alinhamento	E-value	Identidade (%)																		
				100]100:95]]95:90]]90:80]]80:70]]70:60]]60:50]]50:40]]40:30]]30:0]									
blastn XM	L09564 204pb	Nucleotídeo	0																			
]0:1E-10]		12	2																
]1E-10:1E-3]																			
blastn XM	L09564 978pb	Nucleotídeo	0		9	4																
]0:1E-10]		9	3																
]1E-10:1E-3]		1																	
tblastx XM	L09564 204pb	Proteína	0																			
]0:1E-10]	18	6	22	14	3	2													
]1E-10:1E-3]		2		1		2	6	3											
tblastx XM	L09564 978pb	Proteína	0			2																
]0:1E-10]	52	44	56	76	19	6	65	160	55	7									
]1E-10:1E-3]	3			2	2	4	22	57	27	3									
tblastx XM	AAA9904 68aa	Proteína	0																			
]0:1E-10]		6	2	3	1	1	3												
]1E-10:1E-3]		1				1	9	49	8										
tblastn XM	AAA9904 326aa	Proteína	0																			
]0:1E-10]			4	1	2	2			40	25	1								
]1E-10:1E-3]										6	9								
tblastx XP	AAA9904 68aa	Proteína	0																			
]0:1E-10]		6	2	3	1	1	6												
]1E-10:1E-3]		1				1	4	56	9										
tblastp XP	AAA9904 328aa	Proteína	0																			
]0:1E-10]			5	1	2	2			41	26	3								
]1E-10:1E-3]										4	15								
tblastx XP	L09564 204pb	Proteína	0																			
]0:1E-10]	1	7	2	3															
]1E-10:1E-3]		1					7	1											
tblastx XP	L09564 978pb	Proteína	0																			
]0:1E-10]			5			1	1	38	21										
]1E-10:1E-3]								2	8	11									
]1E-3:∞[9	3	24											

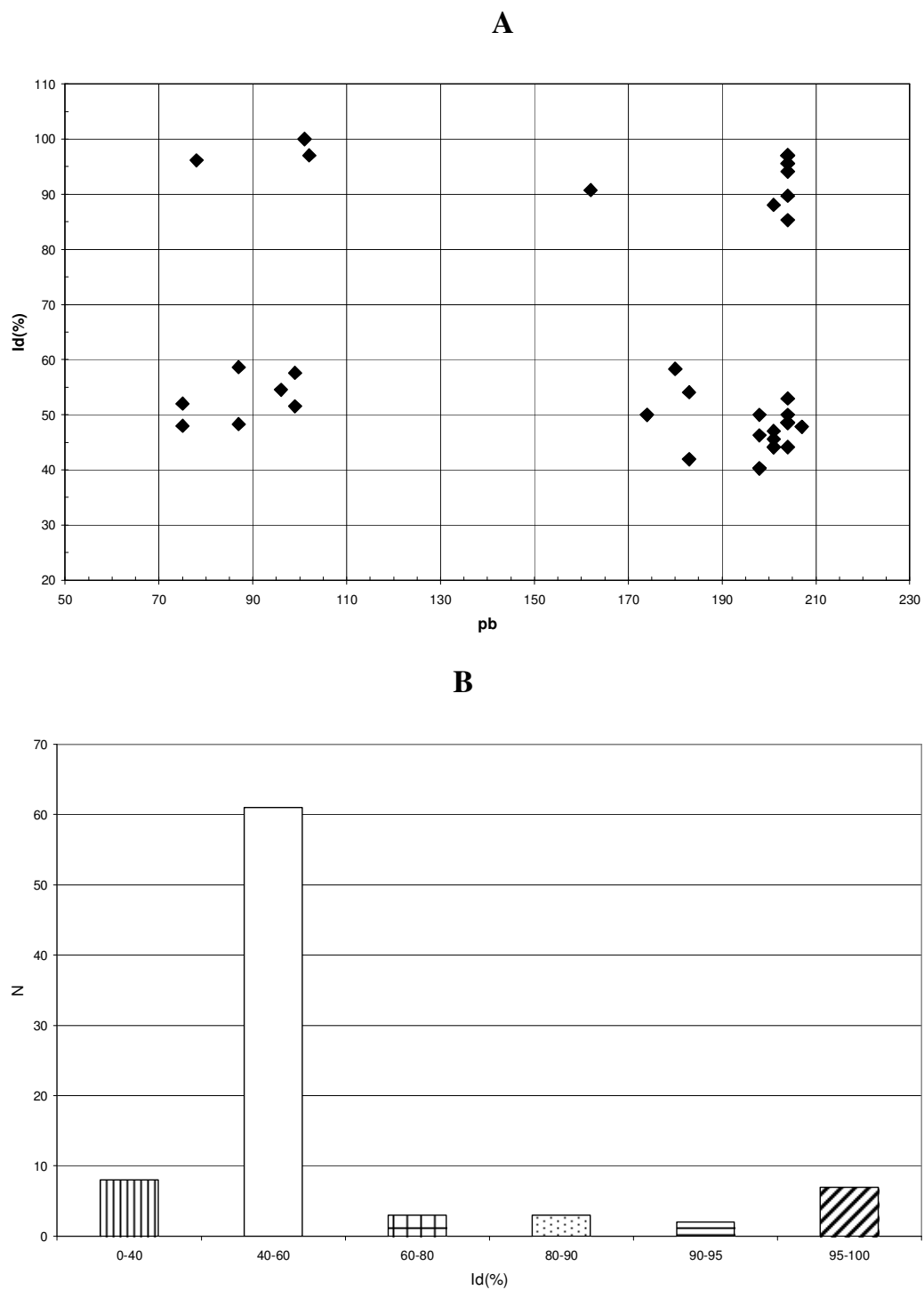


Figura 8. Dispersão de seqüências H49 no genoma do clone CL Brener segundo a porcentagem de identidade (% id). **A)** Gráfico de dispersão. **B)** Histograma da distribuição de freqüência (N) de seqüências H49.

4.1.2 A sequência H49 faz parte de sequências de calpaínas no clone CL Brener

A consulta com tblasn usando a repetição de 68 aa (AAA99049) do gene H49 mostrou que ela está presente H49 em oito calpaínas, sendo duas calpaínas cisteína peptidases e seis calpaínas-like cisteína peptidases (putativas) figura 9.

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value	
gb AAA99049.1	cytoskeleton associated protein	<u>134</u>	2e-30	
ref XP_804989.1	calpain cysteine peptidase, putative [Trypan...	<u>129</u>	4e-29	←
ref XP_804109.1	calpain cysteine peptidase, putative [Trypan...	<u>129</u>	4e-29	←
gb AAA75429.1	ORF repeat unit; putative	<u>111</u>	1e-23	
ref XP_802556.1	calpain-like cysteine peptidase, putative [T...	<u>82.0</u>	1e-14	←
gb AAZ09796.1	cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putati...	<u>71.6</u>	1e-11	
gb AAZ09795.1	cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putati...	<u>70.9</u>	2e-11	
ref XP_809993.1	calpain-like cysteine peptidase, putative [T...	<u>68.2</u>	2e-10	←
ref XP_803263.1	calpain-like cysteine peptidase, putative [T...	<u>68.2</u>	2e-10	←
gb AAA30197.1	flagellar repetitive antigen protein	<u>66.2</u>	6e-10	
ref XP_828204.1	calpain-like cysteine peptidase [Trypanosoma...	<u>65.9</u>	8e-10	
ref XP_828202.1	calpain-like protein [Trypanosoma brucei] >g...	<u>65.1</u>	1e-09	
gb AAZ09797.1	cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putati...	<u>64.7</u>	2e-09	
ref XP_802227.1	calpain-like cysteine peptidase, putative [T...	<u>64.3</u>	2e-09	←
ref XP_828203.1	calpain [Trypanosoma brucei] >gb EAN79091.1]...	<u>63.9</u>	3e-09	
emb CAA41594.1	GM6 protein [Trypanosoma brucei] >sp Q26755 G...	<u>62.0</u>	1e-08	
ref XP_806304.1	calpain-like cysteine peptidase, putative [T...	<u>57.4</u>	3e-07	←
ref XP_814332.1	calpain-like cysteine peptidase, putative [T...	<u>55.1</u>	1e-06	←

Figura 9. Consulta no NCBI usando a repetição de 68 aa do H49. As proteínas H49/calpaínas estão indicadas com setas amarelas.

Na figura 10A apresenta as informações referentes às calpaínas que albergam a sequência H49: número de acesso de sequência em nucleotídeos (XM_), de aminoácidos (XP_), o *scaffold* (NW_) e *contig* (AAHK_) a que pertencem. Também está indicada a localização em aminoácidos do domínio II catalítico (Cys-Pc) e do domínio III.

Essas proteínas foram denominadas de H49/calpaínas e a repetição H49 pode ser conservada ou degenerada tal como apresentado esquematicamente nas figuras 10 e 11. As repetições conservadas foram encontradas nas extremidades das sequências XM_799016, XM_799896 e XM_797463 com 6,3, 5,3 e 0,5 repetições, respectivamente (Fig. 10B). Repetições H49 degeneradas foram identificadas em todas as calpaínas estudadas. Na sequência XM_804900, as repetições degeneradas são distribuídas na região central do gene com 24 blocos de repetição com identidade que varia entre 37-58% (Fig. 11).

A

Genes H49/calpaína identificados no Projeto Genoma de *T. cruzi*

NW	Contig	locus tag	Gene ID	XM_	nt	Proteína id	XP_	aa	KDa	dom II	dom III	outros
918654	AAHK01002600.1	Tc00.1047053505985.9	3533456	799016*	5262	EAN 82258	804109	1753	200	-	-	-
001849411.1	AAHK 01000928.1	Tc00.1047053506721.30	3540687	804900	13716	EAN 88142	809993	4571	520	10-302 628-918 3985-4258	4269-4395	-
	AAHK 01002983.1	Tc00.1047053510801.10	3532857	798170	4148	EAN 81817	803263	1382	156	-	-	-
	AAHK01002163.1	Tc00.1047053511441.10	3534600	799896*	3828	EAN 83138	804989	1275	145	657-930	941-1075	-
	AAHK 01004515.1	Tc00.10470534843.11.10	3531887	797463	1893	EAN 81110	802556	631	72	-	-	-
001849559.1	AAHK 01001688.1	Tc00.1047053509013.10	3536273	801211	4058	EAN 84453	806304	1351	155	727-1000	1011-1137	-
	AAHK 01008049.1	Tc00.1047053445281.9	3531314	797134	1269	EAN 80781	802227	422	49	-	-	-
	AAHK 01000430.1	Tc00.1047053511445.10	3545852	809239	3499	EAN 924811	814332	1165	133	579-852	863-989	-

* Calpaína cisteína peptidase

B

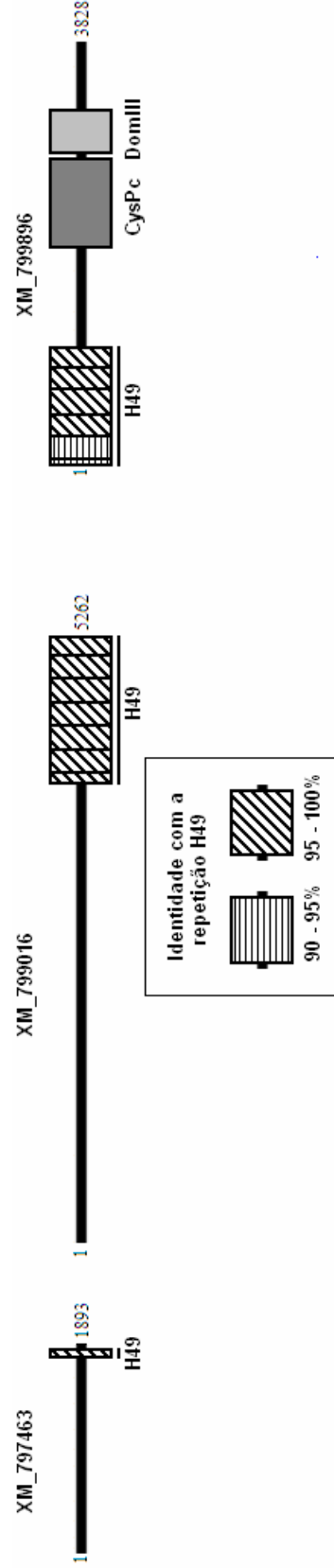


Figura 10. A) Distribuição dos genes H49-calpaína em *scaffolds* e *contigs* do clone CL Brener de *T. cruzi*. XM_ e XP_ se referem as seqüências de nucleotídeos e proteínas, respectivamente. **B)** Representação esquemática dos genes H49-calpaína identificados com a repetição de 204 pb do clone H49 utilizando o programa blastn. Estão indicadas as repetições H49, os domínios III e II (Cys-Pc). Também estão indicadas a identidade das repetições H49 com a repetição H49 padrão conservada.

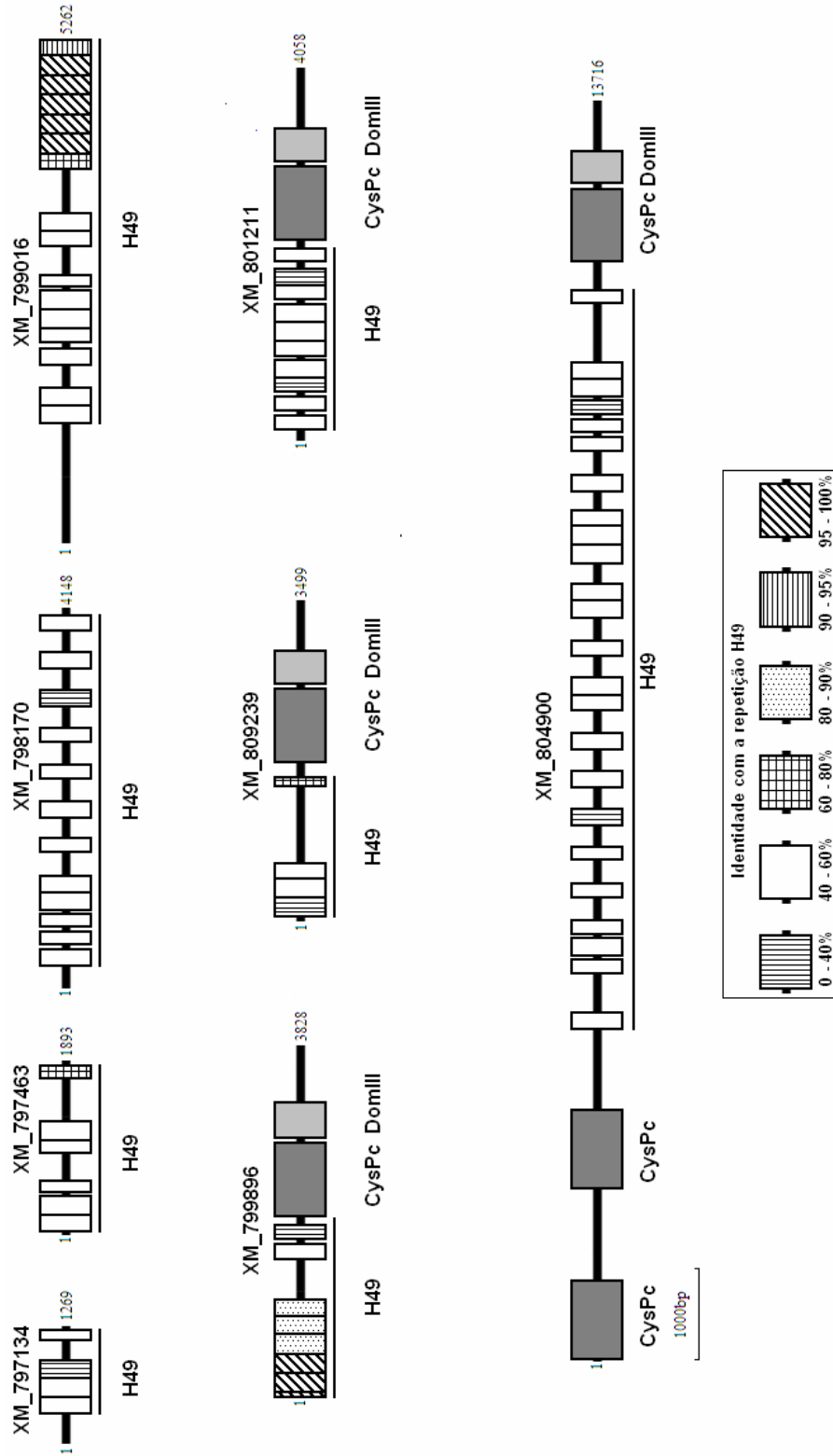


Figura 11. Representação esquemática dos genes H49/calpaína. As sequências de nucleotídeos de oito genes H49/calpaína foram identificados com a repetição de 68 aa do clone H49 utilizando o programa tblastn. Os domínios II (Cys-Pc) e III e as repetições H49 estão indicados. A percentagem de identidade das repetições H49 com a repetição H49 padrão conservada está indicada. As linhas em negro correspondem à sequência sem domínios conservados de calpaína.

4.1.3 Localização e contexto genômico dos genes H49/calpaína no clone CL Brener

Cinco genes H49/calpaína são encontrados no *scaffold* NW_001849559.1 (404.736 pb) no qual estão também localizados os genes do transportador ABC, proteínas hipotéticas conservadas, proteína radial *spoke 3* (putativa) e outras calpaínas que não possuem a repetição H49 na sua sequência (Fig. 12). Outros dois genes H49/calpaína foram identificados em uma das extremidades do *scaffold* denominado NW_001849411.1 (117.014 pb); genes de proteínas hipotéticas conservadas e proteína *radial spoke 3* (putativa) foram encontrados neste *scaffold* (Fig. 13). No *scaffold* NW_978694.1 foi encontrado um gene H49/calpaína (Fig. 13). Este *scaffold* foi removido do banco de dados do NCBI do genoma, e até a presente data (janeiro de 2009) não foi informado o seu destino.

Os genes H49/calpaína estão localizados em regiões do genoma que possuem genes codificadores de proteínas. O fato deles estarem localizados em apenas 2 *scaffolds* sugerem que eles estão restritos à um único cromossomo ou a um par de homólogos.

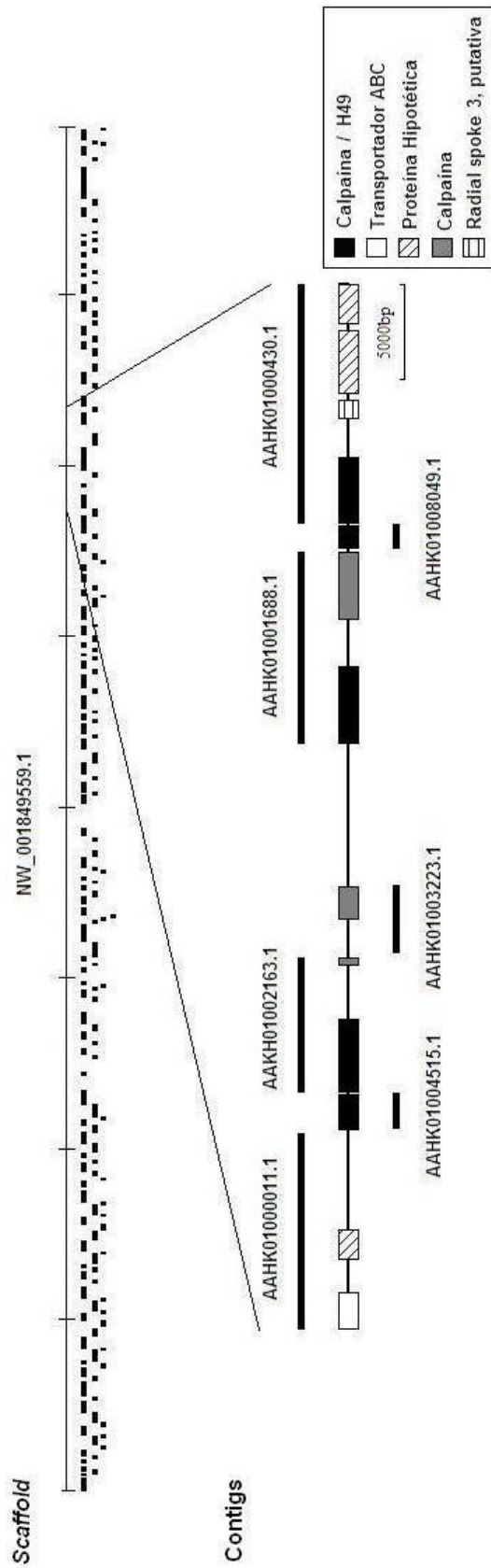


Figura 12. Representação esquemática do contexto genômico onde estão localizados os genes H49/calpaína. Na parte superior da figura está representado o *scaffold* NW_001849559.1. Abaixo estão representados os diferentes *contigs* com seus respectivos números AAHK_ que contém os genes H49/calpaína (XM_797463, XM_799896, XM_797134, XM_801211_ e XM_809239), proteínas hipotéticas conservadas (XM_816505, XM_809241 e XM_809242), transportador ABC (XM_816504), calpaína sem a repetição H49 (XM_799897 e XM_797964) e a proteína radial *spoke 3* (putativa) (XM_809240).

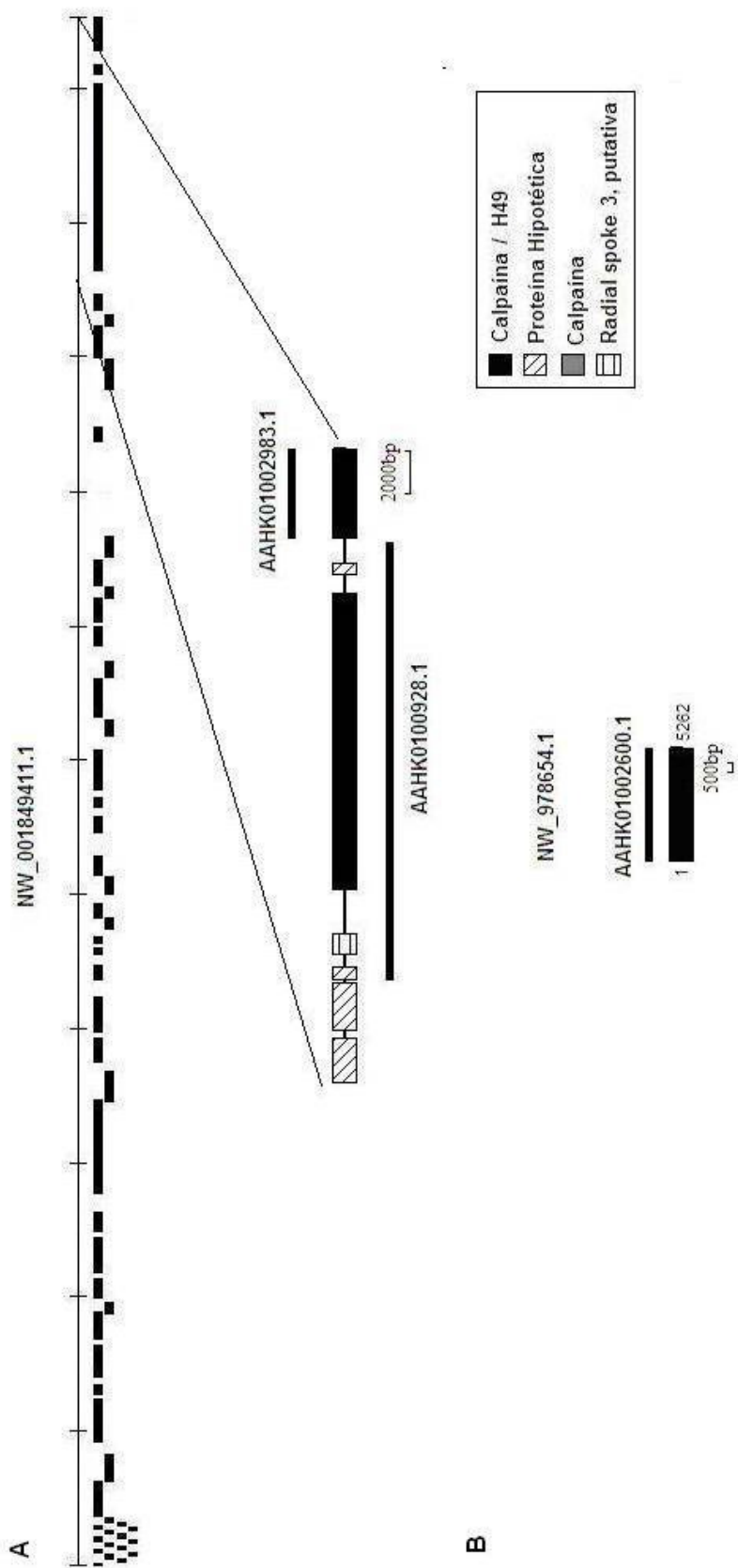


Figura 13. Representação esquemática do contexto genômico onde estão localizados os genes H49/calpaina. A Na parte superior da figura está representado o *scaffold* NW_0017849411, também estão representados dois *contigs* (AAHK0100928.1 e AAHK01002983.1) que contêm dois genes H49/calpaina (XM_804900 e XM_798170). Proteínas hipotéticas conservadas (XM_804862, XM_804863, XM_804902 e XM_804901) e a proteína radial *spoke* 3 (putativa) (XM_804899) formam parte do contexto genômico onde estão localizados os genes H49/calpaina. **B** O *scaffold* NW_978564.1 é formado pelo *contig* AAHK01002600.1 (5262 pb) que contém o gene H49/calpaina (XM_799016).

4.1.4 Identificação dos genes calpaínas no clone CL Brener

A consulta do banco de dados Gen Bank com as palavras chaves “(*calpain* or *calpain-like*) and *T. cruzi* CL Brener” identificou 50 genes que codificam putativas calpaínas. Oito genes correspondem às H49/calpaínas e os 42 restantes às calpaínas sem repetições H49. As calpaínas encontradas foram classificadas como calpaína cisteína peptidase e calpaína-like cisteína peptidase.

Nas tabelas I.1 e I.2 (Anexo I) estão mostrados os genes de calpaína com os números de acesso às seqüências de nucleotídeos (XM_) ou aminoácidos (XP_), o *scaffold* (NW_) e *contig* (AAHK_) a que pertencem, como também está indicada a localização em aminoácidos dos domínios catalítico (Cys-Pc) e III. Outros domínios também foram identificados como: DUF-1935 (domínio de função desconhecida), LRR_RI (*leucine-rich-repeats*) e barril TIM (sítio de ligação a fosfato).

Por outro lado, repetições H49 não associadas às calpaínas foram identificadas com o programa tblastn usando a sequência de 68 aa (AAA99049). Alinhamentos com E-value maior que 1E-3 foram considerados dado que os alinhamentos com E-value menores não foram encontrados. Desta maneira, foram identificadas 12 seqüências H49 de 160-190 pb, com 35-42% de identidade, distribuídos em 4 genes que codificam proteínas hipotéticas conservadas (Tabela I.3).

4.1.5. Comparação dos domínios II (Cys-Pc) e III das calpaínas identificadas no genoma do clone CL Brener.

Foram identificados no genoma do clone CL Brener oito genes H49/calpaína que apresentam repetições de 68 aminoácidos e 4 contigs contendo apenas a repetição H49. É interessante notar que foi encontrado apenas um gene H49/calpaína completo (XM_804900), os demais estão interrompidos nas repetições H49. É sabido que as repetições dificultam o sequenciamento e impedem a sobreposição e alinhamento dos contigs.

Diante destes resultados, nós resolvemos comparar separadamente as proteínas classificadas como “calpain-like cysteine peptidase” e “calpain cysteine peptidase” que contem os domínios II (Cys-Pc) e III. Estão incluídas nesta análise as proteínas H49/calpaína. Quatro proteínas H49/calpaína (XP_806304, XP_814332, XP_804989, XP_809993) apresentam os domínios II (Cys-Pc) e III. A comparação por blastp mostrou que as proteínas XP_806304 (1351 aa) e XP_814332 (1.165 aa) apresentam 72% de identidade entre si e 52-54% com a XP_804989 (1.275 aa). A comparação da proteína XP_809993 (4.571 aa) com as demais é dificultada pela sua grande extensão. Ela apresenta identidade variável com as demais dependendo da região analisada como pode ser visto nas figuras 14 e 15 com relação às repetições H49. As proteínas XP_804109 (1.753 aa) e XP_802556 (631 aa) apresentam identidade variável (92% a 37%) com às repetições H49.

Nas figuras 14 e 15 temos alinhamento dos domínios II (Cys-Pc) e III das calpaínas de *T. cruzi*. Embora exista uma grande variabilidade entre elas, as H49/calpaínas formam um grupo a parte das demais (Figs. 16 e 17). Os domínios Cys-Pc e III presentes nas proteínas H49/calpaínas são bastante conservados entre si (Fig. 16). A identidade entre eles ao nível de nucleotídeos é de 87-90%. A análise filogenética do domínio Cys-Pc das calpaína de *T. cruzi* (Fig. 17) confirma a proximidade entre as proteínas H49/calpaínas que formam um grupo a parte (“bootstrap” de 100%). É interessante notar que um domínio Cys-Pc da H49/calpaína XP_809993 faz parte deste cluster enquanto os outros 2 dominios Cys-Pc presentes nesta proteína tem similariedade com outras calpaínas. A reconstrução filogenética sugere que o domínio Cys-Pc dos isolados acima são derivados de uma sequência comum (Fig. 17).

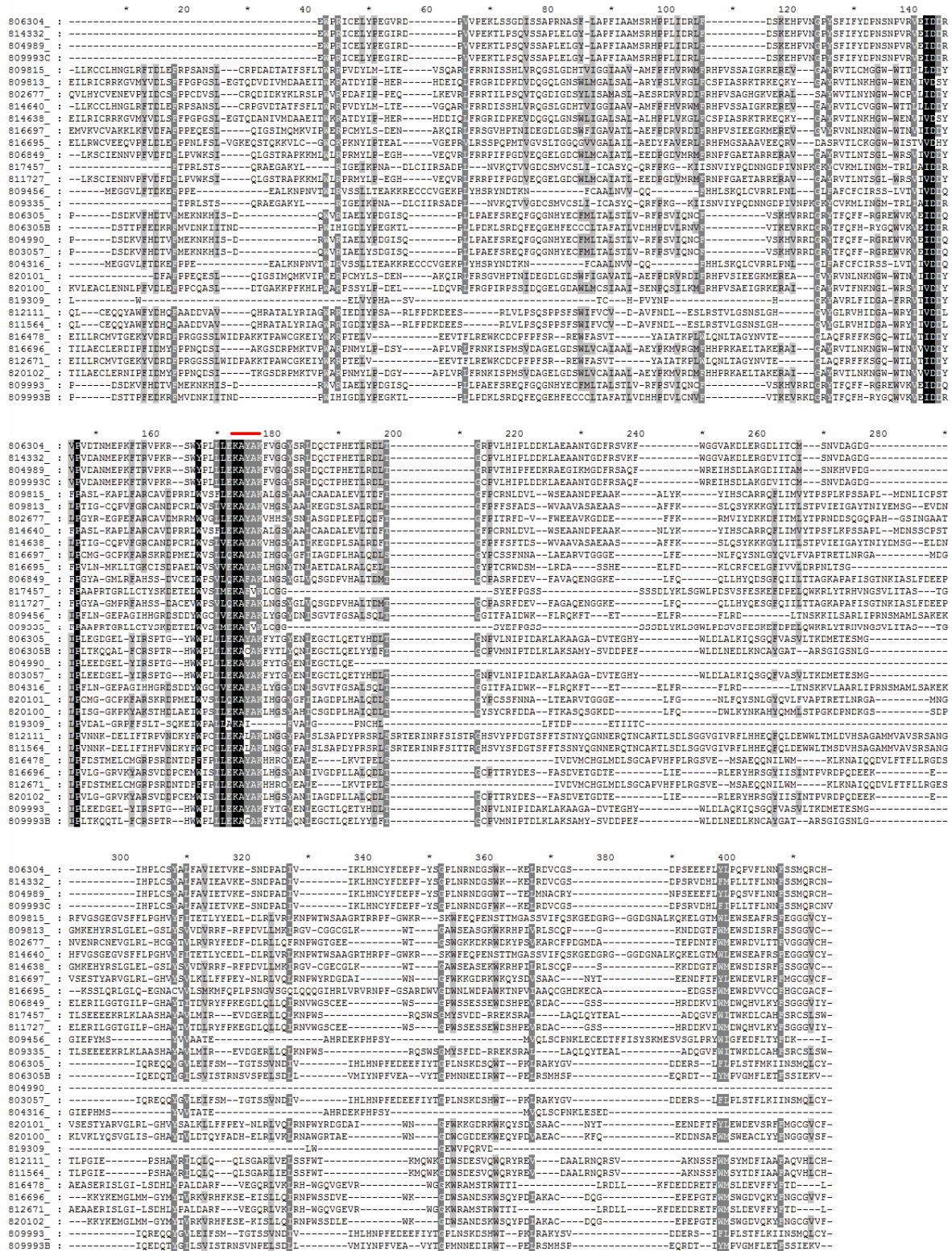


Figura 14. Alinhamento do domínio Cys-Pc das calpaínas de *T. cruzi*. As proteínas estão indicadas pelo número de acesso no GenBank, omitindo-se as letras XP. Os resíduos marcados em preto tem 100% identidade, os cinza escuro 80% e os cinza claro 60%. A linha vermelha indica o motivo KAYAK.

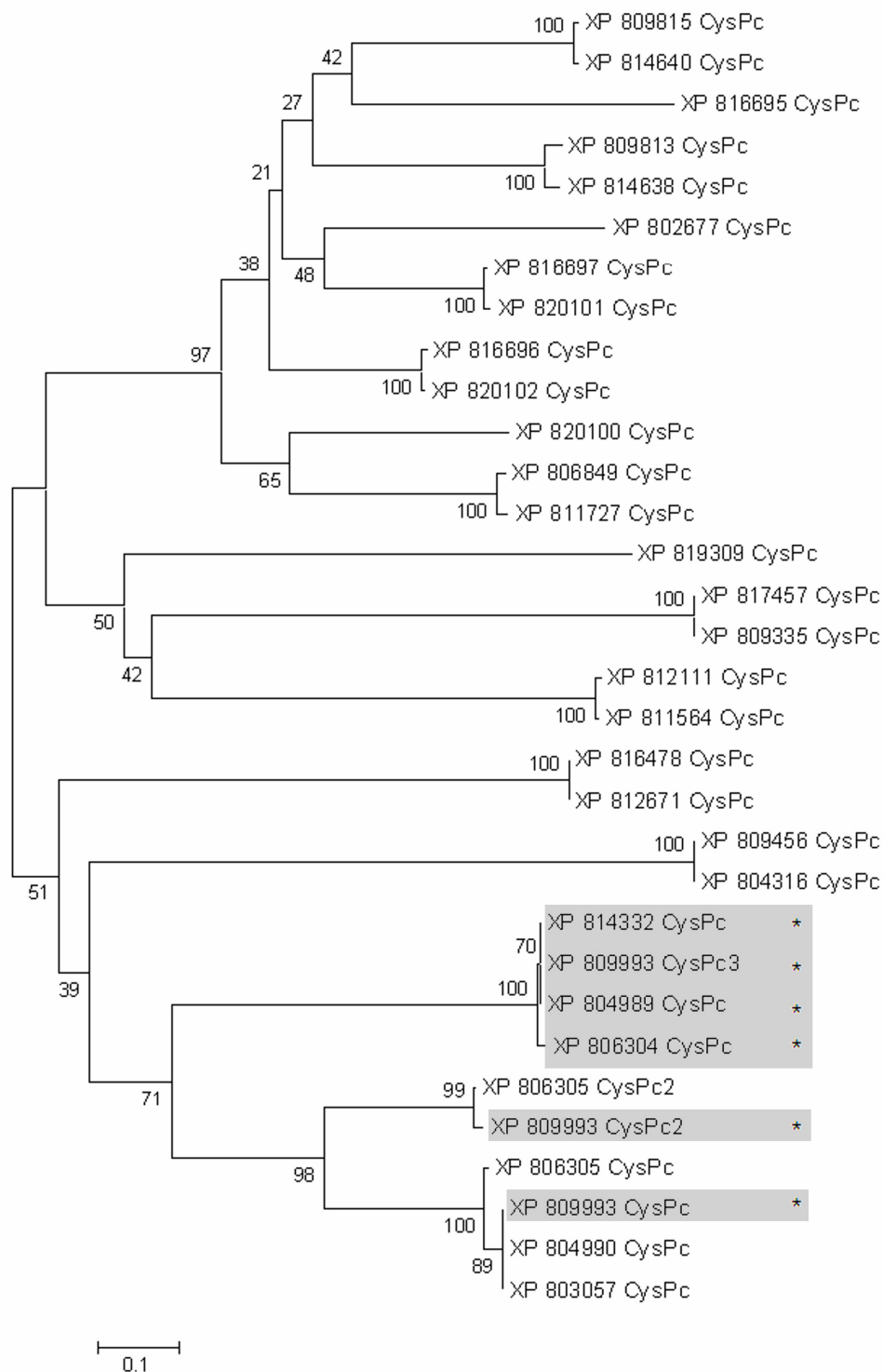


Figura 17. Reconstrução filogenética do domínio Cys-Pc para calpaínas classificadas como calpaína cisteína peptidase e calpaína-like cisteína peptidase. As quatro H49/calpaínas que apresentam o domínio Cys-Pc estão sombreadas em cinza. A nomenclatura Cys-Pc1, Cys-Pc2 e Cys-Pc3 indica a posição seqüencial do domínio catalítico presente na molécula de calpaína. A proteína XP_809993 apresenta três domínios Cys-Pc.

4.2 Identificação dos genes de H49/calpaína por PCR e clonagem gênica

Outra abordagem usada no estudo da organização do gene H49/calpaína foi a amplificação de diversos fragmentos por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Pela análise bioinformática foram identificados oito genes H49/calpaína, caracterizados pela presença de repetições H49 degeneradas e/ou conservadas e de diferentes domínios de calpaína. No presente trabalho procuramos amplificar diferentes regiões representativas dos genes H49/calpaína em DNA genômico, cDNA e em megafragmentos genômicos de *T. cruzi* eclonados em vetor YAC.

Os produtos de PCR das diferentes regiões amplificadas em DNA genômico, cDNA e YAC foram clonados no vetor de seqüenciamento pGEMT-*easy* e seqüenciados por Big Dye (Material e Métodos 3.8 e 3.10). A consulta no ORF *finder* e o alinhamento das seqüências obtidas com as depositadas no banco de dados do NCBI são mostrados em material anexo (Fig. III(1-5) Anexo III), confirmando que tínhamos clonado as regiões desejadas. Os fragmentos amplificados foram utilizados como sonda radiativa em hibridizações em *Southern blotting* e *Chromoblotting*.

4.2.1 Amplificação por PCR em DNA genômico do clone CL Brener

Amplificação do domínio catalítico (Cys-Pc) do gene calpaína/H49

A seqüência usada foi o domínio catalítico da calpaína (Cys-Pc) que é conservado nos genes estudados (XM_799896, XM_801211, XM_809239 e XM_804900) (Fig. 16). Em formas epimastigotas de *T. cruzi* foram amplificados dois fragmentos de 500 e de 1.000 pb da região catalítica de calpaína com iniciadores derivados baseando-se na seqüência XM_799896 que possui repetições H49 conservadas antecedendo o domínio catalítico (Fig. 18 A e B).

Amplificação por PCR da repetição H49 degenerada

Outros pares de iniciadores foram sintetizados baseando-se na seqüência XM_804900 que codifica uma calpaína proteína de elevada massa molecular (~520 kDa) contendo repetições degeneradas H49. Foram amplificadas duas regiões de 500 pb e de 1.000 pb, contendo as repetições H49 degeneradas (Fig. 18 C, D e E).

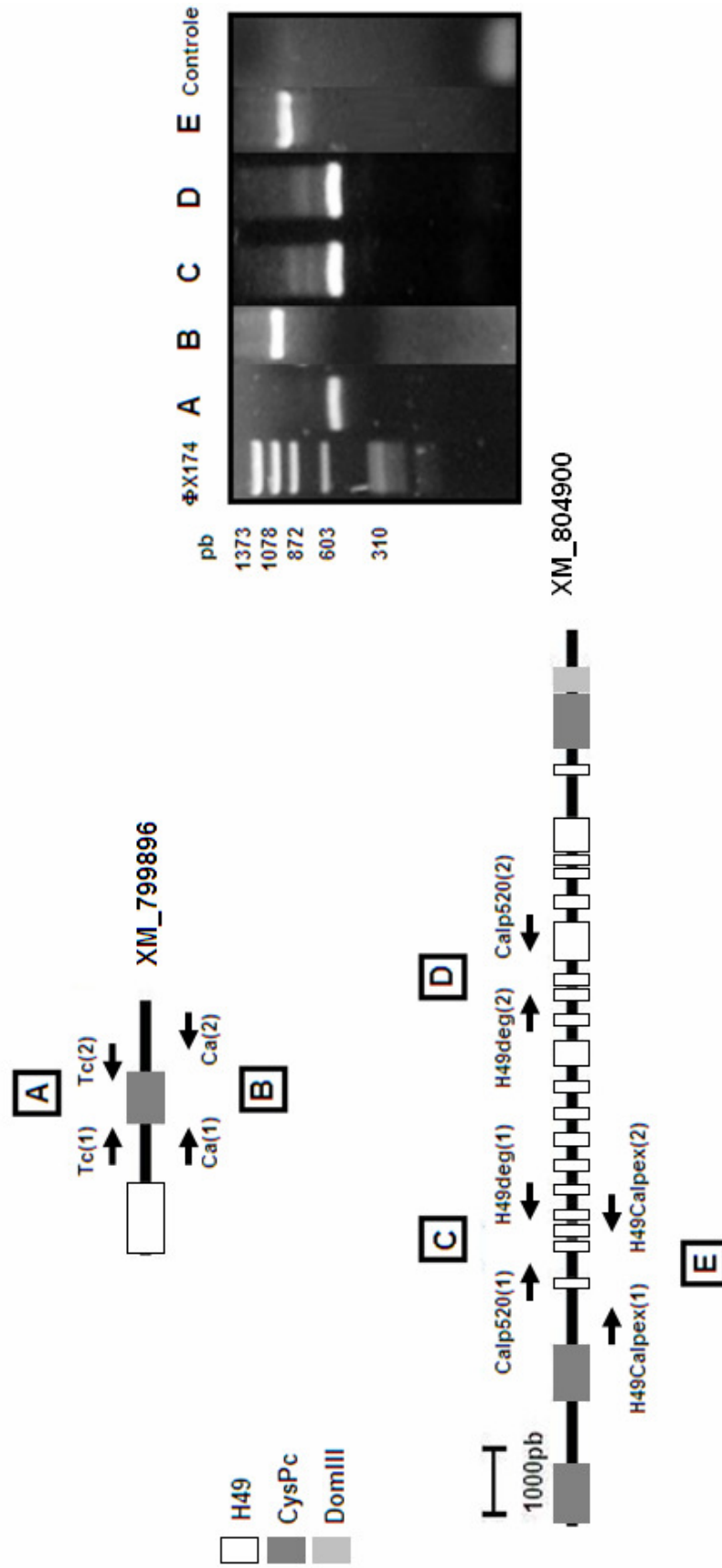


Figura 18. Amplificação por PCR de seqüências H49/calpaína no DNA genômico de epimastigotas do clone CL Brener. À esquerda da figura estão representadas as seqüências e os oligonucleotídeos utilizados na amplificação por PCR (detalhes em Material e Métodos item 3.8.1). As regiões amplificadas contendo o domínio CysPc de calpaína (A e B) e a repetição H49 degenerada (C-E) estão indicadas nos genes XM_799896 e XM_804900, respectivamente. À direita da figura é mostrado o gel de agarose (0,8%) dos fragmentos amplificados (A-E), o último poço mostra o controle negativo (ausência de DNA na reação). O marcador de tamanho molecular foi ϕ X174. O tamanho das bandas está indicado em pares de bases

4.2.2 Amplificação por RT-PCR de seqüências H49/calpaína em cDNA de formas epimastigotas de CL Brener

Amplificação do domínio catalítico (Cys-Pc)

O cDNA de formas epimastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi* foi sintetizado a partir de RNA total utilizando o kit ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen) como descrito em Material e Métodos (item 3.7). O tubo controle continha todos os componentes exceto o cDNA que foi substituído por 2 µL RNA (1,2 µg/µL) tratado com 1 µL de DNase (Amplification Grade). Neste material foi amplificado um fragmento de 500 pb do domínio catalítico Cys-Pc como descrito acima (Fig. 19 C).

Amplificação da repetição H49 degenerada

Assim como descrito para DNA genômico foram amplificados dois fragmentos de 500 pb da repetição H49 degenerada presente no gene H49/calpaína XM_804900 (Fig. 19 A-B).

Amplificação da repetição H49 conservada

Foram amplificados dois fragmentos contendo a repetição H49 conservada e calpaína com oligonucleotídeos desenhados em XM_799896 e XM_799016, como visto no gel de agarose (Fig. 19 D-E).

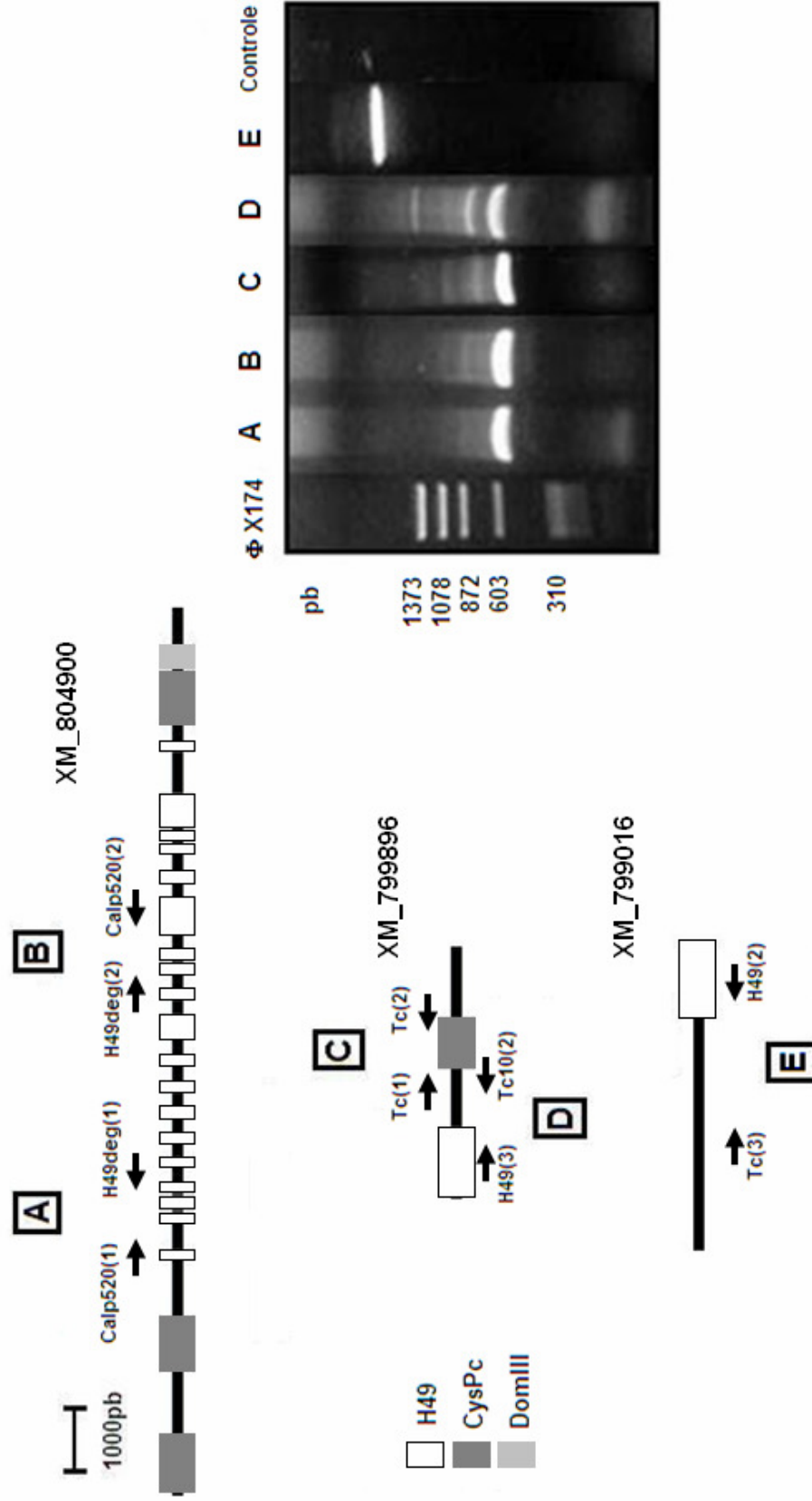


Figura 19. Amplificação por RT-PCR de seqüências H49/calpaina em cDNA de epimastigotas do clone CL Brener. À esquerda da figura estão representadas as seqüências e os nomes dos oligonucleotídeos utilizados em cada amplificação por PCR (detalhes em Material e Métodos item 3.8.1). As regiões amplificadas do gene H49/calpaina contendo a repetição degenerada (A, B) estão indicadas em XM_804900, o domínio catalítico da calpaina (Cys-Pc) e a repetição H49 conservada calpaina (D e E) em XM_799896 e XM_799016, respectivamente. À direita da figura é mostrado o gel de agarose (0,8%) dos fragmentos amplificados (A-D); o último poço mostra o controle (RNA total tratado com DNase). O marcador de tamanho molecular foi ϕ X174. O tamanho das bandas está indicada em pares de base.

4.2.3 Amplificação por PCR em megafragmentos genômicos de *T. cruzi* em vetor YAC (*Yeast Artificial Chromosome*)

Os clones YACs obtidos por Santos *et al.* (1999) foram utilizados no estudo da associação entre seqüências de calpaína e H49. Estes autores construíram um mapa físico dos cromossomos XVI e XVII de *T. cruzi* pela análise de restrição das bandas cromossômicas isoladas e identificação de clones de YAC contendo fragmentos pertencentes às bandas XVI e XVII (Fig. 20A).

A biblioteca de YAC foi construída com DNA genômico de epimastigotas do clone CL Brener e rastreada com sonda radiativa contendo a seqüência de H49. Foram identificados seis clones contendo o gene H49. Amplificamos parte da região catalítica da calpaína (500 pb) em dois clones de YAC denominados de Y₉H₈ e Y₇H₈ que contém repetições de H49 (Fig. 20B-C) que contém DNA das bandas cromossômicas XVI e XVII, respectivamente.

Os dados obtidos nesta seção confirmaram a presença de repetições H49 (degeneradas ou conservadas) associadas às seqüências de calpaína. Esta associação também foi confirmada por RT-PCR indicando que os genes H49/calpaína são transcritos.

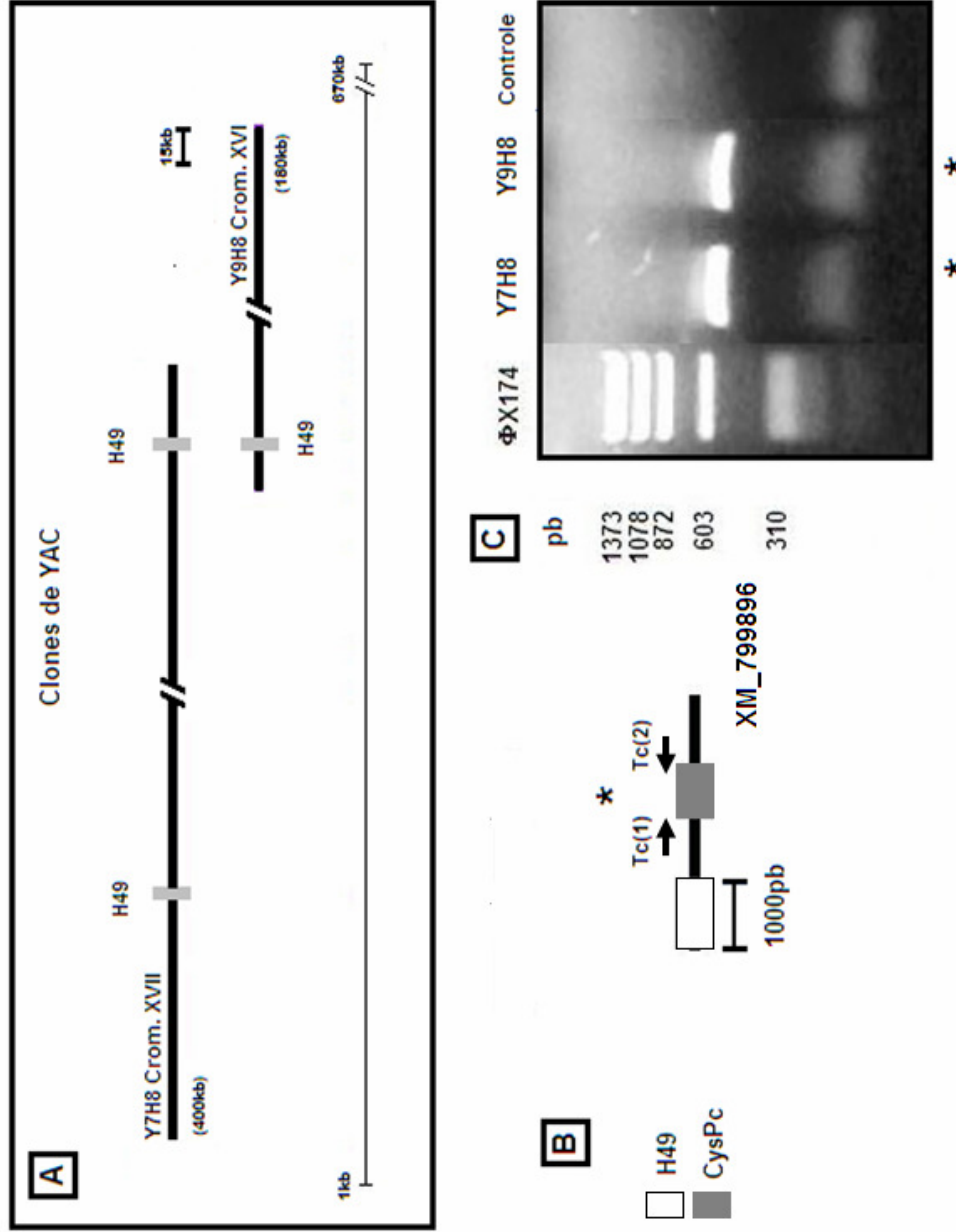


Figura 20. Amplificação por PCR em megafragmentos genômicos de *T. cruzi* clonados em vetor YAC. A) Localização do gene H49 nos clones de YAC Y₇H₈ e Y₉H₈, modificado de (Santos *et al.*, 1999). B) Representação da sequência de oligonucleotídeos utilizados na amplificação por PCR (detalhes em Material e Métodos item 3.8.1). A região amplificada de calpaína Cys-Pc está representada no gene XM_799896. C) Gel de agarose (0,8%) mostrando o fragmento amplificado (*) nos clones Y₇H₈ e Y₉H₈ e o último poço mostra o controle (sem DNA). O marcador de tamanho molecular foi phi X174. O tamanho das bandas está indicado em pares de base.

4.3 Análise da organização dos genes H49/calpaína e calpaína por hibridização em *Southern blotting* e *Chromoblotting*

4.3.1 *Southern blotting*: hibridização com as sondas H49/calpaína e calpaína

O DNA genômico do clone CL Brener foi digerido com diferentes enzimas de restrição (*EcoRI*, *KpnI*, *EcoRV*, *TaqI*, *HaeIII*, *RsaI* e *HinfI*) e separado por eletroforese de agarose 0,8% (Fig. 21A). Os fragmentos de restrição (~20-0, kb) foram transferidos para membrana de nitrocelulose e hibridizados com sondas da repetição conservada H49 e da região catalítica Cys-Pc da calpaína.

Conforme esperado, a sonda da repetição H49 hibridizou com duas bandas de aproximadamente 23 kb e 10 kb obtidas pela digestão com as enzimas *EcoRI*, *KpnI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *RsaI* e *HinfI*, as quais não apresentam sítios na repetição H49 (Fig. 21B). A sonda H49 hibridizou com vários fragmentos obtidos pela digestão com a enzima *TaqI* que apresentam o tamanho de aproximadamente 200 pb e múltiplos de 200 pb (Fig. 21B). Esse perfil de hibridização é esperado uma vez que a enzima *TaqI* apresenta um sítio interno na repetição H49.

A sonda Cys-Pc (1000 pb) foi amplificada por PCR do DNA genômico usando oligonucleotídeos derivados do gene XM_799896. A região amplificada apresenta 87-90% de identidade com os genes H49/calpains XM_804900, XM_809239 e XM_801211. É interessante notar que ela não apresenta similaridade significativa com outros genes de proteínas classificadas como *calpain-like cysteine peptidase* e *calpain cysteine peptidase* no genoma do clone CL Brener. A sonda Cys-Pc hibridizou intensamente com uma banda de aproximadamente de 1 kb gerada pela digestão com *EcoRI* confirmando a análise *in silico* que mostra que o domínio Cys-Pc está flanqueado por sítios *EcoRI* (Fig. 21C). Ela também hibridizou com menor intensidade com um fragmento de aproximadamente 23 kb gerado pela digestão com *KpnI* ou *EcoRV*, indicando que o domínio Cys-Pc e as repetições H49 estão localizadas em uma mesma região cromossômica. Três a quatro bandas de tamanho inferior a 1 kb geradas pela digestão com *HaeIII*, *HinfI* ou *RsaI* hibridizaram intensamente com a sonda Cys-Pc. Este resultado está de acordo com a análise *in silico* que mostra 2 a 4 sítios de restrição destas enzimas na região Cys-Pc dos genes H49/calpains.

Verificamos que 1-2 bandas de ~ 20 kb foram identificadas por hibridização de *Southern blotting*, utilizando as sondas calpaína e H49. Esta banda foi observada quando o DNA genômico do parasita foi digerido com as enzimas *KpnI* ou *EcoRV*, que não cortam dentro da repetição, sugerindo que as sequências de H49 e calpaína estão ligadas (Fig. 21B-C).

A sonda utilizada na hibridização da figura 21D foi amplificada por RT-PCR utilizando-se oligonucleotídeos derivados do gene XM_799016. O fragmento usado como sonda contém repetições H49 conservadas e a sequência de calpaína, porém, diferente do domínio Cys-Pc. O gene XM_799016 não apresenta o domínio Cys-Pc. Conforme esperado, a sonda hibridizou com dois fragmentos de ~23 e 10 kb obtidos pela digestão com *EcoRI*, *KpnI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *RsaI* ou *HinfI*. Na digestão com *EcoRI* pode-se visualizar um fragmento adicional de cerca de 2,9 kb identificado também por análise in silico no gene XM_799016. Nas digestões com *HaeIII*, *RsaI* ou *HinfI* podemos identificar vários fragmentos de tamanho inferior a 1,0 kb que correspondem às sequências codificadoras de calpaínas.

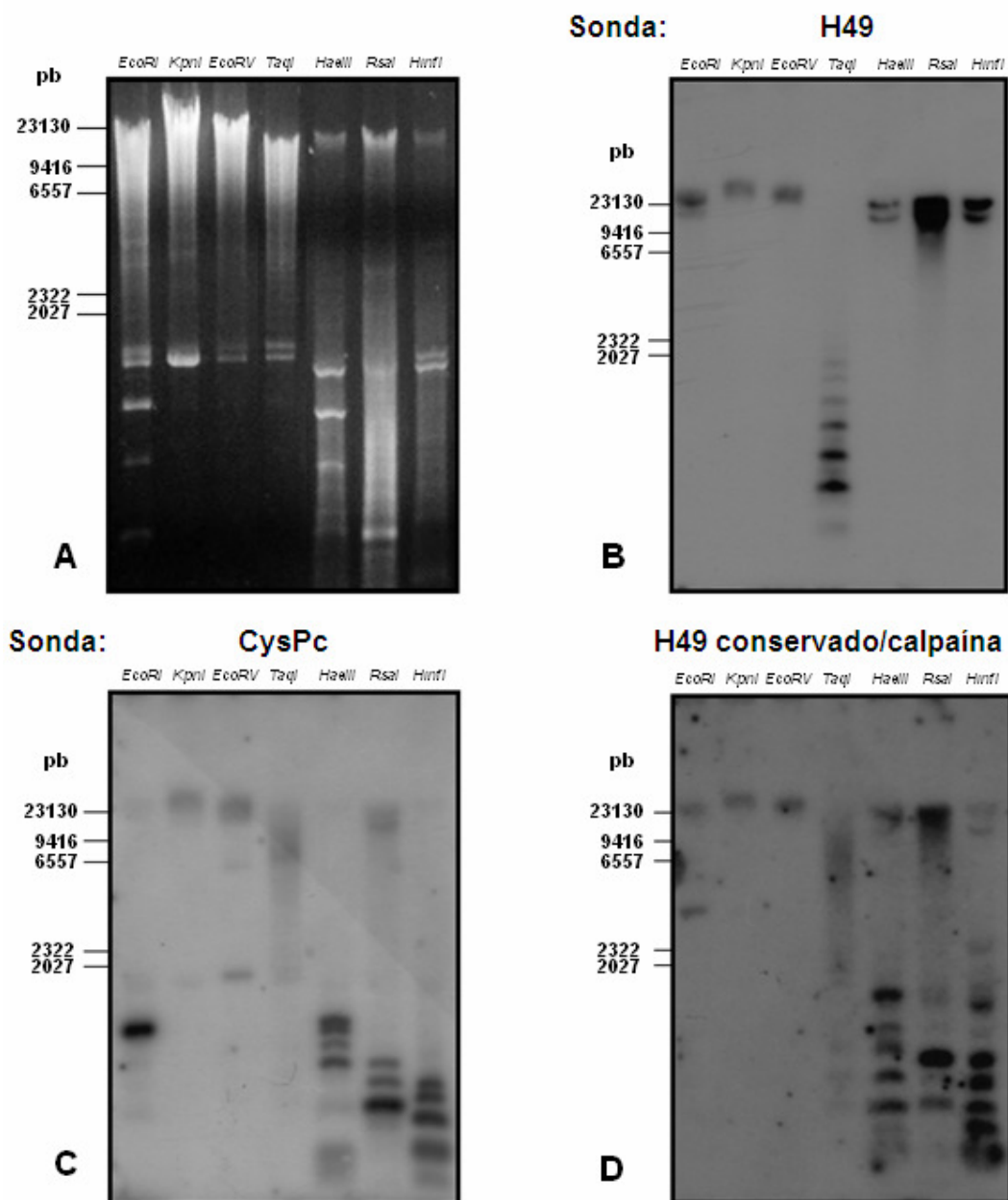


Figura 21. Digestão de DNA genômico de epimastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi* e hibridização com sondas H49/calpaína. A) Separação por eletroforese em gel de agarose (0,8%) dos fragmentos gerados após digestão de 10 µg de DNA genômico com as enzimas de restrição: *Eco* RI, *Kpn* I, *Eco* RV, *Taq* I, *Hae* III, *Rsa* I e *Hinf* I. Os fragmentos de DNA foram transferidos para filtro de náilon e hibridizados com as sondas indicadas. Marcador de tamanho molecular corresponde ao fago λ digerido com *Hind* III. O tamanho das bandas está indicado em pares de base. **B-D)** Hibridização do DNA genômico com as sondas radiativas H49 (clone H49 contendo 4,8 x repetições H49 conservada) (B); domínio catalítico Cys-Pc da calpaína (1.000 pb) (C) e um fragmento contendo a repetição conservada H49 e seqüência de calpaína (D). As sondas foram marcadas com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP conforme descrito em Material e Métodos (3.14). Os filtros foram lavados sequencialmente com as seguintes soluções: 2X SSC (42°C), 1XSSC (42°C) e 0,1bX (56°C) SSC por 30 min cada lavagem. Em seguida, expostos em filme Raios X a -70°C.

4.3.2 Southern blotting: hibridização com sonda contendo a repetição H49 degenerada e calpaína

Por outro lado, analisamos a distribuição das seqüências de calpaína que possuem a repetição H49 degenerada. Amplificamos um fragmento de 1.000 pb do gene XM_804900 que foi utilizado como sonda radiativa (Fig. 22). O perfil de hibridização obtido com a sonda contendo a repetição H49 degenerada (Fig. 22) é diverso daquele obtido com as outras sondas (Fig. 21). A sonda H49 degenerada hibridizou com uma banda de aproximadamente 23 kb obtida pela digestão com as enzimas *EcoRV* ou *KpnI* mas não reconheceu uma banda de mesmo tamanho detectada pela H49 conservada nas digestões com *EcoRI*, *HaeIII*, *RsaI* e *HinfI*. Lembramos que a sonda contendo a repetição H49 conservada tinha hibridizado com um banda de ~23 kb nas digestões com estas enzimas (vide Fig. 21B). A ausência de hibridização de sonda H49 degenerada com estas bandas pode ser explicada pelas diferenças de seqüências encontradas entre as repetições degeneradas e conservadas. A seqüência de nucleotídeos da repetição H49 degenerada difere da repetição H49 conforme mostrada na figura 21B. No gene XM_804900, que contem as repetições degeneradas, existe um grande número de sítios das enzimas *HaeIII* (n=46), *RsaI*(n=32) e *HinfI*(n=48) que estão ausentes na repetição H49 conservada. Isto explicaria a hibridização da sonda H49 degenerada com bandas de menor tamanho geradas pela digestão com estas enzimas (Fig. 22). O fato da sonda H49 degenerada não ter hibridizado com as bandas 23 kb dos genes H49/calpaína contendo a repetição conservada indica que a divergência de seqüência existente entre as repetições H49 impede a hibridização cruzada entre elas.

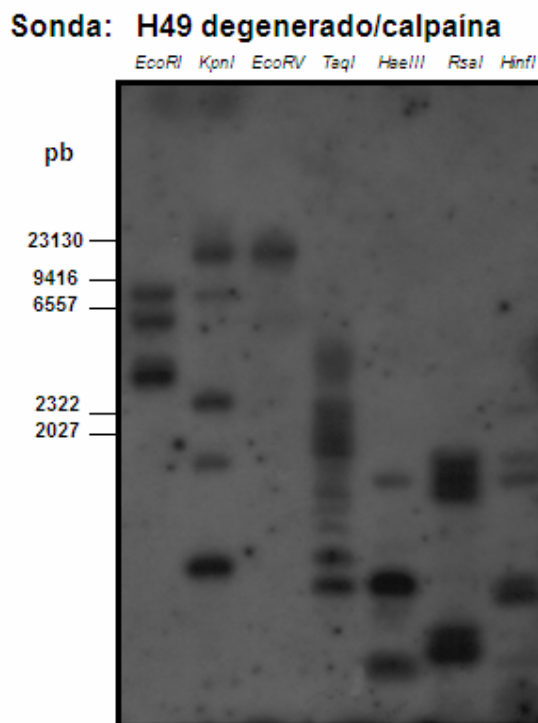


Figura 22. Hibridização do DNA genômico epimastigotas do clone CL Brener de *T. cruzi* com sonda da repetição H49 degenerada-calpaína (não Cys-Pc). Cerca de 10 µg de DNA genômico foram digeridos com as enzimas de restrição *Eco* RI, *Kpn* I, *Eco* RV, *Taq* I, *Hae* III, *Rsa* I e *Hinf* I, transferidos para membrana de nitrocelulose e hibridados com a sonda radiativa α^{32} P-dCTP do H49 degenerado-calpaína (1.000 pb). Os filtros foram lavados consecutivamente uma vez com as seguintes soluções: 2X SSC (42°C), 1X SSC (42°C) e 0,1 X (50°C) SSC por 30 min cada. O marcador de tamanho molecular corresponde a fago ϕ digerido com *Hind* III. O tamanho das bandas esta mostrado em pares de base.

4.3.3 Localização cromossômica do gene H49/calpaína

O DNA cromossômico de formas epimastigotas do clone CL Brener foi submetido à eletroforese por campo pulsado para separação das bandas cromossômicas (Fig. 23A). As bandas cromossômicas, cujo tamanho varia 0,45 a 3,5 Mb, estão indicadas com algarismos romanos I a XX, como proposto por (Cano *et al.*, 1995). O material foi transferido para membrana de nitrocelulose e hibridizado com sondas derivadas da região conservada H49, calpaína (Cys-Pc) e H49 degenerado/calpaína.

O gene H49 tinha sido mapeado nas bandas cromossômicas XVI-XVII no clone CL Brener (Santos, 1998). Conforme esperado a sonda de calpaína também hibridizou nessas bandas cromossômicas. Mostramos que no clone CL Brener o padrão de hibridização das três sondas é idêntico, ou seja, as sondas calpaína e H49, hibridizam nas mesmas bandas cromossômicas (2,6-2,3 Mb), que correspondem as bandas XVII e XVI, respectivamente (Fig. 23B).

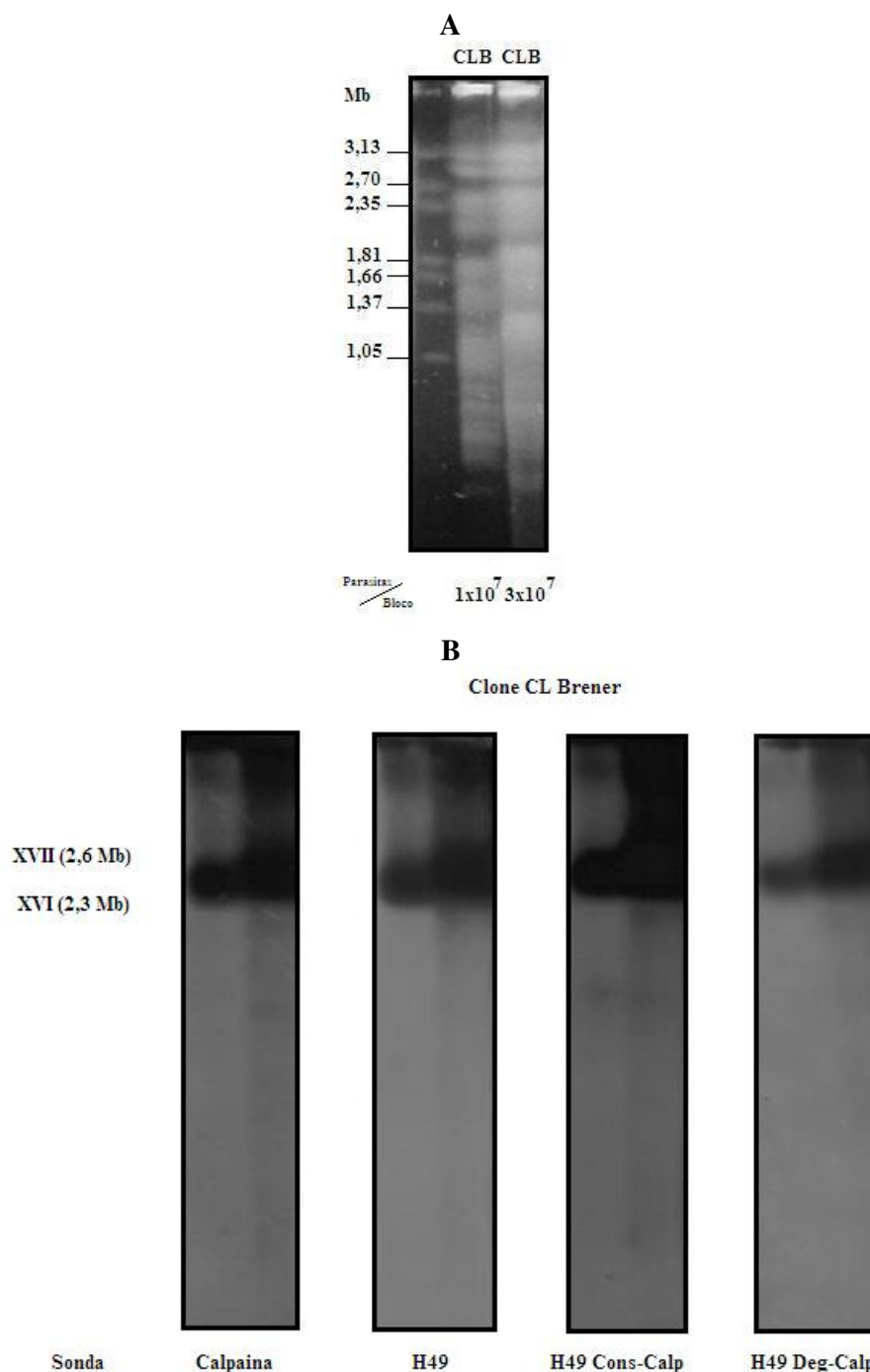


Figura 23. Chromoblotting (epimastigotas clone CL Brener). **Painel A.** Bandas cromossômicas de epimastigotas do clone CL Brener (1×10^7 e 3×10^7 parasitas por bloco), foram separadas por PFGE e coradas com brometo de etídeo. Marcador de tamanho molecular *Hansenula wingei* (1,05-3,03 Mb). **Painel B.** Hibridização com sonda radiativa de calpaína, H49, H49 conservado/calpaína e H49 degenerado/calpaína. Os números atribuídos as bandas cromossômicas estão dados em números romanos. Os tamanhos das bandas cromossômicas estão em Mb (megabases). Condições de lavagens estão descritas em Material e Métodos (3.15).

4.4 Caracterização das proteínas H49/calpaínas de *T. cruzi*

4.4.1 Expressão proteína recombinante H49

O inserto do clone H49 (L09564, Cotrim et al., 1990) composto por 4,8 repetições de 204 pb foi subclonado no vetor de expressão pGEX (Amersham). Antes de expressar a proteína recombinante H49, confirmamos a fase de leitura vetor por seqüenciamento usando o kit BygDye® (Applied Biosystems).

A expressão da proteína recombinante H49 foi obtida pela transformação de bactérias DH5 α com o vetor de expressão e indução por IPTG como descrito em Material e Métodos (3.16). A proteína recombinante em fusão com GST (glutathione transferase) tem aproximadamente 66 kDa que corresponde à soma da massa da GST (29 kDa) e do antígeno H49 (37 kDa) (Fig. 24).

A proteína recombinante H49 é extremamente solúvel, e pode ser purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Glutathione Sepharose 4B (Amersham Biosciences) eluída com glutathione reduzida como descrito em Material e Métodos (3.17). A partir de um litro de cultura obtivemos cerca de 7 mg de proteína recombinante H49 em fusão com GST.

4.4.2 Expressão proteína recombinante calpaína A (domínio catalítico Cys-Pc)

Com base na sequência de nucleotídeos do gene H49/calpaína (XM_799896) amplificamos um fragmento de cerca de 1.000 pb que codifica a região catalítica da calpaína (819 pb, 273 aa). A região foi amplificada com oligonucleotídeos iniciadores (Ca1 e Ca2) que contém sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Eco*RI, respectivamente, que permitiu a inserção do inserto no vetor de expressão pGEX-3X (Amersham) no sentido desejado (Fig. 25).

A construção pGEX/calpaína A foi seqüenciada para confirmar que o inserto estava em fase com a GST. As bactérias foram transformadas com o plasmídeo e a expressão da proteína induzida com IPTG. Na figura 26 (painel A), pode-se observar a expressão da proteína recombinante calpaína A de aproximadamente 64 kDa. Também foi possível observar no gel que bactérias transformadas com o vetor pGEX-3X sem inserto expressaram apenas a proteína GST de massa molecular de 29 kDa.

Confirmamos pela técnica de Western blotting, utilizando o anticorpo monoclonal anti-GST, que as bandas de 65 e 29 kDa eram as proteínas GST/calpaína A e GST, respectivamente (Fig. 26 B).

A proteína de fusão GST/calpaína A é insolúvel, detectada no precipitado após centrifugação do lisado bacteriano. Na tentativa de obter a proteína solúvel, modificamos a temperatura e o tempo de indução. No entanto, nenhuma modificação favoreceu a solubilização, de modo que a proteína de fusão foi purificada do gel de poliacrilamida como descrito em Material e Métodos (4.17.1).

4.4.3 Expressão proteína recombinante calpaína B (H49 degenerado/calpaína)

Um fragmento do gene XM_804900 de 1.039 pb (346 aa), que codifica as repetições H49 degeneradas (identidade em aminoácidos menor que 50% quando comparada com a sequência do L09564) e calpaína foi amplificado por PCR. Como no caso anterior, usamos iniciadores (H49 calpex1 e H49 calpex2) com sítios de restrição para *Bam*HI e *Eco*RI, respectivamente. O fragmento foi subclonado no vetor pGEX-3X que expressou uma proteína em fusão com GST em *E. coli* (BL21), denominada calpaína B. A proteína apresenta 305 aa correspondente a repetição degenerada H49 (identidade em aminoácidos 42-47%) e o restante à uma porção da calpaína que não corresponde aos domínios conservados (Fig. 27).

Com a finalidade de verificar a expressão da proteína recombinante, as bactérias foram induzidas com IPTG 0,6 mM a 37°C. O lisado bacteriano foi centrifugado, o precipitado ressuspenso em tampão de amostra para proteínas e analisado por eletroforese SDS-PAGE (10%) (Fig. 28A). O perfil eletroforético mostrado no poço 1 corresponde às bactérias BL21 não transformadas. Uma banda de aproximadamente 64 kDa correspondente à calpaína B foi observada quando as bactérias transformadas foram induzidas com IPTG (poço 2). Quando bactérias BL21 foram transformadas com o plasmídeo sem inserto, apenas a proteína GST (29 kDa) foi observada após indução com IPTG (poço 3).

A confirmação da expressão da proteína recombinante foi obtida por *Western blotting* usando o anticorpo monoclonal anti-GST (Fig. 28B). O anticorpo reagiu com duas bandas de 64 kDa e de 29 kDa correspondentes à proteína recombinante e GST, respectivamente (poços 2 e 3).

A proteína de fusão não é solúvel o que dificultou a sua purificação. Não tivemos sucesso em obter a proteína solúvel modificando as condições de indução. O precipitado bacteriano foi tratado com concentrações crescentes de uréia (2-7 M) na tentativa de solubilizar a proteína de fusão. Ao dialisar o lisado bacteriano com soluções renaturantes que incluíam uréia em concentrações decrescentes, a maior parte das proteínas precipitaram dentro do saco de diálise. Mesmo na presença de 2M de uréia não conseguimos recuperar quantidades significativas de proteína após eluição com glutatona reduzida. Portanto, como no caso anterior, a proteína foi extraída do gel de poliacrilamida como descrito em Material e Métodos (4.17.2).

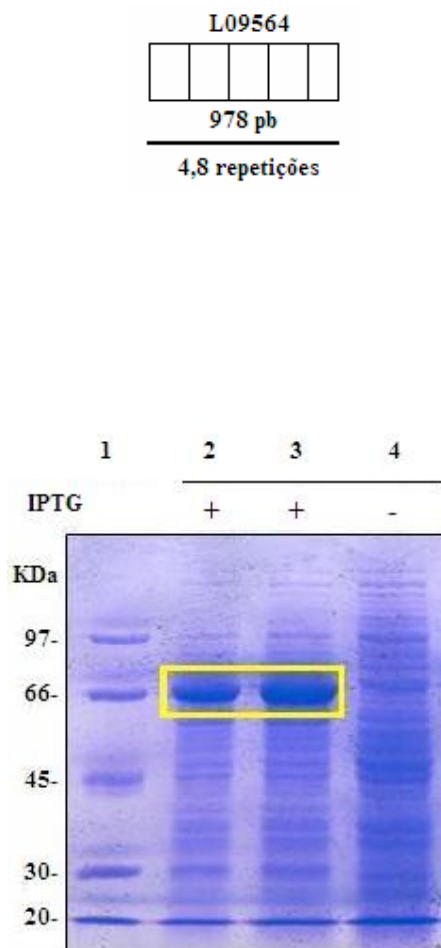


Figura 24. Expressão da proteína recombinante GST/H49. Análise da proteína recombinante por eletroforese em SDS-PAGE (10%) e da coloração com azul de Coomassie. 1) Marcador de peso molecular. 2) e 3) Proteína recombinante GST/H49 induzida com IPTG 1 mM (banda de 66 kDa). 4) Proteínas de *E. coli* (DH5 α) não transformadas com o vetor pGEX-3X. Na parte superior da figura é mostrado um esquema do clone H49, indicando a região de 4,8 repetições H49 que foi expressa em fusão com GST.

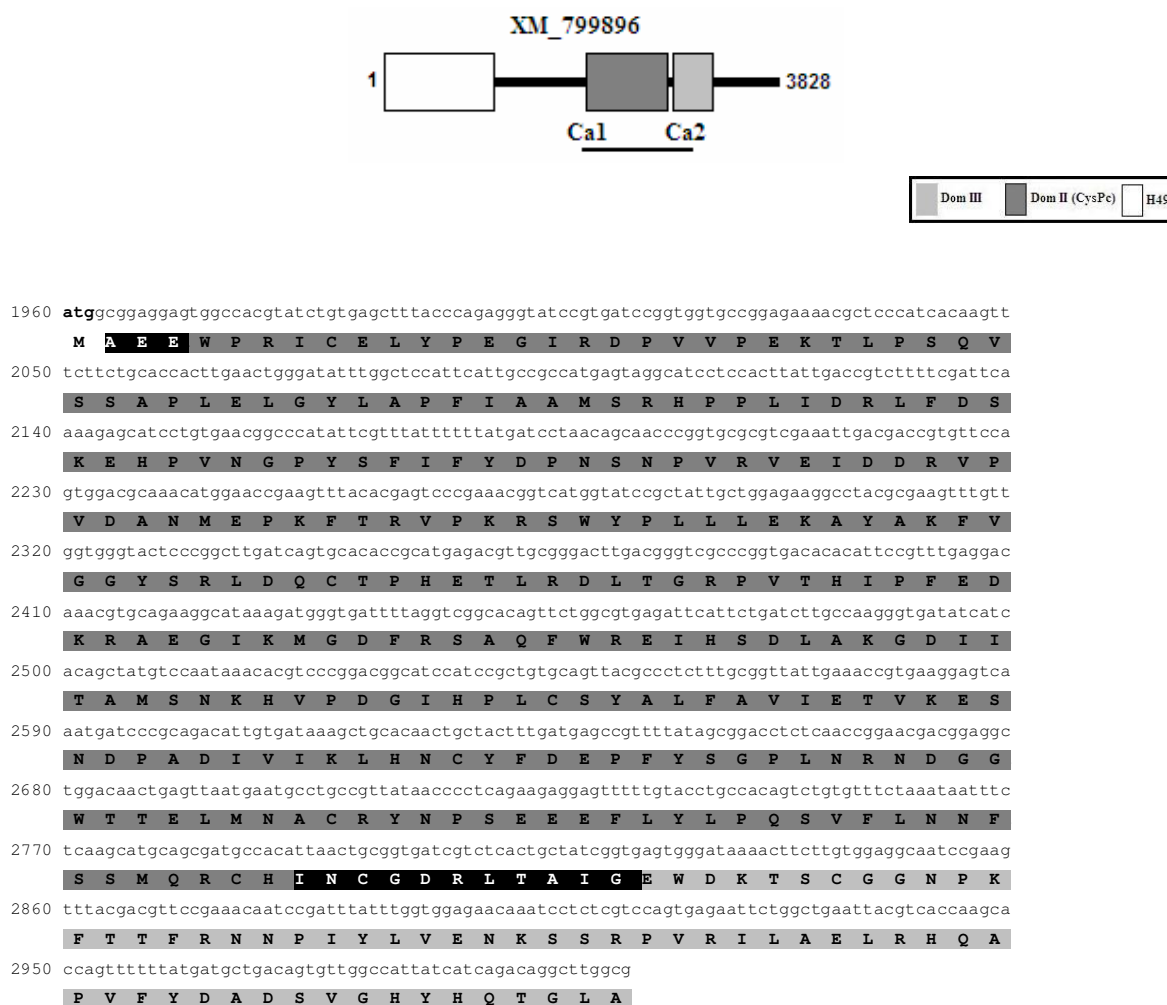
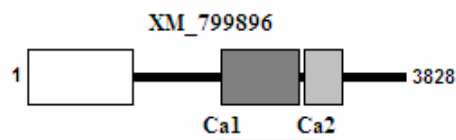
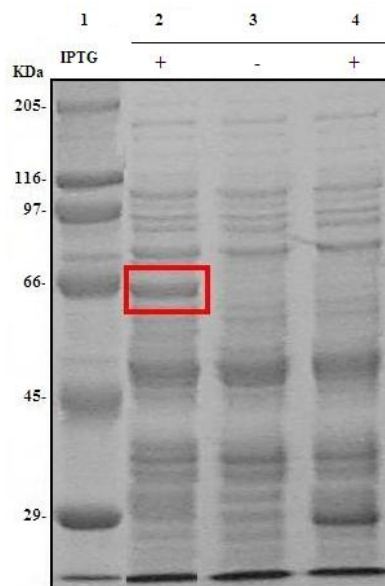


Figura 25. Construção calpaína A: região da calpaína (Cys-Pc) expressa em fusão com GST. Esquema mostrando a região do gene XM_799896 que foi amplificada por PCR, clonada e expressa no vetor de expressão pGEX-3X. Ca1 e Ca2 são os iniciadores com sítios de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, respectivamente. Também é mostrada a sequência em nucleotídeos e aminoácidos da região clonada, em verde o códon de iniciação. As regiões em negro correspondem à sequência sem domínios conservados de calpaína, em cinza escuro e claro estão indicados os domínios catalítico (Cys-Pc) e III da calpaína, respectivamente.



A



B

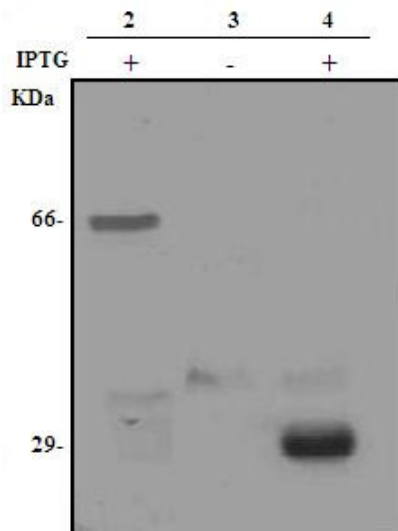


Figura 26. Expressão da proteína recombinante de GST/calpaína A. **Painel A** Gel de poliacrilamida (10%) corado com azul de Coomassie. 1) Marcador de peso molecular. 2) Proteína recombinante GST/calpaína (64 kDa) induzida com IPTG 1 mM. 3) Proteínas de *E. coli* (DH5α) não transformadas com o vetor pGEX-3X. 4) Bactéria *E. coli* transformada com plasmídeo pGEX-3X sem inserto. **Painel B.** *Western blotting*. Reação com o anticorpo anti-GST diluído 1/8000. Na parte superior da figura é mostrado um esquema do gene XM_799896 indicando a região clonada e expressa em fusão com GST.

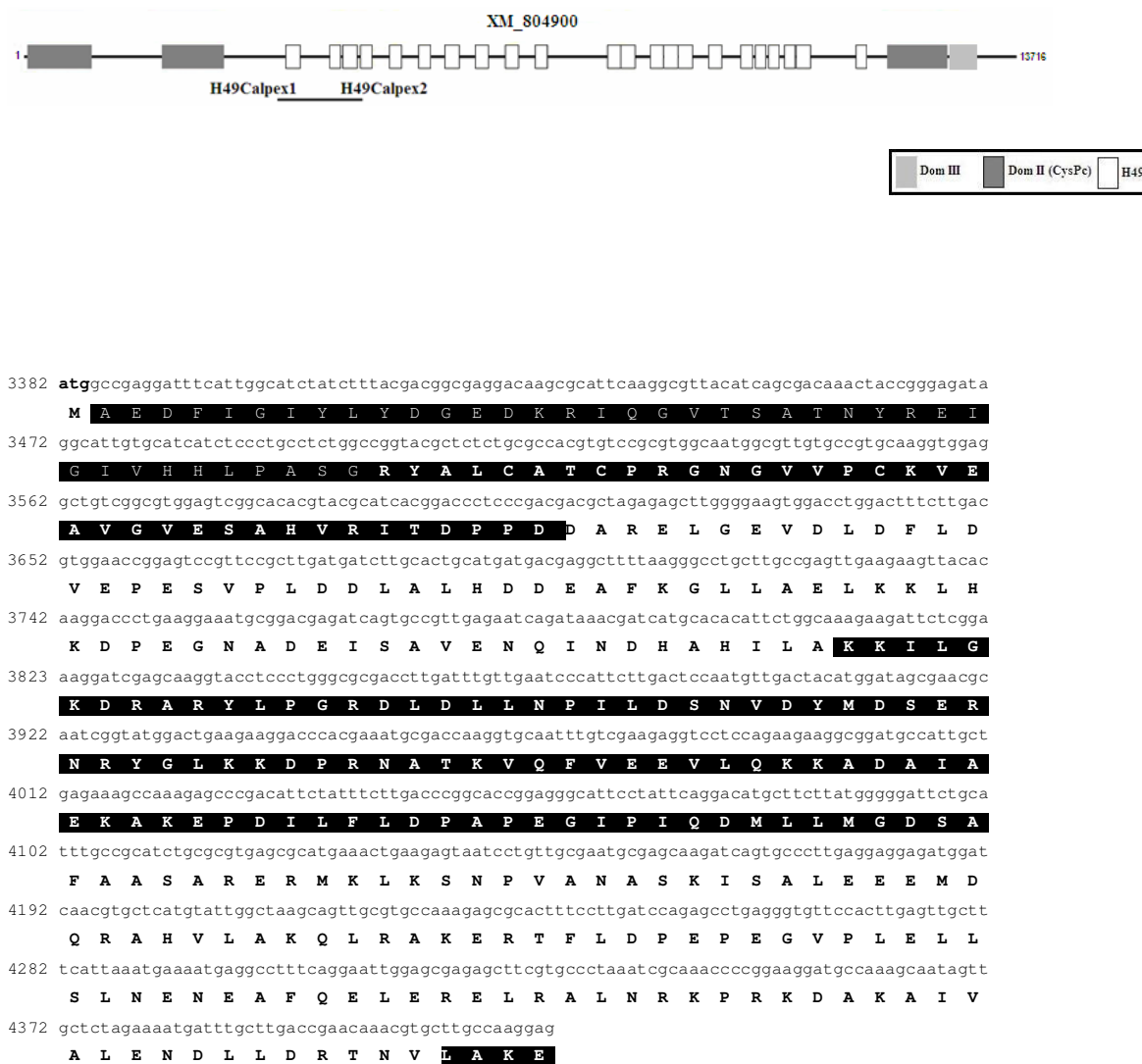
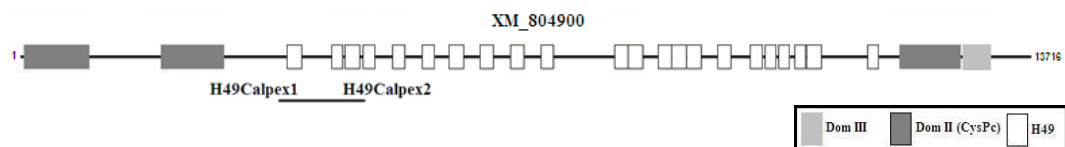
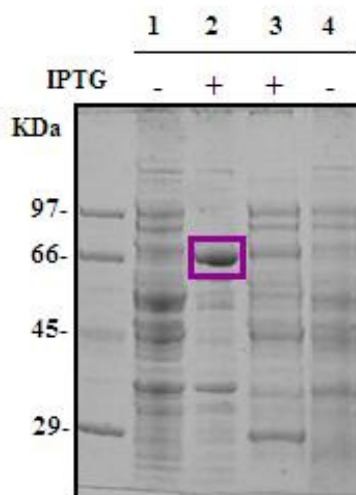


Figura 27. Construção calpaína B: região H49 degenerado/calpaína expressa em fusão com GST. Esquema mostrando a região do gene XM_804900 clonada e expressa no vetor pGEX-3X. H49Calpex1 e H49Calpex2 são os iniciadores com sítios de restrição *Bam*HI e *Eco*RI, respectivamente. Também é mostrada a seqüência de nucleotídeos e aminoácidos da região clonada, em verde o códon de iniciação. As regiões em negro correspondem à seqüência sem domínios conservados da calpaína, em branco são representados os blocos de repetições H49 degeneradas.



A



B

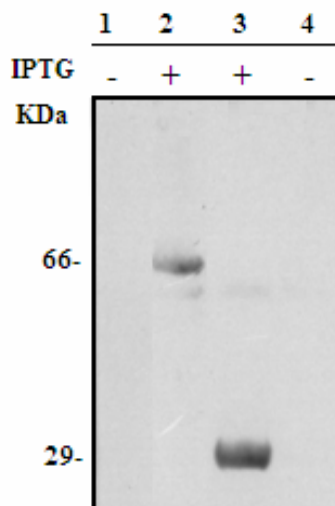


Figura 28. Expressão da proteína recombinante de GST/calpaína B. Painel A. Gel poliacrilamida (10%) corado com azul de Coomassie. 1) *E. coli* BL21. 2) Proteína recombinante GST-H49 degenerado/calpaína induzida com IPTG 0,6 mM. 3) Proteínas de *E. coli* não transformadas com o vetor pGEX-3X. 4) Bactéria *E. coli* transformada com plasmídeo pGEX-3X sem inserto. **Painel B.** *Western blotting*. Reação com o anticorpo anti-GST diluído 1/8000. Na parte superior da figura é mostrado um esquema do gene XM_804900 indicando a região clonada e expressa em fusão com GST.

4.4.4 Purificação das proteínas H49, calpaína e H49 deg-calpaína em fusão com GST

A proteína recombinante H49 foi purificada por cromatografia em coluna de *Glutathione Sepharose*. Na figura 29 são mostradas as amostras coletadas após a eluição por competição com glutathiona reduzida (ver Material e Métodos 4.17.3).

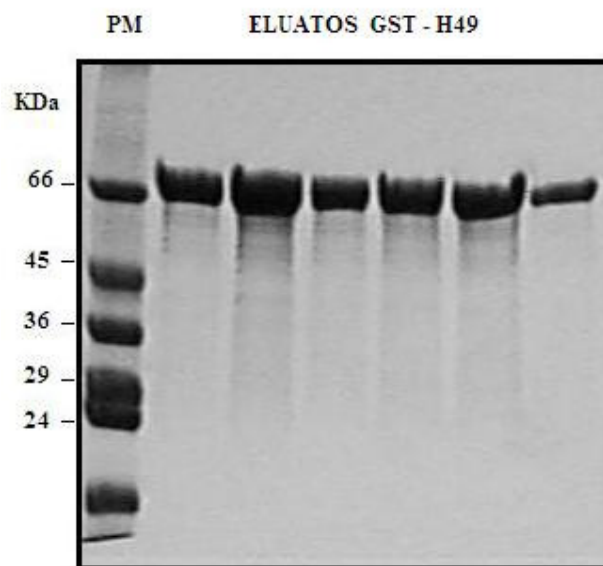


Figura 29. Purificação da proteína recombinante GST-H49. Gel de poli-acrilamida (10%) corado com azul de Coomassie. A proteína GST-H49 purificada é observada em cada um dos eluatos como uma banda de 66 KDa após da eluição com glutathiona reduzida. PM: Marcador de peso molecular.

A purificação das proteínas recombinantes (Cys-Pc) e H49 degenerado/calpaína em fusão com GST foi realizada por eluição das proteínas do gel de poli-acrilamida, porque eles são insolúveis. Na figura 30 são mostradas as proteínas obtidas após a purificação.

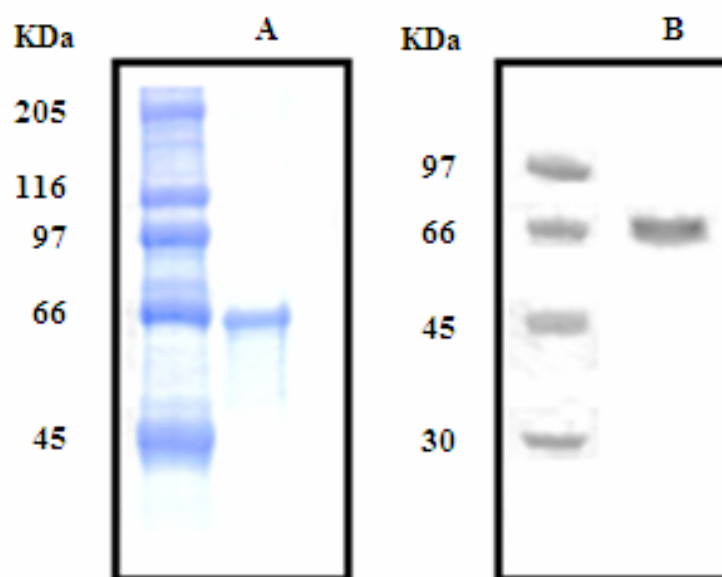


Figura 30. Purificação das proteínas recombinantes Calpaína A (Cys-Pc) e Calpaína B (H49 degenerado/calpaína em fusão com GST). A) Proteína GST-calpaína A purificada (banda de 65 kDa). B) Proteína GST- Calpaína B (H49 degenerado/calpaína) purificada (banda de 66 kDa).

As proteínas recombinantes H49, calpaína A (Cys-Pc) e calpaína B em fusão com GST foram utilizadas para gerar anticorpos policlonais em camundongo e coelho. Os anticorpos foram utilizados em estudos de *Western blotting* e imunofluorescência indireta.

4.4.5 Reatividade de soros policlonais anti-calpaína A, anti-calpaína B e anti-H49

Camundongos Balb/c e coelhos da linhagem Nova Zelândia foram imunizados com as proteínas recombinantes em fusão com GST. Os soros foram testados contra as proteínas recombinantes, GST e extrato de parasitas por *Western blotting* e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Os soros anti-calpaína A e anti-calpaína B foram analisados unicamente por *immunoblotting* devido à insolubilidade das proteínas recombinantes.

Na figura 31 são mostradas as reações com as respectivas proteínas recombinantes para cada um dos soros. Os anticorpos presentes nos soros de camundongo e coelho reconheceram fortemente as proteínas recombinantes.

A reatividade dos soros anti-calpaína B com a proteína recombinante H49 foi analisada por *Western* e *dot blotting*. O soro de coelho contra a repetição degenerada reagiu fortemente com o imunógeno (linha 1) e com menor intensidade com o H49 (linha 2) (Fig. 32A). No *dot blotting*, os soros de camundongo e coelho reconheceram fracamente a proteína H49. Ao contrário, um forte sinal foi visto com o soro anti-H49 em todas as diluições utilizadas (Fig. 32 B e C).

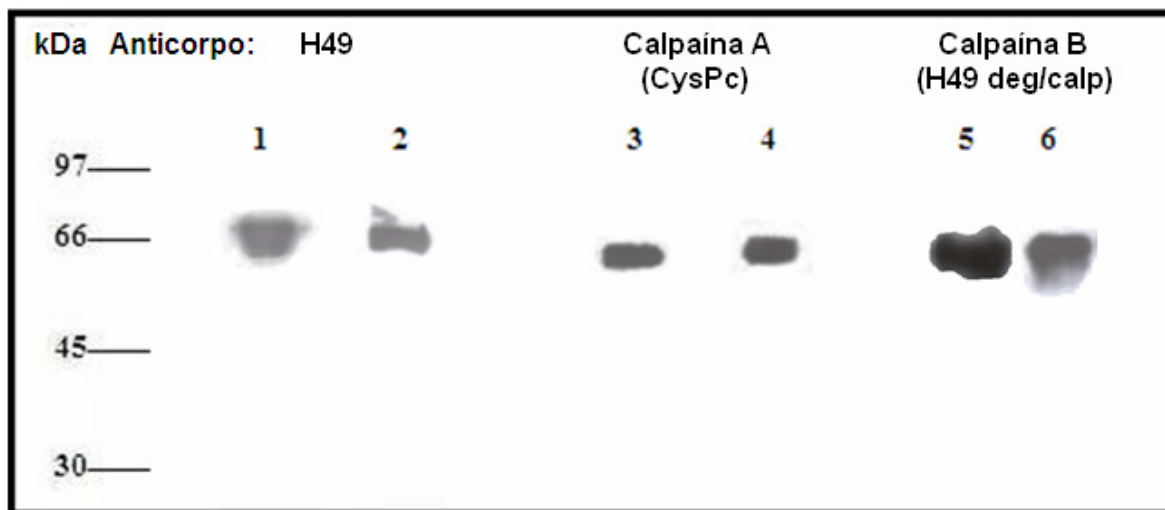


Figura 31. Reatividade dos soros anti-calpaína e H49 com as proteínas recombinantes. Os soros anti-H49, anti-calpaína A e anti-calpaína B foram testados com 2 e 5 µg das respectivas proteínas recombinantes por *immunoblotting*. Linhas 1, 3 e 5, soros de camundongo anti-H49 (1/500), anti-calpaína A (1/150) e anti-calpaína B (1/150), respectivamente. Linhas 2, 4 e 6, soros de coelho anti-H49 (1/4000), anti-calpaína A (1/150) e anti-calpaína B (1/150), respectivamente. A revelação foi feita por quimiluminescência utilizando anti-IgG conjugado à peroxidase de camundongo (1/500) e coelho (1/4000). As diluições dos soros estão indicadas entre parênteses.

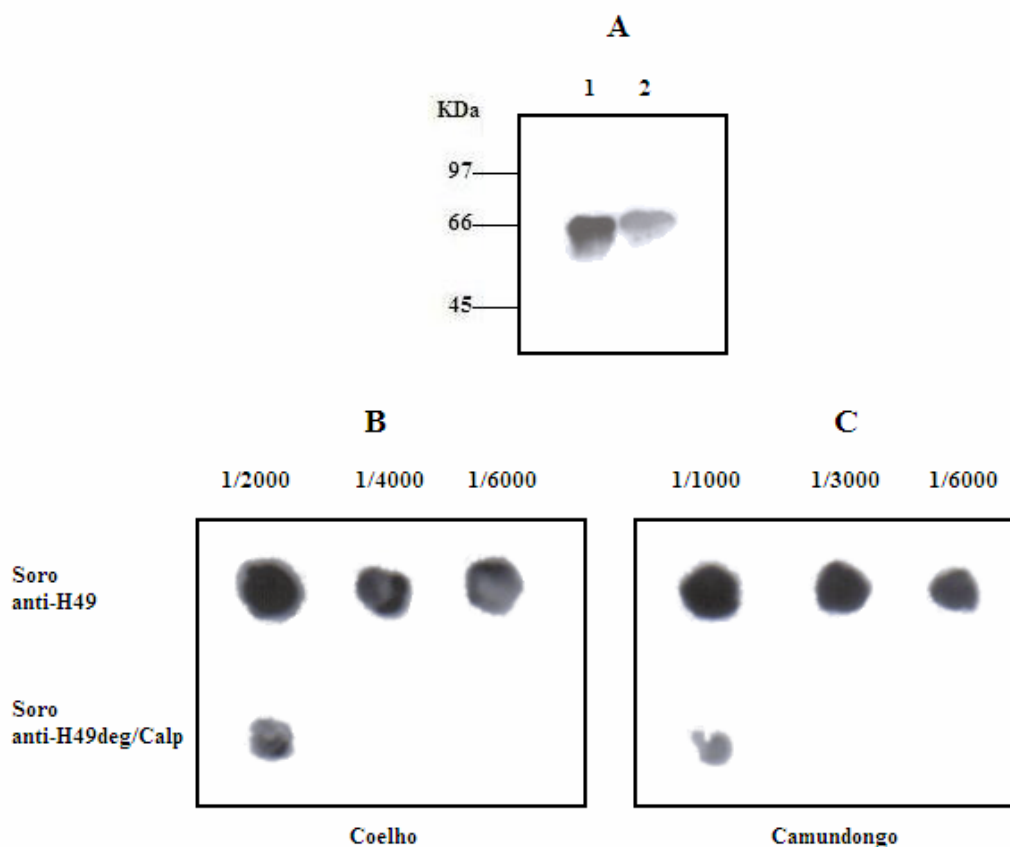


Figura 32. Reatividade do soro anti-calpaína B com a proteína recombinante H49. (A) *Western blotting*. Reatividade das proteínas recombinantes calpaína B (1) e H49 (2) com o soro de coelho anti- H49 degenerado/calpaína (1/250) e anti-IgG conjugado peroxidase (1/7000). (B e C) *Dot blotting* das proteína recombinante H49 (1,2 µg/dot) com soros de coelho e camundongo anti-H49 e anti-calpaína em diferentes diluições. O *immunoblotting* foi revelado por quimiluminescência utilizando anti-IgG conjugado à peroxidase de coelho (1/4000) e camundongo (1/6000). As diluições dos soros estão indicadas entre parênteses.

4.4.6 Reatividade do soro anti-GST em extrato de proteínas de *T. cruzi*

Os soros policlonais foram obtidos por imunização com proteínas recombinantes em fusão com GST, portanto, anticorpos anti-GST podem estar presentes no soro. Assim, foi avaliada a reatividade do soro anti-GST obtido pela imunização com a proteína GST em extratos de epimastigotas da cepa G e do clone CL Brener. Os soros anti-GST de camundongo e coelho não reagiram com extrato de epimastigotes da cepa G (Fig. 33). Enquanto o soro anti-GST de coelho reagiu fracamente com o extrato do clone CL Brener (Fig. 33). Assim, os soros anti-proteína recombinante foram imunopurificados ou adsorbidos com extrato de bactérias de *E. coli* que expressam GST, para evitar possível reatividade cruzada.

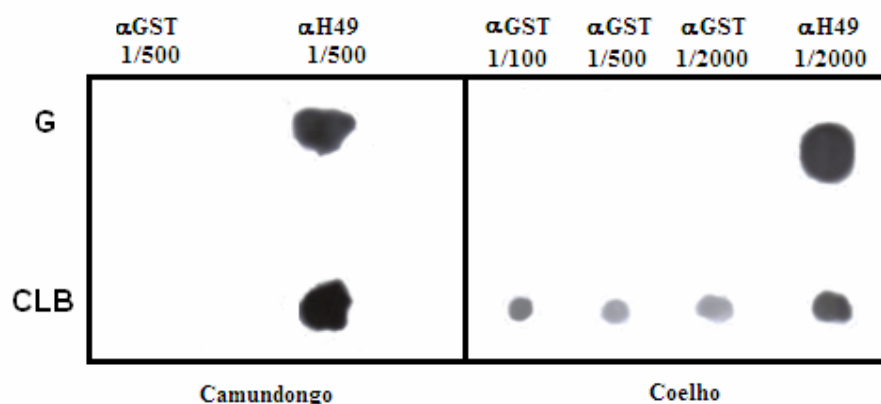


Figura 33. Reatividade do soro anti-GST com extratos de *T. cruzi*. Dot blotting que mostra a reatividade dos soros anti-GST e anti-H49 de camundongo (A) e coelho (B) com os extratos de epimastigotas da cepa G e clone CLB de *T. cruzi*. A revelação foi feita por quimiluminescência utilizando anti-IgG conjugado à peroxidase de camundongo (1/6000) e coelho (1/4000). As diluições dos soros estão indicada acima da figura e entre parenteses.

4.4.7 Reatividade dos anticorpos policlonais anti-H49, anti-calpaína A e anti-calpaína B com epimastigotas da cepa G e do clone CL Brener

Epimastigotas foram lisados em uma solução contendo Triton X-100, inibidores de proteases que permitem preservar as proteínas de proteases intracelulares, tampão PIPES e sais que ajudam a estabilizar microtúbulos que são componentes do citoesqueleto do parasita. Após a centrifugação, as proteínas insolúveis pertencentes ao citoesqueleto e as proteínas associadas ao citoesqueleto do parasita estão presentes no precipitado.

Os anticorpos anti-H49 reconheceram duas bandas de elevada massa molecular (>240 kDa) na cepa G e no clone CL Brener (Fig. 34). Os anticorpos contra a região catalítica (Cys-Pc) da calpaína reconheceram no clone CL Brener quatro bandas de 56, 60, 170 e ~240 kDa. Na cepa G foram identificadas três bandas de 56, 60 e ~240 kDa. A banda de ~240 kDa coincide em tamanho com a banda reconhecida pelos anticorpos anti-H49, indicando que essa banda corresponde à calpaína com a repetição H49 na sua seqüência. As bandas menores identificadas pelo soro anti-calpaína A são calpaínas sem a repetição H49.

Na figura 34 foram incluídos somente os precipitados obtidos após a lise com o detergente. Nos sobrenadantes também foram identificadas as proteínas detectadas nos precipitados,

indicando que uma porção das proteínas associadas ao citoesqueleto pode ser solubilizada quando tratada com detergente.

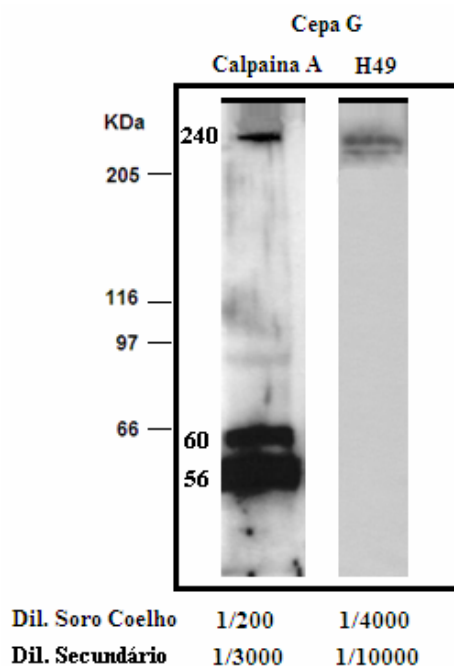
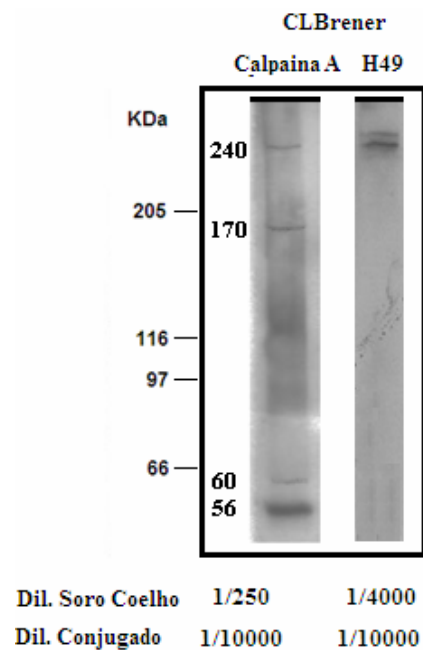


Figura 34. *Western blotting* mostrando a reatividade dos anticorpos anti-H49 e anti-calpaína A com extratos protéicos do clone CL Brener e cepa G. A fração insolúvel contendo o citoesqueleto foi ressuspensa em tampão de amostra denaturante e as proteínas separadas por eletroforese em gel de poliácridamida (5%) contendo SDS. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com os anticorpos H49 e calpaína A nas diluições indicadas na figura.

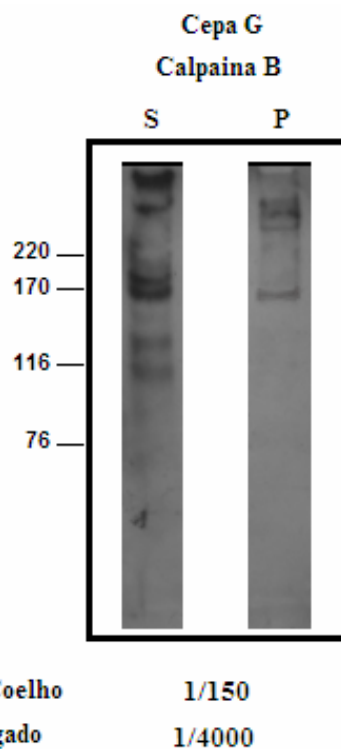


Figura 35. Western blotting mostrando a reatividade dos anticorpos anti-calpaína B com as frações solúvel e insolúvel de epimastigotas da cepa G. As proteínas presentes nas frações solúvel (S) e insolúvel (P) foram obtidas por centrifugação do lisado celular obtido com Triton X-100. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (5%) contendo SDS. As membranas denitrocelulose foram incubadas com anticorpos anti-calpaína B nas diluições indicadas.

Como mostrado na figura 35, o anticorpo anti-calpaína B reconheceu duas bandas de 170 e >220 kDa na fração de citosqueleto P (precipitado). Entretanto, no sobrenadante (S) o soro reagiu com o número maior de proteínas de diferentes tamanhos, e também com as proteínas de 170 e >220 kDa. Esses resultados mostram que o soro contra a repetição degenerada reconhece fracamente uma banda de alto tamanho molecular que também é reconhecida pelos anticorpos contra a repetição conservada de H49.

4.4.8 Localização celular das proteínas H49, Calpaína A e Calpaína B por imunofluorescência indireta em epimastigotas de *T. cruzi*

4.4.8.1 Localização celular de calpaína A (domínio catalítico Cys-Pc)

A reação de imunofluorescência de epimastigotas do clone CL Brener, fixados com paraformaldeído (2%) e permeabilizados com Triton X-100 (0,1%), com os anticorpos anti-calpaína A apresentou um padrão de marcação intracelular. Os anticorpos de camundongo e coelho reconheceram componentes no citoplasma, principalmente, em volta do núcleo e no flagelo, mas a marcação neste ultimo foi fraca (Fig. 36). Os parasitas não permeabilizados não apresentaram marcação.

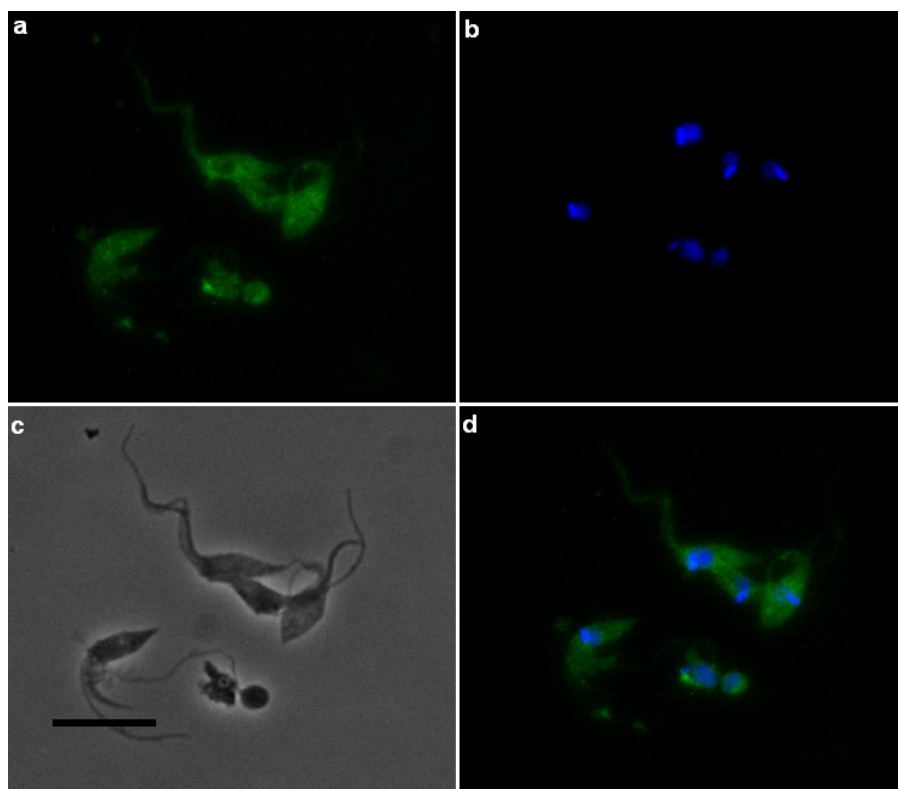


Figura 36. Localização celular da calpaína A (domínio catalítico Cys-Pc) por imunofluorescência em epimastigotas do clone CL Brener. Reatividade com anticorpos de camundongo anti-Calpaína A (1/20). Revelação com anticorpos-anti-imunoglobulinas de camundongo conjugado com fluoresceína (FITC) (1/50). a) anti-calpaína; b) DAPI (1/30); c) contraste de fase; d) sobreposição de anti-calpaína e DAPI. As diluições dos anticorpos e DAPI estão indicadas entre parêntese. Barra=5µm.

4.4.8.2 Localização celular do antígeno H49

A reação com o anticorpo anti-H49 foi intensa com padrão de marcação claramente definido, localizado exclusivamente na região onde o flagelo adere ao corpo do parasita denominada de FAZ (*Flagellar Attachment Zone*) (Figs. 37 e 38). A imunolocalização revelou também que o H49 não está presente, na região anterior do parasita, onde o flagelo torna-se livre (Fig. 38). Por microscopia de epifluorescência verificamos que o H49 está restrito a FAZ em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos permeabilizados da cepa G e do clone CL Brener (Fig. 37 e 38) vide também Anexo IV.

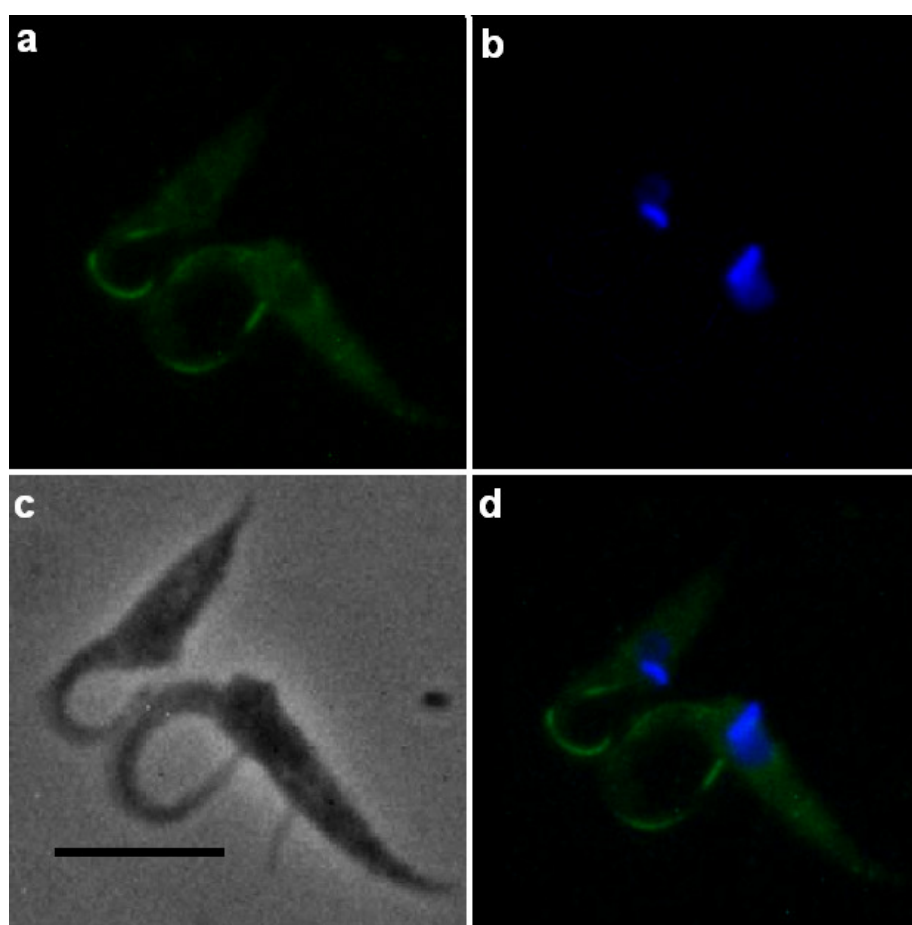


Figura 37. Localização celular das repetições H49 por imunofluorescência em epimastigotas do clone CL Brener. Reatividade com anticorpos de camundongo anti-H49 (1/20). Revelação com anticorpos-anti-imunoglobulinas de camundongo conjugado com fluoresceína (FITC) (1/50). a) anti-calpaína; b) DAPI (1/30); c) contraste de fase; d) sobreposição de anti-H49 e DAPI. As diluições dos anticorpos e DAPI estão indicadas entre parêntese. Barra=5µm.

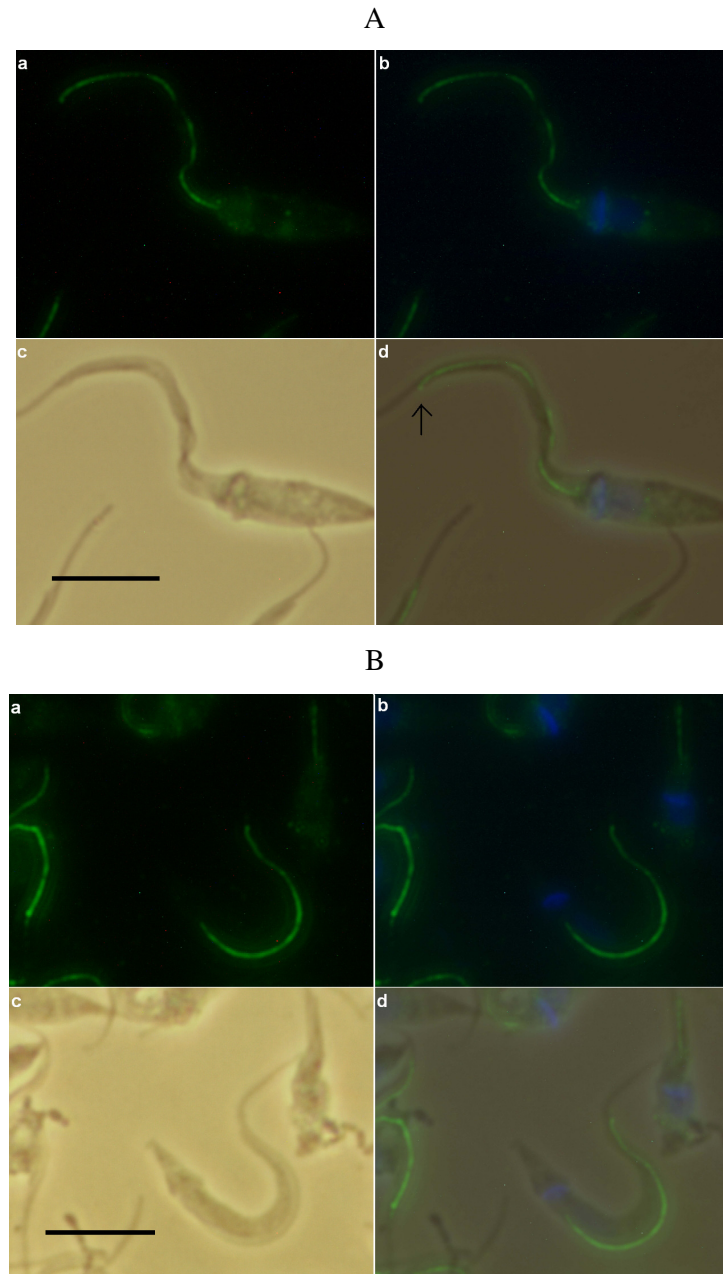


Figura 38. Localização celular das repetições H49 por imunofluorescência em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos da cepa G. Os epimastigotas (A) e tripomastigotas (B) foram tratados com Triton X-100 (0,1%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de camundongo anti-H49 (1/100). Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo Alexa 488 (1/80). a) anti-H49; b) DAPI (1/30); c) contraste de fase; d) sobreposição de anti-H49, contraste de fase e DAPI. As diluições dos anticorpos e DAPI estão indicadas entre parênteses. A seta indica o término da região FAZ. Barra=5 μ m.

4.4.8.3 Ensaios de colocalização entre as repetições H49 e o domínio catalítico Cys-Pc (calpaína A)

A figura 39 mostra os ensaios de colocalização entre a repetição H49 e o domínio Cys-Pc da calpaína. Como mostrado anteriormente, o anticorpo anti-calpaína A (Cys-Pc) reagiu com componentes do citoplasma e o anticorpo anti-H49 com a região FAZ do parasita. Os epítomos reconhecidos pelos anticorpos anti-calpaína e anti-H49 parecem estar muito próximos, mas é difícil afirmar que eles colocalizam.

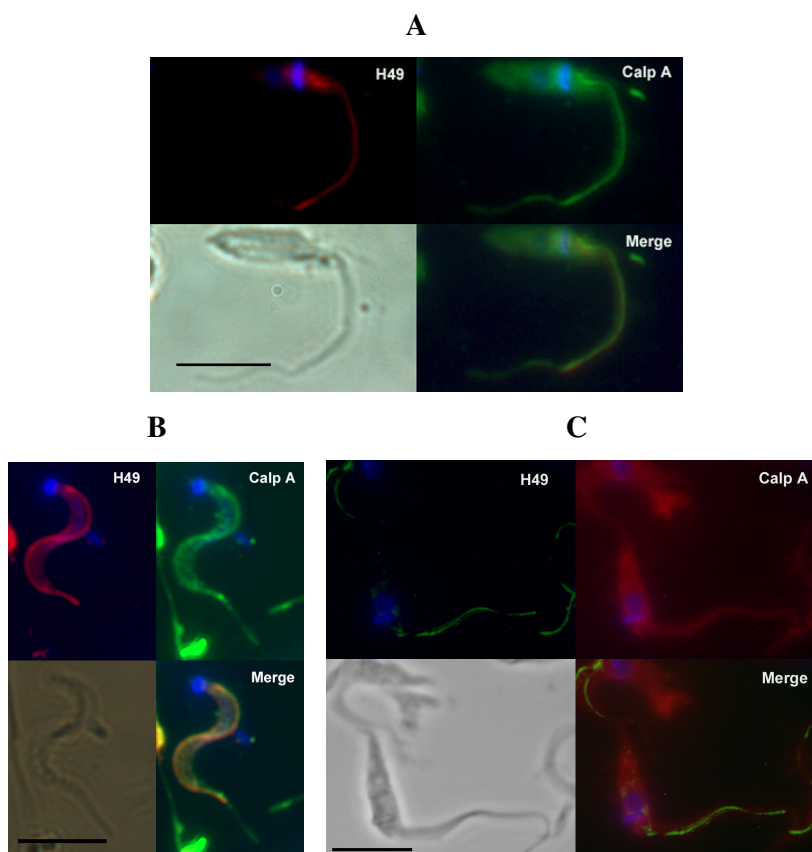


Figura 39. Imunofluorescência calpaína A e H49. Formas epimastigota (A) e tripomastigota metacíclica (B) da cepa G permeabilizados com saponina (0,1%) e fixados com paraformaldeído 2%. Foram utilizados os anticorpos: anti-H49 camundongo (1/20) e anti-calpaína coelho (1/80); anticorpos secundário anti-camundongo Cy3 (1/50) e anti-coelho FITC (1/50). C) Epimastigotas do clone CL Brener permeabilizados com Triton X-100 (0,1%). Anticorpos: anti-H49 camundongo (1/20) e anti-calpaína coelho (1/80); anticorpos secundário anti-camundongo FITC (1/50), anti-coelho Texas Red (1/80) e DAPI (1/30). As diluições dos anticorpos e DAPI estão indicadas entre parênteses. Barra=5μm.

4.4.8.4 Localização celular da Calpaína B (H49 degenerado/calpaína)

Epimastigotas permeabilizados do clone CL Brener foram incubados com anticorpos anti-calpaína B. O antissoro reagiu com componentes ao longo do flagelo, isto é, na região FAZ e na porção do flagelo que encontra-se livre na região anterior do parasita. Também foi observada fluorescência fraca, mas sem padrão definido, no citoplasma do parasita. Assim, a proteína identificada pelo anticorpo contra o H49 degenerado/calpaína, localiza-se no corpo e ao longo do flagelo (Fig. 40).

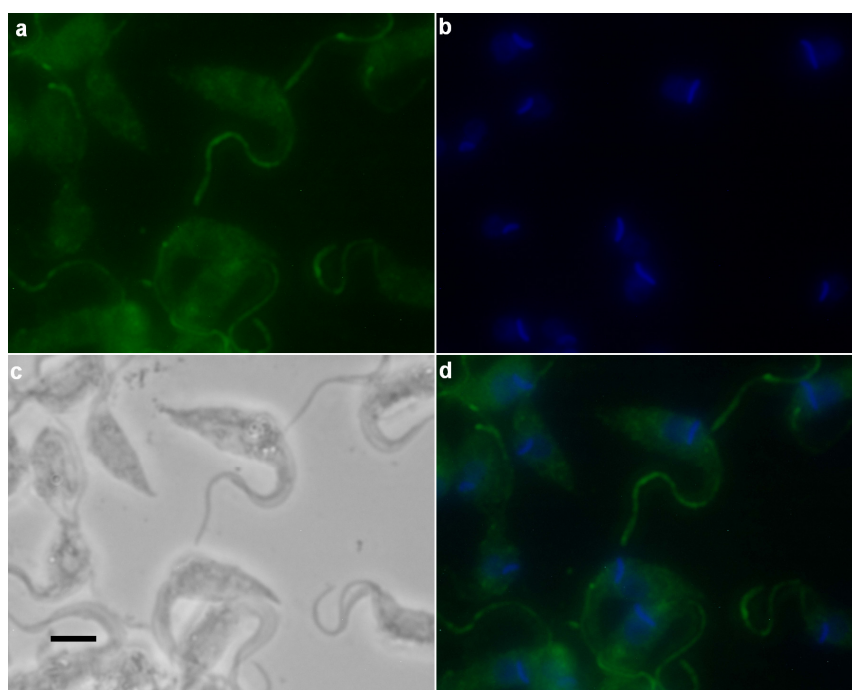


Figura 40. Localização celular da calpaína B por imunofluorescência em epimastigotas do clone CL Brener.

Os parasitas foram tratados com Triton X-100 (0,1%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de camundongo anti-calpaína B (1/20). Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo FITC (1/80). a) anti-calpaína B; b) DAPI (1/30); c) contraste de fase; d) sobreposição de anti-calpaína B, contraste de fase e DAPI. As diluições dos anticorpos e DAPI estão indicadas entre parênteses. Barra=5 μ m.

4.4.9 Localização das proteínas H49 e calpaína em citoesqueleto de epimastigotas de *T. cruzi* por imunofluorescência indireta

Com a finalidade de verificar se existe associação de H49 e calpaína ao citoesqueleto do *T. cruzi*, epimastigotas do clone CL Brener foram lisados com detergente não iônico (NP-40 ou Triton X-100) obtendo-se citoesqueletos destas formas (Material e Método 3.26.3). Após o tratamento com detergente, as proteínas solúveis foram eliminadas por lavagens sucessivas, de modo que somente as proteínas insolúveis (citoesqueleto) foram analisadas por imunofluorescência. Como mostrado nas figuras 41 (extração com Triton X-100) e 42 (extração com NP-40), os anticorpos anti-H49 identificaram a este antígeno como associado ao citoesqueleto com o padrão puntiforme, exclusivamente na região do FAZ. Ao contrário, o anticorpo anti-calpaína (Cys-Pc) reagiu com componentes do citoesqueleto do corpo e ao longo do flagelo. Padrão de marcação semelhante foi observado com o anticorpo anti-calpaína B (H49 degenerado/calpaína). Esta proteína está associada ao microtúbulos subpelviculares do corpo e do flagelo (Fig. 43). A figura 44 mostra a colocalização das calpaínas A e B em preparações de citoesqueleto de epimastigotas lisados com NP-40 (0,5%).

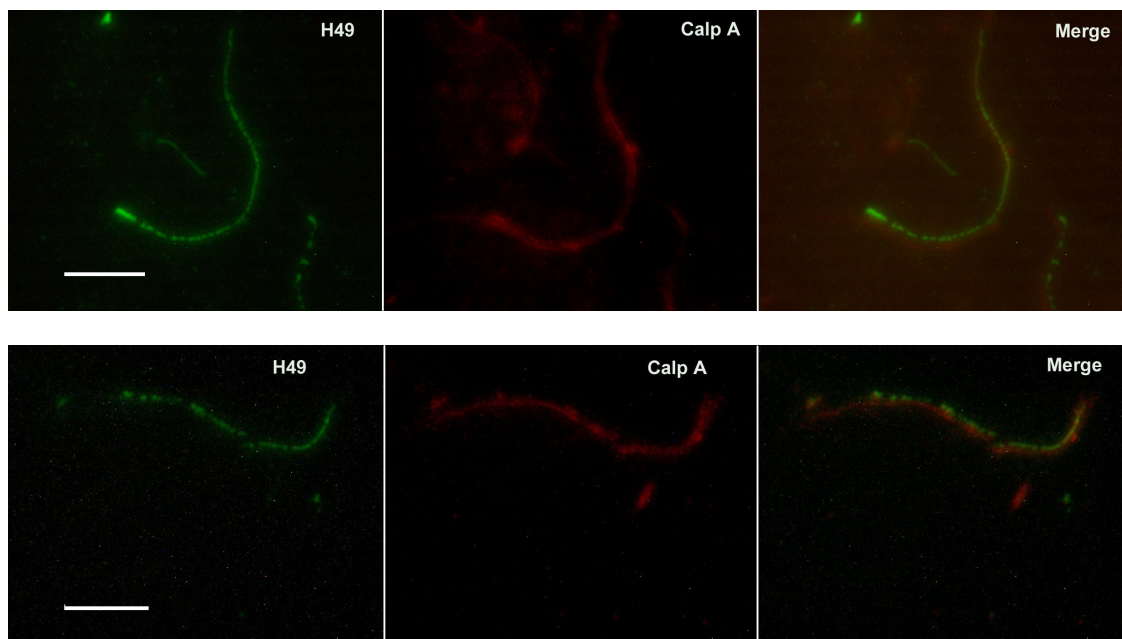


Figura 41. Localização das proteínas H49 e calpaína A em citoesqueleto de epimastigotas do clone CL Brener obtido por lise com Triton X-100. Os parasitas foram lisados com Triton X-100 (1%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de camundongo anti-H49 (1/20) e anti-calpaína A (Calp A) de coelho (1/80); sobreposição de anti-H49 e Calp A (Merge). Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo FITC (1/50) e anti-imunoglobulinas de coelho Texas Red (1/80) e DAPI (1/30). As diluições dos anticorpos estão indicadas entre parênteses. Barra=5 μ m.

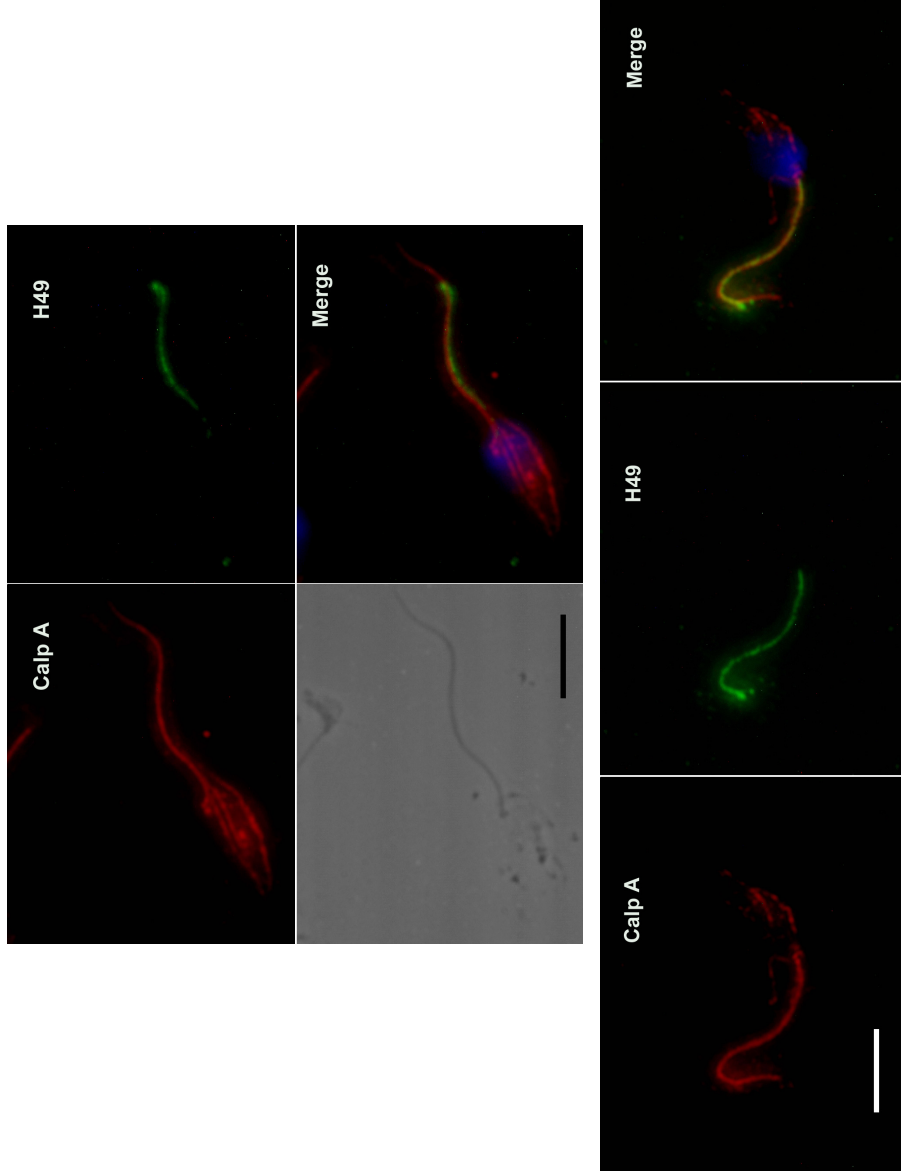


Figura 42. Localização das proteínas H49 e calpaína A em citoesqueleto de epimastigotas do clone CL Brener obtido por lise com Nonidet P-40 (NP-40). Os parasitas foram lisados com NP-40 (0,5%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de camundongo anti-H49 (1/20) e anti-calpaína A (Calp A) de coelho (1/80); sobreposição de anti-H49 e Calp A (Merge); contraste de fase da preparação. Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo Alexa 488 (1/50) e anti-imunoglobulinas de coelho Cy3 (1/50) e DAPI (1/30). As diluições dos anticorpos estão indicadas entre parênteses. Barra=5µm.

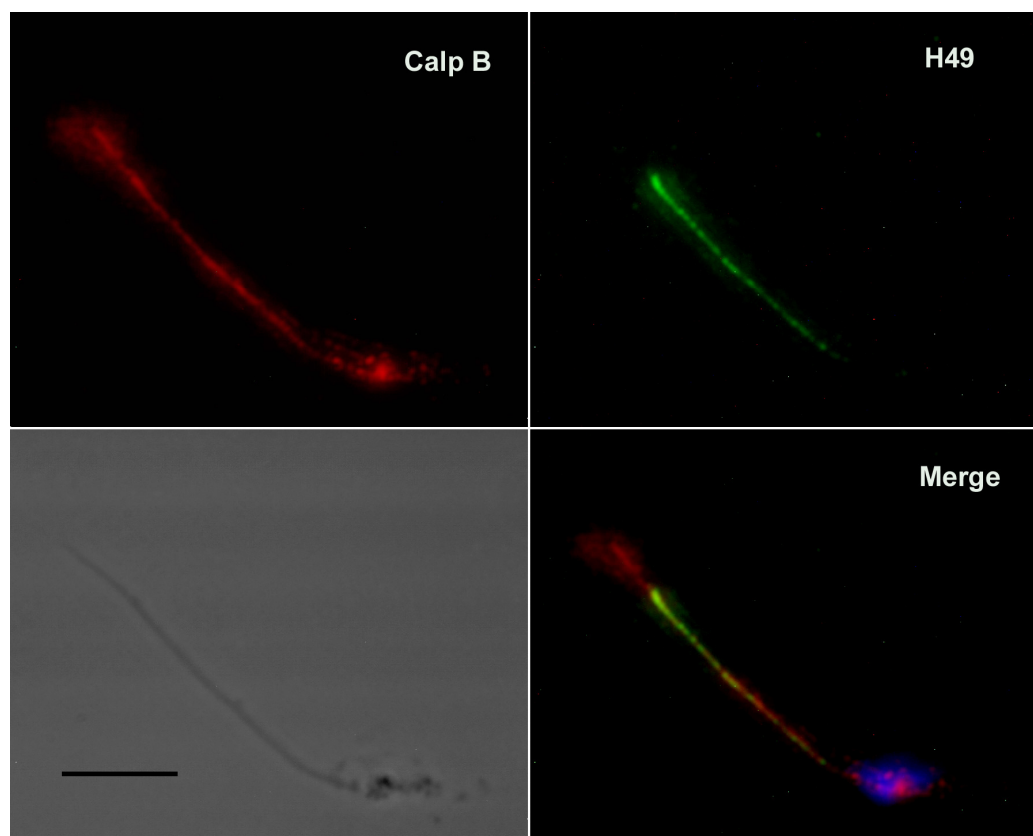


Figura 43. Localização das proteínas H49 e calpaína B em citoesqueleto de epimastigotas do clone CL Brener obtido por lise com NP-40. Os parasitas foram lisados com NP-40 (0,5%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de camundongo anti-H49 (1/20) e anti-calpaína B (Calp B) de coelho (1/80); sobreposição de anti-H49 e Calp A (Merge); contraste de fase da preparação. Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo Alexa 488 (1/50) e anti-imunoglobulinas de coelho Cy3 (1/50) e DAPI (1/30). As diluições dos anticorpos estão indicadas entre parênteses. Barra=5 μ m.

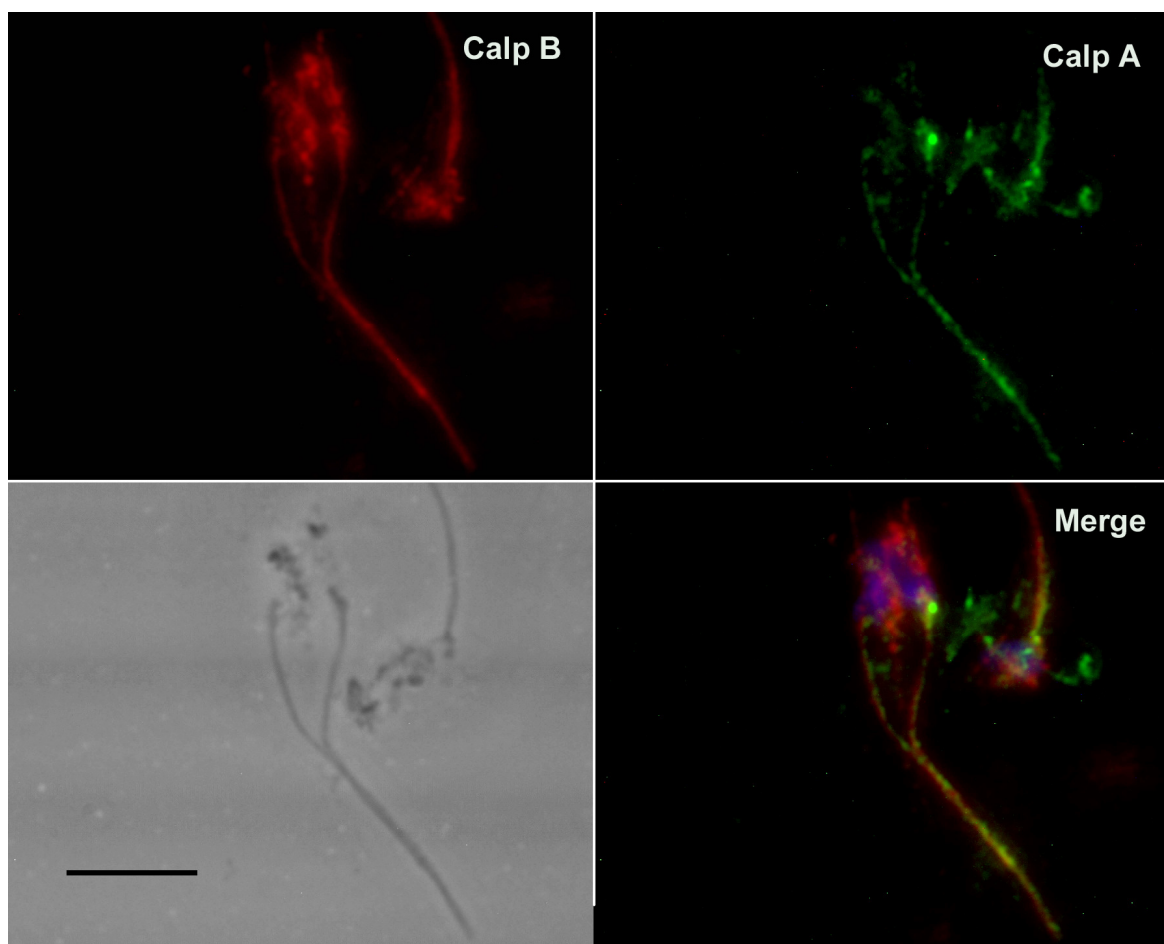


Figura 44. Localização das calpaínas A e B em citoesqueleto de epimastigotas do clone CL Brener obtido por lise com NP-40. Os parasitas foram lisados com Nonidet P-40 (0,5%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de camundongo anti-calpaína B (Calp B) (1/20) e anti-calpaína A (Calp A) de coelho (1/80); sobreposição de Calp A e Calp B (Merge); contraste de fase da preparação. Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo Alexa 488 (1/50) e anti-imunoglobulinas de coelho Cy3 (1/50) e DAPI (1/30). As diluições dos anticorpos estão indicadas entre parênteses. Barra=5 μ m.

4.4.10 Imunofluorescência indireta com marcadores da região FAZ, estrutura paraflagelar e membrana flagelar em epimastigotas do clone CL Brener

Os anticorpos monoclonais de camundongo denominados 4D9 e 1B10 (gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Renato Mortara) reconhecem a região FAZ e a estrutura paraflagelar, respectivamente. Esses dois anticorpos foram utilizados em ensaios de imunofluorescência em epimastigotas do clone CL Brener com o objetivo de confirmar a localização de calpaína e H49. O padrão de marcação com o monoclonal 4D9 foi o mesmo que com anti-H49, ambos os

antígenos estão localizados na região FAZ (Fig. 45). A calpaína A está distribuída pelo citoplasma e ao longo do flagelo (Fig. 45).

O anticorpo monoclonal denominado CBP (*Calcium Binding Protein*), obtido por Engman *et al.* (1989) e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Sérgio Schenkman, reconhece uma proteína ligante a cálcio no flagelo de *T. cruzi*. Ao comparar os padrões de fluorescência das proteínas H49 e CBP (*Calcium Binding Protein*) observamos diferenças notórias. A CBP está localizada na membrana do flagelo, a marcação se estende desde da bolsa flagelar até a porção final do flagelo (Fig. 46). Por outro lado, o antígeno H49 é encontrado exclusivamente na região do FAZ e não apresenta padrão de marcação de membrana como CBP. A imunofluorescência com calpaína corrobora a localização no citoplasma e ao longo do flagelo. Ela também não apresenta um padrão de marcação de membrana (Fig. 46).

O anticorpo 1B10 marca a estrutura paraflagelar que acompanha o axonema no interior do flagelo. Este padrão de fluorescência é diferente do observado com os anticorpos anti-H49 e calpaína, indicando que o H49 e calpaína não se encontram associados à estrutura paraflagelar (Fig. 47).

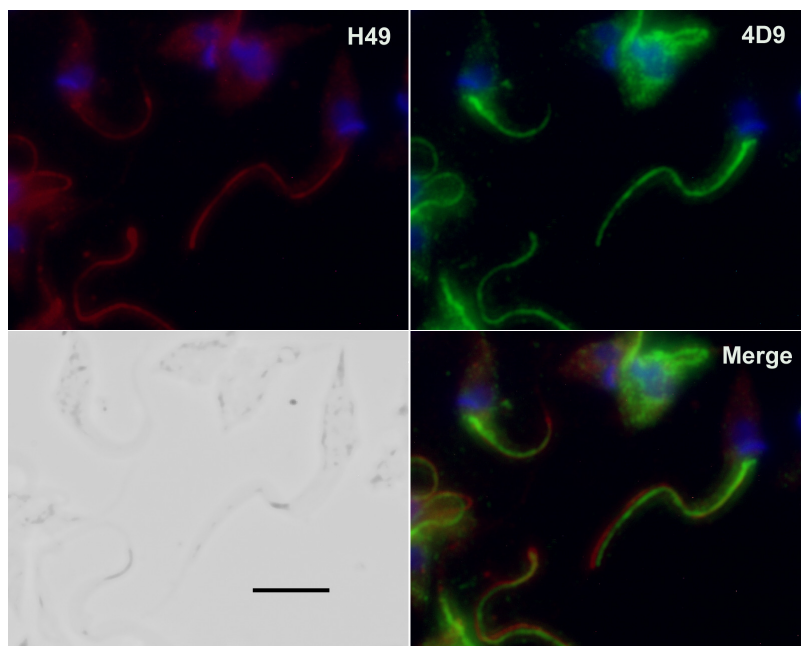


Figura 45. Imunofluorescência com um marcador específico (anticorpo monoclonal 4D9) da estrutura FAZ de *T. cruzi*. Epimastigotas do clone CL Brener foram tratados com Triton X-100 (0,1%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de camundongo anti-calpaína A (Calp A) (1/100); anticorpo monoclonal 4D9 (1/30); anticorpos de coelho anti-H49 (1/200); sobreposição entre os diferentes antígenos (Merge); contraste de fase. Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo FITC (1/80) e anti-imunoglobulinas de coelho Texas Red (1/80) e DAPI (1/80). As diluições dos anticorpos estão indicadas entre parênteses. Barra=5µm.

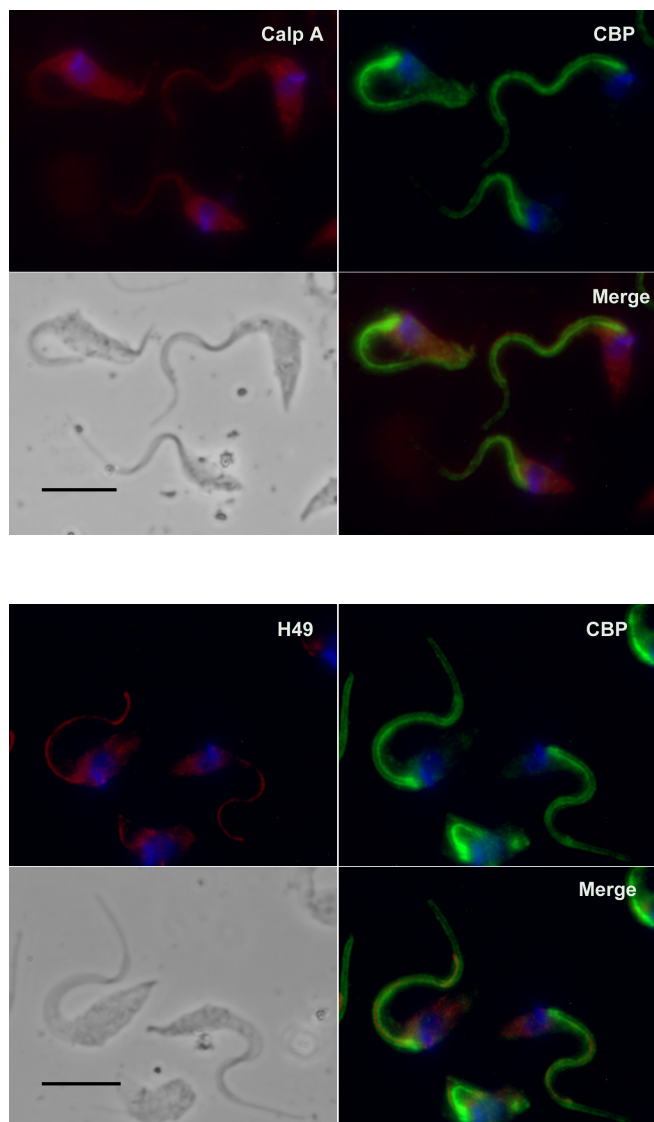


Figura 46. Imunofluorescência com marcador de flagelo (CBP, *Calcium Binding Protein*) de *T. cruzi*. Epimastigotas do clone CL Brener foram tratados com Triton X-100 (0,1%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de coelho anti-calpaína A (Calp A) (1/100); anticorpo monoclonal CBP (1/30); anticorpos de coelho anti-H49 (1/200); sobreposição entre os diferentes antígenos (Merge); contraste de fase. Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo FITC (1/80) e anti-imunoglobulinas de coelho Texas Red (1/80) e DAPI (1/80). As diluições dos anticorpos estão indicadas entre parênteses. Barra=5 μ m.

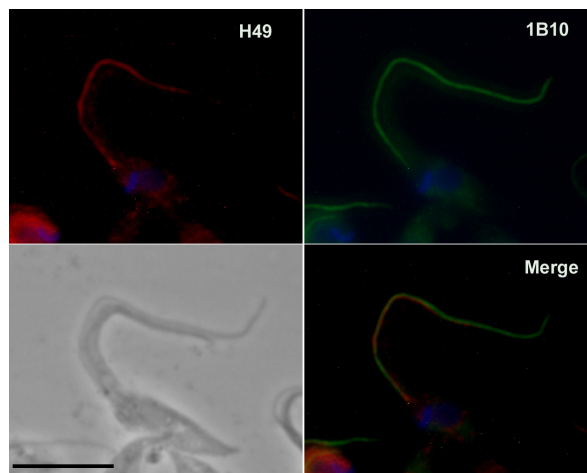


Figura 47. Imunofluorescência com marcador da região paraflagelar (anticorpo monoclonal 1B10) do flagelo de *T. cruzi*. Epimastigotas do clone CL Brener foram tratados com Triton X-100 (0,1%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de coelho anti-H49 (1/200); anticorpo monoclonal 1B10 (1/30); sobreposição entre os diferentes antígenos (Merge); contraste de fase. Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo FITC (1/80), anti-imunoglobulinas de coelho Texas Red (1/80) e DAPI (1/30). As diluições dos anticorpos estão indicadas entre parênteses. Barra=5 μ m.

4.4.11 Imunofluorescência indireta de marcadores para FAZ, estrutura paraflagelar e membrana flagelar em mutantes da GP72

Mutantes nulos (cepa Y) da glicoproteína de 72 kDa (GP72), obtidos por Cooper *et al.* (1993) e gentilmente cedidos pela profa. Dra. Tecia Carvalho, foram analisados por imunofluorescência com anticorpos contra componentes do FAZ, estrutura paraflagelar, membrana do flagelo, H49 e calpaína. Os parasitas mutantes apresentam uma morfologia surpreendente, o flagelo emerge desde a bolsa flagelar, mas não se adere ao corpo, portanto, não existe a região de aderência.

Com os anticorpos 4D9, 1B10 e CBP analisamos se houve mudanças na estrutura da região do FAZ, a estrutura paraflagelar e membrana do flagelo com relação à localização de H49 e calpaína.

A imunomarcação com o anticorpo anti-H49 mostrou que o antígeno H49 está localizado ao longo do flagelo e no corpo dos parasitas mutantes (Fig. 48). É importante salientar que em parasitas não mutantes, o H49 marca somente na região do FAZ e não foi observada

fluorescência no corpo. Com anticorpos contra o domínio catalítico da calpaína (CalpA) foi observada fluorescência no corpo e não foi detectada marcação, nem mesmo fraca, no flagelo do parasita mutante (Fig. 48). Com o anticorpo anti-calpaína B (H49 degenerado/calpaína) foram observadas diferenças notórias entre parasitas mutantes e não mutantes. Observamos um curioso padrão segmentado na porção final do flagelo e fluorescência fraca no corpo (Fig. 49).

O anticorpo 4D9, que reage com um componente localizado ao lado do corpo em parasita normais, apresentou um padrão de marcação restrito ao bolso flagelar no mutante (Fig. 50). Por outro lado, os anticorpos 1B10 e CBP que reconhecem a estrutura paraflagelar e membrana do flagelo, respectivamente, não apresentaram mudanças no padrão de fluorescência quando comparado aos parasitas não mutantes (Figs 51 e 52).

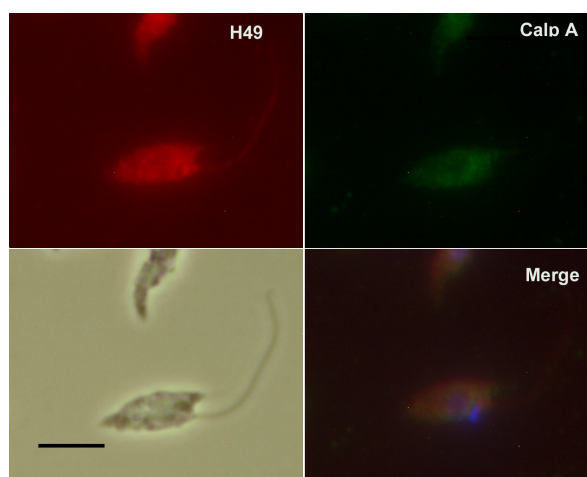


Figura 48. Localização das proteínas H49 e calpaína A em mutantes do gene GP72 por microscopia de epifluorescência. Epimastigotas da cepa Y foram permeabilizados com Triton X-100 (0,1%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de coelho anti-H49 (1/200) e anti-calpaína A (Calp A) de camundongo (1/30); sobreposição de anti-H49 e Calp A (Merge); contraste de fase. Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo FITC (1/50) e anti-imunoglobulinas de coelho Texas Red (1/50) e DAPI (1/30). As diluições dos anticorpos estão indicadas entre parênteses. Barra=5 μ m.

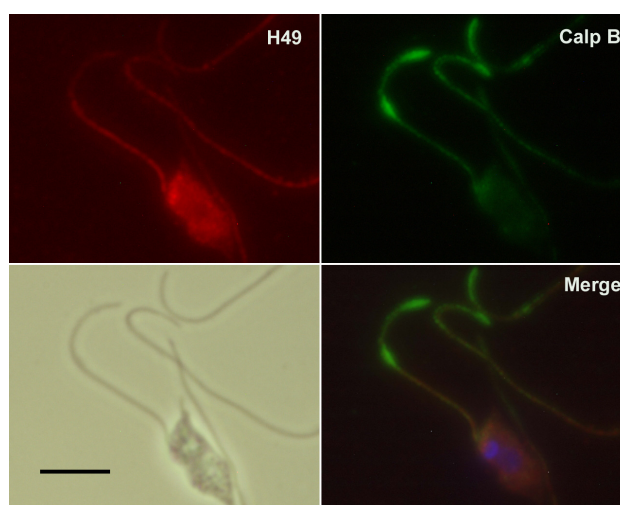


Figura 49. Localização das proteínas H49 e calpaína B em mutantes do gene GP72 por microscopia de epifluorescência. Epimastigotas da cepa Y foram permeabilizados com Triton X-100 (0,1%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de coelho anti-H49 (1/200) e anti-calpaína B (Calp B) de camundongo (1/30); sobreposição de anti-H49 e Calp B (Merge); contraste de fase. Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo FITC (1/50) e anti-imunoglobulinas de coelho Texas Red (1/50) e DAPI (1/30). As diluições dos anticorpos estão indicadas entre parênteses. Barra=5 μ m.

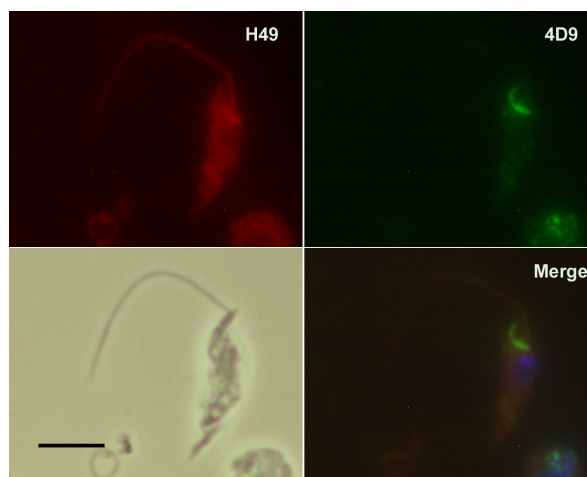


Figura 50. Localização da proteína H49 e de componentes da região FAZ em mutantes do gene GP72 por microscopia de epifluorescência. Epimastigotas da cepa Y foram permeabilizados com Triton X-100 (0,1%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de coelho anti-H49 (1/200) e anticorpo monoclonal 4D9 (1/50), específico para a região FAZ; sobreposição de anti-H49 e 4D9 (Merge); contraste de fase. Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo FITC (1/50) e anti-imunoglobulinas de coelho Texas Red (1/50) e DAPI (1/30). As diluições dos anticorpos estão indicadas entre parênteses. Barra=5 μ m.

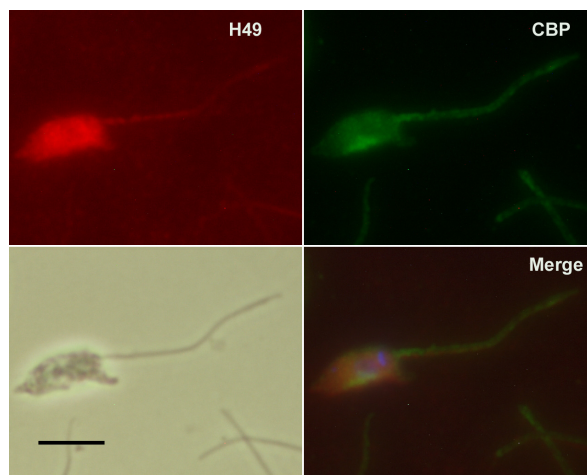


Figura 51. Localização das proteínas H49 e CBP (*Calcium Binding Protein*) em mutantes do gene GP72 por microscopia de epifluorescência. Epimastigotas da cepa Y foram permeabilizados com Triton X-100 (0,1%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de coelho anti-H49 (1/200) e anticorpo monoclonal anti-CBP (1/50), específico para a região FAZ; sobreposição de anti-H49 e CBP (Merge); contraste de fase. Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo FITC (1/50) e anti-imunoglobulinas de coelho Texas Red (1/50) e DAPI (1/30). As diluições dos anticorpos estão indicadas entre parênteses. Barra=5 μ m.



Figura 52. Localização da proteína H49 e de componentes da estrutura paraflagelar em mutantes do gene GP72 por microscopia de epifluorescência. Epimastigotas da cepa Y foram permeabilizados com Triton X-100 (0,1%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de coelho anti-H49 (1/200) e anticorpo monoclonal 1B10 (1/50), específico para a região paraflagelar; sobreposição de anti-H49 e 1B10 (Merge); contraste de fase. Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo FITC (1/50) e anti-imunoglobulinas de coelho Texas Red (1/50) e DAPI (1/30). As diluições dos anticorpos estão indicadas entre parênteses. Barra=5 μ m.

No presente trabalho, prosseguimos o estudo do gene H49 iniciado nos anos 90. Na época, a caracterização molecular do gene que codifica o antígeno imunodominante H49, mostrou que ele é composto de repetições em tandem de 204 pb (68 aa), está presente em pequeno número de cópias, localizadas nos cromossomos XVI e XVII. O tamanho do transcrito H49 é de cerca de 8 Kb, suficiente para codificar uma proteína de massa molecular >240 kDa. Adicionalmente, estudos de microscopia eletrônica mostraram que o antígeno H49 está associado ao citoesqueleto na região de aderência entre o flagelo e o corpo do parasita.

Por outro lado, foi visto que o antígeno H49 reage com anticorpos presentes no soro de pacientes chagásicos crônicos, por esse motivo pode ser utilizado em testes sorodiológicos para a doença de Chagas. A intensa reatividade do antígeno com os anticorpos de pacientes chagásicos é devido à presença de repetições de aminoácidos altamente conservadas. O antígeno H49 é encontrado em todas as formas de vida do parasita, presumindo-se que ele tenha importante função biológica ainda não claramente estabelecida.

Essas informações e os dados do sequenciamento do genoma de *T. cruzi* foram aproveitados na tentativa de compreender a função biológica do H49. A repetição de 68 aa do antígeno H49 foi comparada com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI utilizando o programa Blastp. Verificamos que a repetição H49 está inserida nos genes de calpaína-like e calpaína-cisteína peptidases de *T. cruzi* (Fig. 9).

A relação entre as repetições H49 e calpaína foi estudada sob dois aspectos: 1) organização genômica por análise informática, *Southern blotting*, *chromoblotting* e amplificação por PCR de seqüências calpaína e H49 em DNA genômico, cDNA e clones de YACs; 2) localização celular da proteína H49/calpaína por imunofluorescência indireta no parasita e análise da tradução por *western blotting*. A discussão apresentada a seguir foi estruturada de acordo com estes dois tópicos. Finalmente, propomos um modelo sobre a função dos genes H49/calpaína considerando as informações coletadas.

5.1 Estrutura e organização dos genes H49/calpaína

Dos alinhamentos utilizando diferentes programas de BLAST com a seqüência de nucleotídeos ou de aminoácidos da repetição H49 (Tabela 2) foram escolhidos os alinhamentos

gerados pelo programa tblastn que inclui as 8 calpaínas que possuem a repetição H49 (Fig. 11). Os genes calpaínas contendo a repetição H49 foram denominados H49/calpaínas.

A análise de 84 alinhamentos gerados por tblastn permitiu agrupar as seqüências H49 presentes nas calpaínas em dois grupos denominados arbitrariamente de H49 conservado (identidade superior a 80%) ou de degenerado (identidade inferior a 80%) com relação à seqüência H49 caracterizada por Cotrim *et al.* (1990). A maior parte das repetições corresponde à repetição H49 degenerada (61/84) com identidade de 40-60% (Fig. 8). As informações disponíveis não permitem inferir se as repetições conservadas derivam das degeneradas ou vice-versa. Porém, sabemos que a conversão gênica ocorre em tripanossomas, este mecanismo genético poderia explicar a diminuição de identidade com a seqüência original.

Anteriormente, não tinha sido descrito na literatura a presença e distribuição da repetição H49, seja ela conservada ou degenerada, em genes anotados como calpaína em *T. cruzi* CL Brener. Utilizando o programa blastn foi visto que em três (XM_799896; XM_797463; XM_799016) das oito calpaínas estudadas, a repetição H49 conservada (identidade de 90-100%), está situada em uma das extremidades do contig (Fig. 10). É possível que as calpaínas (XM_797463 e XM_799896) sejam parte do mesmo gene, mas devido à presença de repetições conservadas nas extremidades os *contigs* não foram sobrepostos.

O restante das seqüências H49/calpaínas (85%) depositadas no banco de dados apresenta a repetição H49 degenerada amplamente distribuída nas H49/calpaínas (Fig. 8). No gene H49/calpaína (XM_804900), que codifica uma proteína de 520 kDa, as repetições degeneradas estão localizadas na região central da molécula, sendo flanqueadas por domínios Cys-Pc (Fig. 11). Em *T. brucei*, a distribuição das repetições degeneradas é similar a de *T. cruzi*. Identificamos por tblastn (*query*, repetição H49 conservada) dois genes calpaínas-like (XM_823109 e XM_823111) que codificam proteínas de massa molecular 658 e 661 kDa, respectivamente, e outro gene calpaína (XM_823110) que codifica uma proteína de 158 kDa. A organização dos domínios II e das repetições degeneradas no gene XM_823109 de *T. brucei* é similar ao gene H49/calpaína (XM_804900), provavelmente, trata-se de genes ortólogos.

As calpaínas clássicas possuem seis domínios característicos, quatro na subunidade de 80 kDa e dois na subunidade de 28 kDa. A atividade catalítica é determinada pela presença da triade catalítica (CHN) presente no domínio II (Cys-Pc) e pelos motivos *EF-hand* que se ligam a

cálcio, presentes no domínio IV (Goll *et al.*, 2003). As calpaínas que diferem desta configuração são anotadas como “*calpain-like*” (CALP) (Ono *et al.*, 1998a).

As oito H49/calpaínas de *T. cruzi* podem ser classificadas como *calpain-like* (CALP), porém, duas delas (XP_804109 e XP_804989) estão anotadas como “*calpain cysteine peptidase, putative*”. É interessante notar que a proteína XP_804989 (Tc00.1047053511441.10) foi classificada como CALP no trabalho de Ersfeld *et al.* (2005).

Considerando a classificação de Ersfeld *et al.* (2005), seis das H49/calpaínas, apresentam o domínio I e o domínio heterogêneo (Dom I^H) maior do que 18 a 20 aa, mas não apresentam motivos de acilação. Calpaínas com essas características não tinham sido identificadas no trabalho de Ersfeld *et al.* (2005). Portanto, nós propomos incluir nesta classificação, esse novo grupo de calpaínas que apresenta somente o domínio I^H. O domínio I^H é composto principalmente por repetições H49 degeneradas. A proteína (XP_804109) apresenta repetições H49 conservadas na região carboxi-terminal. As outras H49/calpaínas (XP_809993 e XP_804989) não apresentam o domínio I.

Duas H49/calpaínas (XP_806304 e XP_814332) poderiam ser classificadas como do grupo 2 (I^H,II,III,C), mas apresentam repetições H49 degeneradas no domínio I^H. A proteína XP_804989 foi identificada e classificada no grupo 5 (R,II,C) por Ersfeld *et al.* (2005). Porém, esta sequência foi atualizada no GenBank do NCBI, incorporando-se um domínio III depois do domínio II (região em aa 941-1075). Em Junho de 2009, essa alteração foi anulada restando apenas o domínio II (Cys-Pc). A proteína XP_809993 foi classificada por Ersfeld *et al.* (2005) no grupo 4 (II,III,II,III,R,II,III,C), porém, a sequência depositada no GenBank não apresenta as duas cópias do domínio III localizadas antes das repetições (figura 11).

O alinhamento do domínio II das calpaínas em *T. cruzi* (Fig. 14), incluindo as H49/calpaínas, mostrou que este domínio é conservado, porém a tríade catalítica (CHN) não se encontra intacta. Não é sabido se calpaínas com a tríade modificada possuem atividade proteásica ou se elas tem outras funções ainda não conhecidas (Goll *et al.*, 2003; Ersfeld *et al.*, 2005; Croall e Ersfeld, 2007). A existência de outras calpaínas em *T. cruzi* que não possuem a repetição H49 sugere que elas exerçam funções diferentes. A árvore filogenética construída com os domínios catalíticos Cys-Pc das calpaínas com ou sem a repetição H49 mostrou que as

sequências H49/calpaínas formam um grupo distinto (bootstrap 100%), sugerindo que isto tenha a ver com uma função diferente exercida por estas proteínas.

Como descrita por Ersfeld *et al.* (2005), identificamos a presença do motivo KAYAK no domínio II em todas as proteínas. O motivo KAYAK, não tem função conhecida, está conservado nas quatro H49/calpaínas que possuem domínio II, que constituem um grupo distinto na reconstrução filogenética (Fig. 17). É interessante notar que os três domínios II (Cys-Pc) encontrados na proteína H49/calpaína (XP_809993) apresentam divergências entre si que fazem que na reconstrução filogenética elas fiquem em diferentes ramos. Isto reforça a idéia da ocorrência de múltiplos eventos de duplicação genética, sugerindo a idéia de um ancestral comum contendo o domínio II das H49/calpaínas de *T. cruzi* (Ersfeld *et al.*, 2005).

O domínio III é similar entres as calpaínas, sugerindo uma função reguladora da atividade catalítica da proteína por meio de algum mecanismo independente de motivos *EF-hands*. Tem sido sugerido que o domínio III interage com a membrana plasmática, uma etapa imprescindível na ativação das calpaínas (Molinari e Carafoli, 1997; Strobl *et al.*, 2000; Moldoveanu *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2004).

A arquitetura e função das calpaínas são variadas e complexas. A existência de calpaínas com diferentes domínios (calmodulina, SOHL, etc) e isoformas (CANP3, micro e mili-calpaína, etc) é um indicativo da complexa evolução destas proteínas. A organização dos domínios nas H49/calpaínas (I^H,R; I^H,R,II,III,C; II,II,R,II,III,C; R,II,C) mostra a complexidade das calpaínas de *T. cruzi* (Goll *et al.*, 2003); Ono *et al.*, 1998a; Ersfeld *et al.*, 2005). As repetições H49 poderiam ser consideradas como um domínio adicional nas calpaínas. A importância e presença destas repetições serão discutidas no modelo proposto, para explicar a função biológica de H49/calpaínas.

Os genes H49/calpaínas estão agrupados em três *scaffolds*: NW_001849559.1 contendo 5 genes H49/calpaínas, NW_001849411.1 com 2 cópias e NW_978564.1 com um gene H49/calpaína. Os genes H49/calpaína estão agrupados e restritos a dois cromossomos homólogos ou em um único cromossomo como acontece em *T. brucei* e *L. major* (Ersfeld *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos por *chromoblotting* confirmam a análise do banco de dados. As quatro sondas utilizadas: H49, calpaína, H49 conservado/calpaína e H49 degenerado/calpaína

hibridizaram nas mesmas bandas cromossômicas XVII e XVI do clone CL Brener indicando que os genes H49/calpaína devem estar agrupados e restritos a um ou a dois cromossomos homólogos de tamanhos diferentes (Fig. 23).

A presença dos genes H49/calpaína, de outras calpaínas e de proteína *radial spoke* no mesmo locus em *T. cruzi*, talvez, tenha algum significado biológico. Como visto nos estudos de imuno fluorescência, as H49/calpaínas estão localizadas na região do FAZ e a proteína *radial spoke* está localizada no axonema ao interior do flagelo. Sabe-se que a transcrição dos genes em *T. cruzi* é policistrônica (Donelson *et al.*, 1999), embora os transcritos não estejam obrigatoriamente envolvidos em uma mesma função celular, é possível que os genes H49/calpaínas e os genes localizados na região, cumpram alguma função relacionada com o flagelo.

A amplificação de diferentes fragmentos dos genes H49/calpaína por PCR em DNA genômico, cDNA e clones de YACs, mostrou que existem genes de H49/calpaína com repetições de H49 conservadas e degeneradas no genoma de *T. cruzi*, confirmando a informação obtida por análise bioinformática.

No DNA genômico de epimastigotas do clone CL Brener foram amplificadas sequências de 500 e 1000 pb contendo o domínio catalítico (Cys-Pc) ou da região contendo a repetição H49 degenerada (Fig. 18). Em cDNA de epimastigotas de CL Brener foram amplificadas as regiões citadas acima como também a região contendo a repetição H49 conservada presentes nos genes XM_799016 e XM_799896 (Fig. 19). A importância deste resultado é confirmar que as proteínas H49/calpaína com repetições conservadas ou degeneradas são efetivamente transcritas. O fato de não amplificarmos a região contendo a repetição conservada mais a calpaína em DNA genômico pode ser devido ao fato do iniciador H49 ligar-se a várias repetições dificultando a amplificação.

Nos YACs Y₉H₈ e Y₇H₈ derivados das bandas cromossômicas XVI e XVII do clone CL Brener, respectivamente, conseguimos amplificar a região catalítica (Cys-Pc) das calpaínas (Fig. 20). Dado que ambos os clones possuem a repetição H49, estes resultados sugerem que eles estão relacionados às calpaínas e confirmam que os genes H49/calpaínas estão localizados nas bandas XVI e XVII como mostrado por hibridização com as bandas cromossômicas.

O padrão de hibridização da sonda de H49 com o DNA genômico de *T. cruzi* (Fig. 21 B) foi semelhante ao encontrado por Cotrim *et al.* (1995) e Santos *et al.* (1999). A sonda hibridizou

com 2 bandas de ~23 kb e 9 kb, resultantes de digestão com as enzimas *EcoRI*, *KpnI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *RsaI* e *Hinfi*, e várias bandas menores que 2 kb quando foi utilizada a enzima *TaqI*. Verificamos que as bandas geradas por *TaqI* apresentam padrão em escada (204 pb do H49) mostrado por Cotrim *et al.* (1995). Este padrão confirma a distribuição em tandem das repetições H49 uma vez que elas apresentam um sítio interno para enzima *TaqI*. Ao comparar o autoradiograma obtido com a sonda H49 com os dados *in silico* (ver Fig. II.2, Anexo II), verificamos que o tamanho das bandas obtidas *in silico* são menores que 9 kb com todas as enzimas utilizadas, inclusive com *EcoRI*. Estas bandas estão presentes nos *scaffolds* NW_001841559.1 e NW_918654.1. No primeiro *scaffold* estão presentes bandas para todas as enzimas de restrição utilizadas e no segundo *scaffold* as enzimas *KpnI* e *EcoRV* não apresentam sítios de restrição.

A sonda calpaína (Cys-Pc) hibridizou intensamente com um fragmento *EcoRI* de ~1 kb e com menor intensidade com uma banda de ~20 kb (Fig. 21C). Com as enzimas *KpnI* e *EcoRV* foram detectadas bandas de ~20 kb e uma banda de ~2 kb. Com as enzimas *HaeIII*, *RsaI* e *Hinfi* foram identificadas várias bandas menores de 2 kb, e uma banda adicional de 20 kb na digestão com *Rsa I*. Ao comparar o autoradiograma com os dados *in silico* (Fig.II.1, Anexo II), verificarmos uma razoável concordância entre eles. *In silico* foram detectadas algumas bandas de menor tamanho que pertencem ao *scaffold* NW_001849559.1. O *scaffold* NW_001849411.1, que contém a repetição H49 degenerada, contém as bandas detectadas pela sonda Cys-Pc. Além disso, devemos considerar que a sonda Cys-Pc também hibridiza com seqüências de outros genes calpaína que não contém a repetição H49.

Os dados da hibridização e da análise *in silico* revelam que as repetições H49 conservadas não apresentam sítios internos para as enzimas *EcoRI*, *KpnI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *RsaI* e *Hinfi*. Estes resultados sugerem que as repetições H49 conservadas estão organizadas em tandem de tamanho razoável. Este arranjo dificulta enormemente o sequenciamento completo do gene H49/calpaína. Podemos notar que o único gene H49/calpaína completo (XM_804900, 13.716 nucleotídeos) apresenta as repetições H49 degeneradas. Por outro lado, fica evidente que a sonda H49, nas condições de hibridização utilizadas, não hibridiza com as repetições H49 degeneradas.

Diante do exposto, verificamos que não é simples comparar os contigs de seqüências com os resultados de hibridização, uma vez que ainda não dispomos de um gene H49/calpaína completo, contendo repetições H49 conservadas. Gostaríamos de sugerir que o contig

AAHK01004515.1, que contém a região amino-terminal de um gene H49/calpaína (XM_797463), poderia ser sobreposto ao contig AAHK01002163.1, que contém a região carboxi-terminal de outro gene H49/calpaína (XM_799896).

A sobreposição destes 2 contigs pela região contendo a repetição H49 conservada, reproduziria um gene H49/calpaína completo mostrado na figura 53.

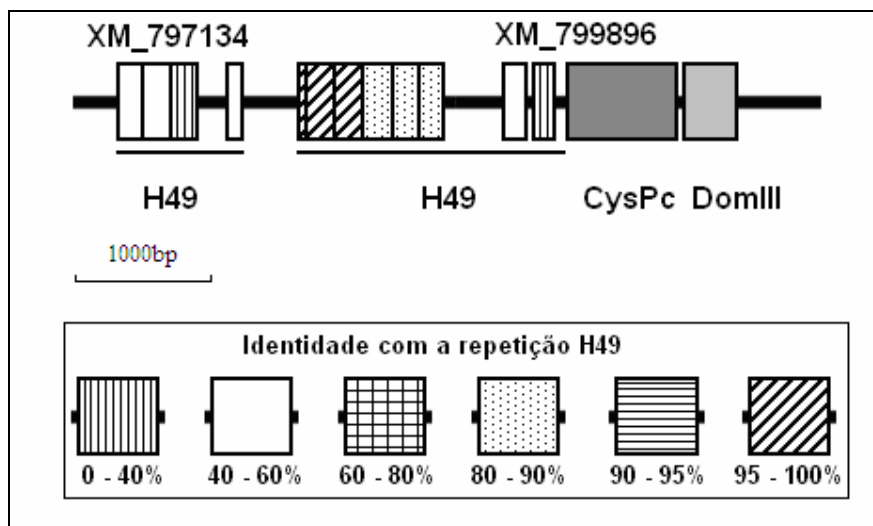


Figura 53. Sobreposição dos contigs AAHK01004515.1 (XM_797463) e AAHK01002163.1 (XM_799896) na região contendo a repetição H49 conservada.

O perfil de hibridização da sonda contendo a repetição H49 conservada e parte da sequência de calpaína (Fig. 21 D) é a combinação dos radiogramas anteriores (Fig. 21 B e C). É interessante notar a hibridização da sonda com vários fragmentos de tamanho inferior a 2 kb, derivados da digestão com *HaeIII*, *RsaI* e *HinfI*. Estes fragmentos contêm sequências da região não repetitiva do gene H49/calpaína.

O perfil de hibridização da sonda contendo seqüências H49 degenerado e calpaína (Fig.22) com o DNA genômico de CL Brener difere dos mostrados anteriormente (Fig. 21). Pode-se notar o desaparecimento de uma banda de 23 kb obtida pela digestão com *EcoRI*, *HaeIII*, *RsaI* ou *HinfI*, que reagiu fortemente com as sondas contendo a repetição H49 conservada e o domínio catalítico II (Cys-Pc). Algumas das bandas obtidas pela digestão com *EcoRI* que hibridizaram com a sonda H49 degenerado/calpaína também foram detectadas *in silico* (II.5).

Conforme citado anteriormente, a comparação entre os dados de restrição *in silico* com os de hibridização não é uma tarefa simples, uma vez, que nem todas as seqüências H49/calpaínas estão representadas no banco de dados. Além disso, a presença de repetições no interior destas seqüências dificulta a reconstituição dos genes completos por sobreposição dos contigs.

5.2 Expressão e localização celular das proteínas H49/calpaínas

O primeiro passo no estudo da localização celular de proteínas H49/calpaína foi a clonagem e expressão de três proteínas recombinantes que representam diferentes regiões das proteínas H49/calpaína: o domínio catalítico (Cys-Pc), as repetições H49 conservadas e degeneradas (Fig. 24 a 28). A proteína GST/H49 é solúvel, dado que as repetições H49 são formadas por aminoácidos com cadeias laterais hidrofílicas (Cotrim *et al.*, 1990); a proteína GST/calpaína B, apesar de ser formada por repetições degeneradas é insolúvel do mesmo modo que GST/calpaína A.

A região catalítica (Cys-Pc) da H49/calpaína (XP_804989) foi escolhida para ser expressa em fusão com GST, porque o alinhamento dos domínios catalíticos Cys-Pc das H49/calpaína, mostrou que ele é altamente conservado entre elas (Fig. 16) e apresenta baixa identidade com domínios catalíticos (Cys-Pc) de outras calpaínas que não tem a repetição H49, presentes no genoma de *T. cruzi* (Fig. 14). Por outro lado, decidimos trabalhar com a região H49 degenerado/calpaína porque nos interessava saber se a proteína H49/calpaína (XP_809993) de massa molecular 520 kDa, era expressa e qual era sua localização no parasita. A expressão de GST/H49 foi necessária nos estudos de co-localização das proteínas H49/calpaínas e será discutido mais adiante.

As proteínas recombinantes purificadas (Fig. 29 e 30) foram utilizadas como imunógenos em camundongos e coelhos para obter anticorpos policlonais contra as regiões de interesse, que foram utilizados na caracterização de H49/calpaínas. A reatividade de cada um dos soros foi testada contra as respectivas proteínas recombinantes (Fig. 31) confirmando a reatividade e especificidade. Os anticorpos policlonais de coelho contra calpaína B (repetição H49 degenerada/calpaína) reagiram fracamente com a proteína recombinante H49, tal como mostrado por *western blotting* (Fig. 32 A) e *dot blotting* (Fig. 32 B e C), provavelmente devido à baixa identidade com a repetição conservada (42 a 47%). Este resultado sugere que as proteínas

H49/calpaína contendo repetição conservada ou degenerada são da mesma família, mas proteínas distintas.

Como mostrado no *western blotting* da fração de citoesqueleto, os anticorpos anti-H49 reconheceram duas bandas de alto tamanho molecular de aproximadamente 240 kDa. Cotrim *et al.* (1990) mostraram que essas bandas com soro de pacientes chagásicos crônicos. Em *T. brucei*, Vaughan *et al.* (2008), mostraram que a proteína FAZ1, que contém 36 repetições de 14 aa, encontra-se associada ao filamento citoplasmático do FAZ. A proteína apresenta padrão similar ao antígeno H49, ou seja, duas bandas >200 kDa. É possível que o antígeno H49 também esteja associado ao filamento citoplasmático do FAZ, e que existam outras proteínas associadas além do FAZ1.

Em concordância com os resultados acima, anticorpos anti-calpaína A (Cys-Pc), também reconheceram uma banda de 240 kDa em preparações de citoesqueleto. É interessante notar que essa banda é observada quando inibidores de protease e quelantes de cálcio (EGTA ou EDTA) são adicionados ao tampão de lise, sugerindo que essas proteínas são sensíveis à ação de proteases intracelulares reguladas por cálcio. A banda reconhecida por este anticorpo é observada como uma banda fraca, às vezes imperceptível. As proteínas da região do FAZ apresentam tamanho molecular elevado, compostas por repetições de aminoácidos e são expressas em pequenas quantidades, dificultando a sua detecção (Gull, 1999).

As bandas de 56, 60 e 170 kDa reconhecidas pelos anticorpos anti-calpaína A correspondem às calpaínas sem a repetição conservada, dado que não foram detectadas proteínas deste tamanho com os anticorpos anti-H49. O tamanho predito das proteínas H49/calpaína com domínio Cys-Pc é de 145, 155 e 133 kDa. A banda de 170 kDa detectada pelo antissoro anti-calpaína A pode representar uma destas proteínas, que sofrem modificações postraduccionais. As outras proteínas podem corresponder às calpaínas com domínio catalítico, mas que não pertencem à família H49/calpaínas.

O soro anti-calpaína B reconheceu na fração de citoesqueleto duas proteínas de cerca de 170 e 200 kDa. A proteína de 170 kDa pode ser a mesma proteína reconhecida pelo soro anti-calpaína A (Cys-Pc) que contém repetições degeneradas H49 e o domínio catalítico (Cys-Pc) (XP_806304). A banda >220 kDa seria a mesma proteína reconhecida pelo soro anti-H49, uma vez que o soro anti-calpaína B reagiu fracamente com o antígeno recombinante H49 (Fig. 32).

As outras proteínas de menor tamanho, identificadas na fração solúvel, podem representar proteínas H49/calpaína com repetições H49 degeneradas.

A análise por *imunoblotting* com anticorpos anti-H49, calpaína A (Cys-Pc) e calpaína B mostrou que as proteínas H49/calpaína estão presentes no citoesqueleto de formas epimastigotas do clone CL Brener e da cepa G. Dados recentes da literatura sugerem que as calpaínas participam ativamente no remodelamento do citoesqueleto, mediado por cálcio (Goll *et al.*, 2003; Tonami *et al.*, 2007).

Por outro lado, os três antissoros testados reagiram com componentes da fração solúvel. Este resultado poderia ser explicado pelo fato das calpaínas serem citoplasmáticas, mas frente a um estímulo de cálcio elas se associaram à membrana plasmática. Recentemente, Giese *et al.* (2008) mostraram a presença de uma calpaína-like nas frações celulares solúvel e insolúvel de *T. cruzi*.

A técnica de imunofluorescência foi utilizada para estudar a distribuição celular das proteínas H49/calpaína. O soro anti-calpaína A (domínio catalítico Cys-Pc) reagiu em epimastigotas permeabilizados, com calpaínas contendo o domínio Cys-Pc localizadas principalmente no citoplasma, observando-se também marcação fraca no flagelo. Giese *et al.* (2008) e Sangenito *et al.* (2009) encontraram o mesmo padrão de distribuição citoplasmático das calpaínas. Estes autores não mencionam a presença de calpaína no flagelo.

A imunofluorescência com anticorpos de coelho e camundongo anti-H49 mostraram que as repetições de H49 conservadas estão restritas à região do FAZ, tal como mostrado por microscopia eletrônica (Cotrim *et al.*, 1990). A sobreposição de fluorescência com o antígeno H49 e contraste de fase mostra claramente que o antígeno H49 não está presente na região anterior do flagelo (Fig. 38). Provavelmente, o antígeno H49 seja um componente análogo à proteína FAZ1 de *T. brucei* em *T. cruzi*.

Em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos da cepa G, a sobreposição da imunofluorescência obtida com anticorpos anti-calpaína A e anti-H49 sugere que os epítomos reconhecidos por estes anticorpos estão localizados muito próximos, mas não é possível afirmar que pertencem à uma mesma identidade.

Por outro lado, o soro anti-calpaína B reagiu com componentes presentes no citoplasma, FAZ e flagelo. O soro anti-calpaína B reconheceu epítomos presentes na proteína H49/calpaína (XP_809993) que contêm as repetições degeneradas H49. Portanto, era esperado que houvesse alguma marcação na região do FAZ, onde se localizam as repetições H49 conservadas. Os estudos de imunolocalização sugerem que a proteína H49/calpaína (XP_809993) está localizada na região anterior do flagelo onde FAZ não existe, e a proteína H49/calpaína (XP_804109) que contém as repetições conservadas H49, encontra-se no FAZ. Estas diferenças sugerem que mesmo sendo duas H49/calpaínas, filogeneticamente próximas, elas apresentam funções diferentes no parasita.

Estudos de imunofluorescência com anticorpos anti-calpaína A, anti-calpaína B e anti-H49, em preparações de citoesqueleto de epimastigotas, confirmaram a associação de proteínas H49/calpaína com o citoesqueleto de *T. cruzi*. O soro anti-H49 apresentou padrão de marcação puntiforme, característico de componentes presentes exclusivamente no FAZ (Bastin *et al.*, 1996).

O soro anti-calpaína A reagiu com componentes associados aos microtúbulos subpeliculares do citoesqueleto do corpo celular e do flagelo. Os anticorpos anti-calpaína B apresentaram o mesmo padrão de fluorescência, confirmando a co-localização das duas H49/calpaínas. A intensidade do sinal observado foi mais nítida que quando empregamos epimastigotas intactos, provavelmente, pela maior exposição dos epítomos e perda de proteínas solúveis nas preparações de citoesqueleto. A associação de calpaínas com o citoesqueleto de tripanossomatídeos foi demonstrada em *T. brucei*, a calpaína estágio-específica CAP 5.5 (Hertz-Fowler *et al.*, 2001) encontra-se associada aos microtúbulos subpeliculares e não foi encontrada em microtúbulos do axonema. Ao contrário da CAP 5.5, as H49/calpaínas de *T. cruzi* podem estar associadas aos microtúbulos do corpo celular e do flagelo no parasita.

Na tentativa de obter maior informação sobre a localização das proteínas H49/calpaínas, utilizamos marcadores específicos das estruturas FAZ, paraflagelar e da membrana flagelar. O anticorpo monoclonal 4D9, específico para FAZ, apresentou mesmo padrão de marcação que o anti-H49 confirmando a localização do antígeno H49 na região de aderência entre o flagelo e o corpo celular.

O anticorpo 1B10, específico para estrutura paraflagelar, apresentou padrão de marcação diferente do H49, marcando internamente todo o flagelo. Deduzimos que o antígeno H49 não está presente em todo o flagelo, mas não podemos descartar a possibilidade de existir uma associação na região do FAZ entre o H49 e a estrutura paraflagelar. Em *T. brucei* foram descritas estruturas que conectam o domínio proximal da estrutura paraflagelar à região de membrana associada ao FAZ (Sherwin e Gull, 1989; Bastin *et al.*, 2000). A proteína CBP apresentou padrão de fluorescência diferente do antígeno H49 e da calpaína. É possível deduzir que as proteínas H49/calpaína não estão localizadas na membrana do flagelo, devido às diferenças de marcação e a necessidade de permeabilizar o parasita para detecção do sinal.

Os resultados apresentados mostram que o antígeno H49 está localizado no FAZ. A imunofluorescência de parasitas mutantes, que não apresentam FAZ, corrobora essa hipótese. O antígeno H49 está distribuído no citoplasma e ao longo do flagelo do mutante, o antígeno 4D9 marcador de FAZ, acumula-se na bolsa flagelar. Os nossos resultados estão de acordo com os de Rocha *et al.* (2006) e Bisaggio *et al.* (2006), que utilizaram anticorpos anti-FRA e 4D9. Os nossos resultados mostram que a expressão do gene H49/calpaína independe da presença de FAZ, porém, na ausência desta estrutura, a proteína H49 fica dispersa no citoplasma e flagelo. Talvez, a glicoproteína GP72 seja a responsável pela formação de FAZ, endereçando as proteínas H49 e 4D9 para esta região.

Por outro lado, o padrão de marcação dos mutantes com os anticorpos que reconhecem estrutura paraflagelar e a proteína CBP é semelhante ao encontrado em parasitas não mutantes, isto sugere que o flagelo não sofreu alterações. Portanto, as modificações estruturais no FAZ, detectadas em mutantes, deveriam acontecer em estruturas que conectam a membrana do flagelo com a do corpo do parasita, sugerindo que o antígeno H49 participa da formação desta estrutura. Em parasitas mutantes, a proteína reconhecida pelo soro anti-calpaína B está distribuída ao longo do flagelo, acumulando-se em alguns pontos do flagelo. Essa distribuição anômala, talvez seja devido à ausência de aderência do flagelo no corpo celular.

5.3 Modelo e função das proteínas H49/calpaína em *T. cruzi*

Como foi discutido anteriormente, não está disponível no banco de dados (GenBank) a seqüência completa do gene H49/calpaína contendo as repetições H49 conservadas.

Invariavelmente, os contigs são interrompidos nas regiões contendo as repetições H49 conservadas. Desta maneira sugerimos que os genes XM_797463 (XP_802556) e XM_799896 (XP_804989), ou XM_799016 (XP_804109) e XM_799896 (XP_804989), façam parte de um mesmo gene H49/calpaína. Desta maneira, os genes XM_797463 ou XM_799016 corresponderiam à região 5' e o gene XM_799896 à região 3'. As repetições H49 conservadas podem se enovelar de maneira estável, constituindo um domínio que apresenta estrutura secundária bem definida, formada por regiões de α -hélice de 14 e 32 aminoácidos, separadas entre si por regiões desorganizadas. Os modelos apresentados a seguir (Fig. 54 e 55) foram baseados assumindo que as proteínas XP_802556 e XP_804989 ou XP_804109 e XP_804989 são partes de uma mesma proteína H49/calpaína.

O programa COILS (*prediction of coiled coil proteins*) prediz que as repetições H49 poderiam formar uma estrutura do tipo *coiled coil* que se caracteriza pela interação de duas cadeias polipeptídicas em alfa-hélice formando uma super-hélice, na qual os resíduos de aminoácidos hidrofílicos expostos ao meio aquoso (Lupas *et al.*, 1991).

A análise por imunofluorescência mostra que a proteína contendo as repetições conservadas de H49 está localizada na região de aderência do flagelo ao corpo celular, ou seja, na região do FAZ. A suposta localização da proteína H49/calpaína na célula é mostrada no modelo da figura 54. Na região N-terminal da proteína H49 não foram identificados sítios para acilação, tal como acontece com a calpaína CAP 5.5 de *T. brucei* ou na proteína CBP que estão ligadas à membrana plasmática via resíduos de ácido palmítico e mirístico (Hertz-Fowler *et al.*, 2001; Buchanan *et al.*, 2005). Supomos que a ligação das proteínas H49/calpaína à membrana plasmática da célula deva acontecer por outro mecanismo. O domínio III poderia ser responsável por essa interação, uma vez que ele interage com fosfolipídios de membrana após estímulo de cálcio (Suzuki *et al.*, 2004). Os fosfolipídios diminuem a dependência de cálcio para a autólise e ativação das micro-calpaínas (Saido *et al.*, 1992; Tompa *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2004). A interação entre resíduos hidrofóbicos das cadeias laterais, interações eletrostáticas e ligação covalente (pontes dissulfeto) na região de aderência também poderiam contribuir para a ligação da proteína H49/calpaína à membrana celular.

Na região do FAZ, a estrutura em espiral (*coiled coil*) das proteínas H49/calpaína induziria a formação de dímeros que atuariam como um “grampo” mantendo unidas as membranas do corpo celular e do flagelo (Fig. 54). Os aminoácidos hidrofílicos ficariam expostos, na região de

aderência o que explicaria a antigenicidade da repetição H49 (Paranhos-Bacalla *et al.*, 1994). Segundo o nosso modelo (Fig. 54), dímeros de H49/calpaína estariam dispostos um ao lado do outro formando uma fileira, exemplificado pelo padrão puntiforme observado na imunofluorescência do citoesqueleto (Fig. 41). A proteína H49/calpaína estaria associada ao filamento citoplasmático do FAZ, que interage com filamentos intermediários e microtúbulos subpeliculares.

A estrutura do tipo *coiled coil* é encontrada em proteínas que exercem função estrutural, por exemplo, a queratina que reforça a camada externa da pele, a miosina II que está envolvida na atividade contrátil de células musculares e não musculares e na citocinese e translocação ou transporte do corpo celular durante migração de células (Hasson e Mooseker, 1996; Powell, 2005). Podemos também citar a tripanina, uma proteína associada ao citoesqueleto de *T. brucei* cuja depleção causa problemas no movimento do flagelo (Hutchings *et al.*, 2002). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as proteínas H49/calpaína tenham funções estruturais na região FAZ. A manutenção estrutural da região FAZ é de vital importância para que processos celulares como a citocinese e motilidade do flagelo ocorram normalmente (Kohl e Gull, 1998; Gull, 1999; Moreira-Leite *et al.*, 2001; Vaughan e Gull, 2003; Broadhead *et al.*, 2006).

Além do papel estrutural sugerido para as proteínas H49/calpaína é possível que elas tenham funções adicionais, por exemplo, que atuem como proteases no remodelamento de citoesqueleto como documentado na literatura para as calpaínas clássicas (Goll *et al.*, 2003). Não está descartada a possibilidade de atividade protease, em calpaínas sem a tríade catalítica intacta e domínio IV contendo motivos *EF-hands* de ligação a cálcio (Ersfeld *et al.*, 2005). As proteínas H49/calpaína XP_804989 e XP_809993 (Fig. 11) possuem somente os domínios II (Cys-Pc) e III. Foi demonstrado que um fragmento de calpaína contendo os domínios I, II e III apresenta atividade enzimática, sugerindo que eles são suficiente para a atividade de protease da calpaína (Vilei *et al.*, 1997).

Em calpaínas existem outros sítios, além do motivo *EF-hands* do domínio IV, que podem ligar-se a cálcio. Foi descrito que nos domínios I e II (Cys-Pc) existem dois sítios conservados de ligação, um em cada domínio (Moldoveanu *et al.*, 2004). A conservação dos sítios de ligação a cálcio em calpaínas constitui um mecanismo ancestral de ativação destas enzimas, incluindo aquelas que não possuem *EF-hands* (Moldoveanu *et al.*, 2002), assim é possível que calpaínas atípicas, como H49/calpaínas, possuam atividade cisteína peptidase e sejam reguladas por cálcio.

Com o programa Net Phos (Blom *et al.*, 1999) foram identificados nas H49/calpaínas potenciais sítios de fosforilação, distribuídos por toda a proteína. No caso de H49/calpaína XP_804989 existem 53 potenciais sítios de fosforilação (serina: 32, treonina:13 e tirosina:8), enquanto que a proteína XP_809993 apresenta 170 potenciais sítios de fosforilação (serina: 95, treonina: 38, tirosina:37). As calpaínas podem ser substrato para proteínas quinases (Kuo *et al.*, 1994), e tem sido sugerido que a fosforilação de calpaínas poderia ser um importante mecanismo para regulação de sua atividade (Suzuki *et al.*, 2004). Resultados preliminares de nosso laboratório (Galetović A., 2008) sugerem a presença de modificações pós-traducionais em proteínas H49/calpaína. Análise por gel de eletroforese bidimensional e *western blotting* com anticorpos anti-H49 e calpaína (Cys-Pc), mostrou que anticorpos anti-calpaína A (Cys-Pc) reconhecem várias proteínas de tamanhos moleculares de aproximadamente 50 kDa, na faixa de pH 4.5-5, e também proteínas de 60 kDa, pH~5,5, em tripomastigotas metacíclicas e epimastigotas, respectivamente.

Em contraste, os anticorpos anti-H49 reagiram com proteínas de alto tamanho molecular (>200 kDa), na faixa de pH 4.5-5. As proteínas reconhecidas pelo anticorpo anti-H49 sofreram proteólise a pH 5 em formas metacíclicas e epimastigotas das cepas CL e G. É possível que as modificações pós-traducionais observadas sejam devidas a fosforilação de H49/calpaínas, processo que induz mudanças conformacionais que regulam a atividade enzimática destas proteínas. Recentemente, foi relatado que a fosforilação do resíduo de serina 369 no domínio II da calpaína por uma proteína quinase, causaria sua inativação por mudança na conformação (Shiraha *et al.*, 2002).

Em relação às H49/calpaínas contendo repetições degeneradas do H49 é possível que elas apresentem atividade proteásica. Segundo os resultados de imunofluorescência as proteínas H49/calpaínas contendo repetições degeneradas encontram-se no flagelo e também no corpo celular do parasita. Não é possível afirmar que estas proteínas estejam localizadas na região FAZ (Fig. 32).

A proteína H49/calpaína (XP_809993), contendo repetições H49 degeneradas, não possui sítios preditos para acilação, portanto, como sugerido anteriormente, poderia associar-se à membrana do corpo celular ou do flagelo por meio do domínio III (ver modelo figura 54). A sua atividade poderia ser regulada por cálcio e pela ligação aos fosfolipídios de membrana, tal como

sugerido para a proteína H49/calpaína (XP_804989) contendo as repetições conservadas. A região central da molécula, onde são encontradas as repetições degeneradas H49, contém estruturas *coiled-coil* como predito pelo programa COILS-*Prediction of coiled coil proteins*. A função de H49/calpaínas com repetições degeneradas, na região do flagelo, poderia estar relacionada com o processo de migração celular. Neste sentido é conhecido que proteases (cisteína-proteinase, serina e aspártico proteases e metaloproteases) de tripanossomas participam na invasão da célula hospedeira (Rosenthal, 1999). Sabe-se que calpaínas rompem a ligação entre integrina (na adesão focal) e actina do citoesqueleto, por proteólise de talina o que permite a migração celular (Dourdin *et al.*, 2001; Franco e Huttenlocher, 2005).

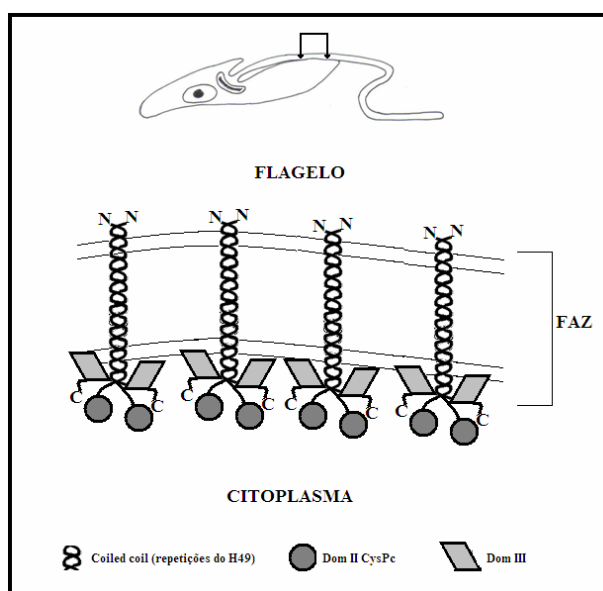


Figura 54. Estrutura e função H49/calpaína com repetições conservadas. As proteínas XP_804989 e XP_802556 estão localizadas na região FAZ. Os dímeros de H49/calpaínas estariam dispostos em uma fileira e atuariam como um “grampo” ligando as membranas do corpo celular e do flagelo. A estrutura *coiled-coil* ficaria exposta ao meio extracelular na região de aderência.

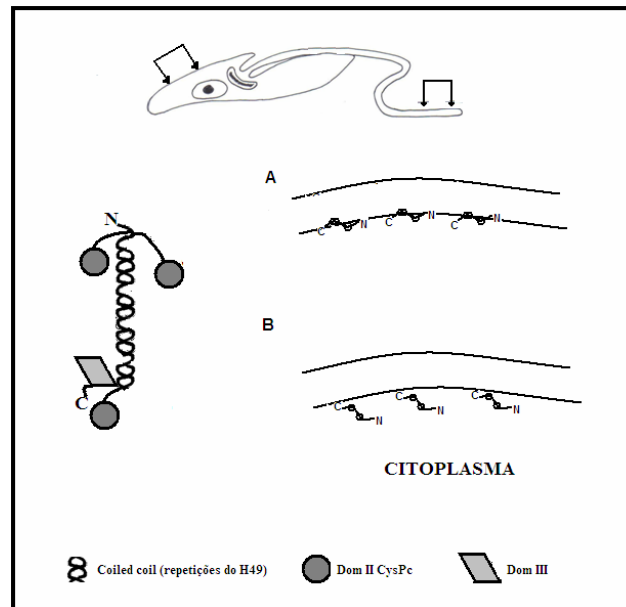


Figura 55. Estrutura e função H49/calpaína com repetições degeneradas. Estão mostradas duas possíveis formas de H49/calpaína (A e B) no corpo celular e no flagelo do parasita. À esquerda da figura está esquematizado o dímero formado pelas proteínas H49/calpaína contendo as repetições degeneradas (XP_809993, 520 kDa) e os domínios II e III. (A) H49/calpaína interagindo com a membrana por meio de domínio III. (B) H49/calpaína interagindo com o domínio III, mas com a região N-terminal orientada dirigida ao espaço intracelular.

Referências

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.

Bastin, P., Matthews, K. R., Gull, K. The paraflagellar rod of kinetoplastida: Solved and unsolved questions. *Parasitol Today.* 1996 Aug;12(8):302-7.

Bisaggio, D. F., Campanati, L., Pinto, R. C., Souto-Padron, T. Effect of suramin on trypomastigote forms of *trypanosoma cruzi*: Changes on cell motility and on the ultrastructure of the flagellum-cell body attachment region. *Acta Trop.* 2006 May;98(2):162-75.

Blom, N., Gammeltoft, S., Brunak, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* 1999 Dec 17;294(5):1351-62.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

Brener, Z., Chiari, E. [morphological variations observed in different strains of *trypanosoma cruzi*.]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1963 Sep-Oct;19:220-4.

Broadhead, R., Dawe, H. R., Farr, H., Griffiths, S., Hart, S. R., Portman, N., Shaw, M. K., Ginger, M. L., Gaskell, S. J., McKean, P. G., Gull, K. Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome. *Nature.* 2006 Mar 9;440(7081):224-7.

Buchanan, K. T., Ames, J. B., Asfaw, S. H., Wingard, J. N., Olson, C. L., Campana, P. T., Araujo, A. P., Engman, D. M. A flagellum-specific calcium sensor. *J Biol Chem.* 2005 Dec 2;280(48):40104-11.

Cano, M. I., Gruber, A., Vazquez, M., Cortes, A., Levin, M. J., Gonzalez, A., Degraeve, W., Rondinelli, E., Zingales, B., Ramirez, J. L. et al. Molecular karyotype of clone cl

brener chosen for the trypanosoma cruzi genome project. Mol Biochem Parasitol. 1995 May;71(2):273-8.

Casaletti, L., Tauhata, S. B., Moreira, J. E., Larson, R. E. Myosin-va proteolysis by Ca^{2+} /calpain in depolarized nerve endings from rat brain. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Aug 15;308(1):159-64.

Cooper, R., de Jesus, A. R., Cross, G. A. Deletion of an immunodominant trypanosoma cruzi surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. J Cell Biol. 1993 Jul;122(1):149-56.

Cotrim, P. C., Paranhos-Baccala, G., Santos, M. R., Mortensen, C., Cano, M. I., Jolivet, M., Camargo, M. E., Mortara, R. A., Da Silveira, J. F. Organization and expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoskeleton of trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol. 1995 Apr;71(1):89-98.

Cotrim, P. C., Paranhos, G. S., Mortara, R. A., Wanderley, J., Rassi, A., Camargo, M. E., da Silveira, J. F. Expression in escherichia coli of a dominant immunogen of trypanosoma cruzi recognized by human chagasic sera. J Clin Microbiol. 1990 Mar;28(3):519-24.

Cotrim, Paulo. Caracterização de um antígeno repetitivo e imunodominante associado ao citoesqueleto do *trypanosoma cruzi*: Potencial utilização no sorodiagnóstico da doença de chagas. Tese apresentada à universidade federal de são paulo-escola paulista de medicina, para a obtenção do título de doutor em ciências. São Paulo; 1992.

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

D'Angelo, M. A., Montagna, A. E., Sanguineti, S., Torres, H. N., Flawia, M. M. A novel calcium-stimulated adenylyl cyclase from trypanosoma cruzi, which interacts with the

structural flagellar protein paraflagellar rod. *J Biol Chem.* 2002 Sep 20;277(38):35025-34.

de Souza, W. Macro, micro and nano domains in the membrane of parasitic protozoa. *Parasitol Int.* 2007 Sep;56(3):161-70.

Donelson, J. E., Gardner, M. J., El-Sayed, N. M. More surprises from kinetoplastida. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 16;96(6):2579-81.

Dourdin, N., Bhatt, A. K., Dutt, P., Greer, P. A., Arthur, J. S., Elce, J. S., Huttenlocher, A. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001 Dec 21;276(51):48382-8.

El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Wortley, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D. A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J. F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P. T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A. C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M. J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C. R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J. C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J. L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S. L., Sanchez, D. O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A. J., Sisk, E., Tammi, M. T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P. N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C. M., Stuart, K. D., Andersson, B. The genome sequence of *trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. *Science.* 2005a Jul 15;309(5733):409-15.

Engman, D. M., Krause, K. H., Blumin, J. H., Kim, K. S., Kirchhoff, L. V., Donelson, J. E. A novel flagellar Ca^{2+} -binding protein in trypanosomes. *J Biol Chem.* 1989 Nov 5;264(31):18627-31.

Ersfeld, K., Barraclough, H.Gull, K. Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *J Mol Evol.* 2005 Dec;61(6):742-57.

FIOCRUZ. **Doença de chagas** Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/>. Acesso em: Janeiro de 2009.

Franco da Silveira, J. , Umezawa, E. S.Luquetti, A. O. Chagas disease: Recombinant trypanosoma cruzi antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.* 2001 Jun;17(6):286-91.

Franco, S. J.Huttenlocher, A. Regulating cell migration: Calpains make the cut. *J Cell Sci.* 2005 Sep 1;118(Pt 17):3829-38.

Galetović A., Santos M., Cordero E. e Franco da Silveira J. (2008). Identification of post-translational modifications in h49/calpain like proteins of *trypanosoma cruzi*. Annual Meeting on Basic Research in Chagas'Disease, Águas de Lindóia, SP, Brasil.

Galtier, N., Gouy, M.Gautier, C. Seaview and phylo_win: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci.* 1996 Dec;12(6):543-8.

Giese, V., Dallagiovanna, B., Marchini, F. K., Pavoni, D. P., Krieger, M. A.Goldenberg, S. Trypanosoma cruzi: A stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 Sep;103(6):598-601.

Godsel, L. M.Engman, D. M. Flagellar protein localization mediated by a calcium-myristoyl/palmitoyl switch mechanism. *EMBO J.* 1999 Apr 15;18(8):2057-65.

Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W.Cong, J. The calpain system. *Physiol Rev.* 2003 Jul;83(3):731-801.

Gull, K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1999;53:629-55.

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

Hager, D. A. Burgess, R. R. Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: Results with sigma subunit of escherichia coli rna polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. *Anal Biochem.* 1980 Nov 15;109(1):76-86.

Hasson, T. Mooseker, M. S. Vertebrate unconventional myosins. *J Biol Chem.* 1996 Jul 12;271(28):16431-4.

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 Aug;116(1):25-34.

Hosfield, C. M., Elce, J. S., Davies, P. L. Jia, Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca^{2+} -dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.* 1999 Dec 15;18(24):6880-9.

Hutchings, N. R., Donelson, J. E. Hill, K. L. Trypanin is a cytoskeletal linker protein and is required for cell motility in african trypanosomes. *J Cell Biol.* 2002 Mar 4;156(5):867-77.

Ibanez, C. F., Affranchino, J. L., Macina, R. A., Reyes, M. B., Leguizamon, S., Camargo, M. E., Aslund, L., Pettersson, U. Frasc, A. C. Multiple trypanosoma cruzi antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs. *Mol Biochem Parasitol.* 1988 Jul;30(1):27-33.

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

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

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

Kohl, L., Gull, K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol Biochem Parasitol.* 1998 May 15;93(1):1-9.

Kohl, L., Sherwin, T., Gull, K. Assembly of the paraflagellar rod and the flagellum attachment zone complex during the trypanosoma brucei cell cycle. *J Eukaryot Microbiol.* 1999 Mar-Apr;46(2):105-9.

Kuo, W. N., Ganesan, U., Davis, D. L., Walbey, D. L. Regulation of the phosphorylation of calpain II and its inhibitor. *Mol Cell Biochem.* 1994 Jul 27;136(2):157-61.

Lacomble, S., Vaughan, S., Gadelha, C., Morpew, M. K., Shaw, M. K., McIntosh, J., Gull, K. Three-dimensional cellular architecture of the flagellar pocket and associated cytoskeleton in trypanosomes revealed by electron microscope tomography. *J Cell Sci.* 2009 Apr 15;122(Pt 8):1081-90.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lafaille, J. J., Linss, J., Krieger, M. A., Souto-Padron, T., de Souza, W., Goldenberg, S. Structure and expression of two trypanosoma cruzi genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Mol Biochem Parasitol.* 1989 Jun 15;35(2):127-36.

Landfear, S. M., Ignatushchenko, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 2001 Jun;115(1):1-17.

Levin, M. J., Mesri, E., Benarous, R., Levitus, G., Schijman, A., Levy-Yeyati, P., Chiale, P. A., Ruiz, A. M., Kahn, A., Rosenbaum, M. B. et al. Identification of major trypanosoma cruzi antigenic determinants in chronic chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Nov;41(5):530-8.

Lupas, A., Van Dyke, M., Stock, J. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science.* 1991 May 24;252(5010):1162-4.

Moldoveanu, T., Hosfield, C. M., Lim, D., Elce, J. S., Jia, Z., Davies, P. L. A Ca^{2+} switch aligns the active site of calpain. *Cell.* 2002 Mar 8;108(5):649-60.

Moldoveanu, T., Jia, Z., Davies, P. L. Calpain activation by cooperative Ca^{2+} binding at two non-ef-hand sites. *J Biol Chem.* 2004 Feb 13;279(7):6106-14.

Moreira-Leite, F. F., Sherwin, T., Kohl, L., Gull, K. A trypanosome structure involved in transmitting cytoplasmic information during cell division. *Science.* 2001 Oct 19;294(5542):610-2.

Ono, Y., Shimada, H., Sorimachi, H., Richard, I., Saido, T. C., Beckmann, J. S., Ishiura, S., Suzuki, K. Functional defects of a muscle-specific calpain, p94, caused by mutations associated with limb-girdle muscular dystrophy type 2a. *J Biol Chem.* 1998b Jul 3;273(27):17073-8.

Ono, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K. Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998a Apr 17;245(2):289-94.

Paranhos-Bacalla, G. S., Santos, M. R., Cotrim, P. C., Rassi, A., Jolivet, M., Camargo, M. E., Da Silveira, J. F. Detection of antibodies in sera from chagas' disease patients using a trypanosoma cruzi immunodominant recombinant antigen. *Parasite Immunol.* 1994 Mar;16(3):165-9.

Ponce, C., Ponce, E., Vinelli, E., Montoya, A., de Aguilar, V., Gonzalez, A., Zingales, B., Rangel-Aldao, R., Levin, M. J., Esfandiari, J., Umezawa, E. S., Luquetti, A. O.da Silveira, J. F. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of chagas' disease by detection of trypanosoma cruzi-specific antibodies in blood of donors and patients in central america. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):5065-8.

Powell, Kendall. Myosin powers cytokinesis. *The Journal of Cell Biology.* 2005;170(4):514-515.

Raynaud, F., Fernandez, E., Coulis, G., Aubry, L., Vignon, X., Bleimling, N., Gautel, M., Benyamin, Y.Ouali, A. Calpain 1-titin interactions concentrate calpain 1 in the z-band edges and in the n2-line region within the skeletal myofibril. *FEBS J.* 2005 May;272(10):2578-90.

Ridgley, E., Webster, P., Patton, C.Ruben, L. Calmodulin-binding properties of the paraflagellar rod complex from trypanosoma brucei. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 Jul;109(2):195-201.

Rocha, G. M., Brandao, B. A., Mortara, R. A., Attias, M., de Souza, W.Carvalho, T. M. The flagellar attachment zone of trypanosoma cruzi epimastigote forms. *J Struct Biol.* 2006 Apr;154(1):89-99.

Rosenthal, P. J. Proteases of protozoan parasites. *Adv Parasitol.* 1999;43:105-59.

Ruiz-Moreno, L., Bijovsky, A. T., Pudles, J., Alves, M. J.Colli, W. Trypanosoma cruzi: Monoclonal antibody to cytoskeleton recognizes giant proteins of the flagellar attachment zone. *Exp Parasitol.* 1995 Jun;80(4):605-15.

Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A.Barrell, B. Artemis: Sequence visualization and annotation. *Bioinformatics.* 2000 Oct;16(10):944-5.

Saido, T. C., Shibata, M., Takenawa, T., Murofushi, H., Suzuki, K. Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J Biol Chem.* 1992 Dec 5;267(34):24585-90.

Sangenito, L. S., Ennes-Vidal, V., Marinho, F. A., Da Mota, F. F., Santos, A. L., D'Avila-Levy, C. M., Branquinha, M. H. Arrested growth of *trypanosoma cruzi* by the calpain inhibitor mdl28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms. *Parasitology.* 2009 Apr;136(4):433-41.

Santos, M. R., Lorenzi, H., Porcile, P., Carmo, M. S., Schijman, A., Brandao, A., Araya, J. E., Gomes, H. B., Chiurillo, M. A., Ramirez, J. L., Degrave, W. M., Levin, M. J., da Silveira, J. F. Physical mapping of a 670-kb region of chromosomes xvi and xvii from the human protozoan parasite *trypanosoma cruzi* encompassing the genes for two immunodominant antigens. *Genome Res.* 1999 Dec;9(12):1268-76.

Santos, Márcia Regina Machado dos. Organização do genoma de *trypanosoma cruzi*: Mapeamento físico e genético de uma região de 880 kb dos cromosomas que contém os genes codificadores dos antígenos imunodominantes h49 e j18. Tese apresentada à universidade federal de são paulo-escola paulista de medicina, para a obtenção do título de doutor em ciências. São Paulo; 1998.

Shiraha, H., Glading, A., Chou, J., Jia, Z., Wells, A. Activation of m-calpain (calpain ii) by epidermal growth factor is limited by protein kinase a phosphorylation of m-calpain. *Mol Cell Biol.* 2002 Apr;22(8):2716-27.

Sorimachi, H., Saido, T. C., Suzuki, K. New era of calpain research. Discovery of tissue-specific calpains. *FEBS Lett.* 1994 Apr 18;343(1):1-5.

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

Strobl, S., Fernandez-Catalan, C., Braun, M., Huber, R., Masumoto, H., Nakagawa, K., Irie, A., Sorimachi, H., Bourenkow, G., Bartunik, H., Suzuki, K., Bode, W. The crystal

structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jan 18;97(2):588-92.

Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., Sorimachi, H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes*. 2004 Feb;53 Suppl 1:S12-8.

Suzuki, K., Sorimachi, H. A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett*. 1998 Aug 14;433(1-2):1-4.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007 Aug;24(8):1596-9.

**TDR/WHO. Reporte sobre la enfermedad de chagas
grupo de trabajo científico 17–20 de abril de 2005 - actualizado en julio de 2007 -
buenos aires, argentina** Disponível em: <http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas>. Acesso em:

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. Clustal w: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994 Nov 11;22(22):4673-80.

Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K., Friedrich, P. Domain iii of calpain is a Ca^{2+} -regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Feb 9;280(5):1333-9.

Tonami, K., Kurihara, Y., Aburatani, H., Uchijima, Y., Asano, T., Kurihara, H. Calpain 6 is involved in microtubule stabilization and cytoskeletal organization. *Mol Cell Biol*. 2007 Apr;27(7):2548-61.

Umezawa, E. S., Bastos, S. F., Coura, J. R., Levin, M. J., Gonzalez, A., Rangel-Aldao, R., Zingales, B., Luquetti, A., Oda Silveira, J. F. An improved serodiagnostic test for

chagas' disease employing a mixture of trypanosoma cruzi recombinant antigens. Transfusion. 2003 Jan;43(1):91-7.

Vaughan, S.Gull, K. The trypanosome flagellum. J Cell Sci. 2003 Mar 1;116(Pt 5):757-9.

Vaughan, S., Kohl, L., Ngai, I., Wheeler, R. J.Gull, K. A repetitive protein essential for the flagellum attachment zone filament structure and function in trypanosoma brucei. Protist. 2008 Jan;159(1):127-36.

Vilei, E. M., Calderara, S., Anagli, J., Berardi, S., Hitomi, K., Maki, M.Carafoli, E. Functional properties of recombinant calpain i and of mutants lacking domains iii and iv of the catalytic subunit. J Biol Chem. 1997 Oct 10;272(41):25802-8.

WHO. Technical reports series. Control of chagas disease. 2002 [Acesso em. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_905.pdf.

Yoshida, N. Surface antigens of metacyclic trypomastigotes of trypanosoma cruzi. Infect Immun. 1983 May;40(2):836-9.

Zingales, B., Pereira, M. E., Oliveira, R. P., Almeida, K. A., Umezawa, E. S., Souto, R. P., Vargas, N., Cano, M. I., da Silveira, J. F., Nehme, N. S., Morel, C. M., Brener, Z.Macedo, A. Trypanosoma cruzi genome project: Biological characteristics and molecular typing of clone cl brener. Acta Trop. 1997 Nov;68(2):159-73.

Abstract

We have previously isolated a *T. cruzi* recombinant clone, termed H49, that encodes tandemly arranged repeats of 68-amino acids (aa). The repeats are found in an immunodominant antigen (~240 kDa) which is involved in the attachment of the flagellum to the cell body in the FAZ region of the parasite. Here we present further characterization of the structure of H49 gene and protein. Blast search of *T. cruzi* databases showed that the 68-aa repeats can be found in the central domain of 8 calpain-like cysteine peptidases. In two of them, the H49 repeats are highly conserved and arranged in tandem arrays, whereas in other calpains the repeats are degenerated and can be separated by short nonrepeat sequences. These proteins show the domains Cys-Pc and calpain_III, characteristics of calcium-dependent cysteine proteinases. The association between H49 and calpain sequences was further confirmed by PCR amplification and analysis of YAC clones using primers designed to amplify specific regions of calpain and H49 repeat. We mapped the H49 locus in clone CL Brener using YAC overlapping clones. The association of H49 and calpain in these YACs was demonstrated by PCR and restriction analysis. Consistent with this, chromoblot analysis revealed that H49 and calpain probes hybridized with the same chromosomal bands. Our data indicate that the H49 repeats are part of a subset of calpain genes, and they were termed H49/calpains. Recently, a novel family of cytoskeleton-associated proteins was described in *Trypanosoma brucei* and *Leishmania*. These proteins are characterized by their similarity to the catalytic region of calpain, and also by the presence of tandemly arranged amino acid repeats that share 30-40% similarity with H49. These results suggest that the acquisition by trypanosomatids of calpain containing repeats (maybe by gene fusion) was a relatively late event in the evolution of this family of proteins.

To study the occurrence and subcellular distribution of H49/calpain protein in epimastigotes, we have expressed different domains of the calpain and the 68-aa repeats in bacteria, purified the proteins, and employed them to immunize rabbits and mice. The affinity purified polyclonal antibodies were used as probes to study the organization and subcellular distribution of 68-aa repeats and calpain in *T. cruzi*. Antibodies raised against the calpain domains and 68-aa repeats reacted, by immunoblot analysis, with a ~240 kDa protein in the whole epimastigote extracts. Anti-calpain antibodies reacted with additional bands of ~170, 60 and ~56 kDa which correspond to the calpain proteins without 68-aa repeats. Immunofluorescence analysis showed that H49/calpain-like protein is only localized in the region of adhesion between the cell body and flagellum. Calpain was present not only in the

flagella, but it was also localized in the cytoplasm. Further, the cytoskeleton-associated H49/calpain was colocalized with markers of the flagellar attachment zone (FAZ).

Repetitive domain of H49/calpains contain alpha-helices (helix-turn-helix) that could be arranged in a coiled-coil rope-like structure. We suggest that H49/calpain proteins form a homodimer that could link the flagellar membrane to the cell body membrane at the flagellar attachment zone.

Tabela I.1 - Calpains *like* cisteína peptidases identificadas no Projeto Genoma de *T. cruzi*.

NW	Contig	locus tag	Gene ID	XM	nt	Proteína id	XP	aa	KDa	dom II	dom III	outros
001849207.1	AAHK 01000956.1	Tc00.1047053508555.70	3540476	804722	3696	EAN 87964	809815	1231	138	663-1024	-	529-623 41-125 (DUF1935)
		Tc00.1047053508555.50	3540474	804720	2148	EAN 87962	809813	715	81	176-516	-	
	AAHK 01002772.1	Tc00.1047053511333.10	3533123	798662	651	EAN 82001	803755	216	25	-	-	-
001849308.1	AAHK 01003205.1	Tc00.1047053511335.9	3532605	797974	546	EAN 81621	803067	182	21	-	-	41-125 (DUF1935)
	AAHK 01003971.1	Tc00.1047053511329.10	3532068	797584	1697	EAN 81231	802677	564	65	31-370	-	-
		Tc00.1047053509237.151	3546223	809548	775	EAN 92790	814641	258	29	-	-	121-201
001849313.1	AAHK 01000402.1	Tc00.1047053509237.140	3546222	809547	2232	EAN 92789	814640	743	84	175-536	-	41-135 (DUF1935)
		Tc00.1047053509237.120	3546220	809545	2148	EAN 92787	814638	715	81	176-516	-	41-140 (DUF1935)
001849357.1	AAHK 01001404.1	Tc00.1047053503987.20	3537612	802301	852	EAN 85543	807394	283	32	-	-	-
		Tc00.1047053506563.220	3548615	811605	582	EAN 94847	816698	193	22	-	-	-
	AAHK 01000249.1	Tc00.1047053506563.210	3548614	811604	2079	EAN 94846	816697	692	78	174-503	-	38-137 (DUF1935)
001849375.1		Tc00.1047053506563.190	3548633	811602	2577	EAN 94844	816695	858	94	284-618	-	128-234 (DUF1935)
	AAHK 0100553.1	Tc00.1047053510957.9	3531634	797305	1048	EAN 80952	802398	349	40	-	-	185-285 (DUF1935)
001849383.1	AAHK 01001530.1	Tc00.1047053510337.20	3536974	801756	2553	EAN 84998	806849	850	95	281-615	-	143-242 (DUF1935)
001849389.1	AAHK 01000201.1	Tc00.1047053506227.130	3722719	812364	3204	EAN 95606	817457	1067	120	272-564	767-924	-
001849395.1	AAHK 01000697.1	Tc00.1047053503855.40	3542744	806634	2553	EAN 89876	811727	850	95	281-615	-	143-242 (DUF1935)
001849417.1	AAHK 01001323.1	Tc00.1047053508675.29	3539057	802678	345	EAN 85920	807711	114	13	-	-	7-111 (DUF1935)
001849447.1	AAHK 01001011.1	Tc00.1047053511269.70	3540059	804363	2313	EAN 87605	809456	770	88	218-498	-	25-127 (TIM barrel)
001849490.1	AAHK 01001028.1	Tc00.1047053511847.10	3539931	804242	2628	EAN 87484	809335	875	99	80-372	575-732	-
		Tc00.1047053506983.48	3537501	802207	345	EAN 85449	807300	114	13	-	-	7-111 (DUF1935)
001849542.1	AAHK 01001423.1	Tc00.1047053506983.39	3537500	802206	345	EAN 85448	807299	114	13	-	-	7-111 (DUF1935)
		Tc00.1047053509013.19	3536274	801212	3582	EAN 84454	806305	1194	135	10-302 628-918	926-1070	-
001849559.1	AAHK 01002163.1	Tc00.1047053511441.20	3534601	799897	484	EAN 83139	804990	161	19	10-158	-	-
	AAHK 01003223.1	Tc00.1047053504107.10	3532592	797964	1729	EAN 81611	803057	576	65	10-302	313-442	-

Tabela I.1 - Calpains *like* cisteína peptidases identificadas no Projeto Genoma de *T. cruzi*. (continuação)

NW	Contig	locus_tag	Gene ID	XM	nt	Proteína id	XP	aa	KDa	dom II	dom III	outros
001849544.1	AAHK 01002489.1	Tc00.1047053507829.10	3533709	799223	2250	EAN 82465	804316	749	85	200-480	-	7-109 (TIM barrel)
001849565.1	AAHK 01000064.1	Tc00.1047053508999.200	3552673	815008	2079	EAN 98250	820101	692	78	188-503	-	38-137 (DUF1935)
		Tc00.1047053508999.190	3552672	815007	2514	EAN 98249	820100	837	96	321-648	-	185-285 (DUF1935)
	AAHK 01001669.1	Tc00.1047053509003.30	3536348	801272	396	EAN 84514	806365	131	15	-	-	15-117 (DUF1935)
		Tc00.1047053509003.40	3536349	801273	402	EAN 84515	806366	133	15	-	-	14-116 (DUF1935)
001849566.1	AAHK 01001780.1	Tc00.1047053509003.20	3536347	801271	630	EAN 84513	806364	209	23	-	-	68-203 (DUF1935)
		Tc00.1047053509001.40	3535903	800905	444	EAN 84147	805998	147	17	-	-	16-120 (DUF1935)
		Tc00.1047053511727.30	3551724	814216	4365	EAN 97458	819309	1454	161	267-367	-	-
001849569.1	AAHK 01000653.1	Tc00.1047053503909.84	3543199	807018	3093	EAN 90260	812111	1030	116	262-609	615-739 (LRR_RI)	22-165 (LRR_RI)
001849574.1	AAHK 01000718.1	Tc00.1047053511507.70	3542541	806471	3093	EAN 89713	811564	1030	116	262-609	615-739 (LRR_RI)	22-165 (LRR_RI)
918969	AAHK 01002285.1	Tc00.1047053504933.10	3534236	799608	680	No está	804701	225	26	-	-	-

Tabela I.2 - Calpains cisteína peptidases identificadas no Projeto Genoma de *T. cruzi*.

NW	Contig	locus_tag	Gene ID	XM	nt	Proteína_id	XP	aa	KDa	dom II	dom III	outros
1849426	AAHK 01000263.1	Tc00.1047053510121.170	3548378	811385	4779	EAN 94627	816478	1592	180	675-987	310...449 1437...1580	4-133 LRR_RI
001849308.1	AAHK 01004320.1	Tc00.1047053511331.10	3531937	797497	664	EAN 81144	802590	221	24	-	-	-
		Tc00.1047053477983.10	3531737	797379	547	EAN 81016	802462	181	21	-	-	-
001849375.1	AAHK 01000249.1	Tc00.1047053506563.200	3548613	811603	2190	EAN 94845	816696	729	82	191-513	-	56...155 (DUF1935)
001849493.1	AAHK 01000584.1	Tc00.1047053506493.90	3543919	807578	4779	EAN 90820	812671	1592	180	675-987	310-449 1437-1580	4-133 LRR_RI
001849565.1	AAHK 01000064.1	Tc00.1047053508999.220	3552674	815009	2190	EAN 98251	820102	729	82	191-513	-	56-155 (DUF1935)

Tabela I.3 – Sequências H49 não associadas à calpaina identificadas no Projeto Genoma de *T. cruzi*.

NW	Contig	locus tag	Gene ID	XM	nt	Proteína id	XP	aa	KDa
001849449.1	AAHKK 01000823.1	Tc00.1047053511383.89	3541526	805601	6464	EAN 88843.1	810694	2155	248
001849489.1	AAHKK 01001013.1	Tc00.1047053508533.10	3540044	804334	8441	EAN 87586.1	809437	2812	316
001849495.1	AAHKK 01000168.1	Tc00.1047053508837.80	3550150	812910	11487	EAN 96152.1	818003	3828	436
919687	AAHK 01001567.1	Tc00.1047053404001.20	3536794	801622	6992	EAN 84864.1	806715	2329	263

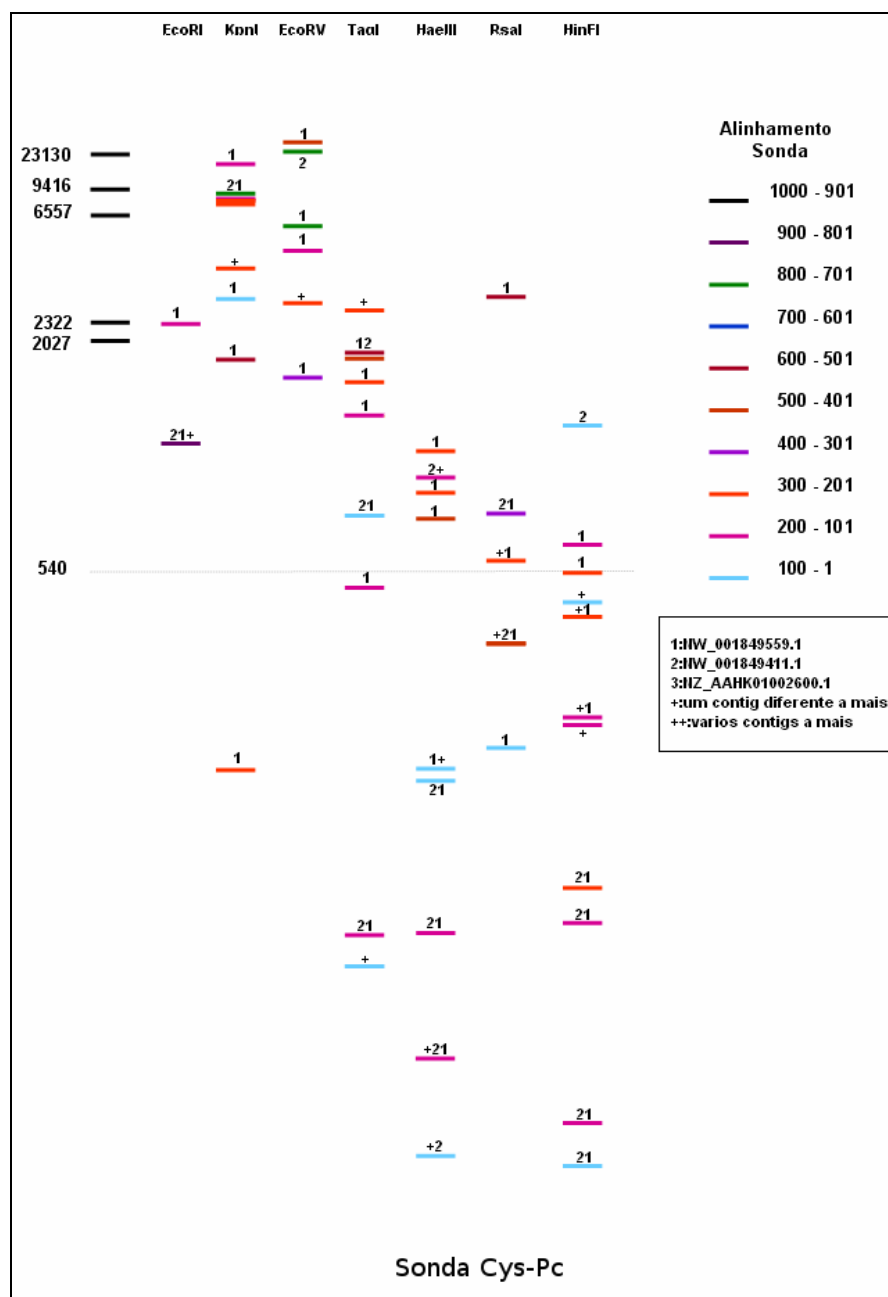


Figura II-1. Digestão *in silico* de *scaffolds* do clone CL Brener de *T. cruzi* e hibridização com sonda domínio catalítico Cys-Pc da calpaína (1.000 pb).

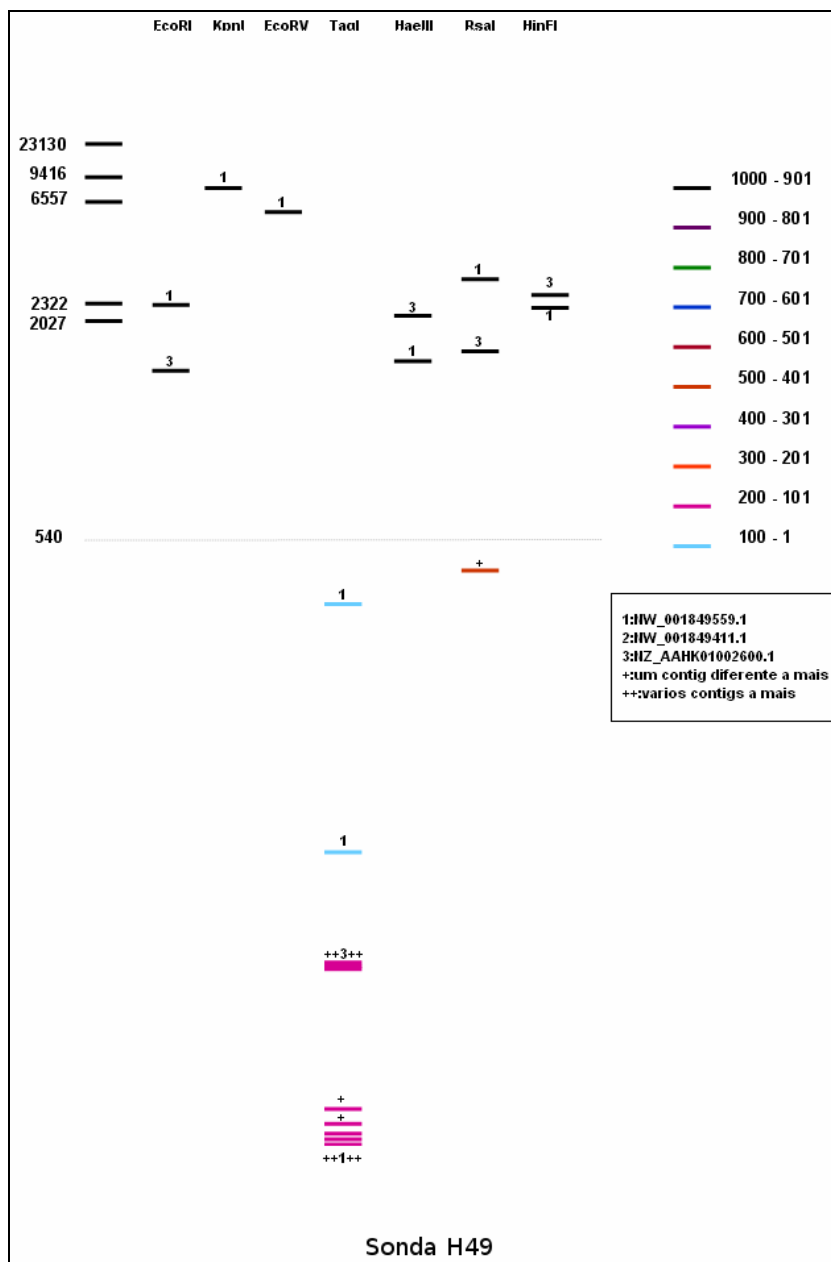


Figura II-2. Digestão *in silico* de *scaffolds* do clone CL Brener de *T. cruzi* e hibridização com sonda H49 (clone H49 contendo 4,8 x repetições H49 conservada).

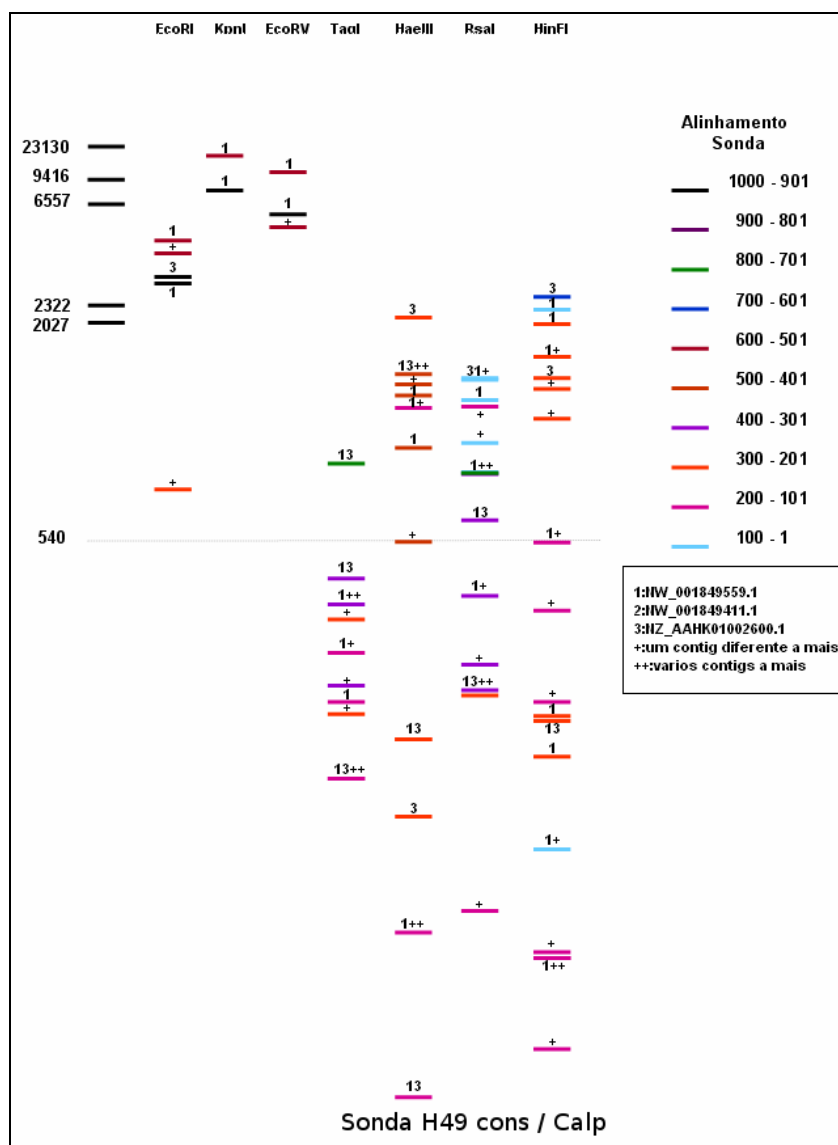


Figura II-3. Digestão *in silico* de *scaffolds* do clone CL Brener de *T. cruzi* e hibridização com sonda H49 conservada/calpaína.

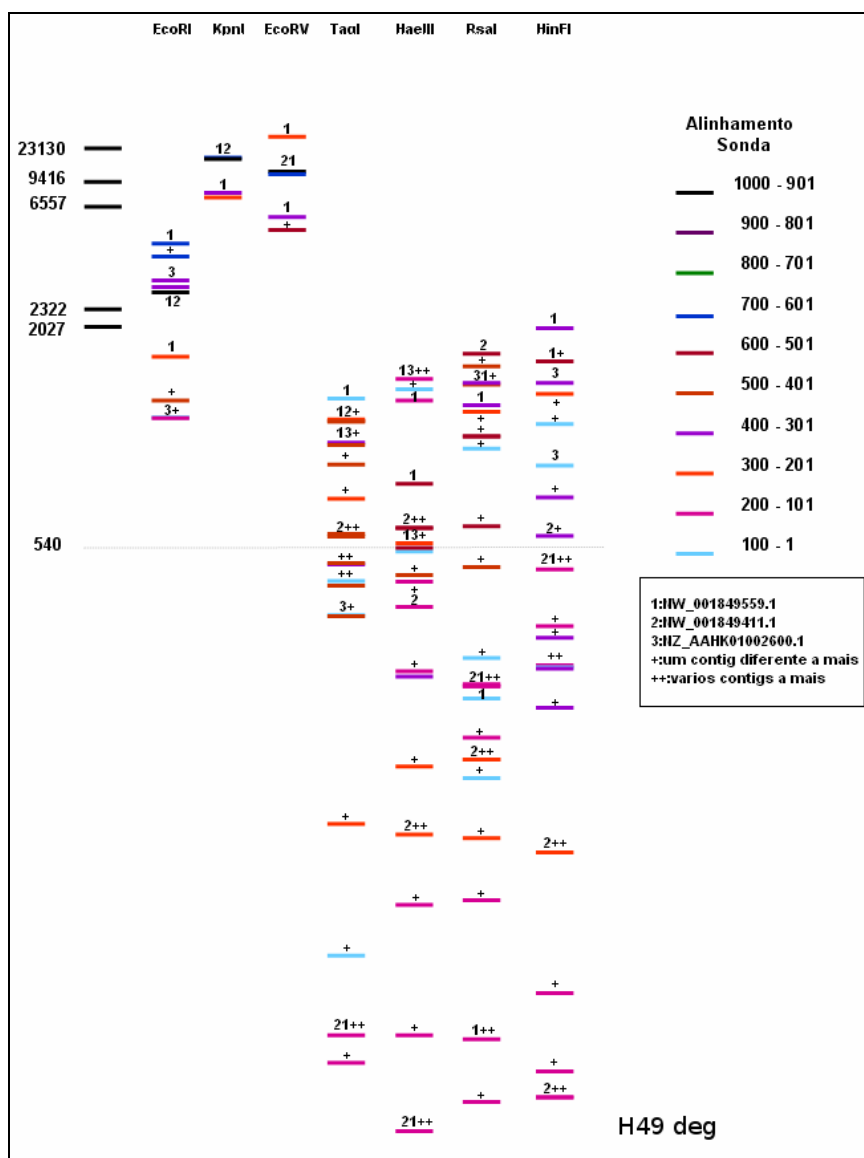


Figura II-4. Digestão *in silico* de *scaffolds* do clone CL Brener de *T. cruzi* e hibridização com sonda H49 degenerado-calpaína (1.000 pb).

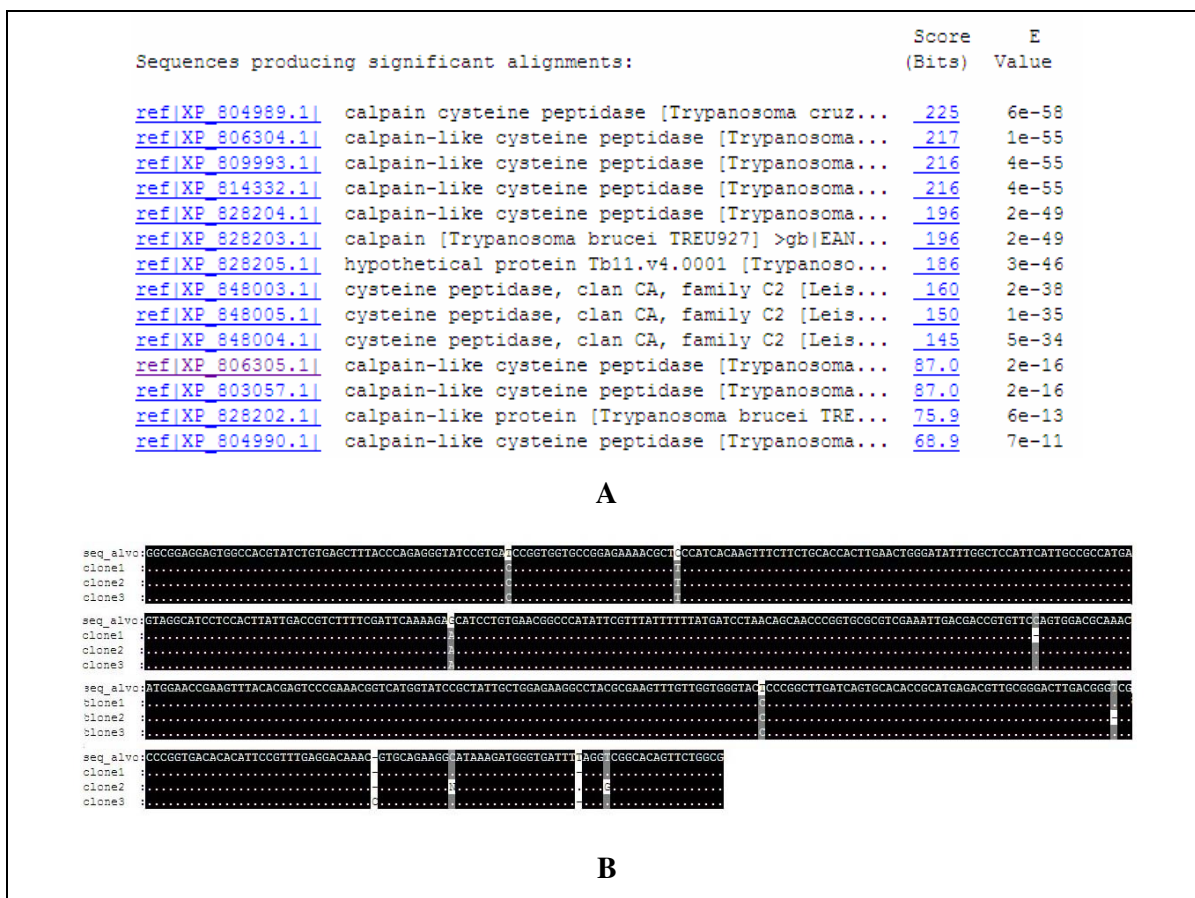


Fig III.1. Sequência de calpaína (Cys-Pc) amplificada por PCR em DNA genômico. Painel A) Sequência submetida a ORF *finder*. **Painel B)** Alinhamento da sequência amplificada e da sequência alvo (XM_799896). As cores preto, cinza e branco indicam identidades de 100, 80 e 60% respectivamente. Os alinhamentos das seqüências foram realizados por *Clustal Method*

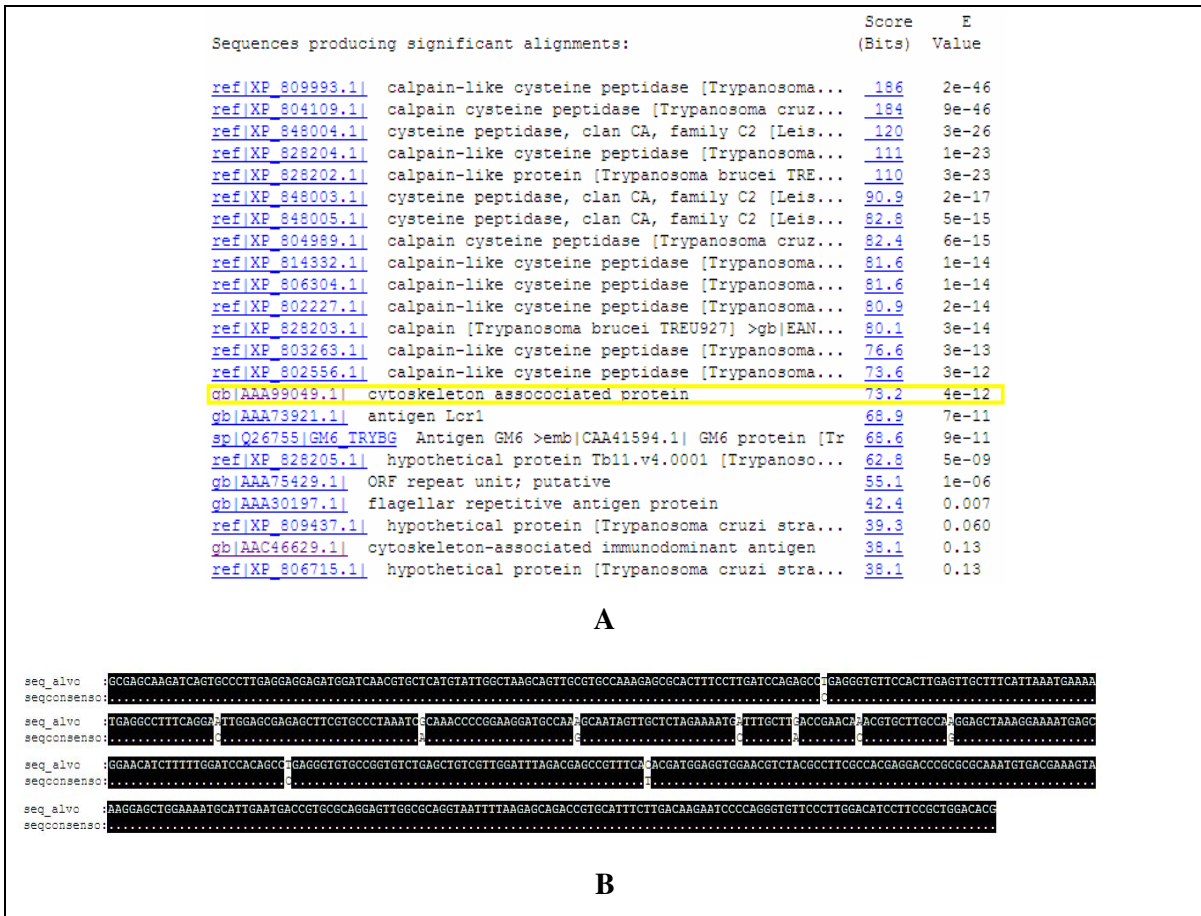


Fig III.2. Seqüência de H49 degenerado/calpaína amplificada por PCR em DNA genômico. Painel A) Seqüência submetida a ORF *finder*. **Painel B)** Alinhamento da seqüência amplificada e da seqüência alvo (XM_809993). As cores preto, cinza e branco indicam identidades de 100, 80 e 60% respectivamente. Os alinhamentos das seqüências foram realizados por *Clustal Method*

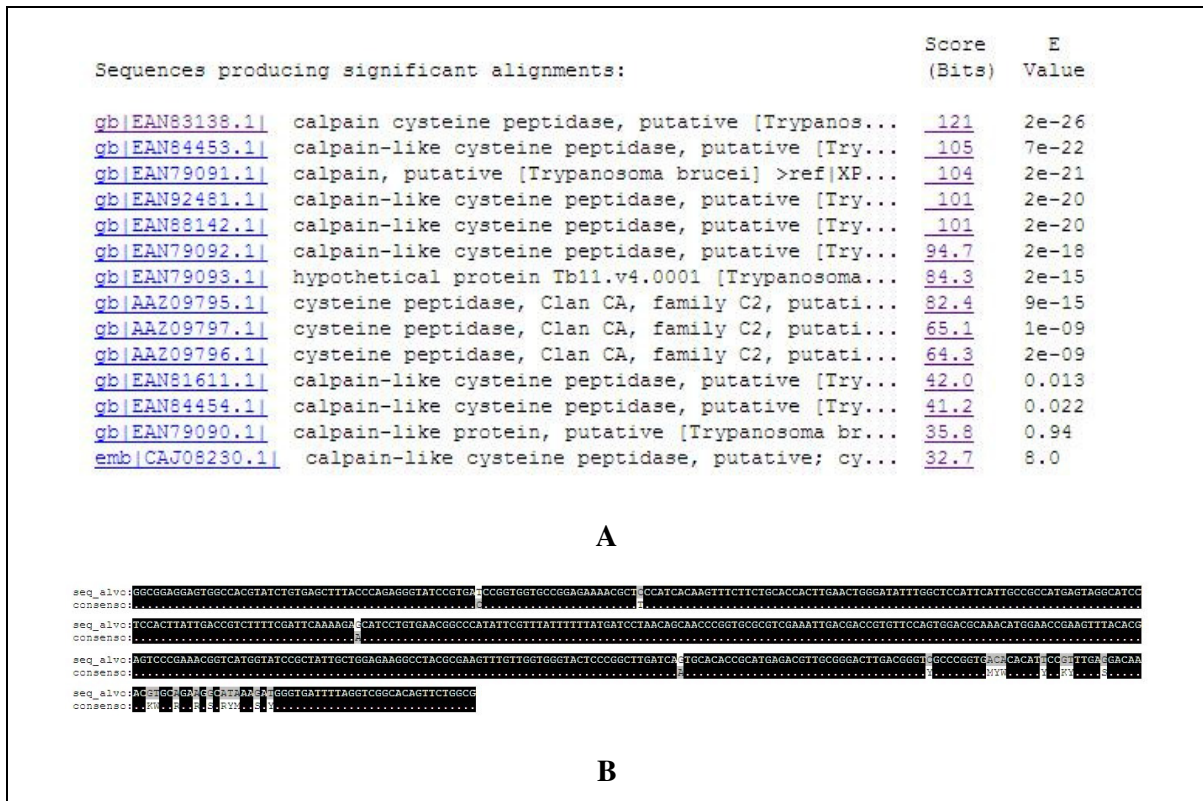


Fig III.3. Sequência de calpaína (Cys-Pc) amplificada por PCR em cDNA. Painei A) Sequência submetida a ORF finder. Painei B) Alinhamento da sequência amplificada e da sequência alvo (XM_ 799896). As cores preto, cinza e branco indicam idêntidades de 100, 80 e 60% respectivamente. Os alinhamentos das seqüências foram realizados por *Clustal Method*



Fig III.4. Sequência de H49 degenerado/calpaína amplificada por PCR em cDNA. Painel A) Sequência submetida a ORF *finder*. **Painel B)** Alinhamento da sequência amplificada e da sequência alvo (XM_ 809993). As cores preto, cinza e branco indicam identidades de 100, 80 e 60% respectivamente. Os alinhamentos das sequências foram realizados por *Clustal Method*.

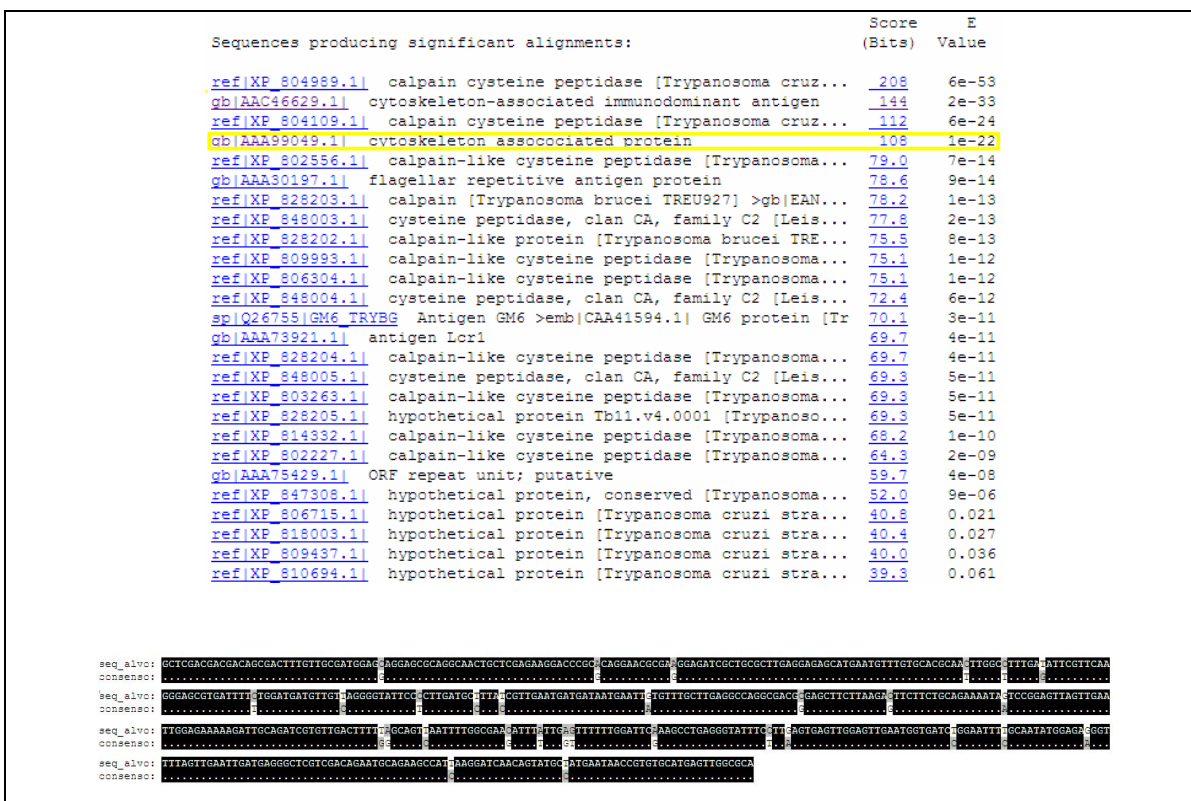


Fig III. 5. Sequência de H49 conservado/calpaína amplificada por PCR em cDNA. PAINEL A) Sequência submetida a ORF *finder*. **PAINEL B)** Alinhamento da sequência amplificada e da sequência alvo (XM_799896). As cores preto, cinza e branco indicam identidades de 100, 80 e 60% respectivamente. Os alinhamentos das sequências foram realizados por *Clustal Method*

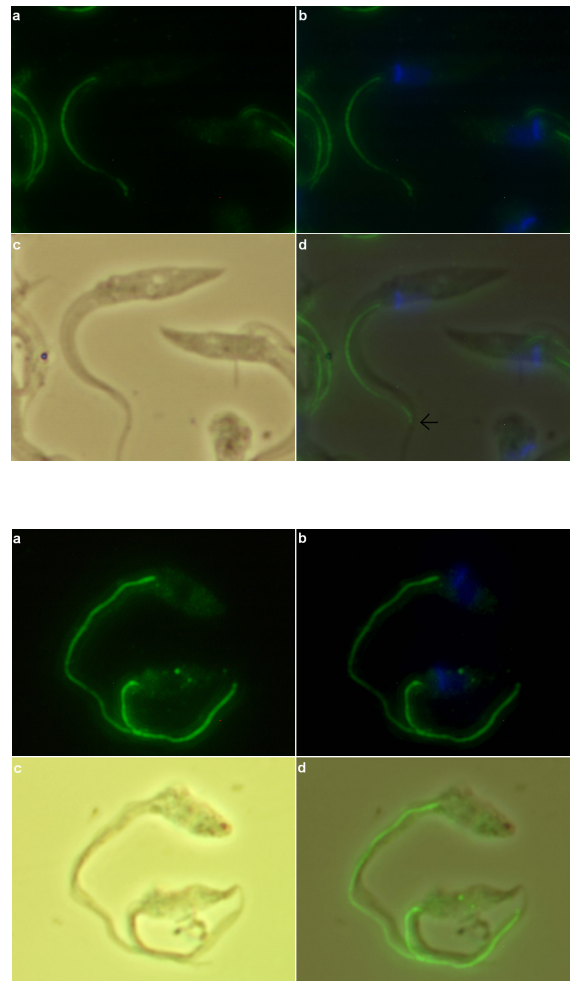


Figura IV. I. Localização celular das repetições H49 por imunofluorescência em epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos da cepa G. Os parasitas foram tratados com Triton X-100 (0,1%) e fixados com paraformaldeído (2%). Reatividade com anticorpos de camundongo anti-H49 (1/100). Revelação com anticorpos anti-imunoglobulinas de camundongo Alexa 488 (1/80). a) anti-H49; b) DAPI (1/30); c) contraste de fase; d) sobreposição de anti-H49 e DAPI. As diluições dos antissoros e DAPI estão indicadas entre parênteses. A seta indica o término da região FAZ.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)