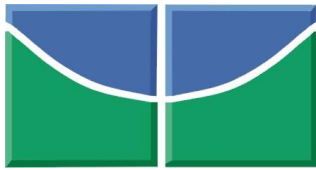


Maurício Farnese

**Identificação das proteínas ligantes de Ca^{2+} /
calmodulina de *Trypanosoma cruzi***

Brasília-DF, 2013



Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Ceilândia

Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde

Identificação das proteínas ligantes de Ca^{2+} / calmodulina de *Trypanosoma cruzi*

Maurício Farnese

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr.Sébastien Olivier Charneau

Brasília, Dezembro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Membros	Matrícula FUB
Presidente: Sébastien Olivier Charneau	1023345
1º membro: Wagner Fontes	151190
2º membro: Izabela Marques Dourado Bastos	1010859
3º membro: Carla Nunes de Araújo	1036050

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	6
Agradecimentos.....	7
Resumo.....	8
Abstract.....	9
1. Introdução.....	10
1.1 Doença de Chagas.....	11
1.2 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	12
1.3 A invasão celular.....	17
1.4 O complexo calmodulina/Ca ²⁺ e seu contexto biológico.....	18
1.5 O complexo calmodulina/Ca ²⁺ em <i>T. cruzi</i> (TcCaM)	21
1.6 Proteômica e histórico da proteômica de <i>T. cruzi</i>	24
2. Justificativa.....	26
3. Objetivos.....	26
4. Material e Métodos.....	28
4.1 Bioinformática.....	29
4.2 Análise experimental e identificação das CaM-BPs.....	29
4.2.1 Cultura de parasito.....	29
4.2.2 Enriquecimento das CaM-BPs por cromatografia de afinidade.....	30
4.2.3 Eletroforese unidimensional.....	30
4.2.4 Preparação das amostras por precipitação.....	30
4.2.5 Eletroforese bidimensional.....	31
4.2.6 Identificação das CaM-BPs por espectrometria de massa do tipo MALDI/TOF.....	31
4.2.7 Identificação das CaM-BPs por LC-MS/MS.....	32
5. Resultados e Discussão.....	33
5.1 Proteínas ligantes de Ca ²⁺ na amastigogênese.....	34
5.2 Proteínas ligantes de Ca ²⁺ na superfície.....	41
5.3 Enriquecimento e análise proteômica das CaM-BPs.....	48
5.3.1 Primeiro enriquecimento de CaM-BPs de <i>T. cruzi</i>	50
5.3.2 Segundo enriquecimento de CaM-BPs de <i>T. cruzi</i>	53
5.3.3 Análise do SDS-PAGE por LC-MS/MS.....	56
6. Conclusão.....	57
7. Perspectivas.....	58
8. Referências bibliográficas.....	59

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
Figura 2. Esquema tridimensional da morfologia da forma tripomastigota.....	13
Figura 3. Esquema tridimensional da morfologia da forma amastigota	14
Figura 4. Esquema tridimensional da morfologia da forma epimastigota.....	15
Figura 5. Representação da estrutura terciária da calmodulina.....	20
Figura 6. Proteínas ligantes de CaM com sua localização e funções gerais.....	24
Figura 7. Tendência de expressão de proteínas durante a amastigogênese.....	38
Figura 8. Fluxograma das etapas experimentais de análises das CaM-BPs.....	49
Figura 9. SDS-PAGE da purificação de CaM-BPs da forma epimastigota.....	50
Figura 10. Perfil eletroforético 2D das CaM-BPs da eluição E1 (1º enriquecim.)... 51	
Figura 11. Perfil eletroforético 2D das CaM-BPs da eluição E2 (1º enriquecim.)... 53	
Figura 12. Perfil eletroforético 2D das CaM-BPs da eluição E1 (2º enriquecim.)... 54	
Tabela 1. Domínios de ligação ao Ca ²⁺ em proteínas reguladas durante a amastigogênese.....	35
Tabela 2. Proteínas ligantes de Ca ²⁺ com expressão regulada durante a amastigogênese.....	36
Tabela 3. Domínios de ligação ao Ca ²⁺ em proteínas de superfície de tripomastigotas e amastigotas.....	43
Tabela 4. Proteínas ligantes Ca ²⁺ na superfície de tripomastigotas e amastigotas.....	44
Tabela 5. Identificação das CaM-BPs do 1º enriquecimento.....	52
Tabela 6. Identificação das CaM-BPs do 2º enriquecimento.....	56
Tabela 7. Identificação da HSP70 de <i>T. cruzi</i> por fragmentação.....	58

ABREVIATURAS

2-DE – eletroforese bidimensional

Å – Angstrom (10^{-10}m)

ACN – acetonitrila

Ca^{2+} - íon cálcio

CaM – calmodulina

CaMBPs – proteínas ligantes de calmodulina

CaMK – cinase calmodulina-dependente

CRT – calreticulina

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DTT – ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiamínico tetracético

EGTA – ácido etilnaglicol-bis(mino etil éter) N', N'-tetracético

IAA – iodoacetamida

IEF – isoeletrofocalização

kDa - kilodalton

LIT - *Liver infusion tryptose* - Infusão de fígado triptose

MALDI - *Matrix-assisted laser desorption/ionization*

MS – espectrometria de massas

TCA – ácido tricloroacético

TcCaM – calmodulina de *T. cruzi*

TFA – ácido trifluoroacético

TOF – *Time of flight*

Agradecimentos

Não posso deixar de iniciar agradecendo ao prof. Sébastien, que me proporcionou tanto conhecimento para chegar até aqui, com paciência, companheirismo e amizade.

Agradeço imensamente ao amigo Rayner, sem o qual não poderia ter finalizado esse trabalho. Sempre muito prestativo.

A todos os colegas, professores e funcionários do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, obrigado por tantos ensinamentos e bons momentos.

Agradeço ainda ao prof. Jaime Martins de Santana, a Profa. Izabela M. D. Bastos e todos os pesquisadores do Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro pela importante colaboração com a cultura celular.

Outra importante colaboração foi do prof. Fabio Gozzo e Hugo César R. de Jesus do Lab. Dalton de espectrometria de massas, na Unicamp.

A minha família que sempre me apoia incondicionalmente, agradeço pela jornada da vida.

Pela paciência, lealdade e incentivo, agradeço minha companheira Dayane.

Um agradecimento ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde por me proporcionar esse estudo.

Agradeço ainda aos membros da banca, Wagner Fontes, Izabela Dourado e Carla Nunes.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* atinge milhões de pessoas em todo mundo, especialmente na América Latina, onde é endêmica. Em seu ciclo de vida, o parasito passa por diversos processos de diferenciação para adaptar-se a diferentes condições dentro do hospedeiro mamífero e do inseto triatomíneo. Componentes localizados na superfície do parasito e da célula hospedeira desempenham papéis importantes na invasão, entretanto os mecanismos envolvidos são muito discutidos. Sabe-se que a sinalização mediada por Ca^{2+} é um aspecto importante na invasão celular e na diferenciação do parasito. A calmodulina (CaM) é uma proteína citoplasmática Ca^{2+} -dependente em eucariotos que regula várias proteínas. A ligação da CaM ao Ca^{2+} induz uma mudança conformacional que promove a interação desta com diversas proteínas com importantes funções biológicas. A CaM de *T. cruzi* (TcCaM) tem sido associada à várias funções diferentes como regulação do crescimento, estimulação enzimática, transdução de sinais, além de modular os efeitos do Ca^{2+} . Desta forma, a fim de melhor entender o envolvimento das proteínas ligantes de CaM (CaM-BPs) nos processos de invasão e diferenciação de *T. cruzi*, foram adotadas nesse trabalho duas abordagens de identificação de proteínas ligantes de Ca^{2+} e/ou CaM. Primeiramente pela análise bioinformática de proteínas diferencialmente expressas durante a amastigogênese e proteínas presentes na superfície do parasito. Foram preditas 17 proteínas ligantes de Ca^{2+} dentre as identificadas com expressão regulada durante a amastigogênese e 36 proteínas na superfície de tripomastigota e amastigota. Estas possuem funções enzimática, de armazenamento, transporte dentre outras. A segunda foi uma abordagem experimental onde identificamos 6 proteínas, as quais desempenham funções estruturais, motilidade, adesão ou enzimática. Esta segunda vertente foi realizada experimentalmente por uma abordagem proteômica. As CaM-BPs extraídas da forma epimastigota foram enriquecidas por cromatografia de afinidade e separadas em géis eletroforéticos (1D-PAGE e 2D-PAGE). A identificação por espectrometria de massas foi iniciada e já foram identificados componentes da estrutura celular como α - e β -tubulinas, proteína *paraflagellar rod* putativa e uma proteína de transdução de sinal intracelular, a HSP70. Esses dados auxiliam no entendimento sobre como o Ca^{2+} , a TcCaM e seus ligantes participam em processos celulares como invasão e diferenciação do *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; calmodulina; proteômica; cromatografia de afinidade, espectrometria de massas.

Abstract

Chagas' disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, afflicts millions worldwide especially in Latin America where it is endemic. During its life-cycle, the parasite undergoes several differentiation events in order to adapt to a variety of conditions inside both mammalian host and triatomine vector. Components from both parasite and host-cell surfaces play major roles in invasion, however the mechanisms involved are still much discussed. It is known that Ca^{2+} mediated signaling is an important aspect of host-cell invasion and parasite differentiation. Calmodulin (CaM) is a cytoplasmic Ca^{2+} -dependent protein that regulates several proteins in eukaryotes and the binding of Ca^{2+} to CaM induces conformational changes, which promotes the interaction to a variety of other proteins with important biological functions. *T. cruzi* CaM (TcCaM) has been linked to several functions such as growth regulation, enzyme stimulation, and signal transduction, besides modulating the effects of Ca^{2+} concentration. Thus, in order to better understand the involvement of CaM binding proteins (CaM-BPs) in the invasion process and *T. cruzi* differentiation, was adopted here two approaches to identify Ca^{2+} - and/or CaM- binding proteins. First through bioinformatic prediction of such proteins among those identified as differentially expressed during amastigogenesis and those presented in the parasite cell surface. It was predicted 18 Ca^{2+} -binding proteins with regulated expression level during differentiation and 36 in the surface of trypomastigotes and/or amastigotes. These have enzymatic, storage, transportation and others functions. The second was an experimental approach where we identified 6 proteins, which play structural, motility, adhesion or enzymatic functions. This second part was an experimental proteomic approach, where CaM-BPs from epimastigotes were enriched by affinity chromatography and separated by gel electrophoresis (1D-PAGE and 2D-PAGE). Mass spectrometric identifications were initiated and it already has been identified cell structure components such as α - and β -tubulins, putative paraflagellar rod proteins and a signal transduction protein, the HSP70. This data contribute to the understanding of the involvement of Ca^{2+} , TcCaM and their ligands in the invasion and differentiation processes.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; calmodulin; proteomics; affinity chromatography; mass spectrometry.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana é uma infecção causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Estima-se que 7 a 8 milhões de pessoas estão infectadas no mundo, principalmente em áreas endêmicas na América Latina onde a doença está presente em 21 países (WHO, 2013). O principal modo de transmissão desta doença em áreas endêmicas é através das fezes infectadas de triatomíneos, conhecidos popularmente como barbeiros, entretanto o *T. cruzi* também pode ser transmitido por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos, transmissão transplacentária, acidentes laboratoriais, e também a transmissão pode ocorrer através dos alimentos contaminados com fezes do barbeiro, a qual vem se tornando muito frequente (WHO, 2013). Estes insetos pertencem à família Reduviidae e geralmente vivem nas frestas de casas mal construídas em áreas rurais ou suburbanas, onde normalmente se escondem durante o dia e tornam-se ativos à noite, quando se alimentam de sangue humano, tendo preferência por uma área exposta da pele como a face. Ao realizar o repasto, o inseto defeca próximo à picada e os parasitos alcançam a corrente sanguínea quando a pessoa se coça e assim leva as fezes sobre a abertura da picada, ou em mucosas (WHO, 2013).

A doença de Chagas apresenta-se em duas fases. A fase inicial aguda dura cerca de dois meses após a infecção, sendo caracterizada por grande número de parasitos circulantes no sangue. Na maioria dos casos, os sintomas são inexistentes ou leves, mas podem incluir dores de cabeça, febre, aumento dos gânglios linfáticos, palidez, dor muscular, dificuldade em respirar, inchaço e dor abdominal ou torácica. O primeiro sinal característico visível pode ser uma lesão de pele ou um inchaço arroxeadado da pálpebra de um olho. Este achado ocorre em 50% dos casos notificados, em média (WHO, 2013). Na fase crônica, os parasitos se encontram no interior das células, principalmente no músculo cardíaco e no sistema digestivo. Até 30% dos pacientes sofrem de distúrbios cardíacos, 10% de distúrbios digestivos (tipicamente dilatação do esôfago ou cólon) e uma minoria de distúrbios neurológicos ou mistos. Com o passar dos anos, a infecção pode conduzir o indivíduo à insuficiência cardíaca ou morte súbita causada pela destruição progressiva do músculo cardíaco (WHO, 2013).

O diagnóstico precoce e o tratamento da doença de Chagas continuam a serem desafios, com a fase aguda muitas vezes passando despercebida e a terapia durante a fase crônica sendo paliativa e não curativa (Rassi *et al.*, 2009; Perez-Molina *et al.*, 2009). Apesar de um século de pesquisa científica, a relação entre a biologia celular da interação parasito-hospedeiro e a fisiopatologia da doença de Chagas ainda permanece pouco compreendida.

1.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi possui um ciclo de vida complexo que envolve quatro estágios morfogenéticos principais (Fig. 1) (Tanowitz *et al.*, 1992). Epimastigota e tripomastigota metacíclico são formas típicas do inseto, enquanto que a forma sanguínea de tripomastigota e amastigota são específicos do hospedeiro vertebrado.

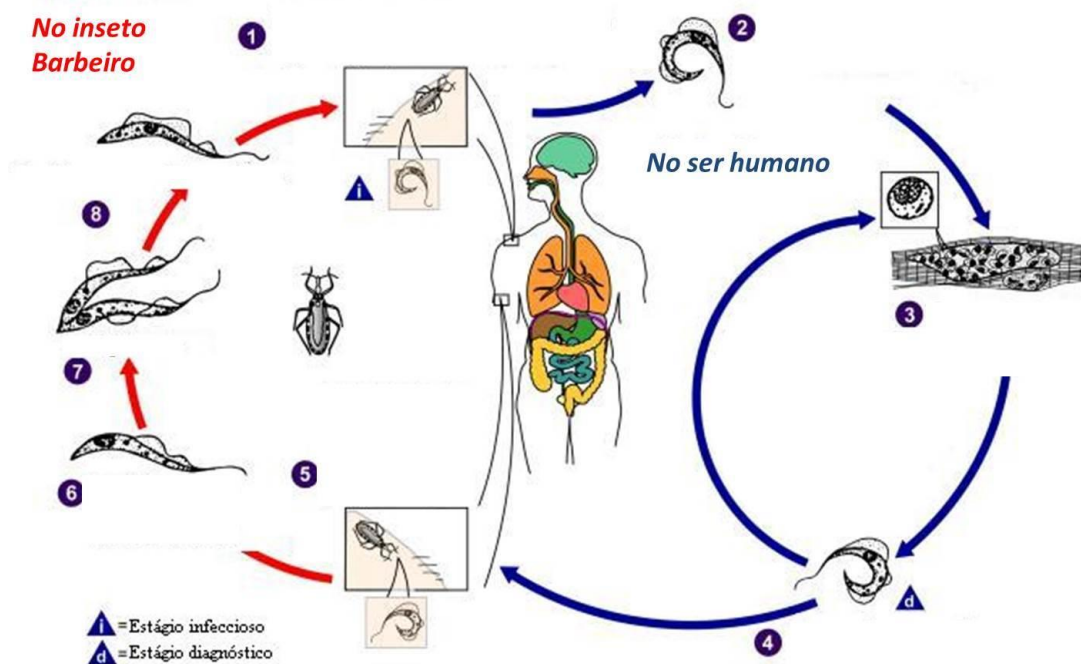


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. O triatomíneo alimenta-se do sangue dos mamíferos e defeca em sua pele (1). A presença da forma infectante tripomastigota metacíclico nas fezes contamina o indivíduo pela entrada do protozoário na corrente sanguínea por meio de fissuras na pele (2). Uma vez no sangue, este invade células e passa a se diferenciar e multiplicar em formas arredondadas replicativas chamadas amastigotas (3). Em seguida o protozoário se diferencia novamente na forma flagelada tripomastigota (4) que ainda na corrente sanguínea, tem a capacidade de invadir novas células ou a contaminação de outro triatomíneo (5) que se alimente desse mamífero infectado (6). Dentro do trato digestório do inseto, o parasito passa por novas

transformações tornando-se epimastigotas (7) e voltando a ser infectante na forma tripomastigota metacíclico (8). (Adaptado de <http://www.dpc.cdc.gov/dpdx>).

A forma tripomastigota é alongada e levemente achatada medindo cerca de 25 µm de comprimento e 2 µm de diâmetro. O acidocalcissoma é uma organela ácida eletrodensa envolvida no armazenamento de íons cálcio (Ca²⁺) e sua homeostase (Docampo *et al.*, 2005) e se localiza na parte anterior da célula. Apresenta cinetoplasto arredondado e localizado posteriormente ao núcleo na célula do parasito. Essa organela rica em DNA é capaz de se autoduplicar. O flagelo emerge de uma bolsa flagelar e se adere ao longo da extensão do corpo celular formando a membrana ondulante e torna-se livre na região anterior. As formas tripomastigotas são altamente infectantes, sendo encontradas no hospedeiro mamífero na corrente sanguínea, no espaço intercelular e intracelular (tripomastigota sanguíneo) e no inseto vetor na região posterior do tubo digestório (tripomastigota metacíclico) (Fig.2).

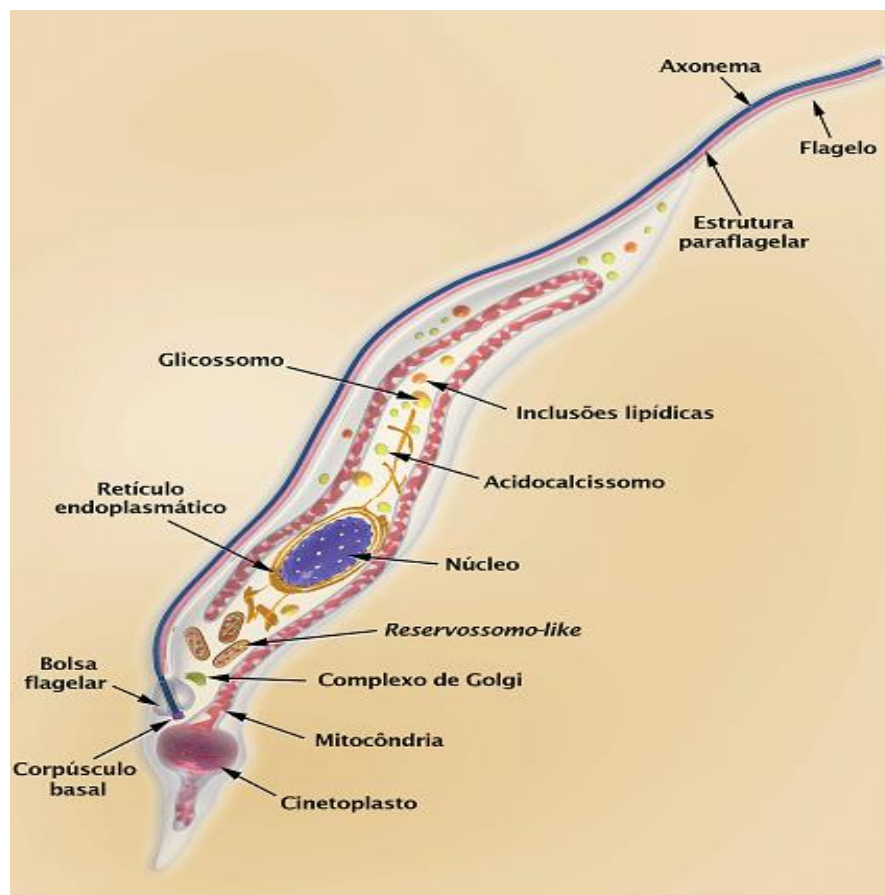


Figura 2. Esquema tridimensional dos aspectos morfológicos da forma tripomastigota mostrando as principais estruturas celulares (Teixeira, 2011).

A forma amastigota é arredondada e mede cerca de 5 μm de diâmetro apresentando flagelo reduzido e cinetoplasto em forma de bastonete situado entre o núcleo e a base da bolsa flagelar. O núcleo do parasito nessa forma de vida é relativamente grande e redondo. Os parasitos nessa forma de vida, ainda são infecciosos, porém menos eficientes. Os amastigotas são encontrados preferencialmente no interior de células de mamíferos infectadas, onde se multiplicam com um tempo médio de duplicação da população de 15 h e o ciclo intracelular de replicações e diferenciação completo dura cerca de quatro dias (Engel, Doyle *et al.*, 1985) (Fig. 3).

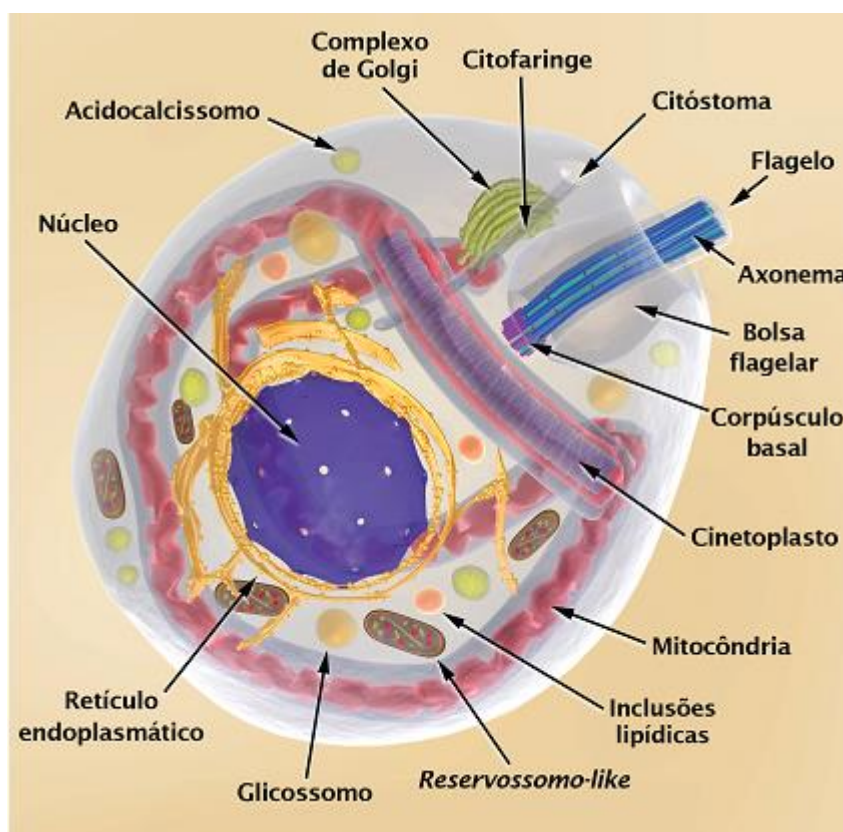


Figura 3. Esquema tridimensional dos aspectos morfológicos da forma amastigota mostrando as principais estruturas celulares (Teixeira, 2011).

A forma epimastigota é replicativa e não é considerada como infecciosa. Essa forma de vida é encontrada no aparelho digestório dos vetores triatomíneos após o repasto com sangue contaminado com tripomastigotas, os quais se diferenciam para essa forma provavelmente devido ao estresse nutricional. Mede entre 20 e 40 μm de comprimento e sua morfologia celular é fusiforme e possui o cinetoplasto em forma de bastão, localizado próximo à base da bolsa flagelar de onde emerge o

flagelo alongado que, apesar de se aderir por toda a extensão da célula do parasito, possui a maior parte do flagelo desprendido do corpo (Fig. 4).

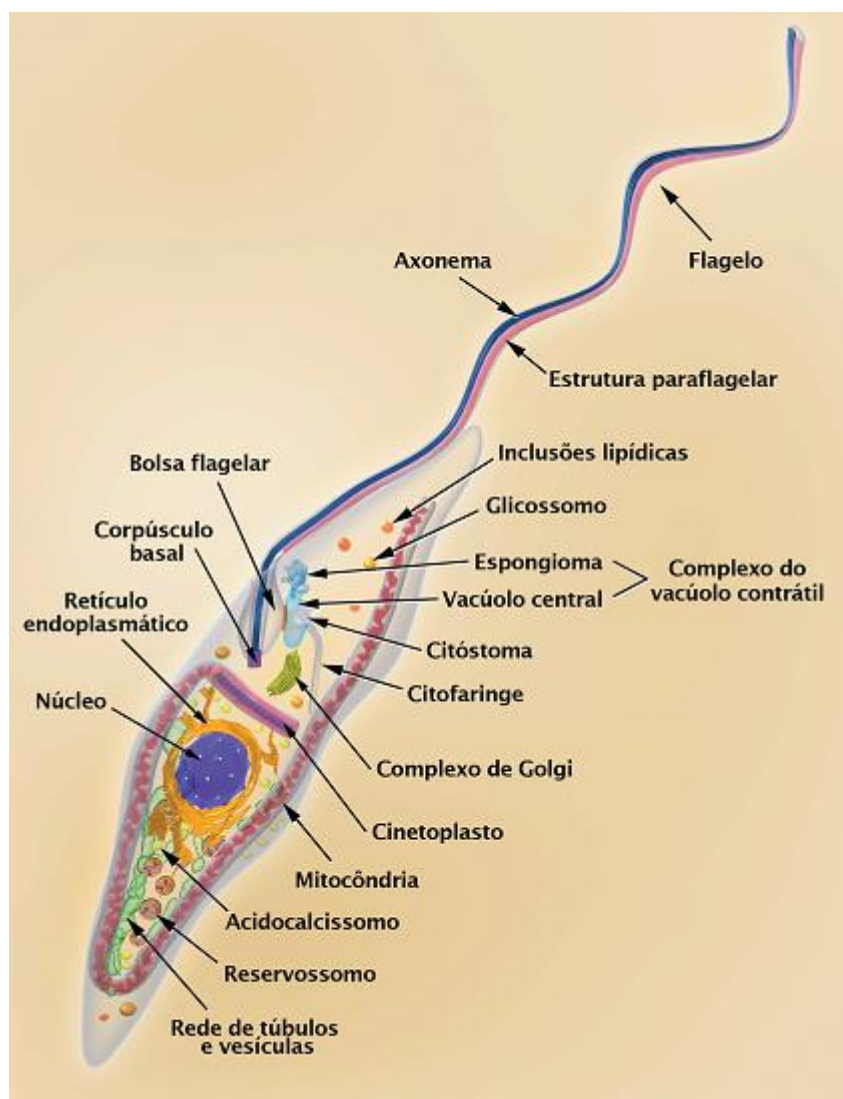


Figura 4. Esquema tridimensional da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* mostrando as principais estruturas celulares (Teixeira, 2011).

Cada estágio de desenvolvimento distingue-se pela morfologia e expressão de antígenos de superfície e de componentes intracelulares estágio-específicos (Andrews *et al.*, 1998; Contreras *et al.*, 1985). As formas tripomastigotas metacíclicas são, a princípio, capazes de infectar qualquer célula nucleada do hospedeiro vertebrado, porém existe um tropismo dependente da cepa infectante (Brenner, 1985). De modo geral as primeiras células a serem invadidas são macrófagos, fibroblastos e células musculares. Os tripomastigotas infectam as

células não fagocíticas do hospedeiro vertebrado através do reconhecimento de componentes localizados na superfície do parasito e da célula hospedeira. Foi sugerido que essa adesão seja mediada por glicoproteínas e lectinas (proteínas capazes de se ligar a carboidratos) tanto do parasito quanto das células hospedeiras. Desta maneira, componentes localizados na superfície do parasito e da célula hospedeira desempenham papéis importantes para a invasão (Burleigh e Woolsey, 2002). O parasito então é interiorizado através de uma depressão na membrana (Burleigh e Andrews, 1998), que desencadeia uma cascata de sinalização disparando um pico de concentração de cálcio tanto no parasito quanto na célula hospedeira (Dorta *et al.*, 1995) e promovendo a ativação de proteínas cinases e fosfatases no sítio de contato célula-célula (Vieira *et al.*, 2002).

Outras moléculas que funcionam como segundo mensageiro para efetuar a transdução de sinais intracelular são AMP cíclico (c-AMP), GMP cíclico (c-GMP), óxido nítrico e segundos mensageiros lipofílicos como diacilglicerol, ceramida e eicosanóides (Campbell e Reece, 2004). Após a invasão, os tripomastigotas encontram-se transitoriamente no vacúolo parasitóforo. Neste momento, os lisossomos se fundem com o vacúolo e liberam seu conteúdo, tornando-o ácido (Andrews, 1993). Assim, a membrana parasitófora é gradualmente degradada (Carvalho *et al.*, 1989) devido à liberação de enzimas pelo parasito e ação da proteína do tipo porina denominada Tc-tox (Andrews *et al.*, 1990). Por meio desses processos as formas tripomastigotas escapam para o citoplasma celular, onde dão continuidade a diferenciação para formas amastigotas. Os amastigotas iniciam um processo de divisões sucessivas e posteriormente se diferenciam novamente em tripomastigotas, ocorrendo em seguida o rompimento das células hospedeiras. Os tripomastigotas são liberados no meio extracelular podendo alcançar a corrente sanguínea através da qual alcançam outras regiões do corpo do hospedeiro vertebrado infectando novas células ou, enquanto na circulação, serem capturados pelo inseto vetor, reiniciando o ciclo (Brener, 1999).

1.3 A invasão celular

Ao longo da evolução, o *T. cruzi* tem desenvolvido mecanismos complexos e redundantes para garantir o sucesso na invasão celular, variando desde a cepa do parasito, à fase do ciclo, e ainda aos tipos celulares do hospedeiro. Aspectos da invasão que variam de acordo com tipos de células podem ser: interações nas superfícies, eventos enzimáticos, sinalização mediada por cálcio, o tráfego de moléculas nas membranas do parasito e do hospedeiro, as contribuições do citoesqueleto para captação do parasito e, finalmente a entrada no citoplasma através da fuga do vacúolo parasitóforo (Conrad L. *et al.*, 2009).

Os mecanismos celulares envolvidos na fagocitose têm sido muito estudados. Já na infecção de células não fagocíticas, pelo menos duas vias principais foram caracterizadas. O primeiro baseia-se em uma sinalização mediada por cálcio na superfície lisossomal, que irá proporcionar membranas que formarão o vacúolo de uma forma dependente da polimerização de actina e de microtúbulos (Tardieux *et al.*, 1994; Tyler e Engman, 2001; Schenkman *et al.*, 1991), enquanto o segundo é uma invaginação da membrana plasmática envolvendo a sinalização por cinase dependente de inositol trifosfato (IP3) e essa é independente de polimerização de actina (Woolsey *et al.*, 2003; Burleigh, 2005; De Souza, 2002; Andrade e Andrews, 2005).

A interação do protozoário com moléculas da célula hospedeira faz com que glicoproteínas ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI) na superfície celular sofram uma intensa modificação de seu açúcar e de suas cadeias laterais atuando como enzimas de superfície aderindo à membrana plasmática da célula hospedeira para realizar a fusão. (Brown e Waneck, 1992). As proteínas GPI-ancoradas em *T. cruzi* servem como moléculas de adesão (Field *et al.*, 1991), mas também formam uma importante camada de evasão imune (Ferguson *et al.*, 1994). Além disso, as proteínas GPI-ancoradas podem associar e definir o compartimento de microdomínio lipídico (Karakhanova *et al.*, 2010). Essas moléculas da superfície iniciam eventos de sinalização no parasito e na célula hospedeira. O ambiente da membrana plasmática contém microdomínios lipídicos, os quais regulam eventos de sinalização através da organização espaço-temporal das proteínas (Kenworthy *et al.*, 2004). Essas bolsas lipídicas na membrana do parasito parecem interferir na fluidez da membrana, e um

comprometimento das vias de sinalização parasito-hospedeiro favorece a invasão do agente patogênico no hospedeiro (Barrias *et al.*, 2007).

Cerca de 50% do genoma do *T. cruzi* codifica uma diversidade de proteínas de superfície como proteases GP63, a superfamília GP85/trans-sialidade, as mucinas e as proteínas associadas às mucinas (El-Sayed *et al.*, 2005; Alves e Colli, 2008). A adaptação do parasito aos hospedeiros vertebrados tem sido creditada ao polimorfismo estrutural e funcional das isoformas de cisteína-proteases, como por exemplo dos genes codificantes da cruzipaina, mostrando diferentes preferências de substrato e suscetibilidade à inibidores (dos Reis *et al.*, 2008).

Tripomastigotas apresentam um receptor mediado pelo transporte de ATP, sistema regulado por tirosina e serina/treonina fosfocinase (Sadigursky e Santos-Buch, 1997). A adesão do protozoário à célula hospedeira é feita através de receptores colinérgicos muscarínicos e beta-adrenérgicos, e a ligação a receptores na membrana de monócitos modula as vias de transdução de sinal intracelular (Borda *et al.*, 1991). A invasão ocorre após o recrutamento do vacúolo abaixo da membrana plasmática, que se invagina para aumentar a taxa de fusão com os lisossomos (Andrade e Andrews, 2004). Na internalização do parasito ocorre aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular antes da fusão do lisossomo (Andrade e Andrews, 2005).

1.4 O complexo calmodulina/ Ca^{2+} e seu contexto biológico

O cálcio em sua forma bivalente é um elemento essencial para diversas funções biológicas. Em muitos organismos, a maioria do Ca^{2+} se encontra complexado com fosfatos para formar exo ou endoesqueletos que não apenas servem como suporte estrutural, mas também tem importante função de tamponar os níveis de Ca^{2+} dentro dos fluidos extracelulares ($\sim 1.10^{-3}$ M) (Chin e Mean, 2000). Por outro lado, a concentração intracelular basal de Ca^{2+} livre ($\sim 1.10^{-7}$ M) é milhares de vezes menor que fora das células, proporcionando potencial para o influxo imediato para seu interior onde irá atuar como segundo mensageiro. Diversos estímulos promovem o movimento de Ca^{2+} de fora para dentro da célula, via canais de Ca^{2+} na membrana plasmática, ou de compartimentos intracelulares. O *T. cruzi* possui uma grande organela ácida e eletrodensa responsável pelo armazenamento

de Ca^{2+} , o acidocalcissoma. Esse Ca^{2+} assim que é liberado se encontra brevemente disponível para atuar na sinalização celular, e em seguida proteínas especializadas e as bombas de Ca^{2+} se combinam imediatamente para sequestrar e transportá-lo para o ambiente extracelular ou locais de armazenamento dentro da própria célula. Nos instantes em que se encontra livre no citoplasma, o Ca^{2+} produz sinais que alteram o metabolismo e assim, funções celulares e o fazem de duas formas diferentes. Ou a ligação do Ca^{2+} às suas proteínas ligantes desencadeia a transdução de sinais, mas não produz nenhuma alteração significativa na conformação desse ligante, são as proteínas de transporte e tamponamento de Ca^{2+} . Ou a outra forma é quando a ligação provoca alteração da conformação tridimensional e funcional, são os sensores de Ca^{2+} . Neste último grupo se enquadra a proteína multifuncional calmodulina (Chin e Mean, 2000).

A calmodulina (CaM) é uma das proteínas mais onipresentes no reino animal (Garcia-Marchan *et al.*, 2009). Em mamíferos ela é encontrada principalmente no encéfalo e no coração, este último é justamente o órgão tipicamente afetado pela doença de Chagas. É uma proteína citoplasmática cálcio-dependente, fosforilada por proteínas serina/treonina cinases, e tirosina cinases (Benaim e Villalobo, 2002) e possui quatro sítios de ligação ao Ca^{2+} . A CaM é uma molécula de 16 kDa e 65 Å, e sua estrutura terciária, quando ligada ao Ca^{2+} se apresenta sob a forma de halter, ou seja dois agrupamentos globulares nos seus C- e N- terminais que são separados por uma α -hélice central flexível (fig. 5). Cada agrupamento possui duas regiões de ligação com íons cálcio (*EF hand*), com 12 importantes resíduos, principalmente glutamato e aspartato, os quais coordenam a associação ao cálcio (Babu *et al.*, 1985). A ligação ao Ca^{2+} induz uma mudança conformacional na CaM, expondo resíduos hidrofóbicos que promovem a interação do complexo Ca^{2+} /CaM com diversas proteínas, incluindo a família de Ser/Thr-cinases com importante função biológica como por exemplo na diferenciação celular e ciclo celular (Soderling, 1999).

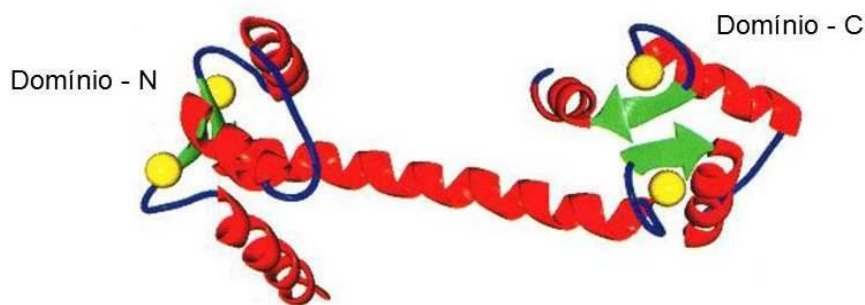


Figura 5. Representação em fita da estrutura terciária de CaM demonstrando α -hélices em vermelho, átomos de Ca^{2+} em amarelo, folhas β em verde e *loops* em azul (Finn e Forsén, 1995).

A concentração e a localização da CaM na célula tem um importante papel na regulação da atividade biológica e constitui, no mínimo 0,1% do total de proteínas presentes em uma célula, e é expressa em níveis ainda mais elevados em células de rápido crescimento, especialmente aquelas submetidas à divisão e diferenciação (Chin e Mean, 2000).

Não foram encontradas substituições entre as sequências da CaM em vertebrados, o que indica que essa proteína foi muito bem conservada ao longo da evolução. No entanto, diferenças na sequência de aminoácidos entre a proteína de mamíferos e de *T. cruzi* têm sido descritas. A análise da sequência da proteína mostrou substituição de 15 aminoácidos na proteína do *T. cruzi* comparado ao seu homólogo em mamíferos, o que constitui uma característica importante. (Garcia-Marchan *et al.*, 2009).

É interessante ressaltar que muitas das reações reguladas pela CaM têm efeitos opostos. Por exemplo, ela ativa tanto enzimas que sintetizam quanto degradam AMP cíclico. Uma possível resposta a esse paradoxo é que as células podem controlar compartimentos subcelulares de CaM e deste modo regular a disponibilidade tanto de proteínas alvo como de CaM. Uma forma de alcançar essa tarefa é através do tráfego e posicionamento dos mRNAs que codificam CaM para locais especializados, seguido de tradução local se necessário (Toutenhoofd e Strehler, 2000). Além disso a CaM pode por si só ser objeto de regulação por vários mecanismos como fosforilação. Recentemente foi sugerido que uma característica fundamental na especificidade dos alvos da CaM é o caráter negativo através de repulsão eletrostática de alvos não específicos (Andre *et al.*, 2004).

A alteração na concentração intracelular de Ca^{2+} regula a CaM de três formas distintas: (i) em nível celular, direcionando sua distribuição subcelular; (ii) em nível

molecular, promovendo diferentes modos de associação com proteínas alvo; (iii) orientando diversos estados conformacionais na CaM que resulta na ativação de alvos específicos.

Em âmbito subcelular, a coordenação espacial e temporal entre Ca^{2+} , CaM e seus efetores são importantes para canalizar todos os três componentes em uma via de sinalização produtiva. A capacidade da CaM em integrar sinais de Ca^{2+} para diferentes contextos celulares de migração entre vários compartimentos reforça este ponto. Em âmbito intermolecular, CaM utiliza diferentes modos de interações Ca^{2+} -dependentes, que são responsáveis pela geração de afinidade e de especificidade para os alvos. Em âmbito submolecular, a exposição ao Ca^{2+} de grupos doadores de energia integrantes da CaM é acoplada aos grupos receptores de energia nos seu alvos, levando a alterações na ligação do Ca^{2+} pela CaM assim como na função de seus efetores (Chin e Mean, 2000).

Estes níveis de regulação se relacionam através da mobilidade dos grupos separados que derivam das diferentes interações entre CaM e seus alvos. Por isso, algumas classes de proteínas podem ancorar CaM em localizações celulares específicas dependendo da estabilidade de determinado complexo efector da CaM na ausência e na presença de sinais de Ca^{2+} . É provável que a afinidade desses complexos seja devida a interações complementares entre os locais das proteínas alvo e os sítios da CaM que modificam sua conformação em resposta ao Ca^{2+} . As interações Ca^{2+} -dependentes não só afetam a afinidade do complexo, mas também regulam a atividade dos efetores (Chin e Mean, 2000).

1.5 O complexo calmodulina/ Ca^{2+} em *Trypanosoma cruzi* (TcCaM)

A calmodulina tem sido associada a várias funções diferentes em tripanossomatídeos, como regulação do crescimento (Eid e Sollner-Webb, 1991), estimulação de fosfodiesterases cAMP-dependentes (Tellez-Iñon *et al.*, 1985), da proteína cinase CaM-dependente (Ogueta *et al.*, 1994), transdução de sinal na via de cGMP-óxido nítrico (Paveto *et al.*, 1995), e ainda estimulação de Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (Benaim *et al.*, 1995). O aumento de Ca^{2+} citosólico regula uma série de respostas de transdução de sinais transmembrana. A maioria dos efeitos do Ca^{2+} intracelular são modulados pela CaM. Por sua vez, o complexo Ca^{2+} /CaM ativa proteínas cinases Ca^{2+} /CaM-dependentes (CaMK), ao que parece

ser uma família de enzimas multifuncionais já que transmite informações para múltiplos substratos-alvos em resposta à elevações transitórias de Ca^{2+} intracelular. Entre as estruturas conhecidas da maioria das cinases, o segmento de ligação à CaM pode se apresentar como uma sequência linear que se liga a regiões hidrofóbicas do túnel α -hélice formado entre os dois domínios globulares da CaM (Meador *et al.*, 1992). A autofosforilação modulada por Ca^{2+} /CaM é a característica mais notável das CaMKs (Schulman, 1993).

Estudos recentes mostraram que a ligação do complexo Ca^{2+} /CaM à isoformas de CaMK é absolutamente necessária para o funcionamento da cascata da CaM-cinase (Tokumitsu e Soderling, 1996). Essas cinases já foram bem caracterizadas em um estudo com CaMkinase II, CaMKK, e cinase da cadeia leve da miosina, essa última de forma independente de Ca^{2+} (Chin e Means, 2000; Crivici e Ikura, 1995). Foi demonstrado que a CaM pode assumir no mínimo três diferentes conformações em virtude do ligante flexível que conecta os dois domínios globulares responsáveis pela ligação ao Ca^{2+} e proteínas-alvo. Essas interações envolvem hélices curtas (aproximadamente 20 resíduos) formados pelo domínio de ligação à CaM das cinases e assim sugere um critério preditivo de identificação dos sítios da CaM (Rhoads e Friedberg, 1997). Nesses complexos, os domínios de ligação à CaM geralmente se enquadram em 3 categorias (Sequência de resíduos de aminoácidos: 1-10, 1-14, 1-16) que se distinguem pelo seu espaçamento hidrofóbico volumoso e pelos aminoácidos básicos e são suportadas por resíduos aromáticos próximos das extremidades.

Análises do perfil de expressão de proteínas ligantes de TcCaM, em suas fases de diferenciação indicam que essas proteínas podem ser diferencialmente expressas nos estágios específicos de desenvolvimento (Orr *et al.*, 1992). A maioria dessas proteínas estágio-específicas foram encontradas em vesículas nas formas replicativas (epimastigota e amastigota), e em menores concentrações no citosol e na membrana. Essas proteínas ligantes variam em subunidades de peso molecular maior que 200 kDa a 20 kDa ou menos. Foram encontradas no citoplasma das três formas de vida do parasito, o mesmo espectro de proteínas ligantes de CaM (CaM-BPs, *CaM-binding proteins*), embora em quantidades diferentes, sugerindo que essas proteínas estariam realizando funções gerais de manutenção (*housekeeping*). Na membrana dos três estágios de vida e na fração particulada de tripomastigota tudo indica haver escassez de CaM-BPs. (Orr *et al.*, 1992).

Baseado na necessidade de ligação ao Ca^{2+} , as proteínas que se ligam à CaM podem ser classificadas em três categorias: Ca^{2+} -dependente, Ca^{2+} -independente e Ca^{2+} -inibida (James *et al.*, 1995). Existe um grande número de proteínas ligadas de um modo dependente de Ca^{2+} , com alta afinidade (constante de dissociação na faixa de nM), sem qualquer homologia de sequência forte das regiões de ligação (Berggard *et al.*, 2006). A região que se liga à CaM é uma α -hélice anfipática com carga líquida positiva, e muitos motivos foram identificados (Yap *et al.*, 2000) embora estes não estejam em conformidade a todos os alvos. Algumas das proteínas ligantes de CaM, seus compartimentos celulares e funções gerais são demonstradas na figura 6.

Uma característica incomum das CaM-BPs é a falta de uma sequência conservada de aminoácidos para ligação à CaM. Uma comparação quantitativa de estruturas de raio X de alta resolução com outras estruturas cristalinas de complexos peptídeos de CaM de nematódeos revelaram diferenças significativas na orientação relativa de dois domínios da CaM (Kurokawa *et al.*, 2001). Apesar da orientação da ligação dos alvos peptídeos do domínio C-terminal ser bem conservada, ocorrem grandes mudanças na orientação entre o alvo e o domínio N-terminal da CaM, que envolve um movimento da hélice N-terminal da CaM, respeitando os outros três sítios *EF-hand* no domínio N-terminal. A estrutura atual também revela uma série de contatos específicos entre CaM e CaMKK, incluindo interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio. Estas interações identificadas na estrutura devem desempenhar um papel fundamental na determinação da direção da ligação da CaMKK em relação aos dois domínios da CaM (Kurokawa *et al.*, 2001).

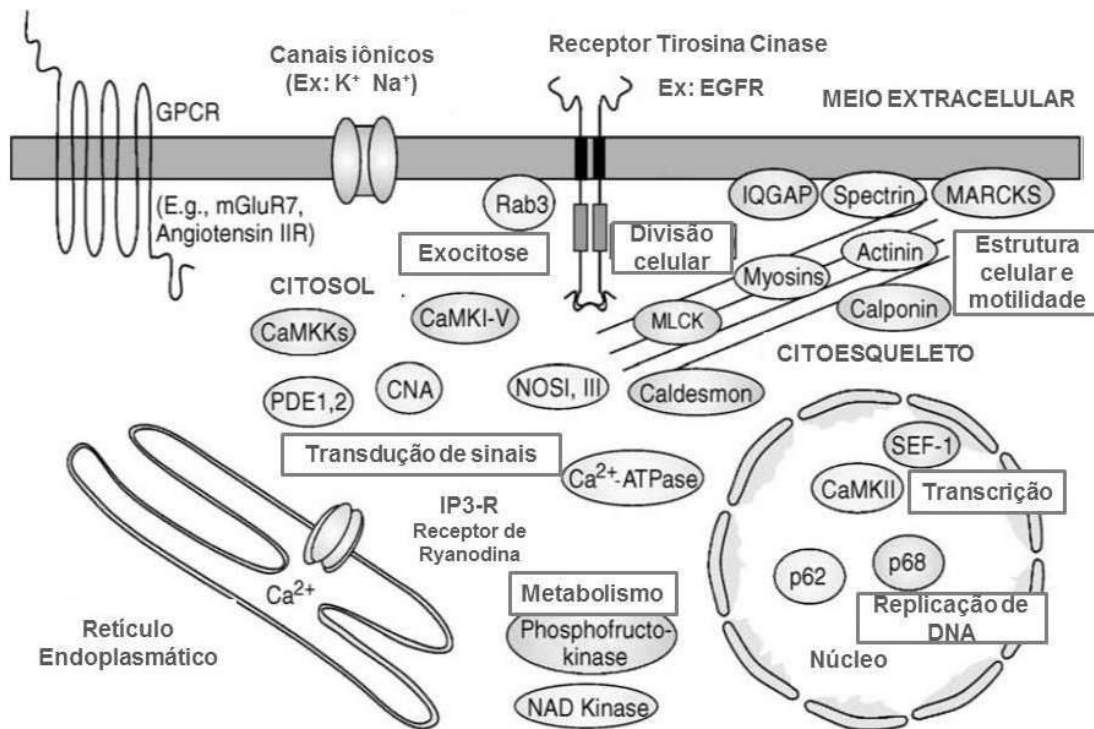


Figura 6. Algumas proteínas ligantes de CaM com sua localização e funções gerais. Inúmeros elementos de sinalização citosólica são CaM-BPs, incluindo a subunidade A da calcineurina, proteína fosfatase Ca²⁺/CaM dependente, proteína cinase Ca²⁺/CaM dependente, óxido nítrico sintetase e fosfodiesterases (Adaptado de Danton, 2003).

Com a finalidade de se aprofundar no estudo das CaM-BPs, as pesquisas normalmente giram em torno da elucidação da estrutura da CaM e a dinâmica da interação do Ca²⁺ com outras proteínas; determinação do padrão de expressão e regulação dos níveis de mRNA de CaM, ou ainda abordagens capazes de identificar possíveis alvos da CaM. Estudos de processo da dinâmica celular baseados em proteômica têm demonstrado que esta estratégia experimental é apropriada para identificação de novas CaM-BPs, utilizando cromatografia de afinidade associada à espectrometria de massa (Berggard *et al.*, 2006). Nesse modelo, a CaM quando ligada ao Ca²⁺ muda sua conformação permitindo a ligação de proteínas-alvo via sítio hidrofóbico.

1.6 Proteômica e histórico da proteômica de *T. cruzi*

Proteômica é um campo de estudo e tecnologia que se propõe a analisar de forma global o conjunto de proteínas expressas codificadas por um determinado genoma, numa célula ou tecido, isto é, o proteoma (Wasinger *et al.*, 1995). Devido à

natureza dinâmica do proteoma (ele se altera frente a diferentes condições e estímulos), seu estudo representa uma forma de procurar possíveis funções das proteínas e uma forma de investigar processos metabólicos em sistemas vivos para melhor entender o funcionamento de uma célula ou tecido em nível molecular.

O proteoma de um determinado organismo permite saber quando um produto gênico está sendo expresso, a concentração relativa deste produto e por fim, as modificações que podem ocorrer nessas proteínas após sua tradução. A análise proteômica pode mostrar como esses processos metabólicos, regulatórios e de sinalização se tornam disfuncionais nos estados patológicos e como podem ser manipulados mediante por exemplo, a administração de medicamentos ou a terapia gênica (Anderson *et al.*, 2000).

Durante a infecção por *T. cruzi*, o parasito precisa se adaptar às rápidas mudanças fisiológicas devido aos diferentes ambientes encontrados em seus hospedeiros. Esse fato sugere expressão diferencial de diversos genes envolvidos na interação parasito-hospedeiro (Cuervo *et al.*, 2010). Além disso, sabe-se que em tripanossomatídeos ocorre a regulação pós-traducional de expressão de proteínas por meio de variações na estabilidade ou eficiência de tradução dos mRNAs. Por esse motivo várias abordagens proteômicas têm se mostrado úteis na análise dessas mudanças de expressão proteica do parasito durante seu ciclo de vida.

O primeiro estudo de proteômica comparativa entre as formas evolutivas do *T. cruzi* utilizou uma estratégia baseada na combinação de eletroforese bidimensional e espectrometria de massa (2-DE MS) (Paba, *et al.*, 2004). Os resultados mostraram que grande parte das proteínas identificadas apresentava expressão conservativa entre as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota (Paba *et al.*, 2004).

Uma das maiores dificuldades em representar completamente o proteoma através de um gel 2D reside na diversidade de proteínas presentes nos diferentes tipos celulares, aliada à grande diferença de níveis de expressão entre as mesmas. Uma forma de contornar esse problema é trabalhar com o subproteoma. A importância da proteína não depende exclusivamente da quantidade de expressão, mas muitas vezes do local onde é expressa e da sua regulação. Em um estudo utilizando gel 1DE e 2DE seguido por nano LC-MS/MS para analisar a fração subcelular enriquecida por acidocalcisomas e glicosomas juntamente com outras organelas de *T. cruzi*, foram identificadas 396 proteínas, sendo que desse total 138 foram classificadas como proteínas hipotéticas (Farella *et al.*, 2008).

Com o propósito de se obter informações sobre as redes de sinalização de *T. cruzi*, Nakayasu e sua equipe (2009) conduziram a análise proteômica do fosfoproteoma da forma epimastigota de *T. cruzi*. Após a digestão trípica, as amostras foram fracionadas por cromatografia SCX e os fosfopeptídeos enriquecidos por cromatografia do tipo IMAC. A análise dos peptídeos foi executada por LC-MS/MS, identificando 237 fosfopeptídeos de 119 proteínas distintas e mapeados 220 sítios de fosforilação, incluindo 148 serinas, 57 treoninas e 8 tirosinas. As tirosinas fosforiladas foram validadas por imunoprecipitação e *western blot* usando um anticorpo anti-tirosina (Nakayasu, Gaynor *et al.*, 2009). Esse grupo publicou também na mesma época a primeira análise proteômica em larga escala de âncoras de GPI da forma epimastigota de *T. cruzi*, o qual foi batizado de *GPIomics* (Nakayasu *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Devida a importância dos fenômenos moleculares envolvendo cátions bivalentes, em especial o cálcio, e diversas proteínas a ele relacionada e o papel nos processos intrínsecos do protozoário *Trypanosoma cruzi*, dentre os quais se destacam a invasão e diferenciação e que o faz ser tão bem adaptado, justifica o estudo aprofundado das proteínas ligantes de Ca^{2+} e de CaM a fim de elucidar estes mecanismos e contribuir para identificação de possíveis alvos terapêuticos.

3. OBJETIVOS

Essa dissertação visa melhor compreender o contexto biológico do Ca^{2+} e da CaM na invasão e diferenciação do *T. cruzi*, primeiramente pela análise bioinformática das listas de centenas de proteínas identificadas como diferencialmente expressas e/ou fosforiladas durante o processo de diferenciação e também nos extratos enriquecidos com proteínas da superfície celular das formas tripomastigota e amastigota. Tal análise bioinformática teve como objetivo a predição de proteínas ligantes de Ca^{2+} e CaM. Paralelamente buscamos também padronizar um protocolo de enriquecimento/purificação de proteínas ligantes da CaM por

cromatografia de afinidade e, assim, poder entender melhor o contexto de interações da CaM no parasito e concomitantemente validar as predições computacionais. Portanto para atingir os objetivos de nossa análise, as seguintes etapas foram desenvolvidas:

1^a. Análise bioinformática das proteínas ligantes de Ca²⁺ e CaM no *T. cruzi* por meio da predição dessas proteínas dentre aquelas que foram identificadas por nosso grupo expressas na superfície celular de tripomastigotas e amastigotas e como diferencialmente expressas na amastigogênese.

2^a. Padronização com a forma epimastigota do enriquecimento de CaM-BPs visando validar a predição computacional. Para atingir tal fim utilizamos a seguinte abordagem: enriquecimento por cromatografia de afinidade a CaM, separação em géis de eletroforese 1D e 2D e identificação por espectrometria de massas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bioinformática

Para identificação das proteínas ligantes de Ca^{2+} da superfície de *T. cruzi* e durante a diferenciação foi realizada a predição das proteínas a partir dos dados obtidos por Queiroz (2013), em sua tese de doutorado por uma abordagem de alto rendimento de identificação e quantificação relativa de proteínas (artigos em submissão). Para interpretação dos dados foram utilizados o *software ProteinCenter* (Thermo Scientific) e maiores informações foram obtidas também pelo *software Blast2GO* (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) (Conesa *et al.*, 2005). As proteínas com conhecido domínio de ligação ao Ca^{2+} e/ou à CaM foram selecionadas e submetidas a filtragem no arquivo geral do subproteoma de *T. cruzi* durante a amastigogênese. Os domínios conhecidos de ligação ao Ca^{2+} e/ou à CaM estão relacionados na tabela 1.

Além disso, as proteínas ligantes de CaM enriquecidas experimentalmente, foram analisadas *in silico* no banco de dados *Calmodulin Target Database*. O site realiza análises na sequência da proteína, e com base no posicionamento de resíduos hidrofóbicos busca possíveis domínios de ligação a CaM (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb>). Os critérios para determinação de um sítio de ligação a CaM putativo são: hidropatia; capacidade de formação α -helicoidal; peso do resíduo; carga do resíduo; teor do resíduo hidrofóbico, classe helicoidal e ocorrência de resíduos específicos. As proteínas analisadas por esse programa são classificadas em quatro tipos: “domínio de ligação a CaM não classificado”, “potencial domínio de ligação a CaM”, “potencial motivo IQ” e “ausência de domínio de ligação a CaM”.

4.2 Análise experimental e identificação das CaM-BPs

4.2.1 Cultura de parasito

A forma epimastigota da linhagem Berenice foi obtida por cultura em meio LIT suplementado com 5% de soro fetal bovino (SBF), incubados a 25 °C com agitação constante (Magalhães *et al.*, 2008).

4.2.2 Enriquecimento das CaM-BPs por cromatografia de afinidade

Para o preparo da amostra foi utilizada $1,5 \times 10^9$ células da forma epimastigota submetidas à triplo choque térmico, seguidas de uma homogeneização em 3 mL de tampão gelado (tampão homogeneização) [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, coquetel de inibidores de proteases sem EDTA]. O homogenato foi centrifugado a $15.000 \times g$ por 30 min a 4 °C. As amostras proteicas (~3 mg) foram preparadas para cromatografia de afinidade à resina CaM-Sepharose-4B (GE Healthcare), adicionando 2 mM de CaCl_2 , e seguida de incubação com 1 mL de resina Sepharose-4B no gelo por cinco minutos. A resina foi previamente equilibrada com 10 mL de tampão de equilíbrio [50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM de CaCl_2 , 1 mM DTT], contendo 100 mM NaCl. As etapas de lavagem foram realizadas com 30 mL de tampão de lavagem L1, contendo 200 mM NaCl, seguido de nova lavagem com 30 mL de tampão L2 com 500 mM NaCl. As CaM-BPs foram recolhidas utilizando dois tampões de eluição. Primeiramente com 5 mL de tampão de eluição 1 [50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 100 mM de NaCl e coquetel de inibidores de proteases sem EDTA] e, então, com 2 mL de tampão de eluição 2 [50 mM Tris-HCl pH 7,5, 6 M uréia/1,7 M tiouréia].

4.2.3 Eletroforese unidimensional

Após a purificação foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% em condição desnaturante e redutora (SDS-PAGE) para visualização do perfil proteico das frações: FNL (fração não-ligada); L1 (lavagem 1); L2 (lavagem 2); E1 (eluição 1) e E2 (eluição 2). A corrida foi realizada utilizando o sistema Hoefer® à voltagem constante de 30 mA e 22 °C. O gel foi corado com nitrato de prata.

4.2.4 Preparação das amostras por precipitação

Para proceder à avaliação do perfil das proteínas eluídas, utilizamos a fração E1 para o preparo da amostra a ser submetida à eletroforese bidimensional. A fim de retirar o excesso de sal foi realizada precipitação acrescentando TCA correspondente a 15% do volume da eluição 1. Em seguida a amostra foi agitada vigorosamente (por vortex), incubada a -20 °C por 1 hora, seguidas de centrifugação a $15.000 \times g$ por 15 min. O sobrenadante foi descartado e 600 mL de acetona gelada foram adicionados, seguido de centrifugação a $15.000 \times g$ por 6 min. O procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez. A acetona foi completamente

removida e o precipitado foi ressuspenso em tampão 2D [7,77 M ureia, 2,33 M tiouréia].

4.2.5 Eletroforese bidimensional

Na amostra solubilizada em tampão 2D foram acrescentados 85 mM DTT, 2,5% Triton X-100, 0,5% anfólito 3-10, 10% isopropanol e incubadas durante 1 h à temperatura ambiente num volume final de 350 µL e centrifugada por 5 min a 14000 × *g*. O sobrenadante foi preparado para ser submetido à eletroisofocalização em tiras de gel de gradiente de pH imobilizado - IPGstrips (GEHealthcare) com o maior gradiente de pH (3 a 10). Antes da segunda dimensão, as tiras foram submetidas às etapas de redução e alquilação: com incubação de 40 min cada. À solução de equilíbrio [6 M uréia, 30% glicerol, 10% SDS] foi adicionado 125 mM DTT para a redução e, num segundo momento, 300 mM acrilamida também na solução de equilíbrio para a alquilação. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE 12% utilizando sistema Hoefer® à voltagem constante de 30 mA e 22 °C e coradas com nitrato de prata (Charneau *et al.*, 2007).

4.2.6 Identificação das CaM-BPs por espectrometria de massa do tipo MALDI/TOF

Os *spots* proteicos revelados no gel 2DE correspondentes às proteínas ligantes de Calmodulina/Ca²⁺ presumidas foram excisados e digeridos com tripsina. Esses *spots* foram descorados por 10 min em uma solução descorante [K₃[Fe(CN)₆] 15 mM, 50 mM de tiosulfato de sódio]. Em seguida foram lavados com três ciclos de 200 µL de H₂O Milli-Q, seguido por mais três ciclos de lavagem com 50% acetonitrila (ACN) e três ciclos de 50 mM NH₄HCO₃ por 5 min, intercalados. Durante a lavagem final com a ACN, fragmentos de gel foram macerados com um pistilo e secados a vácuo em SpeedVac, durante 20 minutos. Os géis secos foram reidratados acrescentando 5 - 10 µL de solução de 25 mM NH₄HCO₃, 2,5 mM CaCl₂ contendo 12,5 ng/µL de tripsina (Promega) e incubadas em gelo por 45 minutos. Imediatamente após a incubação, a solução remanescente foi removida e adicionou-se 5-10 µL da mesma solução tampão de digestão sem enzima e incubou-se overnight a 37 °C, sendo o tamanho do fragmento do gel o fator determinante da quantidade de solução a ser acrescentada. No dia seguinte foi adicionado 1 µL de

1% ácido trifluoroacético (TFA) à solução contendo o produto da digestão e 1 µL da amostra acidificada foi aplicada na placa AnchorChip™ (600 nm, Bruker), esperando-se secar completamente. Posteriormente, foi aplicado 0,5 µL de 5 µg/µL DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzóico) em 30% ACN e 0,1% TFA. Após secagem, foi submetido à análise PMF. Para PFF, foi adicionado 1 µL de 1 µg/µL HCCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico) em 90% ACN e 0,1% TFA. Para ambas as análises foram utilizadas um espectrômetro de desorção/ionização a laser assistida por matriz, MALDI/TOF-TOF (Autoflex III, Bruker Daltonics, Karlsruhe, Alemanha). Espectros de massas foram processadas utilizando o programa FlexAnalysis 2.2 e Biotools (Bruker). A identificação das proteínas foi realizada por software *MASCOT* contra banco de dados de proteínas de *T. cruzi* em nosso servidor. Espectros contendo peptídeos de tripsina auto digeridos foram calibrados internamente. Os seguintes parâmetros foram utilizados para buscas de banco de dados: precisão massa monoisotópica até 100 ppm para espectros calibrados internamente e até 300 ppm para espectros calibrados externamente, até um sítio de clivagem triptica perdido, propionamidação de cisteína como a modificação fixa e oxidação da metionina e N-acetilação da proteína como modificações variáveis.

4.2.7 Identificação das CaM-BPs por LC-MS/MS

As bandas referentes às frações E1 e E2 do gel SDS-PAGE foram selecionadas para identificação por uma abordagem de maior rendimento por espectrometria do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF). Foram excisadas as bandas mais intensas para serem digeridas. O protocolo de digestão segue idêntico ao utilizado para digestão dos spots do gel bidimensional e identificação por MALDI/TOF. Acrescenta-se uma etapa seguinte de dessalinização em microcoluna Zip-Tip C18 (Millipore), utilizando 0,1% TFA para as lavagens e ACN para a eluição. Em seguida as amostras foram secas em SpeedVac para serem enviadas ao laboratório Dalton de espectrometria de massas, na Unicamp por intermédio da colaboração com o professor Dr. Fábio Gozzo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O envolvimento dos níveis de Ca^{2+} e seu papel nos mecanismos de diferenciação de *T. cruzi* têm sido muito explorados em pesquisas (Chin e Mean, 2000; Orr *et al.*, 1992; Lammel *et al.*, 1996). Isso porque as proteínas ligantes de Ca^{2+} também exercem grande influência na regulação da concentração deste íon e no movimento deste através do ambiente extracelular e entre compartimentos intracelulares. A fim de elucidar a forma que essas proteínas atuam na amastigogênese, principiaremos por elencar essas proteínas dentre aquelas cujos níveis de abundância relativa durante estágios específicos do processo de diferenciação do parasito apresentaram regulação.

Uma vez que este trabalho está inserido em um projeto mais amplo de pesquisa sobre proteômica de *T. cruzi*, realizamos uma análise de predição das proteínas que possuem domínio de ligação ao Ca^{2+} e de ligação a calmodulina a partir dos dados abrangentes obtidos por Queiroz e colaboradores (Queiroz, tese 2013). Em sua tese de doutorado, foram investigadas a variação do proteoma em estágios intermediários da diferenciação celular durante a amastigogênese, e também foram investigados o subproteoma de superfície celular das formas tripomastigota e amastigota, com uma abordagem de alto rendimento de identificação e quantificação relativa de proteínas. Desta forma foram realizados estudos *in silico* das proteínas ligantes de Ca^{2+} com diferenças na expressão durante a amastigogênese e na superfície do parasito.

5.1 Proteínas ligantes de Ca^{2+} na amastigogênese

A fim de elucidar a forma que as proteínas ligadoras do Ca^{2+} e/ou da calmodulina atuam na amastigogênese, principiaremos por elencar essas proteínas dentre aquelas cujos níveis de expressão relativos durante estágios específicos do processo de diferenciação do parasito apresentaram regulação.

Foi utilizado um modelo de indução *in vitro* da amastigogênese pela incubação de tripomastigotas em meio DMEM, pH 5,0 (Tomlinson *et al.*, 1995). Amostras foram coletadas em fases intermediárias pontuais da diferenciação da seguinte forma: (i) antes da indução (tripomastigota); (ii) 30 minutos após o estímulo, onde se espera ocorrer as primeiras mudanças bioquímicas decorrentes da

diferenciação; (iii) 2 horas após estímulo, tempo no qual *in vivo* o parasito permanece em pH ácido dentro do fagolisossoma; e (iv) 9 horas após o estímulo (amastigotas axênicos).

A listagem das proteínas diferencialmente expressas durante a amastigogênese preditas com o domínio de ligação de interesse obtida dos programas *proteinCenter* e *BLAST2GO* (Queiroz, tese 2013), revelou 12 domínios com regiões de ligação ao Ca^{2+} , destacando *EF hand* (domínio estrutural do tipo hélice-alça-hélice), sítios de ligação à calreticulina/calnexina e de transportadores de Ca^{2+} , e um *IQ motif*, que por definição é um domínio de ligação à CaM (tabela 1).

Tabela 1. Domínios de ligação ao Ca^{2+} em proteínas reguladas durante a amastigogênese.

Domínios de ligação ao Ca^{2+}	Nº InterProScan
EF-Hand 1, calcium-binding site	IPR018247
Calcium-transporting P-type ATPase, subfamily IIA, SERCA-type	IPR005782
Flagellar calcium-binding protein calflagin	IPR003299
Calreticulin/calnexin, conserved site	IPR018124
Peptidase C2, calpain, catalytic domain	IPR001300
IQ motif, EF-hand binding site	IPR000048
Calreticulin/calnexin	IPR001580
EF-hand domain	IPR002048
EF-hand domain pair	IPR011992
EF hand_6	PF13405 (PFAM)
EF hand_7	PF13499 (PFAM)
EF hand_8	PF13833 (PFAM)

Das 1339 proteínas identificadas no proteoma total durante a amastigogênese, 560 apresentaram regulação da expressão proteica, as quais foram agrupadas em quatro *clusters* (Fig.7). Foi então realizada a classificação dessas proteínas para segregar somente as com domínio de ligação ao Ca^{2+} . Nesta filtragem foram identificadas 17 proteínas de nosso interesse. Essas proteínas possuem diversificadas funções, dentre elas atividade enzimática, transportadoras de Ca^{2+} ou com domínio *EF hand* (tabela 2).

Tabela 2. Proteínas de expressão regulada durante a amastigogênese que possuem domínio predito de ligação ao Ca²⁺.

GI	UNIPROT	cluster	DESCRIÇÃO
322827561	E7L1W4	1	calcium-translocating P-type ATPase, putative
115531	P18061	3	calmodulin
407851861	E7L9I8	3	calmodulin, putative
322819024	E7LHB9	3	calmodulin, putative
322819504	E7LGE0	3	calpain cysteine peptidase, putative
407843824	E7LMU7	3	calpain-like cysteine peptidase, putative, cysteine peptidase, Clan CA, family C2, putative
322823951	E7L813	3	calreticulin, putative
322829685	E7KY53	3	centrin, putative
119859	P07749	3	flagellar calcium-binding protein
407850136	E7LCV7	3	hypothetical protein TCSYLVIO_004287
407847937	E7LGH5	4	hypothetical protein TCSYLVIO_005468
70868503	E7KZ30	3	hypothetical protein, conserved
407846282	E7LJY3	2	hypothetical protein, calcium binding protein EF hand, putative
407859521	E7KY58	3	I/6 autoantigen, putative
322815177	E7LP53	4	putative uncharacterized protein
322825810	E7L4T5	4	putative uncharacterized protein
4165126	O96608	1	SERCA-type calcium-ATPase

Os perfis de expressão das proteínas reguladas (figura 7) apresentaram linhas de tendência de expressão que se correlacionam com os eventos pelos quais o parasito passa na célula hospedeira *in vivo* (Queiroz, tese 2013). Como podemos observar, os *clusters* 1 e 3 apresentam menor e maior abundância de proteínas respectivamente nos tempos intermediários, sem muita diferença entre os pontos extremos, onde se encontram as formas completamente diferenciadas do parasito. Já nos *clusters* 2 e 4, o tempo 2 horas que apresenta maior e menor abundância de proteínas respectivamente, tendo em vista que no hospedeiro as formas tripomastigotas permanecem dentro do fagolisossoma por cerca de 2 horas, o que corrobora com essa alteração na expressão das proteínas no modelo utilizado.

Estes dados sugerem que a regulação da expressão relativa dessas proteínas pode estar relacionada a eventos moleculares chave da diferenciação entre os estágios de vida do parasito.

De acordo com os dados da tabela 2, podemos observar que a maioria das proteínas (11 de 17) se enquadram no cluster 3, ou seja são super-expressas nos tempos intermediários, o que nos leva a crer que as proteínas que ligam Ca^{2+} cumprem alguma função regulatória no processo de diferenciação. Em contrapartida, nos *clusters* 2 e 4, que representam respectivamente as proteínas super ou sub-expressas após 2 h de incubação, encontramos apenas proteínas putativas ou não caracterizadas. Ou seja, após a diferenciação do parasito em amastigota existem proteínas desconhecidas diferencialmente expressas que são interessantes pelo fato de ainda não terem similaridade de sequência com proteínas de vertebrados, o que as tornam possíveis alvos terapêuticos. Nos estágios intermediários da diferenciação, ou seja, até o momento de saída do parasito do fagolisossoma temos conhecimento que o conjunto de proteínas ligantes de Ca^{2+} são indispensáveis, entretanto após este momento do ciclo pouco se sabe sobre a função das proteínas que alteram sua expressão.

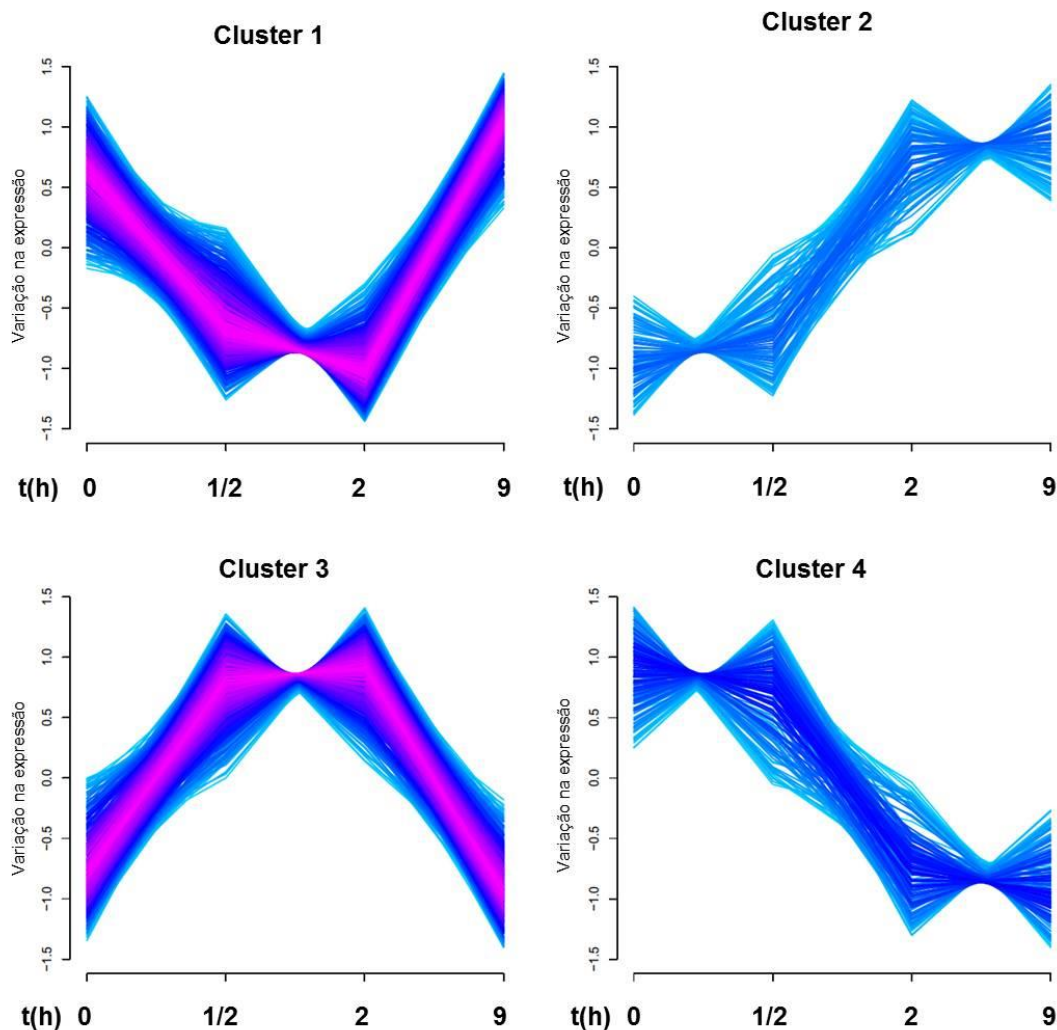


Figura 7. Tendência de expressão de proteínas durante a amastigogênese nos tempos 0, 30 min, 2 h e 9 h de indução da diferenciação. (Adaptado de Queiroz, 2013)

Dentre as principais proteínas identificadas, certamente destaca-se a calmodulina por ter papel fundamental no ciclo de vida do *T. cruzi* com envolvimento nos mecanismos de sinalização celular que regula importantes processos como controle do ciclo celular, secreção de proteínas, organização do citoesqueleto e motilidade celular (Means, 1988). Foi demonstrado que inibidores de CaM bloqueiam a diferenciação em *T. cruzi* (Lammel *et al.*, 1996) e o envolvimento da CaM no processo de amastigogênese ainda é pouco conhecido, entretanto o fato da CaM estar envolvida no controle de diversas enzimas como cinases e fosfatases, que certamente tem participação nos mecanismos intrínsecos, nos indica que sua concentração intracelular no momento chave da amastigogênese deva apresentar-

se elevada. Esta hipótese foi corroborada em nossos resultados já que esta proteína e outras semelhantes putativas foram classificadas no *cluster* 3 cuja abundância é maior em estágios intermediários da diferenciação, indicando que o nível de expressão desta proteína esteja intimamente relacionado à diferenciação do parasito.

O AMP cíclico está relacionado à regulação e controle do crescimento e diferenciação em *T. cruzi* (Voorheis e Martin, 1981) e sabe-se ainda que a CaM tem a capacidade de estimular a atividade de cAMP fosfodiesterase (Tellez-Iñon *et al.*, 1985).

Além da CaM, também foi encontrada a calreticulina (CRT), uma importante proteína relacionada à estocagem de Ca^{2+} no lúmen do retículo endoplasmático e regulação da concentração desse íon no citoplasma (Wang *et al.*, 2012). Considerada uma chaperona, tem reconhecida função na proliferação celular, facilitando o dobramento e evitando agregação de proteínas recentemente sintetizadas que ainda não adquiriam a sua conformação tridimensional funcional (Nelson *et al.*, 1997). É também um componente das vias de controle de qualidade além de atuar como segundo mensageiro na regulação gênica. Em neutrófilos sabe-se que a calreticulina e bombas Ca^{2+} -ATPases são redistribuídas durante o processo de fagocitose, aumentando a concentração da calreticulina em torno das partículas ingeridas. Essa concentração ocorre antes que a fagocitose se complete e também antes do aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular, indicando que esta redistribuição dos compartimentos precede a liberação de Ca^{2+} (Nelson *et al.*, 1997). A CRT foi inicialmente isolada em *T. cruzi* em 1991, é um antígeno de 45kDa, e seu gene possui localização variável no cromossomo (Aguillon *et al.*, 1995). Este gene já foi clonado, sequenciado e expresso (Aguillon *et al.*, 2000). Sabe-se que em *T. cruzi*, a CRT se liga a glicanas monoglicosiladas (Labriola *et al.*, 1999) e participa da maturação da cruzipaína, uma protease lisossomal (Conte *et al.*, 2003).

Outra proteína presente nos estágios intermediários da diferenciação foi a calpaína, uma cisteína peptidase Ca^{2+} -dependente, cujo papel pode estar envolvido em funções celulares essenciais, tais como o rearranjo de proteínas do citoesqueleto, e clivagem de proteínas a fim de ativar receptores e pró-enzimas (Ennes-Vidal *et al.*, 2010). A calpaína também foi descrita por estar envolvida em

outros processos celulares como apoptose, transdução de sinais, diferenciação e remodelamento do citoesqueleto (Ono *et al.*, 1998). Algumas destas funções estão relacionadas aos fenômenos bioquímicos que ocorrem na amastigogênese, portanto é razoável identificarmos a elevação no nível de expressão desta proteína durante o processo de diferenciação.

A centrina, que também foi classificada no *cluster* 3, é uma fosfoproteína encontrada no centríolo e ambiente pericentriolar. Essas são necessárias para duplicação dos centríolos, e podem ainda desempenhar um papel importante na divisão dos fusos mitóticos, causando contração mediada por Ca^{2+} (Salisbury *et al.*, 2002). Isso reforça a hipótese de que a indução por pH ácido capacita o parasito para a replicação uma vez que tripomastigotas são considerados infectantes e não replicativos enquanto que os amastigotas são formas replicativas do *T. cruzi*.

Em relação às proteínas enquadradas no *cluster* 1, as quais são sub expressas nos estágios intermediários da diferenciação, encontramos apenas duas proteínas, que aliás são enzimas. A *calcium-translocating P-type ATPase* putativa (GI 322827561), e a SERCA Ca^{2+} -ATPase (GI 4165126). Esta última é uma bomba de cálcio encontrada no retículo sarcoplasmático que transfere Ca^{2+} do citoplasma da célula para o lúmen do retículo endoplasmático à custa de hidrólise de ATP. Por ter uma função de transporte acredita-se que sua expressão ocorra antes dos 30 minutos, que seria o momento que há maior necessidade de concentração de Ca^{2+} no citoplasma celular propiciando processos intrínsecos da amastigogênese. Ocorre aumento de Ca^{2+} no citoplasma de tripomastigotas após a invasão (Docampo *et al.*, 1996) e foi ainda demonstrado que o tratamento de tripomastigotas com agentes quelantes de Ca^{2+} resultou em inibição da invasão celular (Moreno, 1994). Nossos dados reforçam o fato das bombas terem aumento de expressão no início da amastigogênese, o que é observado pela inclusão destas enzimas no *cluster* 1. Nos estágios intermediários não se verificaria atividade de ATPase no interior do parasito. Entretanto Hong Gang e colaboradores (1998) demonstraram que a forma amastigota apresenta maior conteúdo de Ca^{2+} comparado às formas de vida extracelular, e esse aumento se correlaciona com aumento da expressão de bombas de Ca^{2+} e também devido a abundância de acidocalcisomas (Lu *et al.*, 1998). Essas bombas foram localizadas em vacúolos intracelulares e na membrana plasmática

como foi demonstrado por imunofluorescência, microscopia eletrônica e experimentos com biotilação (Lu *et al.*, 1998).

Foi reportado também que as ATPases envolvidas no transporte de Ca^{2+} na membrana plasmática são estimuladas pela CaM e inibidas pelas drogas inibidoras desta (Benaim *et al.*, 1991), e assim podemos propor que a função destas duas proteínas estão intimamente ligadas, o que pode ser observado em nossos resultados que demonstram aumento de expressão de bombas com conseguinte aumento de CaM no parasito, ou seja o transporte de Ca^{2+} é requerido para CaM exercer sua função, demonstrando estreita correlação entre essas proteínas.

Como sabemos o Ca^{2+} intracelular exerce importante controle nos eventos de crescimento celular. Os níveis de Ca^{2+} no interior do RE controlam sua função, portanto a falta deste íon pode comprometer a síntese, processamento e tráfego de proteínas, assim como a depleção do Ca^{2+} do RE elimina a fonte de sinalização necessária para estimular o crescimento em um ou mais pontos críticos do ciclo celular. Aparentemente a sinalização intracelular por Ca^{2+} é capaz de mediar a desagregação do envelope nuclear e da progressão mitótica nas células em divisão (Alison *et al.*, 1993).

A concentração de Ca^{2+} maior em amastigotas pode indicar uma adaptação ao ambiente intracelular. Amastigotas de *Leishmania mexicana amazonensis* possuem grande quantidade deste íon disponível e ainda apresentam maior expressão da enzima SERCA Ca^{2+} -ATPase do que os estágios extracelulares do ciclo. Têm sido demonstrado que o conteúdo dos compartimentos intracelulares de Ca^{2+} exerce profundo controle sobre o crescimento celular, e essas mudanças podem resultar na incapacidade do Ca^{2+} ser bombeado para os compartimentos intracelulares (Hong *et al.*, 1998), o que confirma nossos resultados, já que durante os estágios intermediários da amastigogênese as bombas de Ca^{2+} são menos abundantes.

5.2 Proteínas ligantes de Ca^{2+} na superfície

Além das análises realizadas com proteínas envolvidas na amastigogênese, também foi realizada predição das proteínas com domínios de ligação ao Ca^{2+} e

CaM do subproteoma de superfície celular de tripomastigota e amastigota com abordagem de alto rendimento de identificação de proteínas.

As proteínas membranares de *T. cruzi* exercem importante papel na homeostase celular e regulação de processos metabólicos, além de propiciar adesão a tecidos hospedeiros e degradação de componentes extracelulares para garantir acesso às células e aumentar a eficiência na infecção. Portanto a identificação das proteínas de superfície ligantes de Ca^{2+} é uma abordagem interessante, pois sabemos que o influxo de Ca^{2+} para o interior da célula desencadeia importantes processos relacionados à invasão e diferenciação.

Um desenho experimental foi criado de tal forma que fosse propício a identificação do subproteoma de superfície celular com segurança, com reduzida contaminação de proteínas citosólicas ou secretadas. Para tanto foram realizadas duas abordagens experimentais: (i) Enriquecimento das proteínas de membrana através da biotilação das proteínas expostas seguidas por cromatografia de afinidade a estreptoavidina e (ii) tripsinização da superfície de células intactas (*shave*), juntamente com um teste controle, com incubação sem tripsina. Com essas duas abordagens é possível acessar o subproteoma membranar e elencar possíveis proteínas contaminantes pela identificação daquelas presentes na amostra controle (Queiroz *et al.*, 2013).

Para seleção dos domínios de ligação ao Ca^{2+} e/ou à CaM foi utilizada a listagem dos códigos *InterProScan* de todos os domínios identificados por Queiroz em sua tese. Foram filtrados os de interesse e os resultados estão relacionados na tabela 3.

Tabela 3. Domínios de ligação ao Ca²⁺ em proteínas de superfície de tripomastigotas e amastigotas.

Domínios de ligação ao Ca ²⁺	Nº InterProScan
C2 domain	IPR000008
Calcium/calmodulin-dependent/calcium-dependent protein kinase	IPR020636
Calcium-transporting P-type ATPase, subfamily IIA, SERCA-type	IPR005782
Calcium-transporting P-type ATPase, subfamily IIB	IPR006408
Calreticulin	IPR009169
Calreticulin/calnexin	IPR001580
Calreticulin/calnexin, conserved site	IPR018124
EF-Hand 1, calcium-binding site	IPR018247
EF-HAND 2	IPR018249
EF-hand domain	IPR002048
EF-hand domain pair	IPR011992
EF hand_6	PF13405 (PFAM)
EF hand_7	PF13499 (PFAM)
EF hand_8	PF13833 (PFAM)
IQ motif, EF-hand binding site	IPR000048

Utilizando dados abrangentes das identificações por uma abordagem de alto rendimento das proteínas de superfície de tripomastigotas e amastigotas encontradas pela análise no software *Blast2GO* foram identificadas 36 proteínas preditas ligantes de Ca²⁺ (tabela 4). Interessante notar que 12 proteínas foram encontradas na amostra biotinizada, sendo que dessas, 10 também foram identificadas no *shave* (~83%), o que fortalece a segurança da localização dessas proteínas na superfície celular. As duas abordagens fornecem informações complementares (Queiroz *et al.*, 2013) e necessárias para obtenção do subproteoma de superfície celular de ligantes de Ca²⁺.

Tabela 4. Proteínas da superfície de tripomastigotas e amastigotas preditas como ligantes de Ca²⁺.

Estágio ^a	Amostra ^b	ID (Uniprot) ^b	ID (NCBI)	Descrição da sequência
A	B	K4E8R7	407859438	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain-containing protein 1b
T/A	S/C	K4E552	407852086	calcium-binding protein
T/A	B/S	O96608	4165126	calcium-translocating p-type atpase
T/A	B/S	E7L1W4	322827561	calcium-translocating p-type atpase
T/A	S/C	K4DY94	407846995	calcyphosin-like protein
T/A	B/S/C	P18061	115531	calmodulin
T/A	B/S/C	Q4CWP2	70870327	calmodulin-like protein
T/A	B/S/C	K4DSA4	407846282	calmodulin-like protein containing ef hand domain
T/A	S/C	K4E5Z3	407851861	calmodulin-related protein
T/A	S/C	Q4CST9	70868503	calmodulin-related protein
A	S/C	Q9XYF8	4539689	calreticulin
T	S	Q9U9N9	5566311	calreticulin
T/A	B/S/C	E7L813	322823951	calreticulin
T/A	B/S	Q4E591	70887187	centrin
T/A	B	E7KY52	322829699	centrin
T/A	B/S/C	E7KY53	322829685	centrin
T/A	S	K4DKQ3	407833365	<u>coiled-coil domain containing 96-like*</u>
T/A	S	K4DVH4	407844409	ef hand family protein
T/A	S/C	E7L4T5	322825810	ef hand family protein
T/A	S/C	E7L4T6	322825811	ef hand family protein
T/A	S/C	K4DYM8	407847937	ef-hand domain-containing family member c2-like
T/A	B/S	K4DWP7	407846674	ef-hand domain-containing protein 1
T	S	E7L234	322827446	ef-hand domain-containing protein 1-like
A	B/S/C	P07749	119859	flagellar calcium-binding
T	B/S	Q1L1I2	77167273	flagellar calcium-binding
T/A	B/S/C	K4E1Y9	407850136	hypothetical protein TCSYLVIO_004287
T/A	S	K4DS91	407841566	<u>hypothetical protein TCSYLVIO_008215*</u>
T	S	K4DNP8	407837812	hypothetical protein TCSYLVIO_009202
T/A	B/S/C	E7KX99	322830189	hypothetical protein TCSYLVIO_010631
T/A	B/S/C	K4E8Y0	407859521	i 6 autoantigen
T/A	B/S/C	K4E9Y1	407860705	<u>IQ and ubiquitin-like domain-containing*</u>
T/A	B	K4DWF7	407846650	loc495147 protein
A	S	K4E1M4	407849968	lysophosphatidylcholine acyltransferase 2-like
T/A	B/S	K4DXK9	407846969	protein kinase
T/A	B/S	K4DXX9	407847526	radial spoke protein 7

^a Proteínas presentes experimentalmente na superfície das formas de vida tripomastigota (T) e/ou amastigota (A).

^b Proteínas obtidas pelas amostras: biotilação (B), *shave* (S) ou controle (C).

*_Proteínas preditas como ligantes de CaM.

Assim como na amastigogênese, a CaM se mostrou potencialmente presente ou associada à membrana, pois foi identificada nos três testes, biotinilação, *shave* e controle. Frisamos novamente que a presença na amostra controle sugere que essa proteína possa ser um contaminante por lise ou ser secretada/excretada pelo parasito. Além da própria CaM outras quatro proteínas relacionadas ou semelhantes também foram identificadas (Q4CWP2, K4DSA4, K4E5Z3 e Q4CST9) e estavam presentes nas 3 amostras, confirmando a onipresença da CaM, e seu intenso envolvimento nos diversos processos. Esses dados são interessantes, pois além do fato da CaM ser encontrada na membrana do parasito, ela ainda é diferencialmente expressa nos estágios de desenvolvimento conforme discutido no tópico anterior.

Diversas proteínas envolvidas na transdução de sinais dependentes de Ca^{2+} alteram suas atividades em resposta às variações nos níveis de Ca^{2+} livre, mas não são por si só capazes de ligar aos ions Ca^{2+} . Algumas dessas proteínas utilizam a CaM como sensor e mediador da sinalização inicial do Ca^{2+} . A CaM transmite o sinal pela ligação dos íons Ca^{2+} livres em seus dois domínios *EF hand* C- e N-terminal, causando uma alteração conformacional que permite que o complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se ligue a domínios de ligação específicos à CaM, portanto essa ligação com as proteínas alvo altera sua atividade de uma forma cálcio dependente (Vetter e Leclerc, 2003). A CaM em sua forma saturada de Ca^{2+} tem sua conformação distinta da forma livre de Ca^{2+} , o que aumenta a complexidade do modo de reconhecimento do alvo, pois a formação do complexo ternário entre a CaM e suas ligantes requer ajustes na estrutura da CaM, bem como alteração conformacional no alvo que ela provoca ativação (Crivici e Ikura, 1995). Além de se ligar a inúmeras proteínas-alvo, existem diversos peptídeos naturais que se ligam com grande afinidade à CaM, incluindo vários hormônios, neurotransmissores e venenos (Malencik e Anderson, 1982).

A extrema importância da CaM nos processos envolvidos com transdução de sinais na membrana e no citoplasma, e que propiciam a invasão do parasito e diferenciação, se refletem também nas proteínas que ligam CaM. Em nossa pesquisa foram identificadas três proteínas preditas pelo algoritmo *InterProScan* com domínios ligantes de CaM: *coiled-coil domain containing 96-like* (K4DKQ3); *hypothetical protein TCSYLVI0_008215* (K4DS91) e *IQ and ubiquitin-like domain-*

containing (K4E9Y1). Estas proteínas foram ainda analisadas pelo programa *Calmodulin Target Database* para validar a presença de domínios de ligação a CaM. Na análise da sequência de aminoácidos foram identificados sítios de ligação a CaM não classificados no banco de dados (em K4DS91 e K4E9Y1) e um motivo IQ (em K4DKQ3), confirmando serem CaM-BPs.

Proteínas da família *coiled-coil* foram reportadas em leveduras (Kranz *et al.*, 2001) e são proteínas integrais de membrana. Seu percurso na célula inicia no retículo endoplasmático de onde é transportada para a superfície celular, onde fica apenas transitoriamente devido à endocitose. A ubiquitinação dessas proteínas é importante para determinação do tempo de residência na superfície celular (Kölling e Hollenberg, 1994).

A via de degradação ubiquitina-proteassoma é um dos principais mecanismos envolvidos na manutenção de níveis adequados de proteínas celulares. A regulação da degradação proteassomal garante funções celulares apropriadas. A família de proteínas contendo *ubiquitin-like domain* tem sido implicada na degradação do proteassoma (Su e Lau, 2009). A atividade proteassoma é conhecida por ser essencial para a degradação das proteínas estágio específicas durante o remodelamento do citoesqueleto em *T. cruzi* (Gonzalez *et al.*, 1996).

A caracterização bioquímica das proteínas ligantes de CaM define seu papel como integrador de diferentes meios de transdução de sinais, assim como mediador dos eventos celulares Ca^{2+} - dependentes.

Em nossas identificações cabe ainda ressaltar a presença de uma importante proteína cinase (EC:2.7.11.0), uma enzima multifuncional envolvida com a transmissão de informações a múltiplos substratos alvos em resposta a elevações transitórias de Ca^{2+} intracelular. É uma serina/treonina proteína cinase, ou seja, catalisa a transferência de um grupo fosfato da molécula de ATP para o grupo hidroxila dos sítios de fosforilação nos substratos (aminoácidos Ser ou Thr).

A cinase mais conhecida e estudada atualmente é a proteína cinase A, podendo ser considerada um modelo para entendimento da estrutura e função das diversas cinases (Swulius e Waxham, 2008) e tem sido sugerida ser uma importante reguladora dos estágios de diferenciação de *T. cruzi*. A análise por

imunofluorescência demonstra elevada expressão desta proteína na superfície da membrana de tripomastigotas (Bao *et al.*, 2010). Diversos substratos desta enzima foram caracterizados como membros da superfamília trans-sialidases. O parasito não possui a maquinaria para produzir o ácido siálico monossacarídeo, porém o incorpora de seu hospedeiro pela expressão de trans-sialidases em sua superfície. Essas moléculas além de permitirem a aderência, são essenciais na invasão das células hospedeiras e no escape do sistema imune. A proteína cinase A fosforila sítios dessas proteínas e pode ser importante no tráfego de membros da família trans-sialidase. Acredita-se que essas modificações pós traducionais pela proteína cinase exercem um papel na invasão e/ou na diferenciação. (Bao *et al.*, 2010).

A calreticulina, outra importante proteína que também foi encontrada nos processos da amastigogênese, está presente em três formas semelhantes. Uma na superfície de tripomastigota, outra em amastigota e uma forma presente nas duas superfícies. Conforme mencionado, a CRT é uma conhecida proteína de ligação ao Ca^{2+} presente principalmente no retículo endoplasmático, embora ensaios com imunohistoquímica já a localizaram na superfície celular de *T. cruzi* com maiores concentrações nas formas de transição de amastigota em tripomastigota (Souto-Padron *et al* 2004). Esta proteína orienta a conformação de outras proteínas, atuando como molécula chaperona e também regulando os níveis de Ca^{2+} (Ramírez *et al* 2012). Após a infecção, o parasita pode translocar essa molécula do RE para superfície, onde inibe tanto a via clássica como a via da lectina do sistema complemento (Ferreira *et al.*, 2004; Ramirez *et al.*, 2011; Valck *et al.*, 2010) Além disso, em virtude da sua capacidade de ligar e inativar o componente C1, o primeiro do sistema complemento, esta promove a infectividade do parasita. Essas duas propriedades residem no domínio central da molécula (Ramírez *et al.*, 2012). Além disso, a CRT de *T. cruzi* quando externalizada é um receptor de C1q e esse componente do complemento faz a ligação da molécula do parasita aos receptores da superfície celular do hospedeiro (Malhotra, 1993; Ramirez *et al.*, 2011).

No rol das enzimas com dominios ligantes de Ca^{2+} encontradas na superfície de *T. cruzi*, além da proteína cinase, comentada anteriormente, foram identificadas três enzimas do tipo Ca^{2+} -ATPase, sendo uma do tipo vacuolar e duas do tipo P-transportadora de íons Ca^{2+} . Estas enzimas são responsáveis pelo gradiente de Ca^{2+} através das membranas, para que exista diferença de concentração no interior

do parasito em torno de 50 nM no meio intracelular, que é 4 vezes menor que no meio extracelular. Já foi demonstrado atividade de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}\text{ATPase}$ estimulada por CaM na membrana de *T. cruzi* e de *L. brasiliensis* (Benain *et al.*, 1993), e ainda a afinidade dessa enzima pelo Ca^{2+} se mostrou aumentada na presença da CaM, assim como a velocidade máxima da reação. Este fato corrobora nossos resultados, pois foram verificadas a presença dessas ATPases em ambas amostras biotinilada e *shave* o que confirma a presença destes transportadores na membrana do parasito e nos proporciona segurança para afirmar o papel do Ca^{2+} no interior da célula entendendo melhor como se relacionam as funções da CaM e destas enzimas nos processos de invasão e diferenciação do parasito.

Foram ainda identificadas outras proteínas que também possuem o domínio *EF hand*: centrina e uma proteína flagelar de ligação ao Ca^{2+} . A centrina é uma proteína do citoesqueleto essencial para duplicação do corpo basal em organismos eucarióticos inferiores. Em *Leishmania donovani* os níveis de mRNA e de proteína se encontram elevados durante a fase de crescimento exponencial em cultura e diminuem durante a fase estacionária, demonstrando seu papel no crescimento do parasito (Selvapandiyan *et al.*, 2001) e assim podemos prever que essas proteínas presentes na superfície de tripomastigotas devam atuar em alguma etapa de sua transformação em amastigotas.

5.3 Enriquecimento e análise proteômica das CaM-BPs

Para enriquecimento e identificação das CaM-BPs de *T. cruzi*, foi padronizada uma estratégia experimental com epimastigotas baseada na purificação por cromatografia de afinidade seguida de análise por SDS-PAGE ou géis de eletroforese bidimensional (2DE) e espectrometria de massas (MS).

Como sabemos a maioria das funções biológicas das CaM-BPs se baseiam na interação proteína-proteína, portanto nossa abordagem consiste em três etapas: (i) cromatografia de afinidade à CaM utilizando a resina de CaM imobilizada em Sepharose-4B, (ii) separação das proteínas por eletroforese unidimensional (1D) e bidimensional (2D) e (iii) posterior identificação por LC-MS/MS e MALDI-TOF, respectivamente. O modelo experimental está esquematizado na figura 8.

A técnica de cromatografia de afinidade se baseia na ligação específica de moléculas à região hidrofóbica da CaM. Como comentado, essa proteína é extremamente conservada, o que possibilita a utilização deste modelo em diversos organismos.

A resina aqui utilizada possui partículas de matriz que são revestidas por CaM, Passa-se o extrato proteico bruto seguido de lavagens com soluções de concentração crescente de NaCl. Optamos por duas etapas de lavagem, a primeira (200 mM NaCl) retira a maior parte do material não ligado e a segunda lavagem (500 mM NaCl) com maior concentração para eliminar ligações não específicas. Por fim a eluição com EGTA (ácido bis(2-aminoetil) etilenoglicol-N,N,N',N'-tetraacético) um agente quelante de íon bivalente, neste caso o Ca^{2+} , “sequestra” este íon da molécula de CaM, removendo de sua conformação funcional e, portanto, reduzindo a afinidade das CaM-BPs à coluna. Em seguida foi utilizada uma solução com uréia/tiouréia, agentes caotrópicos que desnaturam os ligantes protéicos a CaM possibilitando a eluição mesmo das eventuais proteínas que interagem com a CaM em sua forma não funcional independentemente da presença do Ca^{2+} .

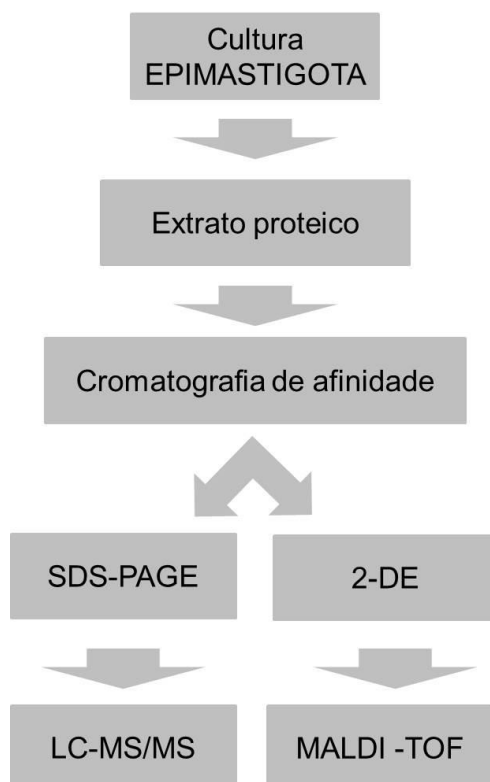


Figura 8. Fluxograma das etapas experimentais de análises das CaM-BPs.

5.3.1 Primeiro enriquecimento de CaM-BPs de *T. cruzi*

Este enriquecimento por cromatografia de afinidade foi demonstrado por géis de eletroforese. As frações proteicas de cada etapa da cromatografia de afinidade a CaM/Ca²⁺ foram separadas e visualizadas por SDS-PAGE demonstrando que a lavagem 1 com 200 mM de NaCl foi eficiente para descartar as proteínas não ligantes de CaM, pois a lavagem 2 com 500 mM de NaCl não apresentou bandas, desta forma podemos inferir que nas eluições não houve contaminação por proteínas que interagem com a CaM de modo não específico (Fig. 9). Ademais as bandas eluídas em E1 e E2 não parecem ser bandas fortemente expressas em comparação com os perfis proteicos na pistas FNL e L1.

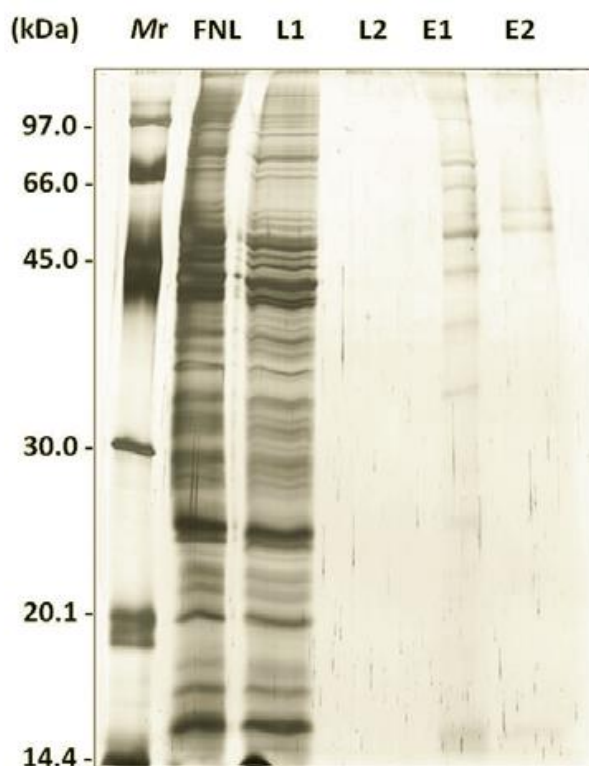


Figura 9. SDS-PAGE 12% das etapas de purificação de CaM-BPs da forma epimastigota de *T. cruzi*. $1,5 \times 10^9$ células da forma epimastigota correspondendo a 3 mg de proteínas totais foram utilizadas. Mr: marcador; FNL: fração não-ligante de CaM; L1: fração lavada com tampão 200 mM NaCl; L2: fração lavada com tampão 500 mM NaCl; E1: fração eluída com tampão de eluição contendo EGTA; E2: fração eluída com tampão de eluição contendo ureia/tiouréia.

Como podemos observar o tampão de eluição com EGTA foi suficiente para eluir a maioria das proteínas da coluna conforme verificamos no perfil de bandas em

E1 comparando com E2 que o tampão de eluição contendo uréia/tiouréia retirou algumas poucas proteínas com ligações muito fortes, demonstrando que ainda existiam proteínas com alta afinidade por CaM independentemente do íons cálcio e por consequência, da forma funcional da CaM, que é ligada ao Ca^{2+} .

Para melhor investigar o perfil das proteínas de interesse, analisamos também as proteínas das eluições 1 e 2 por eletroforese bidimensional (2-DE). Para tal análise foi necessário retirar o excesso de sal, principalmente o NaCl, da amostra por precipitação antes de proceder com a isoeletrofocalização (IEF). Tiras de gel com gradiente linear de pH 3-10 imobilizado (*IPG strips*) foram usadas para separar as proteínas pelo ponto isoelétrico. As proteínas correspondentes às frações E1 e E2 foram então separadas pela massa molecular, na segunda dimensão, realizando um SDS-PAGE 12% e coradas com nitrato de prata (Fig. 10 e 11 respectivamente).

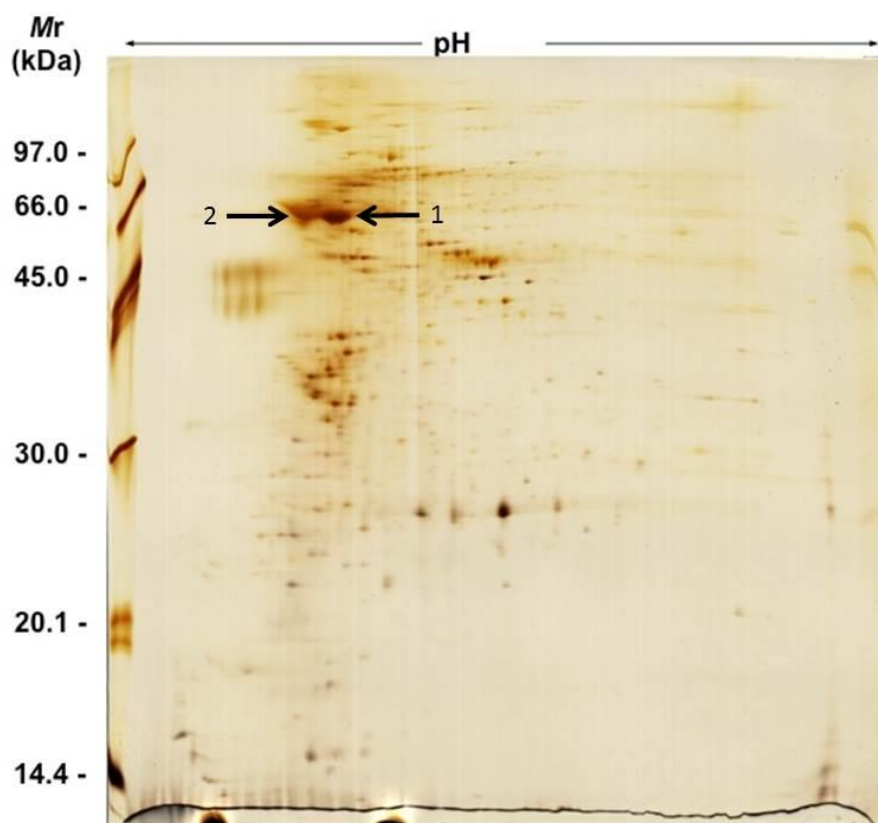


Figura 10. Perfil eletroforético 2D das CaM-BPs da forma epimastigota da eluição E1. As setas demonstram os *spots* identificados

Os *spots* mais intensos foram excisados do gel para serem processados para identificação. Primeiro, foram descorados para retirar o nitrato de prata para realizar a digestão com tripsina. A análise por PMF dos digestos foi realizada em espectrômetro de massas do tipo MALDI/TOF-TOF. Os picos conhecidos de

produtos de autoproteólise da tripsina e de contaminantes digeridos de queratina foram removidos. As proteínas foram identificadas pela busca no banco de dados através do programa *MASCOT*, e apenas duas proteínas apresentaram pontuação significativa (Tabela 5).

Tabela 5. Identificação por *peptide mass fingerprinting* das CaM-BPs do primeiro enriquecimento.

Spots	Nome da proteína (<i>T. cruzi</i>)	Cobertura (%)	Nº acesso	Pontuação	Massa teórica (kDa)	pI teórico
1	α -tubulin	45	GI 71397525	190	50,55	4,94
2	β -tubulin 1.9	29	GI 18568139	199	43,3	4,74

Além de serem constituintes do citoesqueleto, as tubulinas participam de uma série de eventos celulares. Os microtúbulos são formados pela montagem de heterodímeros de α - e β - tubulinas. O *T. cruzi* apresenta três classes de microtubulos: flagelar, o mitótico e formas sub-peliculares (Maingon *et al.* 1988). Durante a replicação de epimastigotas, os níveis de mRNA de α - e β - tubulinas, assim como sua taxa de transcrição diminuem na transição da fase logarítmica para a fase estacionária. Durante o crescimento do parasito, a expressão de α -tubulina é controlada parcialmente em nível transcricional, enquanto que a expressão de β -tubulina é controlada em nível pós traducional (González-Pino, 1999). As formas α - e β - tubulinas são de três a seis vezes mais abundantes em epimastigotas do que em tripomastigotas ou amastigotas (Da Silva *et al.*, 2006). Em outro estudo (Calabria *et al.*, 2008) as tubulinas também foram encontradas como pertencendo às CaM-BPs. Pelo programa de predição de sequência de domínio de ligação a CaM, *Calmodulin Target Database*, essas proteínas possuem um “potencial domínio de ligação a CaM”.

O gel 2D da eluição E2 (Fig. 11) revelou menos *spots* comparado ao de E1, o que era de se esperar, já que no perfil 1D verificamos poucas bandas, demonstrando a remoção mais eficaz das CaM-BPs pelo agente quelante de Ca^{2+} que interage com TcCaM. Conforme mencionado, a fração E2 eluídas pelos agentes caotrópicos deve representar aquelas proteínas com alta força de ligação à CaM, porém de forma independente de Ca^{2+} . Os *spots* não foram analisados por espectrometria de massas.

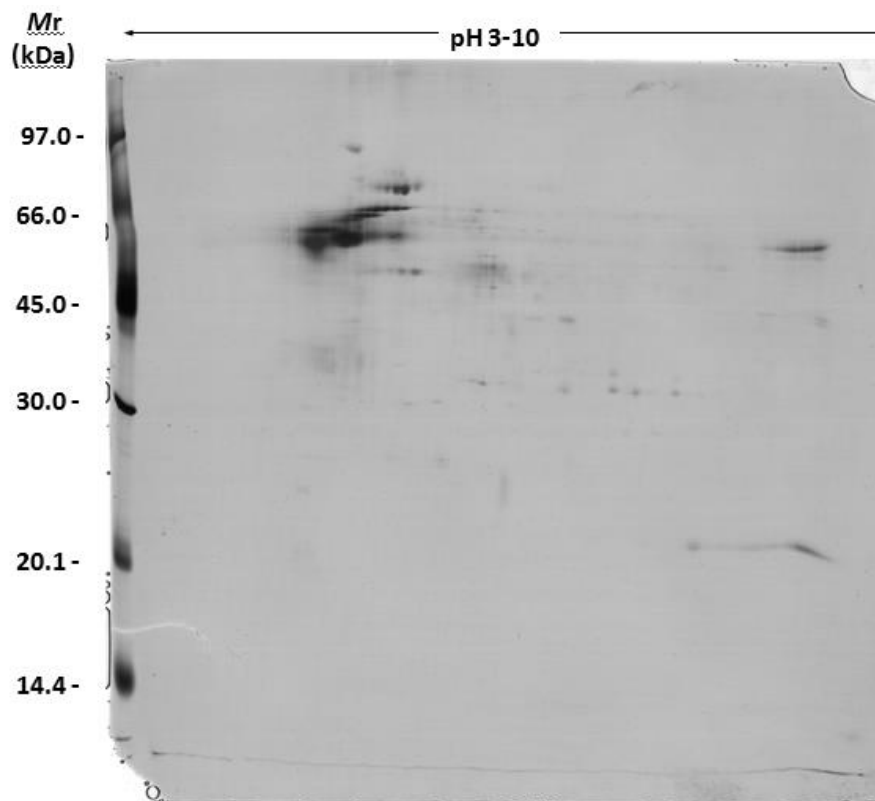


Figura 11. Perfil eletroforético 2D das CaM-BPs de epimastigota correspondente à eluição E2 (primeiro enriquecimento)

5.3.2 Segundo enriquecimento de CaM-BPs de *T. cruzi*

Outra purificação a partir de uma nova amostra com maior quantidade de proteínas foi realizada na tentativa de aumentar o volume de cada *spot* e assim o número de identificações por MALDI-TOF. Como havíamos otimizado a técnica de enriquecimento e visualizado um perfil unidimensional satisfatório na primeira purificação, optamos por realizar diretamente um 2-DE da fração E1, aplicando toda amostra para ter menores perdas. O segundo gel 2D de E1 (Fig. 12) revelou diversos *spots* principalmente na faixa ácida indicando que a IEF não foi capaz de abrir a faixa de separação. Pela presença de leves rastros horizontais e pela forma não arredondada dos *spots* espalhados horizontalmente, conclui-se que a IEF não permitiu isolar bem os *spots*, no entanto permitiu separá-los.

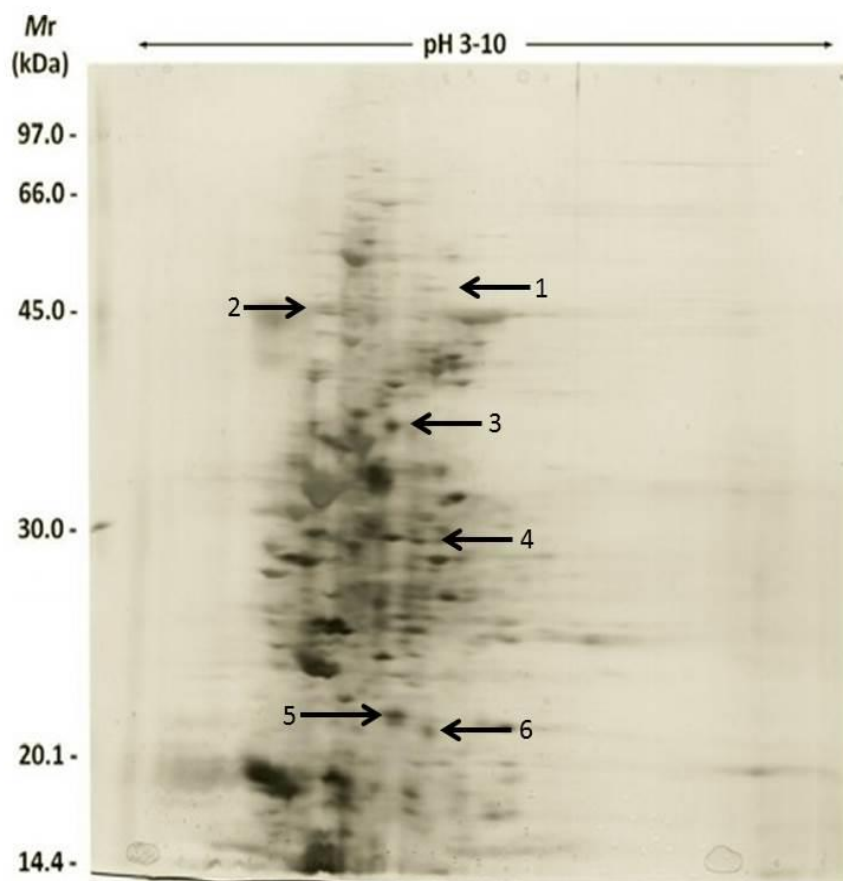


Figura 12. Perfil eletroforético 2D das CaM-BPs de epimastigotas correspondente à fração E1 (segundo enriquecimento).

Para proceder à identificação, os *spots* foram excisados e digeridos para análise por MALDI/TOF. Na figura estão representados por setas os *spots* identificados e com a numeração correspondente. O volume de proteínas na segunda purificação foi realmente maior, o que nos proporcionou uma quantidade maior de identificações (tabela 6). Esses dados corroboram os do primeiro enriquecimento, pois além das duas proteínas identificadas anteriormente, outras quatro importantes proteínas foram aqui demonstradas, o que eleva o conteúdo de nossos resultados.

Tabela 6. Identificação por *peptide mass fingerprinting* de proteínas ligantes de CaM da forma epimastigota de *T. cruzi* do segundo enriquecimento.

Spots ^a	Nome da proteína (<i>T. cruzi</i>) ^b	Nº acesso ^c	Pontuação ^d	Massa teórica (kDa) ^e	p/ teórico ^f
1	paraflagellar rod protein	Tc00.1047053509617.2 0	65	69,2	5,81
2	hypothetical protein, conserved	Tc00.1047053506321.2 80	81	43,3	9,38
3	β-tubulin, putative (fragment)	Tc00.1047053506563.4 0	133	35,2	4,99
4	mucinTcMUCII (pseudogene), putative	Tc00.1047053510085.4	64	26,2	11,81
5	cystathionine beta- synthase, cystein	Tc00.1047053509149.9	78	33,7	5,62
6	α-tubulin, putative	Tc00.1047053411235.9	69	50,5	4,94

a. Spot da Fig. 11.

b. Resultados obtidos pelo programa *MASCOT*.

c. Número de acesso no banco de dados não redundantes de proteínas *NCBI*.

d. Do inglês 'score', resultado da análise com o algoritmo da ferramenta *MASCOT* que avalia a possibilidade do conjunto de peptídeos submetidos à busca serem os mesmos encontrados no banco de dados originados de uma digestão *in silico* de uma proteína conhecida, e estatisticamente significativa.

e. Massa molecular teórica calculada a partir da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína.

f. Ponto isoelétrico calculado a partir da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína.

Todas as proteínas identificadas por este método foram analisadas em banco de dados *Calmodulin Target Database*, para verificar a presença de sequências preditas com domínios de ligação a CaM. As seis proteínas foram classificadas com "potencial domínio de ligação a CaM" sendo que apenas a *Hypothetical protein conserved* apresentou "potencial motivo IQ" no resíduo 210. Esses dados reforçam o fato das proteínas por nós identificadas serem CaM-BPs.

A proteína *paraflagellar rod* faz parte de um complexo de filamentos que se encontra em paralelo com o axonema na maior parte do comprimento do flagelo em tripanossomatídeos (Cachon, 1988). Ao contrário do axonema, que é conservado entre os eucariotos, a proteína *paraflagellar rod* é restrita à cinetoplastídeos e se sabe ter importante função na motilidade celular (Bastin, 1998) e na adesão do parasito a tecidos específicos no inseto vetor (Vickerman, 1973).

Eventos de fosforilação/desfosforilação de componentes do citoesqueleto em resposta à adesão do parasito a elementos da matriz extracelular foram descritos, e comprovado o envolvimento de tubulinas e proteínas *paraflagellar rod* na adesão do parasito à membrana da célula hospedeira (Mattos *et al.* 2012). Em epimastigotas foi reportado a presença de uma zona de adesão flagelar (FAZ) formada pela junção

das membranas do flagelo e do corpo celular. Essa região faz a ligação do axonema à proteína *paraflagellar rod* (Sherwin e Gull, 1989). Sabemos ainda que o flagelo é uma estrutura especializada envolvida na motilidade celular assim como em outros processos biológicos como reconhecimento e adesão (Rocha, 2006).

A família da mucina TcMUCII tem como representante, dentre outras, glicoproteínas derivadas do glicocálix do parasito, proteínas que se relacionam aos estágios iniciais de reconhecimento à célula hospedeira. As proteínas da família TcMUCII contém motivos GPI os quais se ancoram à membrana do *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005) e uma vasta variedade de epítomos que facilitam a adesão do tripomastigota à célula hospedeira e subsequente invasão. Essas proteínas ainda auxiliam na evasão à resposta imune (Andrews, 1989). As proteínas TcMUC estão relacionadas às trans-sialidades, outra família de proteínas essencial ao processo de invasão, propiciando a transferência de ácido siálico da membrana do hospedeiro para glicoproteínas do parasito fazendo a ligação entre as membranas (De Pablos *et al.*, 2011).

A proteína *cystathionine β -synthase* é uma enzima chave no mecanismo de transulfuração em *T. cruzi* (Nozaki *et al.*, 2001). Esta enzima está envolvida em uma das diferentes rotas de reaproveitamento de cisteína, catalizando a primeira etapa da via de transulfuração reversa, ou seja, a reação da homocisteína com serina produzindo cistationina (Marciano *et al.*, 2012).

5.3.3 Análise do SDS-PAGE por LC-MS/MS

Paralelamente optamos também pela manipulação do gel unidimensional e análise por metodologia de maior rendimento. As 12 bandas mais intensas em E1 e as 3 mais intensas em E2 foram excisadas do gel para identificação por LC_MS/MS por meio da colaboração com prof. Fábio Gozzo da Unicamp.

Foi encontrada uma proteína chaperona *heat shock 70 kDa* (HSP70), e na checagem no banco de dados *Calmodulin Target Database*, foi identificado um “domínio de ligação a CaM não classificado”, precisamente no aminoácido 260 (Tabela 7). Estudos revelam que a HSP70 possui uma região funcional, composta por uma sequência de 21 aminoácidos, que forma uma alfa-hélice anfipática a qual se liga com grande afinidade a CaM (Stevenson e Calderwood, 1990). Sabe-se que membros da família das *heat shock 70* podem atuar como chaperonas, regulando o enovelamento e a estabilidade de proteínas ou como marcador de morte celular

(Feder e Hofmann, 1999). Essa proteína foi reportada em *T. cruzi*, tanto na fase de crescimento exponencial, como na fase estacionária de epimastigotas, e ainda elevação na temperatura de 27°C para 37°C pode induzir as proteínas *heat shock* a promoverem a diferenciação para a forma metacíclica (Alcina, 1988).

Tabela 7. Identificação da HSP70 de *T. cruzi* por fragmentação (Q-TOF MS/MS).

Nº de acesso da HSP70 (Uniprot)	Peptídeos
P05456	R↓VEIIANDQGNR↓T
	R↓TTPSYVAFTDSER↓L
	R↓TTPSYVAFTDSER↓L
	R↓TTPSYVAFTDSER↓L
	R↓IINEPTAAAIAYGLDK, ↓V
	R↓IINEPTAAAIAYGLDK↓V
	R↓IINEPTAAAIAYGLDK↓V

“↓” corresponde sitio de clivagem Arg ou Lys da tripsina.

6. CONCLUSÃO

Todos os dados sobre proteínas ligantes de Ca²⁺ participando de diferentes mecanismos envolvidos com a amastigogênese, quando somados aos dados das proteínas encontradas na superfície do protozoário reforçam inúmeros estudos que afirmam o importante papel da sinalização mediada por Ca²⁺ e a complexidade dos mecanismos relacionados a importantes etapas do ciclo de vida que fazem este parasito ser tão bem adaptado.

As diversas proteínas ligantes de Ca²⁺ aqui elencadas possuem funções de armazenamento, de transporte, enzimática, dentre outras. A identificação dessas proteínas auxilia no entendimento da maquinaria bioquímica de *T. cruzi* e proporciona informações para manipulação de possíveis alvos terapêuticos.

As proteínas identificadas experimentalmente por meio de análise proteômica nos proporcionaram maiores informações a respeito das funções das proteínas ligantes de calmodulina como motilidade, proteínas estruturais, síntese metabólica.

As CaM-BPs aqui identificadas estão relacionadas a eventos envolvidos na invasão e diferenciação de *T. cruzi*, complementando os dados obtidos pela análise das proteínas ligantes de Ca^{2+} e desta forma as duas abordagens demonstraram um grau satisfatório de informações e assim espera contribuir para melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na gênese da doença de Chagas.

7. PERSPECTIVAS

Novas identificações das proteínas ligantes de calmodulina obtidas experimentalmente serão analisadas por meio do programa *PEAKS* contra um novo banco de dados a fim de obter uma quantidade maior de identificação.

Além disso, um pequeno volume de amostras dos digestos foram congeladas para serem identificadas utilizando outra metodologia de alto rendimento, espectrômetro do tipo *Orbitrap Elite*, o qual possui acurácia e sensibilidade consideravelmente maior.

Como perspectivas a médio prazo, têm-se interesse em realizar novos enriquecimentos das CaM-BPs da forma tripomastigota, e por uma análise comparativa determinar possíveis alvos de drogas que possam inibir processos relacionados a invasão e diferenciação do *T. cruzi*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguillon JC, Bustos C, Vallejos P, Hermosilla T, Morello A, Repetto Y, *et al.* Purification and preliminary sequencing of Tc- 45, an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen: absence of homology with cruzipain, cruzain, and a 46-kilodalton protein. *Am J Trop Med and Hyg.* 1995. 53: 211–215.
- Aguillon JC, Ferreira L, Perez C, Colombo A, Molina MC, Wallace A, *et al.* Tc45, a dimorphic *Trypanosoma cruzi* immunogen with variable chromosomal localization, is calreticulin. *Am J Trop Med and Hyg.* 2000. 63: 306–312.
- Alcina A, Urzainqui A, Carrasco L. The heat-shock response in *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem.* 1988. 172(1):121-7.
- Alves MJ, and Colli W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Subcell. Biochem.* 2008. 47:58–66.
- Anderson NL, Matheson AD, Steiner S. Proteomics: applications in basic and applied biology. *Curr Opin Biotechnol.* 2000. Aug11;(4):408-12.
- Andrade LO, and Andrews NW. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J. Exp. Med.* 2004. 200: 1135–1143.
- Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. 3, 819–823.
- Andre I, Kesvatera T, Jonsson B, Akerfeldt KS, Linse S. The role of electrostatic interactions in calmodulin-peptide complex formation. *Biophys. J.* 2004;87 (3), 1929-1938.
- Andrews NW. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. *Biol Res.* 1993. 26:65-7.
- Andrews NW, Whitlow MB. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989. 33:249–256.
- Andrews NW, Abrams CK, Statin SL, Griffins GA. *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane poreforming activity at low pH. *Cell*, 1990. 61(7):1277-87.
- Andrews NW, Hong KS, Robbins ES, Nussenweig V. Stage-specific surface antigen expressed during the morphogenesis of the vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 1998. 64, 474–484.
- Babu Y, Sack J, Greenhough T, Bugg C, Means A, Cook W. Three dimensional structure of calmodulin. *Nature.* 1985. 315, 37–40.

Bao Y, Weiss LM, Fen Ma Y, Kahn S, Huang H. Protein kinase A catalytic subunit interacts and phosphorylates members of trans-sialidase super-family in *Trypanosoma cruzi*. *Microbes and Infection*. 2010. 716-726.

Barrias ES, Dutra JM, De Souza W and Carvalho TM. Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. 363:828–834.

Bastin P, Sherwin T, Gull K. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature*. 1998. 391:548.

Benaim G, Cervino V, Hermoso T, Felibert P, Laurentin A. Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania mexicana*. Identification and characterization of a plasmamembrane calmodulin-dependent Ca(2+)-ATPase. *Biol Res*. 1993. 26(1-2):141-50.

Benaim G, Losada S, Gadelha FR and Docampo R. A calmodulin-activated(CaZ + Mg'+)-ATPase is involved in Ca* + transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J*. 1991. 280, 715-720.

Benaim G, Moreno SNJ, Hutchinson G, Cervino V, Hermoso T, Romero PJ, *et al*. Characterization of the plasma membrane calcium pump from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal* 1995. 306, 299–303.

Benaim G, Villalobo A. Phosphorylation of calmodulin: functional implications. *Europ J Biochem*. 2002. 269, 3619–3631.

Berggård T, Arrigoni G, Olsson O, Fex M, Linse S, James P. 140 mouse brain proteins identified by Ca2+-calmodulin affinity chromatography and tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2006. Mar;5(3):669-87.

Borda ES, Sterin-Borda LJ, Pascual JO, Gorelik G, Felix JC, von Kreuter BF *et al*. *Trypanosoma cruzi* attachment to lymphocyte muscarinic cholinergic and beta adrenergic receptors modulates intracelular signal transduction. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1991. 47:91–100.

Brener Z. Host-parasite relations in Chagas disease: mechanisms of infection and disease. *Ann Soc Belg Med Trop*. 65 Suppl. 1985. 1:9-13.

Brener Z, Barral M, Andrade Z. O parasito e sua interação com os hospedeiros. *In: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A. 1999. 2:88-126.

Brown D, and Waneck GL. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *J. Am. Soc. Nephrol*. 1992. 3:895–906.

Burleigh BA, Andrews NW. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Microbiol*. 1998. 1:461-465.

Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microb.* 2002. 11: 701-711.

Burleigh BA. Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? *Sci. STKE* 2005. 36.

Cachon J, Cachon M, Cosson MP, Cosson J. The paraflagellar rod: a structure in search of a function. *Biol. Cell*, 1988. 63:169–181.

Calábria LK, Hernandez LG, Teixeira RR, de Sousa MV, Espindola FS. Identification of calmodulin-binding proteins in brain of worker honeybees. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008 Sep;151(1):41-5.

Campbell NA, Reece JB, Hormones and the endocrine system. *Biology*. Benjamin Cummings, San Francisco. 2004. 943–959.

Carvalho TU, De Souza W. Study of mitochondrial organization in living resident and activated macrophages using the laser dye rhodamine 123. *J Leukoc Biol.* 1989.45(6): 498-502.

Charneau S, Junqueira M, Costa CM, Pires DL, Fernandes ES, Bussacos AC *et al.* The saliva proteome of the blood-feeding insect *Triatoma infestans* is rich in platelet-aggregation inhibitors. *International Journal of Mass Spectrometry.* 2007. 268(2-3): p. 265-76.

Chin D, Mean AR. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology.* 2000. 10, 322–328.

Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talón M, Robles M. *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics.* 2005. 18:3674-6.

Epting CL, Coates BM, Engman DM. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 2010 Nov;126(3):283-91.

Conte I, Labriola C, Cazzulo JJ, Docampo R, Parodi AJ. The interplay between folding-facilitating mechanisms in *Trypanosoma cruzi* endoplasmic reticulum. *Mol Biol of the Cell* 2003.14. 3529–3540.

Contreras VT, Morel CM, Goldenberg S. Stage specific expression precedes morphological change during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1985. 14, 83–96.

Crivici A and Ikura M. Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1995. 24:85-116.

Cuervo P, Domont GB, De Jesus JB. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J Proteomics.* 2010. Mar 10; 73(5): 845-67.

Da Silva RA, Bartholomeu DC, Teixeira SM. Control mechanisms of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2006. Jan; 36(1):87-96.

De Pablos LM, González GG, Solano Parada J, Seco Hidalgo V, Díaz Lozano IM, Gómez Samblás MM, *et al*. Differential expression and characterization of a member of the mucin-associated surface protein family secreted by *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*. 2011. Oct;79(10):3993-4001.

De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr. Pharm. Des*. 2002. 8, 269–285.

Docampo R, De Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol*. 2005. Mar; 3(3):251-61.

Dorta ML, Ferreira AT, Oshiro ME, Yoshida N. Ca^{2+} signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Mol Biochem Parasitol*. 1995. 73:285-289.

Dos Reis FC, Smith BO, Santos CC, Costa TF, Scharfstein J, Coombs GH *et al*. The role of conserved residues of chagasin in the inhibition of cysteine peptidases. *FEBS Lett*. 2008. 582:485–490.

Eid JE, Sollner-Webb B. Homologous recombination in the tandem calmodulin genes of *Trypanosoma brucei* yields multiples products: compensation for deleterious deletions by gene amplification. *Genes and Development* 5. 1991. 2024–2032.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Andersson B *et al*. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005. 309:409–415.

Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos AL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *J Antimicrob. Chemother*. 2010. Jul; 65(7):1395-8.

Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. 1999. 61:243-82.

Ferella M, Nilsson D, Darban H, Rodrigues C, Bontempi EJ, Docampo R, Andersson B. Proteomics in *Trypanosoma cruzi*-localization of novel proteins to various organelles. *Proteomics*, 2008. Jul; 8(13):2735-49.

Ferguson MA, Brimacombe JS, Cottaz S, Field RA, Güther LS, Ralton JE *et al.* Glycosyl-phosphatidylinositol molecules of the parasite and the host. *Parasitol.* 1994. 108(Suppl.):S45–S54.

Ferreira V, Valck C, Sanchez G, Gingras A, Tzima S, Molina MC *et al.* The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immun.* 2004. 172, 3042–3050.

Field MC, Medina-Acosta E, Cross GA. Characterization of a glycosylphosphatidylinositol membrane protein anchor precursor in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991. 48:227–229.

Finn BE, Forsén S. The evolving model of calmodulin structure, function and activation. *Structure.* 1995. Jan 15;3 (1):7-11.

Garcia-Marchan Y, Sojo F, Rodriguez E, Zerpa N, Malave C, Benaim G *et al.* *Trypanosoma cruzi* calmodulin: Cloning, expression and characterization. *Exp Paras.* 2009. 123, 326–333.

Gonzalez J, Ramalho-Pinto FJ, Frevert U, Ghiso J, Tomlinson *et al.* Proteasome activity is required for the stagespecific transformation of a protozoan parasite. *J. Exp. Med.* 1996. 184, 1909–1918.

González-Pino MJ, Rangel-Aldao R, Slezynger TC. Expression of alpha- and beta-tubulin genes during growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *DNA Cell Biol.* 1999. Jun;18(6):449-55.

Hong-Gang Lu, Zhong L, De Souza W, Benchimol M, Moreno S, Docampo R. Ca²⁺ Content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Cell Biol.* 1998 Apr;18(4):2309-23.

James P, Vorherr T, Carafoli E. Calmodulin-binding domains: just two faced or multifaceted? *Trends Biochem Sci.* 1995. Jan;20(1):38-42.

Karakhanova S, Meisel S, Ring S, Mahnke K, Enk AH. ERK/p38 MAP-kinases and PI3K are involved in the differential regulation of B7-H1 expression in DC subsets. *Eur. J. Immunol.* 2010. 40:254–266.

Kenworthy AK, Nichols BJ, Remmert CL, Hendrix GM, Kumar M, Lippincott-Schwartz J *et al.* Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J. Cell Biol.* 2004. 165:735–746.

Kölling R, Hollenberg CP. The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* 1994. 13:3261–3271.

Kranz A, Kinner A, Kölling R. A family of small coiled-coil-forming proteins functioning at the late endosome in yeast. *Mol Biol Cell*. 2001. 12(3):711-23.

Kurokawa H, Osawa M, Kurihara H, Katayama N, Tokumitsu H, Swindells MB. Target-induced conformational adaptation of calmodulin revealed by the crystal structure of a complex with nematode Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Kinase Kinase Peptide. *J. Mol. Biol.* 2001. 312, 59-68.

Labriola C, Cazzulo JJ, Parodi AJ. *Trypanosoma cruzi* calreticulin is a lectin that binds monoglucosylated oligosaccharides but not protein moieties of gly-coproteins. *Mol Biol Cell*. 1999. 10, 1381–1394.

Lammel EM, Barbieri MA, Wilkowsky SE, Bertini F, Isola ELD. *Trypanosoma cruzi*: Involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation. *Exp Paras*. 1996. 83,240–249.

Magalhaes AD, Charneau S, Paba J, Guercio RA, Teixeira AR, Ricart CA *et al*. *Trypanosoma cruzi* alkaline 2-DE: Optimization and application to comparative proteome analysis of flagellate life stages. *Proteome Sci*. 2008 Sep 8;6:24.

Maingon R, Gerke R, Rodriguez M, Urbina J, Hoenicka J, Negri S *et al*. The tubulin genes of *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Biochem*. 1988. Jan 15;171:285-91.

Malencik DA, Anderson SR. Binding of simple peptides, hormones, and neurotransmitters by calmodulin. *Biochemistry* 1982. 21 :348 1

Malhotra R, Collectin receptor (C1q receptor): structure and function. *Behring Institute Mitteilungen*, 1993. 254–261.

Marciano D, Santana M, Nowicki C. Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H(2)S production in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2012. Oct;185(2):114-20.

Mattos EC, Schumacher RI, Colli W, Alves MJ. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes to fibronectin or laminin modifies tubulin and paraflagellar rod protein phosphorylation. 2012. 7(10):e46767.

Meador WE, Means AR, Quijcho FA. Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 A structure of a calmodulin peptide complex. *Science*. 1992, 257 (5074), 1251-1255.

Means AR. Molecular mechanisms of action of calmodulin. *Recent Prog Horm Res*. 1988. 44:223-62.

Moreno SN, Vercesi AE, Docampo R. Ca^{2+}/H^{+} exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J*. 1994. 304 (227–233).

Nakayasu ES, Yashunsky DV, Nohara LL, Torrecilhas AC, Nikolaev AV, Almeida IC. GPIomics: global analysis of glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules of *Trypanosoma cruzi*. Mol Syst Biol, 2009. v.5, p.261.

Nakayasu ES, Gaynor MR, Sobreira TJ, Ross JA, Almeida IC. Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. Proteomics, 2009.v.9, n.13, Jul, p.3489-506.

Nelson DE, Glaunsinger B, Bohnert HJ. Abundant Accumulation of the Calcium-Binding Molecular Chaperone Calreticulin in Specific Floral Tissues of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 1997. 114: 29-37.

Nozaki T, Shigeta Y, Saito-Nakano Y, Imada M, Kruger WD. Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*. J Biol Chem. 2001 Mar 2;276(9):6516-23.

O'Day DH. CaMBOT: profiling and characterizing calmodulin-binding proteins. Cellular Signalling. 2003. 15, 347–354

Ogueta SB, Solari A, Tellez-Iñon MT. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes forms possess a Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinase. FEBS Letters 1994. 337, 293–297.

Ono Y, Sorimachi H, Suzuki K Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. Biochem Biophys Res Commun. 1998. 245: 289-294.

Orr GA, Tanowitz HB, Wittner M. *Trypanosoma cruzi*: Stage Expression of Calmodulin-Binding Proteins. Exp Paras. 1992. 74, 127-133.

Paba J, Santana JM, Teixeira AR, Fontes W, Sousa MV, Ricart CA. Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. Proteomics. 2004. Apr; 4(4): 1052-9

Paveto C, Pereira C, Espinosa J, Montanga AE, Farber M, Torres HN, The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 1995. 270, 16576–16579.

Perez-Molina JA, Perez-Ayala A, Moreno S, Fernandez-Gonzalez MC, Zamora J, Lopez-Velez R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2009. 64, 1139–1147.

Queiroz RM. Proteômica de *Trypanosoma cruzi*: variações em subproteomas durante a amastigogênese. [Tese de doutorado]. Brasília(DF). 2013.

- Queiroz RM, Charneau S, Motta FN, Santana JM, Roepstorff P, Ricart CA. Comprehensive proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell surface proteins by two complementary methods. *J Proteome Res.* 2013 Jul 5;12(7):3255-63.
- Ramírez G, Valck C, Aguilar L, Kemmerling U, López-Muñoz R, Ferreira A *et al.* Roles of *Trypanosoma cruzi* calreticulin in parasite–host interactions and in tumor growth. *Mol Immun.* 2012. 52. 133– 140.
- Ramirez G, Valck C, Ferreira VP, Lopez N, Ferreira A., Extracellular *Trypanosoma cruzi* calreticulin in the host–parasite interplay. *Trends in Paras.* 2011. 27, 115–122.
- Rassi AJr, Dias JC, Marin-Neto JA, Rassi A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart.* 2009. 95, 524–534.
- Rhoads AR, Friedberg F. Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J.* 1997. 11, 331–340.
- Rocha GM, Brandão BA, Mortara RA, Attias M, de Souza W, Carvalho TM. The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *J Struct Biol.* 2006. Apr;154(1):89-99.
- Sadigursky M, Santos-Buch CA. A novel receptor mediated ATP transport system regulated by tyrosine and serine/threonine phosphokinases in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Recept. Signal Transduct.* 1997. 7:29–43.
- Salisbury JL, Suino KM, Busby R, Springett M. "Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells". *Curr Biol.* 2002. Aug 6;12(15):1287-92.
- Schenkman S, Robbins ES, Nussenzweig V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. *Infect. Immun.* 1991. 59, 645–654.
- Schulman H. The multifunctional Ca²⁺ calmodulin- dependent protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993. 5, 241-253.
- Selvapandiyani A, Duncan R, Debrabant A, Bertholet S, Sreenivas G, Negi NS *et al.* Expression of mutant form of *Leishmania donovani* centrin reduces the growth of the parasite. *J Biol Chem.* 2001. Nov 16;276(46):43253-61.
- Sherwin T, Gull K. The cell division cycle of *Trypanosoma brucei* : timing of event markers and cytoskeletal modulations. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1989. 323, 573–588.
- Soderling TR. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem Sci.* 1999. 24(6):232-6.

Souto-Padrón T, Labriola CA, de Souza W. Immunocytochemical localisation of calreticulin in *Trypanosoma cruzi*. *Histochem Cell Biol.* 2004 Dec;122(6):563-9.

Stevenson MA, Claderwood SK. Members of the 70-kilodalton heat shock protein Family contain a highly conserved calmodulin-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* 1990.10, 1234-1238.

Su V, Lau AF. Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: significance in proteasomal degradation. *Cell Mol Life Sci.* 2009. Sep; 66(17): 2819–2833.

Swulius MT, Waxham MN. Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. 65 .2637–2657.

Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin. Microbiol.* 1992. Rev. 5, 409–419.

Tardieux I, Nathanson MH, Andrews NW. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. *J. Exp. Med.* 1994. 179, 1017–1022.

Teixeira DE, Benchimol M e De Souza W. Atlas didático: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ. 2011. 50.

Tellez-Iñon MT, Ulloa RM, Torruela M, Torres HN. Calmodulin and Ca²⁺ dependent cyclic AMP phosphodiesterase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Mol and Bioch Paras.* 1985. 17, 143–154.

Tokumitsu H, Soderling TR. Requirements for calcium and calmodulin in the calmodulin kinase activation cascade. *J. Biol. Chem.* 1996. 271, 5617- 5622.

Tomlinson S, Vandekerckhove F, Frevert U, Nussenzweig V. The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. *Parasitology*, 1995. v. 110 (Pt 5), p. 547-54.

Toutenhoofd SL, Strehler EE. The calmodulin multigene family as a unique case of genetic redundancy: multiple levels of regulation to provide spatial and temporal control of calmodulin pools? *Cell Calcium.* 2000. 28 (2), 83-96.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* 2001. 31, 472–481.

Valck C, Ramirez G, Lopez N, Ribeiro CH, Maldonado I, Sanchez G, Ferreira VP, Schwaeble W, Ferreira A. Molecular mechanisms involved in the inactivation of the

first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin. Mol Immun. 2010. 47, 1516–1521.

Vetter SW, Leclerc E. Novel aspects of calmodulin target recognition and activation. Eur. J. Biochem. 2003. 270, 404–414.

Vickerman K. The Mode of Attachment of *Trypanosoma vivax* in the Proboscis of the Tsetse Fly *Glossina fuscipes*: an Ultrastructural Study of the Epimastigote Stage of the Trypanosome. J Protozool. 1973. 20:394–404.

Vieira M, Dutra JM, Carvalho TM, Cunha-e-Silva NL, Souto-Padrón T, Souza W. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. Histochem Cell Biol. 2002. 118(6):491-500.

Voorheis HP, Martin BP. Characteristics of the calcium-mediated mechanism activating adenylate cyclase in *Trypanosoma brucei*. Eur. J. Biochem. 1981. 116,4.

Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. Int J Biochem Cell Biol. 2012 Jun;44(6):842-6

Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Humphery-Smith I *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis. 1995 Jul;16(7):1090-4.

WHO (2013) Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>.

Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of Trypanosome invasion and vacuole maturation. J. Cell Sci. 2003. 116, 3611–3622.

Yap KL, Kim J, Truong K, Sherman M, Yuan T, Ikura M. Calmodulin target database. J. Struct. Funct. Genomics. 2000. 1 (1), 8-14.