Jean Douglas Ferraz Cordeiro

Clonagem dos genes putativos para prolina
desidrogenase e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase
de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e
caracterização funcional de seus produtos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção de Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

Jean Douglas Ferraz Cordeiro

Clonagem dos genes putativos para prolina
desidrogenase e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase
de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e
caracterização funcional de seus produtos

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia da Relação
Patógeno-Hospedeiro do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção de Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da
Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano
Silber

Versão Original
São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Cordeiro, Jean Douglas Ferraz.

Clonagem dos genes putativos para prolina desidrogenase e Δ 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase de *Leshmania (Leishmania) amazonensis* e caracterização funcional de seus produtos / Jean Douglas Ferraz Cordeiro. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Ariel Mariano Silber.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanosomatídeos.

Versão do título para o inglês: Cloning of genes for putatives proline dehydrogenase and Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *leishmania (leishmania) amazonensis* and functional characterization of their products

Descritores: 1. *Leishmania amazonensis* 2. Via prolina-glutamato 3. Prolina desidrogenase 4. Δ 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase 5. Trypanosomatidae 6. Enzimas I. Silber, Ariel Mariano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0119/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Jean Douglas Ferraz Cordeiro.

Título da Dissertação: Clonagem dos genes putativos para prolina desidrogenase e Δ 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e caracterização funcional de seus produtos.

Orientador(a): Ariel Mariano Silber.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 427/10 referente ao projeto intitulado: “*Clonagem dos genes putativos para prolina desidrogenase e D1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase de Leishmania (Leishmania) amazonensis e caracterização funcional de seus produtos*” sob a responsabilidade de Jean Douglas Ferraz Cordeiro, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 25 de outubro de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

*Dedico esse trabalho à minha querida e
amada mãe.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me ajudar a manter a resignação em todos os momentos em que precisei.

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber, pelo direcionamento, esclarecimentos e ensinamentos a mim ofertados.

À Msc. Elizabeth M. F. Pral, pelo valoroso auxílio técnico, companheirismo e amizade.

Ao Dr. Josué, por todos os ensinamentos que recebi desde o início do meu trabalho e à Dra. Anahi Magdaleno pela grande amizade e apoio.

À Maria Julia Barison pela conduta altruísta, pela ajuda em alguns experimentos, ao qual foi crucial para o projeto. Pelos momentos de discussão científica e pela amizade, essa que me foi oferecida de uma forma nitidamente sincera.

À Flavinha e Denise pela amizade e afinidade, também pelos momentos alegres compartilhados, que seguramente são insubstituíveis.

Aos colegas do laboratório Lis, Inga, Sandra, Brian, Marcel, Flavia Damasceno e Igo.

À Msc. Michelle Marini Horikawa, pelo apoio profissional, companheirismo, amizade e carinho que em muito contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Ao Maurício S. Peña, pelo apoio em diversos experimentos, amizade e pelos momentos ímpares de descontração.

Aos colegas do Departamento, Rodrigo, Ícaro, Leandro, Alessandro e Renan.

Ao Msc. Márcio Massao Yamamoto, pelo suporte nas reações de sequenciamento.

À Profa. Dra. M^a. Carolina Elias por disponibilizar o microscópio de fluorescência e à Msc. Simone pelo suporte na captação das imagens.

À Profa. Dra. Margareth L. Capurro e ao Prof. Dr. Cláudio R. F. Marinho por disponibilizar o nanodrop.

À Profa. Dra. Marta Teixeira por disponibilizar o termociclador, ao Dr. Arlei Marcili pela ajuda nas genotipagens e aos demais colegas deste laboratório.

Ao Dr. Mário de Freitas Balanco, pela amizade e companheirismo que me foram oferecidos.

À Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf Carboni e aos demais colegas do laboratório, Leonardo e Mariana.

Aos demais professores, pelos ensinamentos, a todos os colegas do Departamento e aos funcionários responsáveis pela secretaria de Pós-Graduação, Wilma, Angela e Sabrina.

À minha mãe Joana M. Cordeiro, pelo carinho e amor incondicional, ao meu pai Afonso A. Cordeiro (*in memoriam*), ao meu irmão Jeremias (*in memoriam*) e aos demais irmãos e familiares por toda a ajuda, apoio e carinho, que gratuitamente sempre recebi.

Aos meus amados amigos Cleide, Fabio, Wellington e Bruna que me apoiaram, incentivaram e sempre estiveram ao meu lado, oferecendo uma amizade extremamente sincera.

Não diferente, agradeço especialmente aos preciosos amigos Daniel e Sara que tenho certeza que torcem por mim e sem sombra de dúvida fazem parte da minha vida.

Enfim, a todos aqueles que realmente são amigos, aos quais foram e são muito importantes para mim.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

Palavra puxa palavra, uma ideia traz outra, e assim se faz um livro, um governo, ou uma revolução, alguns dizem que assim é que a natureza compôs as suas espécies.

Machado Assis

RESUMO

FERRAZ, J. D. **Clonagem dos genes putativos para prolina desidrogenase e Δ 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e caracterização funcional de seus produtos.** 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

É sabido que os tripanosomatídeos utilizam aminoácidos, particularmente a prolina, como fontes de carbono e energia. Além disso, essas moléculas estão envolvidas em outros processos fisiológicos como a metaciclogênese, osmorregulação, ou resistência a diferentes condições de estresse. A via redox prolina-glutamato em *L. (L.) amazonensis* esta sendo estudada por nosso grupo. Duas enzimas estão envolvidas nessa rota: 1. prolina desidrogenase (PRODH) que converte L-prolina em Δ 1-pirrolina-5-carboxilato (P5C) e 2. Δ 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH), que converte glutamato-1-semialdeído (GSA) em L-glutamato. Embora a presença dessa via em algumas espécies do gênero *Leishmania* seja fortemente amparada por dados do projeto genoma, não foram reportadas até o momento evidências bioquímicas de sua atividade. Nesse trabalho focamos alguns aspectos da via prolina-glutamato em *L. (L.) amazonensis*. Demonstramos a presença das ORFs de ambos os genes dessa via (que denominamos *LaPRODH* e *LaP5CDH*). É importante frisar que nenhum desses genes tinha sido identificado ainda, já que o sequenciamento genômico dessa espécie ainda não está completo. A presença dos produtos gênicos foi verificada em extratos totais de promastigotas por ensaios de *western blotting*. Através de análises *in silico* e ensaios de imunofluorescência constatamos que *LaPRODH* e *LaP5CDH* são enzimas de localização mitocondrial, fato esse que corrobora com os dados presentes na literatura. Também pudemos conferir a funcionalidade dos produtos desses genes através da complementação de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes para os genes Δ put1 e Δ put2, ortólogos de *LaPRODH* e *LaP5CDH* respectivamente. Em conjunto, esses dados sugerem a presença de uma via metabólica prolina-glutamato funcional em *L. (L.) amazonensi*.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*. Via prolina-glutamato. Prolina desidrogenase. Δ 1-Pirrolina-5-carboxilato desidrogenase. Trypanosomatidae. Enzimas.

ABSTRACT

FERRAZ, J. D. **Cloning of genes for putatives proline dehydrogenase and Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and functional characterization of their products.** 2011. 92 p. Masters thesis (Parasithology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

It is known that trypanosomatids use amino acids, particularly proline, as a carbon and energy sources. In addition, it was involved in other physiological processes such as metacyclogenesis, osmoregulation or resistance to different stress conditions. The proline-glutamate redox pathway is being studied in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* by our group. Two enzymes are involved in this route: 1. proline dehydrogenase (PRODH) which converts L-proline into Δ 1-pyrroline-5-carboxylate (P5C) and 2. Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase (P5CDH) which converts glutamate-1-semialdehyde into L-glutamate. Although, the presence of this pathway in some species of the *Leishmania* genus is strongly supported by their genome project data, no biochemical evidences of their activities were reported up to now. In this work we focus on some aspects of the proline-glutamate pathway in *L. (L.) amazonensis*. We demonstrate the presence of ORFs of both genes from this pathway (which we called *La*PRODH and *La*P5CDH). It is worth to stress that none of these genes were previously identified since the genome sequencing of this specie has not been completed yet. The presence of the genic products was verified in total extracts of promastigotes by western blotting. Through *in silico* analyses and immunofluorescence assays found that *La*PRODH and *La*P5CDH are mitochondrial localization enzymes, this fact corroborates with literature data. We could also demonstrate the functionality of these gene products by complementation of *Saccharomyces cerevisiae* mutant for Δ put1 e Δ put2, orthologs in *La*PRODH and *La*P5CDH respectively. Taken together, these data show the presense of a functional proline-glutamate pathway in *L. (L.) amazonensi*.

Keywords: *Leishmania amazonensis*. Proline-glutamate pathway. proline dehydrogenase. Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. Trypanosomatidae. Enzymes.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDH	Aldeído desidrogenase
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albumina bovina sérica
°C	Graus Celsius
cDNA	DNA complementar
CMXRos	Clorometil-X-rosamina
Da	Daltons
DAPI	4', 6-diamino-2-fenilenoindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxiribonuclease
dNTPs	Desoxinucleotídeo-trifosfato
D. O.	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EC	Enzyme Comission
EDTA	Ácido etilenodiaminoacético
FAD	Flavina adenosina dinucleotídeo
FADH	Flavina adenosina dinucleotídeo reduzida
<i>g</i>	Aceleração gravitacional
<i>g</i>	Grama
GAPDH	Gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase
GD	Glutamato desidrogenase
GSA	Glutamato semi-aldeído
γ-GK	Glutamil quinase gama
γ-GPR	Glutamil fosfato redutase gama
HCl	Ácido clorídrico
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Isopropil--D-tiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de potássio
kb	Quilobases

kDa	Quilodalton
kDNA	Cinetoplasto
L	Litro
L.	Leishmania
La	<i>Leishmania amazonensis</i>
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mg	Miligrama
µg	Micrograma
MgCl	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
µl	Microlitro
mM	Milimolar
µm	Micrômetro
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OAT	Ornitina aminotransferase
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação de polimerase em cadeia
P5C	Δ ¹ -pirrolina-5-carboxilato
P5CDH	Δ ¹ -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase
P5CR	Δ ¹ -pirrolina-5-carboxilato redutase
P5CS	Δ ¹ -pirrolina-5-carboxilato sintetase
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial de hidrogeniônico

PI	Iodeto de propídio
Pmol	Picomol
PRODH	Prolina desidrogenase
POX	Prolina oxidase
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucléico ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TBS	Tampão tris-borato SDS
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Tampão Tris-EDTA
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
U	Unidades de reação da enzima
UV	Ultravioleta
V.	Viannia
WHO	World Health Organization
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil--D-galactopiranosídeo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico e mecanismo de transmissão da leishmaniose	25
Figura 2 - Distribuição geográfica da leishmaniose visceral.....	27
Figura 3 - Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea.....	27
Figura 4 - Representação do metabolismo de L-prolina	33
Figura 5 - Esquema de deleção das ORFs de interesse (Δ put1 e Δ put2) pela inserção do módulo kanMX através de recombinação homóloga.....	46
Figura 6 - Plasmídeo utilizados para transformar as cepas Δ put1 e Δ put2	46
Figura 7 - Qualidade dos RNAs ribossomais obtidos a partir de <i>L. (L.) amazonensis</i> e diferentes linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	48
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de amplificação das ORFs de <i>La</i> PROD _H e <i>La</i> P5CD _H e de digestão das construções em vetores pGEM-T- easy	50
Figura 9 - Diagrama com percentual de similaridade e árvore filogenética da PROD _H putativa de <i>L. (L.) amazonensis</i> e as proteínas ortólogas em diversos organismos.	52
Figura 10 - Diagrama com percentual de similaridade e árvore filogenética da P5CD _H putativa de <i>L. (L.) amazonensis</i> e as proteínas ortólogas em diversos organismos.	52
Figura 11 - Domínios conservados nas sequências de PROD _H e P5CD _H putativas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	54

Figura 12 - Predição por peptídeo sinal na sequência <i>LaPROD</i> H.....	55
Figura 13 - Predição por peptídeo sinal na sequência <i>LaP5CDH</i>	55
Figura 14 - Predição por hélices transmembranares na sequência <i>LaPROD</i> H.....	56
Figura 15 - Predição por hélices transmembranares na sequência <i>LaP5CDH</i>	57
Figura 16 - Regiões de peptídeo sinal e domínio EF-hand em <i>LaPROD</i> H e ortólogos.....	58
Figura 17 - Peptídeo sinal e resíduos conservados de glutamato e cisteína em <i>LaP5CDH</i> e ortólogos.	59
Figura 18 - Proteínas recombinantes <i>LaPROD</i> H e <i>LaP5CDH</i> resolvidas em gel de poliacrilamida	60
Figura 19 - Ensaio de imunolocalização em <i>L. (L.) amazonensis</i> com anticorpos anti- <i>TcPROD</i> H e anti- <i>TcP5CDH</i>	62
Figura 20 - <i>Western blotting</i> com anticorpos anti- <i>TcPROD</i> H e anti- <i>TcP5CDH</i>	63
Figura 21 - Complementação de leveduras mutantes Δ put1 e Δ put2 com os genes <i>LaPROD</i> H e <i>LaP5CDH</i> respectivamente	65
Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de PCR a partir de moldes de cDNA de leveduras mutantes complementadas ou não e <i>L. (L.) amazonensis</i>	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Oligonucleotídeos desenhados.	36
Quadro 2 - Plasmídeos e construções obtidas.	36
Quadro 3 - Descrição de bactérias utilizadas no projeto.	37
Quadro 4 - Descrição de leveduras utilizadas.	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Considerações gerais	22
1.2 Agente etiológico	23
1.3 Estágios e Ciclo biológico	23
1.4 Leishmaniose: as doenças	25
1.5 Epidemiologia	26
1.6 Quimioterapia	28
1.7 Metabolismo de aminoácidos em tripanosomatídeos	29
1.8 Metabolismo da prolina e seus intermediários	31
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Oligonucleotídeos, plasmídeos e micro-organismos	36
3.1.1 Oligonucleotídeos	36
3.1.2 Plasmídeos e construções	36
3.1.3 Parasitas	36
3.1.4 Bactérias (<i>Escherichia coli</i>).....	37
3.1.5 Leveduras (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	37
3.2 Manipulação de DNA	38
3.2.1 Extração de DNA genômico de <i>L. (L.) amazonensis</i>	38
3.2.2 Dosagem de DNA.....	38
3.2.3 Desenho dos oligonucleotídeos para amplificação dos genes PROD _H e P5CD _H de <i>L. (L.) amazonensis</i>	38
3.2.4 Amplificação dos genes putativos para LaPROD _H e LaP5CD _H por PCR (reação em cadeia da polimerase)	39
3.2.5 Eletroforese em gel de agarose	39
3.2.6 Purificação e ligação dos fragmentos de DNA no plasmídeo	40
3.3 Manipulação de bactérias	40
3.3.1 Preparo de bactérias <i>E. coli</i> competentes	40

3.3.2 Transformação de bactérias competentes	40
3.3.3 Identificação de clones positivos	41
3.4 Sequenciamento de DNA	41
3.5 Análises computacionais para os genes putativos de LaPRODH e LaP5CDH	42
3.6 Expressão de proteínas recombinantes.....	42
3.7 Anticorpos primários	43
3.8 Imunolocalização	43
3.9 Western Blotting a partir de extratos protéicos totais de <i>L. (L.) amazonensis</i>	44
3.10 Análise funcional dos genes putativos para LaPRODH e LaP5CDH.....	45
3.10.1 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e seus genótipos.....	45
3.10.2 Manipulação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
3.10.3 Transformações em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
3.11 Manipulação de RNA	48
3.11.1 Extração de RNA.....	48
3.11.2 Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase	48
3.12 PCR com molde de cDNA e eletroforese em gel de agarose	49
4 RESULTADOS.....	50
4.1 Amplificação e clonagem das ORFs dos genes putativos para LaPRODH e LaP5CDH	50
4.2 Sequência e análises computacionais das ORFs putativas para LaPRODH e LaP5CDH	51
4.2.1 Predição computacional de similaridade com genes ortólogos	51
4.2.2 Predição da presença de domínios conservados	53
4.2.3 Predição de peptídeo sinal, domínios transmembranares e depósito das sequências	54
4.2.4 Alinhamento e localização de domínio conservado e peptídeo sinal nas sequências LaPRODH e LaP5CDH.....	57
4.3 Expressão de proteínas recombinantes.....	59
4.4 Ensaio de imunolocalização.....	60
4.5 Western blotting a partir de extratos protéicos totais de <i>L. (L.) amazonensis</i>	62
4.6 Verificação da funcionalidade de LaPRODH e LaP5CDH por complementação de cepas nocaute de <i>S. cerevisiae</i>.....	63
4.7 Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase	65
5 DISCUSSÃO	67

5.1 Presença das ORFs dos genes putativos para PRODH e P5CDH no genoma de <i>L. (L.) amazonensis</i>	67
5.2 Confirmação das identidades dos genes e sustento da hipótese das suas possíveis funções por verificação da presença de domínios conservados	68
5.3 Localização subcelular	69
5.4 Expressão das proteínas nativas e recombinantes	71
5.5 Avaliação da funcionalidade dos produtos codificados pelos genes PRODH e P5CDH de <i>L. (L.) amazonensis</i>	72
5.6 Considerações finais	74
6 CONCLUSÕES	75
7 PERSPECTIVAS	76
REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

As leishmanioses são um conjunto de moléstias infecciosas não contagiosas que afetam os homens e os animais, seus primeiros relatos datam do século 7 a.C., onde foram encontradas inscrições de lesões cutâneas em tábuas na biblioteca do rei Assurbanipal (c. 690 a.C.-627 a.C.) (MANSON-BAHR, 1996). No ano de 1885, Cunningham, cirurgião do exército da Índia Britânica, observou o parasita mas não foi capaz de relacioná-lo à doença (COX, 2002). Em 1900, William B. Leishman corou amostras de células do baço de um paciente, onde observou a presença de corpos arredondados. Ele propôs que se tratava de tripanosomas alterados (LEISHMAN, 1903). Meses depois, o Capitão Charles Donovan confirmou o achado, ficando as estruturas descritas conhecidas como corpos Leishman-Donovan (DONOVAN, 1903). Naquele mesmo ano o médico francês Charles L. A. Laveran achou se tratar de Piroplasmidas, agentes causadores de febre do gado do Texas, para os quais propôs o nome *Piroplasma donovani*. Ronald Ross, propôs que os corpos Leishman-Donovan se tratavam de estágios intracelulares de novos parasitas, os quais chamou *Leishmania donovani* (ROSS, 1903). As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida (ROSS, 1903; VICKERMAN 1976). Esta ordem é constituída por uma variedade de protozoários flagelados que compartilham uma característica em comum: a presença de uma estrutura denominada cinetoplasto. Esta constitui uma parte da mitocôndria onde está contido o DNA do cinetoplasto (kDNA, por kinetoplastid DNA em inglês). O kDNA consiste de uma rede concatenada de moléculas de DNA de basicamente dois tamanhos: os maxicírculos, (umas 20-50 moléculas de uns 20-35 kb) que codificam proteínas envolvidas na produção energética e os minicírculos (em torno de 10.000 moléculas de aproximadamente 0,5-1,5 kb) que codificam RNAs guias (gRNA) envolvidos na edição dos RNAs, um processo restrito aos tripanosomatídeos. O cinetoplasto está situado na base do flagelo, posterior ao corpúsculo basal (SIMPSON, 1968; HONG; SIMPSON, 2003; SIMPSON et al., 2004; DE SOUZA; ATTÍAS; RODRIGUES, 2009; FLEGONTOV et al., 2009).

A família Trypanosomatidae constitui um grupo de protozoários patogênicos, com grande importância médica e econômica. Os organismos desta família podem ser monoxênicos ou heteroxênicos. São responsáveis pelas principais doenças dessa família uma

variedade de espécies do gênero *Leishmania*, e as espécies *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, agentes etiológicos da Leishmaniose, Doença de Chagas e Doença do Sono, respectivamente.

Leishmania spp. são parasitos obrigatórios, heteroxênicos, que em seu ciclo biológico apresentam dois hospedeiros, um inseto (flebotomíneo) e um vertebrado. Através da picada de flebotomíneos (contaminados com *Leishmania spp*) os parasitas são transmitidos, e pode-se desencadear a manifestação de leishmaniose tanto no homem como em outros mamíferos (SHERLOCK et al., 1984; SILVA et al., 2000). A infecção do homem pode ser assintomática, mas quando ocorrem sintomas estes podem se apresentar nas diferentes formas clínicas que serão discutidas mais adiante (PEARSON; SOUSA, 1996).

Esta doença é negligenciada e endêmica em diversos países no mundo, estando intimamente relacionada à parcela pobre da população mundial e é tratada, razoavelmente, como uma das principais questões de saúde pública pela World Health Organization (WHO).

1.2 Agente etiológico

O gênero *Leishmania* divide-se em dois subgêneros de acordo com o local de colonização do tubo digestório do inseto vetor, o subgênero *Leishmania* presente no velho e novo mundo e o subgênero *Viannia* presente apenas no novo mundo. O subgênero *Leishmania* abrange as formas que são restritas a porção média e anterior ao piloro do tubo digestório do inseto (seção suprapylaria) enquanto o subgênero *Viannia* compreende as espécies que colonizam a região média, anterior e posterior ao piloro (seção peripylaria) (LAINSON; SHAW, 1987; LAINSON, 2010). Um terceiro grupo abrange algumas espécies consideradas mais primitivas, são aquelas que infectam alguns lagartos do velho mundo e são restritas a seção hipopylaria, região posterior ao piloro, íleo e reto. A transmissão ocorre quando lagartos se alimentam de insetos infectados. Algumas espécies listadas são *Leishmania tarentolae*, *Leishmania agamae* e *Leishmania ceramodactyli*, porém alguns autores consideram que estes parasitas estariam melhor localizados no gênero *Sauroleishmania* (KILLICK-KENDRICK et al., 1984; LAINSON, 2010).

1.3 Estágios e Ciclo biológico

Como outros membros da ordem Kinetoplastida, *Leishmania spp.* apresenta formas distintas, que são diferenciadas a partir de diversas características, dentre elas o hospedeiro

que infectam, e características morfológicas como forma do corpo, posição do cinetoplasto respeito do núcleo e do sítio de inserção flagelar. Durante seu ciclo biológico *Leishmania spp.* apresenta duas formas: amastigota e promastigota. A forma amastigota é oval ou arredondada com cerca de 10 µm de diâmetro, sem flagelo livre, com núcleo excêntrico e cinetoplasto próximo a ele. Esta forma é obrigatoriamente intracelular, e está presente no hospedeiro vertebrado. A forma promastigota é delgada com aproximadamente 30 µm de extensão, apresentando um flagelo livre, kDNA anterior ao núcleo próximo a base do flagelo. Esta forma é extracelular está presente nos hospedeiros invertebrados (DE SOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009; FLEGONTOV et al., 2009).

A leishmaniose é transmitida ao hospedeiro vertebrado quando formas promastigotas metacíclicas são transmitidas através da picada de fêmeas (infectadas) de flebotomíneos. Estes insetos são moscas da subfamília Phlebotominae, dos gêneros *Phlebotomus* (no velho mundo) e *Lutzomyia* (no novo mundo), vulgarmente chamados mosquitos palha. Após a inoculação, os promastigotas metacíclicos são fagocitados por células do sistema fagocitário, e são internalizados em fagossomas que subsequentemente se fundem a lisossomas formando assim os fagolisossomas ou vacúolos parasitóforos (RITTIG; BOGDAN, 2000; HANDMAN; BULLEN, 2002). Uma vez dentro deste vacúolo diferenciam-se para formas amastigotas, que se dividem por fissão binária (HERWALDT, 1999). Esse processo de diferenciação é disparado pelas condições físicoquímicas que as células encontram nesse ambiente particular. Mudanças bioquímicas, metabólicas e no padrão de expressão gênica são induzidas e acontecem ao longo desse processo (MCCONVILLE et al., 2007; OPPERDOES; COOMBS, 2007; SAXENA et al., 2007). Interessantemente neutrófilos podem fagocitar promastigotas, mas são incapazes de sustentar a diferenciação ou multiplicação destes parasitas. Porém, os neutrófilos infectados podem ser fagocitados por macrófagos, onde enfim os parasitas prosseguem com o ciclo, sendo este fenômeno chamado “cavalo de tróia” (VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

A contaminação do hospedeiro invertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo, no qual macrófagos infectados e formas amastigotas presentes no sangue ou linfa intersticial podem ser ingeridos e ganham o intestino do inseto vetor (HEPBURN, 2003). Neste ambiente os amastigotas diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas. Após replicação por fissão binária, os procíclicos diferenciam-se por um processo denominado metaciclogênese, no qual as formas deixam de se reproduzir e assumem a forma denominada promastigota metacíclico, a qual é infectiva e não proliferativa. Estes migram para a região

anterior do tubo digestivo do vetor, e contaminarão um novo hospedeiro vertebrado no próximo repasto sanguíneo, fechando desta forma o ciclo figura 1 (BATES; ROGERS, 2004).

Figura 1 - Ciclo biológico e mecanismo de transmissão da leishmaniose.

FONTE: Sacks e Noben-Trauth, 2002.

1.4 Leishmaniose: as doenças

A diversidade genética do parasito em combinação com a resposta imunológica do hospedeiro contribuem para uma variação na evolução da infecção, acarretando em distintos quadros clínicos (PEARSON; SOUSA, 1996). Baseadas nas manifestações clínicas e na sintomatologia foram aceitas quatro formas principais da doença: cutânea ou tegumentar, mucocutânea, cutânea difusa e visceral.

Cutânea: é a forma mais comum. É causada por diversas espécies de *Leishmania* spp., e se caracteriza pelo surgimento de lesões exclusivamente cutâneas (ulcerosas ou não), geralmente em partes mais expostas do corpo como face, braços e pernas. O início da lesão ocorre no local da picada, onde há formação de edemas indolores e com aparência clara. Geralmente causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (Viannia) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana* ou *L. (V.) braziliensis* (WHO).

Mucocutânea: evolui frequentemente com o surgimento de lesões ulcerosas levando a uma parcial ou total destruição de mucosas da região nasal, bucal ou faríngea. Com propagação provável por via hematogênica, essa forma de leishmaniose recebe também os nomes de úlcera de Bauru, espúndia, ferida brava e nariz de tapir. Muitas vezes é proveniente de um quadro de leishmaniose cutânea que não recebeu um tratamento adequado. É causada por *Leishmania* (V.) *braziliensis* e raramente por *Leishmania* (V.) *panamensis* (BRASIL, 2007; GONZÁLEZ et al., 2009).

Cutânea difusa: é caracterizada pela presença de nódulos, que por metástase são disseminados, formando lesões intradérmicas não ulcerativas. No Brasil, esta associada exclusivamente a infecção causada por *L. (L.) amazonensis*. Há evidências de que essa espécie tem uma capacidade particular de interferir negativamente em vários mecanismos imunológicos necessários para a geração de uma resposta imune efetiva. Na ausência de uma resposta imune celular efetiva contra o parasito, este se multiplica sem controle, aumentando o número de lesões e expandindo sua distribuição na superfície corporal. Além de *L. (L.) amazonensis* este quadro também é causado por *Leishmania (L.) aethiopica* (MOLYNEUX; KILLICK-KENDRICK, 1987; BRASIL, 2007).

Visceral ou calazar: dentre outros sintomas pode causar anemia, comprometimento da medula óssea e tecido linfóide, hepatoesplenomegalia, febre e cefaléia. É uma doença crônica, debilitante caracterizada pela migração dos parasitos via circulação linfática e sanguínea infectando o sistema fagocítico mononuclear. Quando não tratada, pode evoluir para óbito em mais de 90% dos casos. Foi primariamente uma zoonose, caracterizada como doença eminentemente rural. Posteriormente se expandiu para áreas urbanas e se tornou um sério problema de saúde pública. Três espécies de *Leishmania* pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* são responsáveis pela doença visceral no mundo, *Leishmania (L.) chagasi* nas Américas; *Leishmania (L.) donovani* na Ásia e África e *Leishmania (L.) infantum* na Ásia, Europa e África (HERWALDT, 1999; BRYCESON, 1996; LAINSON; SHAW, 1987).

1.5 Epidemiologia

A leishmaniose tem uma prevalência mundial de 12-20 milhões de pessoas, 350 milhões de pessoas em risco de contágio e uma incidência de 1,5 a 2 milhões de casos por ano, sendo 1 a 1,5 milhões da forma tegumentar e 0,5 milhão da forma visceral (DESJEUX, 2001; MCCONVILLE; HANDMAN, 2007). A doença é endêmica em 88 países, ocorrendo

em regiões tropicais e subtropicais (climas adequados para proliferação do vetor), desde o norte da Argentina ao sul dos Estados Unidos (nas Américas), África, Ásia e sul da Europa (MAGILL, 1995; HERWALDT, 1999; WHO, 2000). Porém, estima-se que a maioria dos casos de leishmaniose visceral (cerca de 90%) está restrita a poucos países, são eles Índia, Nepal, Sudão, Brasil e Bangladesh, enquanto que uma porcentagem similar de leishmaniose cutânea limita-se a países como Argélia, Afeganistão, Arábia Saudita, Paquistão, Brasil, Síria, Peru e Irã (figuras 2 e 3) (MURRAY et al., 2005).

Figura 2 - Distribuição geográfica da leishmaniose visceral. Áreas endêmicas marcadas de vermelho.
FONTE: WHO [(2011)].

Figura 3 - Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea. Áreas endêmicas da marcadas de vermelho.
FONTE: WHO [(2011)].

No Brasil já foram identificadas sete espécies de *Leishmania*, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As principais espécies de importância médica são: *Leishmania* (V.) *braziliensis*, que causa a leishmaniose cutânea e mucocutânea (LUZ et al., 2009), *Leishmania* (L.) *amazonensis*, com um espectro de manifestações clínicas que incluem lesões localizadas, disseminadas e difusas (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004) e *Leishmania* (L.) *chagasi*, um dos agentes etiológicos da leishmaniose visceral (GONTIJO; MELO, 2004).

1.6 Quimioterapia

Baseado na descoberta de Gaspar Oliveira Viana em 1912 (REY, 1962), os antimoniais pentavalentes (Sb^{V}) são as drogas de primeira linha para o tratamento de leishmaniose. Drogas como o estibogluconato de sódio e antimoniato de metilglucamina são Sb^{V} utilizados atualmente, porém a eficácia do tratamento varia de acordo com a forma clínica da doença e resposta imunológica do paciente. Podem apresentar efeitos colaterais como náusea, nefrite, pancreatite, hepatite, mialgia e arritmia cardíaca. São administradas por via parenteral (intramuscular e endovenosa) e são rapidamente eliminados pela urina (MURRAY et al., 2005). O mecanismo de ação destas drogas ainda não está completamente entendido. Presume-se que os antimoniais pentavalentes são pro drogas, ocorrendo dentro do organismo, sua redução em antimônio trivalente (Sb^{III}), sendo esta uma forma ativa e mais tóxica que a primeira (GOODWIN; PAGE, 1943; ROBERTS; MCMURRAY; RAINEY, 1998; SHAKED-MISHAN et al., 2001). Dessa forma a droga age inibindo a glicólise, β -oxidação de ácidos graxos do, fosforilação de ADP (BALAÑA-FOUCE et al., 1998; CROFT; COOMBS, 2003; RATH et al., 2003). Ademais, foi demonstrado que os antimoniais trivalentes induzem o aumento do efluxo de tióis a inibe a enzima tripanotiona redutase, deixando o parasita mais suscetível ao estresse oxidativo (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004).

As drogas de segunda linha utilizadas para o tratamento das leishmanioses são anfotericina B e pentamidina. A anfotericina B é medicamento antifúngico derivado da cepa *Streptomyces nodosus*, de administração por via endovenosa. A droga interage substituindo moléculas de esteróides da membrana plasmática, o que resulta na formação de poros, aumento da permeabilidade e morte do parasita. (CROFT; COOMBS, 2003; CUNNINGHAM, 2002). A anfotericina B pode ser incorporada a lipossomas diminuindo assim sua absorção pelos rins, o alvo principal da dos efeitos colaterais da droga (SOLOMON et al., 2007). Além

da toxicidade renal, o paciente tratado com esta droga pode apresentar disfunção cardíaca (BERMAN, 1997; CUNNINGHAM, 2002).

A pentamidina é uma diamidina aromática, útil em casos de baixa resposta aos antimoniais ou em pacientes com Calazar sensíveis ao antimônio. Porém também se trata de um fármaco com vários efeitos colaterais como toxicidade renal e hipoglicemia (BALAÑA-FOUCE et al., 1998). Seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado, porém sabe-se que o composto liga-se ao DNA, fundamentalmente nas regiões ricas em AT. O kDNA de *Leishmania* apresenta mais regiões ricas em AT que o DNA nuclear, podendo assim afetar a transcrição e replicação nessa organela. Há também a confirmação de alteração o que acarreta na fragmentação dessa organela (BALAÑA-FOUCE et al., 1998; BRAY et al., 2003; CROFT; COOMBS, 2003; MUKHERJEE et al., 2006).

Outra droga para o tratamento de leishmaniose é o mitelfosine, que foi a primeira droga de administração enteral. Em tratamento de pacientes contaminados com leishmaniose visceral, por *L. (L.) donovani* na Índia os resultados foram promissores. Sobre os mecanismos de ação sabe-se que a droga bloqueia a síntese e altera a composição da membrana plasmática. Alguns efeitos colaterais associados ao mitelfosine são diarreias, vômitos, distúrbios gastrointestinais e renais (SOTO et al., 2004; MURRAY et al., 2005).

Efeitos colaterais somados ao aparecimento de resistência às drogas utilizadas têm induzido a WHO recomendar e fomentar a pesquisa em novas drogas contra leishmaniose. Contudo, a falta de significativo retorno comercial para doenças negligenciadas, tem resultado em insuficiente financiamento e comprometimento principalmente do setor privado (RIDLEY, 2003). Neste contexto, muitas das estratégias de pesquisa desenvolvidas com maior sucesso atualmente utilizadas não abordam o desenho de novos compostos químicos, mas a utilização de drogas pré existentes, que já são utilizadas nos tratamentos de outras doenças. Essa abordagem vem rendendo formulações mais efetivas e seguras (MURRAY, 2004).

1.7 Metabolismo de aminoácidos em tripanosomatídeos

Para sobreviver em diferentes condições ambientais os tripanosomatídeos dispõem de um potencial altamente adaptativo, sendo capazes de oxidar distintos tipos de moléculas em ambos hospedeiros. Já está descrita a habilidade desses parasitas para utilizar carboidratos e aminoácidos como fontes de carbono e energia (CAZZULO, 1992, 1994; SILBER et al., 2005; BRINGAUD; RIVIERE; COUSTOU, 2006). Porém, o tipo de metabolismo

predominante em tripanosomatídeos (baseado na oxidação de açúcares ou aminoácidos) varia segundo o tipo de hospedeiro onde o parasita se encontra (vertebrado ou invertebrado), e, portanto, segundo o estágio do ciclo biológico. Enquanto formas tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. brucei* utilizam glicose, a qual é abundante nos fluidos do hospedeiro vertebrado (FAIRLAMB; OPPERDOES, 1986), os estágios que hospedam os insetos vetores dependem do catabolismo de aminoácidos, com preferência em L-prolina (MARR; BERENS, 1977; LAMOUR et al., 2005). Em contrapartida, formas promastigotas de *Leishmania* spp. (presentes no inseto vetor) apresentam a via glicolítica mais ativa, enquanto que a oxidação de ácidos graxos e aminoácidos é mais ativa em amastigotas (hospedeiro mamífero) (OPPERDOES; COOMBS, 2007).

Diferentes estudos têm focado a diferenciação dos promastigotas para amastigotas de *Leishmania*, demonstrando que cada uma destas formas apresentam adaptações específicas aos seus respectivos ambientes. Por exemplo, enquanto amastigotas promovem suas atividades enzimáticas em pH ácido no vacúolo parasitóforo, promastigotas promovem suas atividades em pH neutro no intestino do inseto vetor (ANTOINE et al., 1990; ROSENZWEIG et al., 2008). Rosenzweig et al. (2008) demonstrou que na diferenciação axênica de promastigotas para amastigotas há um aumento da expressão de enzimas gliconeogênicas e do catabolismo de aminoácidos concomitante com o decaimento da capacidade glicolítica. Ao mesmo tempo, há uma super-regulação da capacidade de β -oxidação, catabolismo de aminoácidos, ciclo dos ácidos tricarboxílicos, cadeia respiratória mitocondrial e fosforilação oxidativa. Mutantes para a enzima gliconeogênica frutose-1,6-bifosfatase de formas amastigotas mostraram depender profundamente da gliconeogênese e não de glicose como fonte de carbono, mais provavelmente de aminoácidos para a síntese de carboidratos essenciais. Isto indicaria também uma dependência dessa enzima para a infectividade em macrófagos e em camundongos (NADERER et al., 2006). Para compreender as preferências por diferentes fontes de carbono e energia deve-se também levar em consideração o fato de que a disponibilidade de açúcares nos flebotomíneos dos gêneros *Flebotomus* e *Lutzomyia* é abundante. Esse alto conteúdo de açúcares deriva do fato da sua dieta, em ambos os sexos, ser baseada em néctar de frutas, sendo que o repasto sanguíneo das fêmeas constitui apenas um suplemento (DILLON; EL-KORDY, 1997; SOARES; TURCO, 2003; SANTOS et al., 2008).

Além da participação dos aminoácidos no metabolismo energético, vem se publicando dados que demonstram que aminoácidos ou seus metabólitos estão envolvidos em outros aspectos da biologia dos tripanosomatídeos e outros organismos. O metabolismo de aminoácidos como prolina, glutamato, aspartato, glutamina, isoleucina, leucina e asparagina

foram reportados para *T. cruzi* (ZELEDON, 1960; SYLVESTER; KRASSNER, 1976). Esses aminoácidos podem ser oxidados a glutamato ou aspartato, os quais são processados via Ciclo de Krebs após seu transporte para a mitocôndria (SILBER et al., 2005). Além disso, essas moléculas estão envolvidas em outros processos biológicos como a metaciclogênese, osmorregulação, ou resistência a diferentes condições de estresse (CONTRERAS et al., 1985; ROHLOFF; RODRIGUES; DOCAMPO, 2003; TONELLI et al., 2004). Bringaud (2006) levanta dados da literatura nos quais se comprova que ao longo do ciclo biológico, a oxidação de aminoácidos é fundamental para Tripanosomas e *Leishmania*. Além disso, os amastigotas de *Leishmania* utilizam várias outras moléculas, como purinas, vitaminas e pelo menos dez aminoácidos essenciais presentes no fagolisossomo (MCCONVILLE et al., 2007). Como visto, a utilização de aminoácidos pelos tripanosomatídeos não se restringe a biossíntese protéica, nem tão pouco a fontes de carbono e energia. Mas são moléculas multifuncionais e de extrema importância para adaptação e manutenção das funções metabólicas destes parasitas quando em contato com diferentes ambientes (BRINGAUD; RIVIERE; COUSTOU, 2006).

1.8 Metabolismo da prolina e seus intermediários

A L-prolina, um aminoácido proteogênico serve como fonte de carbono e energia, participa da diferenciação e osmorregulação em tripanosomatídeos (CONTRERAS et al., 1985; TONELLI et al., 2004). Já em plantas seu metabolismo tem um complexo efeito e desenvolvimento da resposta a diferentes tipos de estresse (HONG, et al., 2000; MATTIOLI, et al., 2008; SZE'KELY, et al., 2008). Uma etapa importante do metabolismo deste aminoácido é o seu transporte para o interior das células. Em *T. cruzi* ocorre a partir de dois sistemas, um de baixa e outro de alta afinidade, ambos são ativos e dependem, respectivamente, do gradiente de H^+ e ATP da membrana plasmática (SILBER et al., 2002). Dentro da célula, este aminoácido pode servir como substrato de outra enzima, como a prolina racemase (REINA-SAN-MARTIN et al., 2000). A prolina é muito abundante no intestino do flebotomíneo, tendo sido demonstrado que é uma das principais fontes de energia para promastigotas de *Leishmania* (KRASSNER; FLORY, 1972). Mazareb et al. (1999), utilizou culturas axênicas para demonstrar que promastigotas de *L. donovani* possuem dois sistemas de transporte de prolina, um dependente e outro independente de cátion e amastigotas possuem apenas um, ao qual é cátion independente. Além disso outros estudos demonstraram que promastigotas e amastigotas possuem diferentes sistemas de transporte de prolina, sendo

que o pH ótimo para o transporte varia de acordo com a forma. Em promastigotas o pH 7 é ótimo, enquanto em amastigotas é cerca de pH 5,5 e o nível de captação é cerca de 10 vezes menor que em promastigotas (ZILBERSTEIN; PHILOSOPH; GEPSTEIN, 1989; GLASER; MUKKADA, 1992; ZILBERSTEIN; GEPSTEIN, 1993). Embora essas formas cresçam em temperaturas diferentes, Mazareb et al. (1999) demonstrou que no transporte de prolina, promastigotas e amastigotas mostram temperatura ótima similar, em 37 °C. *Leishmania* possui mecanismos para uma rápida adaptação às extremas mudanças das condições ambientais, esses que dependem da tolerância à temperatura e pH (ZILBERSTEIN; SHAPIRA, 1994).

A oxidação da prolina sua oxidação através da via de interconversão prolina-glutamato é mediada por duas enzimas: prolina desidrogenase (PRODH) ou prolina oxidase (POX) (EC: 1.5.99.8) que é FAD dependente e está hermeticamente ligada a membrana interna da mitocôndria; a segunda enzima da reação é Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH) (EC: 1.5.1.12) NAD^+ dependente, localizada tanto na mitocôndria como no citoplasma (KAVI KISHOR et al., 2005). A primeira etapa da reação se inicia com a PRODH que oxida L-prolina em Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C), o qual se interconverte espontaneamente em glutamato semialdeído (GSA). Na segunda etapa P5CDH catalisa a oxidação de GSA em L-glutamato. Posteriormente L-glutamato é catabolizado até α -cetoglutarato pela enzima glutamato desidrogenase (GD) (EC: 1.4.1.2), onde NAD^+ ou NADP^+ é cofator e a amônia é subproduto da reação, GD também catalisa a reação inversa. Posteriormente o cetoácido α -cetoglutarato servirá como intermediário do ciclo de krebs figura 4 (HOEK; NJOGU, 1980; PHANG; YEH; HAGEDORN, 1981).

Em leveduras e procariotos a biossíntese de prolina a partir de L-glutamato é promovida em três passos pelas enzimas γ -glutamil quinase (γ -GK) (EC: 2.7.2.11), γ -glutamil fosfato redutase (γ -GPR) (EC: 1.2.1.41) e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase. Em eucariotos as reações dos dois primeiros passos é promovida por uma enzima bifuncional, a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) que reduz L-glutamato até GSA, esse que por sua vez se interconverte em P5C. O GSA e o P5C são moléculas que, em ambiente mitocondrial, se interconvertem espontaneamente. Seguindo a biossíntese o P5C servirá como substrato para a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) (EC: 1. 5. 1. 2), sendo assim reduzido até prolina, reação essa dependente de NADPH^+ (figura 4). O gene para P5CS está presente no genoma de *L. major* e *T. cruzi* mas não em *T. brucei*. Assim *Leishmania* e *T. cruzi* podem ser capazes de sintetizar prolina a partir de glutamato, mas aparentemente *T. brucei* não (OPPERDOES;

COOMBS, 2007). Outra via pela qual a prolina é sintetizada provém da transaminação de ornitina até GSA, reação catalisada pela ornitina aminotransferase (OAT, EC: 2.6.1.13), essa mesma enzima pode catalisar a reação inversa onde posteriormente a ornitina entra no ciclo da uréia (PHANG; PANDHARE; LIU, 2008; TANNER, 2008). Estando o P5C situado entre o glutamato e a ornitina, este serve como ponte de carbono entre o ciclo de Krebs e o ciclo da uréia (PHANG, 1985). O ciclo da uréia parece ser ativo em *Leishmania*, pois seu genoma contém diversas enzimas do ciclo, diferente de *T. cruzi* e *T. brucei* (OPPERDOES; COOMBS, 2007). Ademais, antigas observações demonstram que *Leishmania* secreta uréia, enquanto *T. cruzi* e *T. brucei* produzem amônia (YOSHIDA; CAMARGO, 1978).

Figura 4 - Representação do metabolismo de L-prolina. Na primeira etapa a prolina (**PRO**) é oxidada à pirrolina-5-carboxilato (**P5C**) pela prolina desidrogenase (**PRODh**). **P5C** pode ser reduzido de volta a prolina pela enzima pirrolina-5-redutase (**P5CR**), ou ser convertido espontaneamente a glutamato semialdeído (**GSA**). **GSA** pode ser convertido a glutamato pela pirrolina-5-desidrogenase (**P5CDh**). A seguir, o glutamato pode ser desaminado pela glutamato desidrogenase (**GD**) gerando α -cetoglutarato. O α -cetoglutarato entra no ciclo de Krebs, e participa dos metabolismos energético e de aminoácidos. Alternativamente, **GSA** pode ser convertido a ornitina pela ornitina aminotransferase (**OAT**) e participar do ciclo da uréia.

FONTE: Modificado de Verslues e Sharma, 2010.

Os genes putativos para as enzimas dessa via estão anotados nos bancos de dados dos genomas de *L. (L.) major*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) mexicana* e *L. tarentolae*, exceto para *L. (L.) amazonensis* que não tem seu genoma sequenciado. Contudo, até o momento não se encontram trabalhos com abordagem na funcionalidade e localização celular dos produtos desses genes em *Leishmania spp.*

Os dados acima descritos, junto com recentes descrições das funções dos aminoácidos ao longo do ciclo de vida dos tripanosomatídeos evidenciam a importância dessas vias metabólicas nesses organismos. Como mencionado acima, recentemente nosso grupo tem obtido evidências moleculares e bioquímicas da funcionalidade da via prolina-glutamato em *T. cruzi*, assim como da multiplicidade de funções biológicas na qual esta via está envolvida. Esse fato, somado à presença dos genes anotados para enzimas dessa via nos bancos de dados de genoma das diferentes espécies do gênero *Leishmania* permitem hipotetizar a existência dessa via nesses organismos. Considerando as informações acima citadas, julgamos de significativa importância investigar a presença desta via metabólica na espécie *L. (L.) amazonensis*. Neste projeto visamos desvendar a existência desses genes nessa espécie e enfocar alguns aspectos, como demonstração de funcionalidade dos produtos gênicos, assim como localização celular. A identificação dessa via no metabolismo do parasita é de relevância para compreender o comportamento metabólico desse protozoário.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar os genes codificantes para as enzimas prolina desidrogenase (PRODH) e Δ^1 -pirrolina-5 carboxilato desidrogenase (P5CDH) no genoma de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e estabelecer a funcionalidade seus produtos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar as sequências dos genes putativos PRODH e P5CDH de *L. (L.) amazonensis*;
- Delinear os aspectos físico-químicos putativos das sequência putativas de ambas as proteínas através de análises “in silico”;
- Constatar a presença dos produtos dos genes PRODH e P5CDH em extratos protéicos totais de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por ensaios de *western blotting*;
- Revelar a localização localizar subcelular de ambas proteínas no parasita através de ensaios de imunolocalização;
- Demonstrar a atividade funcional das enzimas através da complementação de *Saccharomyces cerevisiae* mutantes para os genes $\Delta put1$ (PRODH) e $\Delta put2$ (P5CDH);
- Confirmar, por ensaio de transcrição reversa, a presença dos produtos de transcrição dos genes PRODH e P5CDH de *L. (L.) amazonensis* em *S. cerevisiae* complementadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Oligonucleotídeos, plasmídeos e micro-organismos

3.1.1 Oligonucleotídeos

Quadro 1 - Oligonucleotídeos desenhados.

Gene	Genótipo e Características	
LaPRODH	<i>LaPOF1</i> 5' ATG CGY CGT CTC CTC CCC CT ^{3'}	Invitrogen
	<i>LaPOF3</i> 5' CGC ATG CTT GTC GAC GCG GA ^{3'}	
	<i>LaPOF4</i> 5' CGA ARA AGC ACG AGG TCT TCT T ^{3'}	
	<i>LaPOR1</i> 5' CTG TAC AGC GAG GCG TGC ATG A ^{3'}	
	<i>LaPOR2</i> 5' CGT GTT GTA GGT YTT CTG TAG GG ^{3'}	
	<i>LaPOR3</i> 5' TTA AAA ACC GCA KCG GCG CTT CAG CT ^{3'}	
LaP5CDH	<i>LaP5CF1</i> 5' ATG CTM CGY CGY ACC GTG YCC T ^{3'}	Invitrogen
	<i>LaP5CF2</i> 5' TCG AGG GGT TTG TGT CGG CCA T ^{3'}	
	<i>LaP5CF3</i> 5' TCA AGA TGG GCC AGC CGG ACG AC ^{3'}	
	<i>LaP5CR1</i> 5' AGA CCA CCG TGT TGC CCA TCA ^{3'}	
	<i>LaP5CR2</i> 5' TCC GCC TTG GCG AYT TCG AT ^{3'}	
	<i>LaP5CR3</i> 5' CTA SAG YGT GTA CAC RTC SGG CA ^{3'}	

3.1.2 Plasmídeos e construções

Quadro 2 - Plasmídeos e construções obtidas.

Plasmídeos	Genótipo e Características	Fonte/Referência
pGEM-T-easy	pUC Ori, gene de fusão LacZα-ccdB, AMPR	Promega
pYES2	CYC1, pUC Ori, promotor GAL1, URA3, AMPR	Invitrogen
pRSET C	His-tag N-terminal, pUC Ori, f1 Ori, Promotor T7, AMPR	Invitrogen
Construções	Descrição	Fonte/Referência
pRSET C <i>LaPRODH</i>	Sequência gênica com código para PRODH de <i>L. (L.) amazonensis</i> clonada em pGEM-T-easy e subclonada em pRSET C	Presente Projeto
pRSET C <i>LaP5CDH</i>	Sequência gênica com código para P5CDH de <i>L. (L.) amazonensis</i> clonada em pGEM-T-easy e subclonada em pRSET C	Presente Projeto
pYES2 <i>LaPRODH</i>	Sequência gênica com código para PRODH de <i>L. (L.) amazonensis</i> clonada em pGEM-T-easy e subclonada em pYES2	Presente Projeto
pYES2 <i>LaP5CDH</i>	Sequência gênica com código para P5CDH de <i>L. (L.) amazonensis</i> clonada em pGEM-T-easy e subclonada em pYES2	Presente Projeto

3.1.3 Parasitas

Leishmania (Leishmania) amazonensis, Cepa LV79, (WHO type – MPRO/72/M1841).

3.1.4 Bactérias (*Escherichia coli*)

Quadro 3 - Descrição de bactérias utilizadas no projeto.

Linhagem	Genótipo e Características	Fonte/Referência
DH5α	SupE, ΔlacU169, φ80lacZΔM15, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, F'[traD36, proAB, lacIq, lacZΔM15]	Hanahan, D., 1983
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F– <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (<i>r_B</i> [–] <i>m_B</i> [–]) <i>dcm</i> ⁺ , <i>Tet</i> ^r , <i>gal</i> λ (DE3), <i>endA</i> , <i>Hte</i> [<i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> Cam ^r]	Stratagen

3.1.5 Leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

Quadro 4 - Descrição de leveduras utilizadas.

Linhagem	Genótipo e Características	Fonte/Referência
Sc288c	<i>MATα SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>	Mortimer e Johnston, (1986); Goffeau et al., (1996).
BY4741	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> Auxotrófica para síntese de uracila	EUROSCARF
BY4741/ pYES2Ø	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> protófia para síntese de uracila recuperada	Presente Projeto
YLR142w	BY4741; <i>MATα</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YLR142w::kanMX4 (ΔPUT1) Mutante para o gene PRODH	EUROSCARF
YHR037w	BY4741; <i>MATα</i> ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YHR037w::kanMX4 (ΔPUT2) Mutante para o gene P5CDH	EUROSCARF
YLR142w/pYES2Ø	BY4741; <i>MATα</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YLR142w::kanMX4 (ΔPUT1) Mutante para o gene PRODH transformada somente com o vetor pYES2	Presente Projeto
YHR037w/pYES2Ø	BY4741; <i>MATα</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YHR037w::kanMX4 (ΔPUT1) Mutante para o gene P5CDH transformada somente com o vetor pYES2	Presente Projeto
YLR142w/LaPRODH	BY4741; <i>MATα</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YLR142w::kanMX4 (ΔPUT1) Mutante para o gene P5CDH complementada com a construção pYES2/P5CDH de <i>L. (L.) amazonensis</i>	Presente Projeto
YHR037w/LaP5CDH	BY4741; <i>MATα</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; YHR037w::kanMX4 (ΔPUT2) Mutante para o gene P5CDH complementada com a construção pYES2/P5CDH de <i>L. (L.) amazonensis</i>	Presente Projeto

3.2 Manipulação de DNA

3.2.1 Extração de DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*

Cerca de 1×10^8 células de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cultivadas em meio Warren a 25 °C foram colhidas por centrifugação a 6.000 x g por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente as células foram lavadas 3 vezes em PBS pH 7,2 e homogeneizadas em 200 µL de tampão TES com adição de 50 µg/mL de proteinase K e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse período, o DNA da amostra foi extraído por tratamento com fenol/clorofórmio. A fase aquosa foi recuperada por centrifugação a 6.000 x g por 5 minutos. O DNA foi precipitado com 2 volumes de isopropanol gelado e centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o DNA precipitado foi lavado com 3 volumes de etanol 70% e centrifugado a 6.000 x g por 5 minutos. A amostra de DNA foi seca à temperatura ambiente e ressuspensa em 150 µl de solução TE.

3.2.2 Dosagem de DNA

A quantificação do DNA foi realizada através da leitura em espectrofotômetro *NanoDrop* (Spectrophotometer ND-1000) a 260nm e 280nm. O fator utilizado para a conversão de DO₂₆₀ em concentração de DNA foi de 50 µg/mL por cada unidade de DO₂₆₀, de acordo com o protocolo descrito por Sambrook et al., (1989). As razões entre as leituras Abs_{260nm}/Abs_{280nm} foram calculadas para verificar a pureza do DNA. A amostra foi considerada pura quando os valores estavam entre 1,8 e 2,0.

3.2.3 Desenho dos oligonucleotídeos para amplificação dos genes PRODH e P5CDH de *L. (L.) amazonensis*

Utilizando as sequências de nucleotídeos de organismos ortólogos de *La*PRODH e *La*P5CDH disponíveis nas bases de dados (NCBI e GeneDB) foram desenhados oligonucleotídeos degenerados (quadro 1) a partir dos domínios conservados dos genes mencionados, utilizando-se o software BioEdit (Sequence Alignment Editor) (HALL, 1999). Os códigos de acesso dos genes PRODH são: LmjF26.1610 (*L. (L.) major*); LbrM26_V2.1630 (*L. (V.) braziliensis*); LinJ26.1620 (*L. (L.) infantum*) e LmxM.26.1610 (*L.*

(*L. mexicana*). E para o gene P5CDH são: LmjF03.0200 (*L. (L.) major*); LbrM03_V2.0210 (*L. (V.) braziliensis*); LinJ03.0050 (*L. (L.) infantum*) e LmxM.03.0200 (*L. (L.) mexicana*).

3.2.4 Amplificação dos genes putativos para *La*PROD_H e *La*P5CD_H por PCR (reação em cadeia da polimerase)

Os iniciadores (senso e antisenso) que flanqueiam os genes foram utilizados para amplificar por PCR as fases abertas de leitura ou ORFs (do inglês *Open Reading Frames*) dos dois genes citados, utilizando o DNA genômico de *L. (L.) amazonensis* como molde. As reações de PCR foram feitas com 0,1 µg de DNA genômico de *L. (L.) amazonensis*, utilizando-se os iniciadores nas concentrações de 0,2 µM, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 2 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas®), 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl (Invitrogen) e água *nuclease free* (Amresco) na quantidade suficiente para 100 µl. O controle negativo foi feito com a adição de água ao invés de DNA. As reações foram feitas em termociclador (Mastercycler gradient – Eppendorf) com 1 ciclo inicial de desnaturação por 4 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de: desnaturação por 1 minuto a 95 °C, anelamento por 2 minutos, em temperaturas entre 65 °C (para PROD_H) e 60 °C (para P5CD_H), extensão de 2 minutos a 72 °C. Ao término dos 30 ciclos, foi feita incubação a 72 °C por 10 minutos para o término da extensão pela *Taq* DNA polimerase .

3.2.5 Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos de DNA amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1X (40 mM Tris-acetado e 1 mM EDTA). Antes da aplicação adicionou-se ao DNA o tampão de amostras (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol e 20% de glicerol). Para migração, foi submetido ao gel uma corrente de 100 V. Após a corrida os géis foram corados com brometo de etídio (solução em 0.5 µg/mL), sob agitação por 15 minutos. Os géis foram visualizados no transiluminador sob fonte de luz UV e fotografados em sistema ImageQuant 300 Capture (GE Healthcare®). Foi utilizado o Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fementas®) como padrão de referência das bandas de DNA.

3.2.6 Purificação e ligação dos fragmentos de DNA no plasmídeo

Os fragmentos gênicos separados por eletroforese foram extraídos do gel de agarose através do uso do kit de purificação *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN®), segundo recomendações do protocolo. Os produtos obtidos foram utilizados para clonar os plasmídeos pGEM T-*Easy* (Promega®). A clonagem foi feita segundo especificações do fabricante do plasmídeo e através da seguinte relação de concentração inserto/vetor:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{kb do inserto}}{\text{kb do vetor}} \times \text{razão inserto: vetor} = \text{ng do inserto}$$

3.3 Manipulação de bactérias

3.3.1 Preparo de bactérias *E. coli* competentes

No preparo das bactérias competentes para a transformação, uma colônia isolada de bactéria (DH5- α ou BL21-Codon Plus (DE3)-RIL) foi inoculada em 5 mL de meio LB (sem antibiótico para DH5- α e com cloranfenicol 50 $\mu\text{g/mL}$ para BL21-Codon Plus (DE3)-RIL) e cultivada sob agitação (200 rpm) a 37 °C por 16 horas. Posteriormente 1 mL da cultura foi diluído em 100 mL de meio LB e incubada nas condições antes citadas até atingir uma densidade ótica (DO_{600}) entre 0,5 e 0,6. As células foram então coletadas por centrifugação a 3.000 x g por 10 minutos a 4 °C e lavadas com 500 mL de água milli-Q estéril gelada. O precipitado foi ressuspensão em 50 mL de CaCl_2 (0,1 M gelado) e incubado em gelo por 1 hora. Em seguida as células foram centrifugadas a 3.000 x g por 15 minutos a 4 °C e o precipitado foi ressuspensão em 2 mL de solução gelada de CaCl_2 0,1 M e 10% de glicerol. As células competentes foram então aliquotadas e estocadas a -70 °C.

3.3.2 Transformação de bactérias competentes

Para transformações, 5 μL de produto de ligação foram incubados (tubos de ensaio estéreis) com 100 μL de células competentes em gelo por 30 minutos e, em seguida as células foram submetidas a choque térmico (42 °C por 2 minutos) e imediatamente incubadas em gelo por mais 10 minutos. Após isso foi adicionado 950 μL de meio SOC (2% triptona; 0,5%

extrato de levedura; 8 mM NaCl; 250 mM KCl; 2 M MgCl₂; 20 mM glicose) para recuperação celular e incubou-se por 60 minutos a 37 °C sob agitação constante (200 rpm). Após a recuperação as bactérias foram plaqueadas em meio LB/1,5% de ágar contendo o respectivo antibiótico e/ou 1 mM de IPTG (Isopropil β-galactopiranosídeo) (Technologies) e 20 µg/mL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-galactopiranosídeo) (usb) para seleção das colônias recombinantes por coloração.

3.3.3 Identificação de clones positivos

Para seleção de clones com os genes de interesse, colônias (brancas, para transformações feitas com pGEM T-*Easy*) foram selecionadas e incubadas em 5mL de meio LB mais o(s) antibiótico(s) de apropriado(s) (100 µg/mL de ampicilina e/ou 50 µg/mL) por 16 horas 37 °C sob constante agitação (200 rpm). E então foi feita extração plasmidial em pequena escala utilizando-se do kit GeneJET™ Plasmid Miniprep (Fermentas®) segundo protocolo do fabricante. Alternativamente 1µg de DNA plasmidial (pGEM T-*Easy* mais gene de interesse) foi digerido com enzima de restrição *EcoRI* (Fermentas®) para liberação de inserto e posterior subclonagem em vetores de expressão em bactérias (pRSET-C) ou em leveduras (pYES2).

3.4 Sequenciamento de DNA

Para verificação da orientação e frame dos genes amplificados e clonados, assim como obtenção da completa sequência da fase aberta de leitura de ambos genes, foram feitas reações de sequenciamento pelo Método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), utilizando os oligonucleotídeos M13 ou T7 direto e reverso, e o kit de sequenciamento de DNA Big Dye Terminator™ 3.1 (Applied Biosystems) segundo instruções do fabricante. As reações foram feitas em termociclador com 1 ciclo de 1 minuto a 96 °C, seguido de 34 ciclos de 96 °C por 45 segundos, 50 °C por 30 segundos e 60 °C por 4 minutos. Ao final das reações, foram adicionados 90 µl de isopropanol 66%, seguido de incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 11.000 x g e o sobrenadante removido. Adicionou-se 150 µl de isopropanol 75% e os tubos foram centrifugados a 11.000 x g por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e os precipitados foram secos em temperatura ambiente. Posteriormente foram submetidos à eletroforese capilar em

seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Os alinhamentos e “contigs” entre as seqüências foram realizados mediante o uso dos programas *BLAST* versão 2.2.19 (NCBI), BioEdit versão 7.0.0, *Seq ManTMII* 5.00 e *MegAlignTM* 5.00 (DNASTAR[®]).

3.5 Análises computacionais para os genes putativos de *LaPRODH* e *LaP5CDH*

Assim que identificadas as fases abertas de leitura de ambos os genes, partiu-se então para as análises computacionais. Primeiramente foi feita a tradução da seqüência de DNA para proteína através do servidor de ferramentas bioinformáticas ExPASy Proteomics Server (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) utilizando a ferramenta “*Translate tool*”. A construção de diagramas com percentual de similaridade e de árvores filogenéticas foram feitas através do programa *MegAlignTM* 5.00 (DNASTAR[®]). A predições por domínios conservados foram feitas através da ferramenta *PROSITE* (www.expasy.org/tools/scanprosite/) (SIGRIST et al., 2002). Também foi utilizado o programa *SignalIP* 3.0 (EMANUELSSON et al., 2007) (EMBL-EBI), para detectar a presença de possíveis peptídeos sinais para direcionamento mitocondrial. A análise da presença de potenciais regiões transmembranares foi feita a partir do programa *TMHMM* 2.0 (SONNHAMMER et al., 1998). Todos os programas foram utilizados com os parâmetros estabelecidos como *padrão*.

3.6 Expressão de proteínas recombinantes

Os genes de ambas enzimas, clonadas em vetor pGEM T-*Easy* (Promega), foram utilizados para subclonar vetores pRSET C (Invitrogen) para expressão em linhagem BL21-CodonPlus [DE3]-RIL. Para tanto, as bactérias contendo os plasmídeos foram crescidas em um pré-inóculo a 37 °C em meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (50 µg/mL) por 16 horas. Após este tempo, os pré-inóculos foram diluídos 1:100 no mesmo meio e incubados a 37 °C sob agitação (200 rpm) até a cultura atingir densidade ótica (DO₆₀₀) de 0,6. Testes preliminares constataram uma melhor expressão da proteína recombinante com indução em 0,5 mM de IPTG por 16 horas a 20 °C. Assim sendo, após esta incubação as culturas foram centrifugadas a 5.000 x g por 15 minutos a 4 °C e os precipitados homogeneizados em um “*mix*” de tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM; NaCl 300 mM, pH 7,4) mais de 50 µL/mL de coquetel de inibidores de proteases (AEBSF, E-64, aprotinina, pepstatina A, leupeptina e cloridrato de bestatina). Para corroborar com a lise foram feitos 4 ciclos de sonicação durante 45 segundos a 40 % de amplitude e 1 minuto entre os pulsos (em

gelo). A seguir foi adicionado 0,1% de Triton X-100 ao lisado e submetido a centrifugação a 20.000 x g por 30 minutos a 4 °C, onde o sobrenadante (fração solúvel) e o precipitado (fração insolúvel) foram aliquotados em tubos separados. Em seguida a fração insolúvel foi ressuspensa em 1 mL do “mix” (acima descrito). A expressão das proteínas de interesse foram verificadas por eletroforese de proteínas (SDS-PAGE 10%). As amostras foram suspensas em tampão SDS-2 X (100 mM Tris-HCl pH: 6,5, SDS 4 %, glicerol 20 %, azul de bromofenol 0,2 %, DiTioTreitol 200 mM). A seguir foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos e aplicadas em gel SDS-PAGE 10%, segundo o método descrito por Laemmli (1970). Os géis foram corados com uma solução de Coomassie Brilliant Blue.

3.7 Anticorpos primários

Os anticorpos primários empregados nesse projeto já se encontravam disponíveis no laboratório. Os mesmos foram produzidos para o desenvolvimento de projetos de investigação das enzimas PRODH e P5CDH em *T. cruzi*, sendo assim discriminados como anti-*Tc*PRODH e anti-*Tc*P5CDH. Antes da utilização dos anticorpos, foram verificados os percentuais de similaridade entre as sequências protéicas ortólogas entre os dois organismos (*T. cruzi* e *L. (L.) amazonensis*), as quais apresentam identidade de 51,9 e 66,6 % para PRODH e P5CDH respectivamente.

3.8 Imunolocalização

5×10^6 células/mL de *L. (L.) amazonensis* foram incubadas por 30 minutos a 28 °C com o marcador mitocondrial MitoTracker[®] Red CMXRos (100 nM) (Molecular Probes). Em seguida as células foram centrifugadas a 2.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente e incubadas sob leve agitação a 25 °C por 30 minutos em 1 mL de meio Warren (sem soro). Ao fim da incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 50 µL de PBS (mantidas protegidas da luz). Posteriormente a suspensão foi aplicada nas lâminas e após 5 minutos foi retirado o excesso. As amostras foram então fixadas com paraformaldeído 2% por incubação à temperatura ambiente por 20 minutos. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS-T (Triton X-100 0,1%), bloqueadas com PBS-BSA 0,1% durante 30 minutos, e lavadas duas vezes com PBS. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (anti-*Tc*PRODH 1:200 ou anti-*Tc*P5CDH 1:400) por 1 hora, lavadas 5 vezes com PBS e incubadas com anticorpo secundário de cabra contra imunoglobulina G de

camundongo conjugado com o corante fluorescente Alexa Fluor [®]488 (Alexa Fluor [®]488 F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) Invitrogen[®]) na diluição de 1:600 por 1 hora a 37 °C. A seguir às lâminas foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Invitrogen[®]) (2 mg/mL), durante um minuto. E, por fim, as lâminas foram montadas com VECTASHIELD (Vector[®]). As preparações foram analisadas em microscópio confocal Carl Zeiss Meta System (modelo LSM 510 NLO) (Thornwood, NY, USA). Foram usados para o mitotracker os comprimentos de excitação de 579 nm e emissão de 599 nm, para o Alexa Fluor os comprimentos de excitação de 488 e de emissão entre 500-550, para a detecção do DAPI 358 nm de excitação e de emissão entre 460. O software Zeiss LSM Image Browser versão 4.2.0.121 para Windows foi utilizado para análises das imagens.

3.9 Western Blotting a partir de extratos protéicos totais de *L. (L.) amazonensis*

Para preparação dos extratos totais uma cultura de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi incubada em meio Warren (mais 10% de SFB) a 25 °C até a fase exponencial, a concentração celular foi ajustada para 5x10⁸ células e a cultura foi lavada 2 vezes com PBS por centrifugada a 3.000 x g por 5 minutos. Após isso a preparação dos estratos seguiram como descrito no item 3.6. Posteriormente as proteínas do extrato foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) e foram transferidas para filtros de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences) como descrito por Towbin et al. (1979) utilizando o sistema Panter[®] semi-dry (Owl). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S (0,1% diluído em ácido acético 10%) e descoradas com água para verificação da eficiência do processo de transferência. As membranas foram bloqueadas por 1 hora em solução TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH: 8,0, NaCl 150 mM e Tween-20 0,05%) contendo 5% de leite desnatado. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário (1:500) sob leve agitação por 1 hora à temperatura ambiente e depois lavadas quatro vezes por 15 minutos com TBS-T. Procedeu-se então as incubações durante 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado a HRP (1:5.000) (horseradish peroxidase-GE Healthcare), seguido de nova lavagem como acima descrito. Após as lavagens, os ensaios foram revelados por quimioluminescência usando o reagente ECL (“ECL[™] Western Blotting Analysis System”, Amersham Biosciences) de acordo com o manual do fabricante. Anticorpos anti-GAPDH foram utilizados como controle positivo das reações.

3.10 Análise funcional dos genes putativos para *LaPROD*H e *LaP5CDH*

3.10.1 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e seus genótipos

As leveduras mutantes empregadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto (IB-USP), correspondentes ao banco de leveduras da “*EUROpean Saccharomyces Cerevisiae ARchive for Functional analysis*” (Euroscarf). São elas: cepa YLR142w ($\Delta put1$) e YHR037w ($\Delta put2$) as quais possuem disrupção dos genes *PROD*H e *P5CDH* ortólogos em *S. cerevisiae* (*put1e put2* respectivamente). A deleções no genoma dos mutantes foram sistematicamente construídas com mutagênese dirigida para cada fase aberta de leitura. Essas disrupções foram feitas pela estratégia de deleção baseado em PCR, em que ocorreu a inserção do módulo KanMX (que confere resistência a geneticina) no interior dos genes. O módulo KanMX: híbrido, possui a sequência do gene *kanr* (codificante para a enzima aminoglicosídeo fosfotransferase) do *transposon Tn903* de *E. coli*. A deleção requer a criação de uma construção, a qual contém o marcador de seleção KanMX flanqueado por sequências homólogas das regiões terminais 5’ e 3’ do gene alvo. Essa construção é conseguida através de 2 “*rounds*” de amplificação por PCR, com distintos pares de oligonucleotídeos. Posteriormente a construção é inserida no interior da ORF por recombinação homóloga figura 5 (BAUDIN et al., 1993; WACH et al., 1994). As cepas de leveduras utilizadas, além das interrupções para os genes do metabolismo da prolina as cepas $\Delta put1$ e $\Delta put2$ possuem deleções para histidina leucina e metionina (genótipo: MATa his3 Δ 1;leu2 Δ 0;met15 Δ 0;ura3 Δ 0). Sabe-se que vários compostos (inclusive alguns aminoácidos) podem servir como fontes de nitrogênio para *Saccharomyces cerevisiae*, podendo interferir com o ensaio de funcionalidade dos genes putativos envolvidos no metabolismo de prolina em *T. cruzi* (GODARD et al., 2007). Assim, as cepas a serem utilizadas foram modificadas pela inserção de genes que diminuíssem a sua dependência de compostos nitrogenados (particularmente outros aminoácidos), de forma de obter cepas que, quando complementadas para os genes deletados, fossem capazes de crescer com prolina como única fonte de nitrogênio. Para tanto, foi recuperada a capacidade destas cepas sintetizarem histidina e leucina, através do uso do plasmídeo YEp351 (HILL et al., 1986) e da construção pYES2-HIS3 a qual foi feita a partir da digestão do plasmídeo pMA210 (MA; PTASHNE, 1987) figura 6. Ambas transformações foram feitas através do método de acetato de lítio como indicado nos materiais e métodos (GIETZ; SCHIESTL, 2007) descrito no item 3.11.

Figura 5 - Esquema de deleção das ORFs de interesse (Δ put1 e Δ put2) pela inserção do módulo kanMX através de recombinação homóloga.
 FONTE: *Saccharomyces* Genome Deletion Project [(2011)].

Figura 6 - Plasmídeos utilizados para transformar as cepas Δ put1 e Δ put2. A) plasmídeo YE351, ao qual confere a capacidade de síntese de leucina. B) esquema de construção do plasmídeo pYES2-HIS3 a partir da digestão do plasmídeo pMA210 e ligação em pYES2.

3.10.2 Manipulação de *Saccharomyces cerevisiae*

Os meios de cultivo para *S. cerevisiae* foram utilizados de acordo com as características prototróficas e auxotróficas de cada cepa. Os meios empregados foram: YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e glicose 2%); meio “*synthetic complet drop-out*” sem adição de uracila (SC^{ura-}), suplementado com os aminoácidos fenilalanina 50 mg/L, triptofano

100 mg/L, ácido glutâmico 100 mg/L, ácido aspártico 100 mg/L, valina 100 mg/L, arginina 20 mg/L, metionina 20 mg/L, tirosina 30 mg/L, isoleucina 30 mg/L, lisina 30 mg/L, treonina 200 mg/L, serina 375 mg/L, a base adenina 50 mg/L, galactose (Gal) 2% e bases nitrogenadas (sem aminoácidos nem sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 0,67% p/v (Amresco®), pH final 5.5; meio “*selective drop-out*” (SD), ao qual contém metionina 20 mg/L (pois os mutantes possuem deleções no gene: *met15*), bases nitrogenadas (como acima citado), Gal 2% e uma única fonte de nitrogênio, prolina 8,7 mM (SD^{PROL}) ou sulfato de amônia 0.67 % p/v (SD^{SA}). Os meios sólidos contêm adicionalmente 1,5% de ágar. Eventualmente foi acrescido 200 mg/L de geneticina aos meios, de acordo com a resistência de cada cepa.

3.10.3 Transformações em *Saccharomyces cerevisiae*

A partir de colônias de *S. cerevisiae* YLR142w (*Δput1*) e YHR037w (*Δput2*) foram feitos inóculos em 5 mL de meio YPD e incubadas durante 16 horas a 30°C sob agitação (200 rpm). Posteriormente $2,5 \times 10^8$ células do inóculo inicial foram contadas e adicionadas em 50 mL de YPD, a cultura foi incubada (nas mesmas condições acima) até atingir uma concentração de 2×10^7 células/mL. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação a $3.000 \times g$ por 5 minutos a 20 °C, lavadas com 25 mL de água estéril e ressuspensas em 1 mL de água estéril, alíquotas de 100 μL foram feitas e utilizadas para cada transformação. Em cada alíquota adicionou-se 5 μg da construção de interesse (pYES-*LaPROD*H, pYES-*LaP5CDH* ou somente pYES), 2 mg/mL de ssDNA (DNA de esperma de salmão) previamente desnaturado a 95 °C, 240 μL (a 50% p/v) de PEG 3350 (polietilenoglicol), 36 μL de acetato de lítio 1M. A mistura foi homogeneizada e submetida a choque térmico a 42 °C por 40 min. Após centrifugação a $13.000 \times g$ por 30 segundos, as células foram suspensas em 100 μL de água estéril e plaqueadas em meio sólido seletivo (SD^{ura-}) suplementado com os aminoácidos adequados de acordo com as genótipo para seleção por auxotrofia, e galactose 2% (indutor do promotor plasmidial). As placas foram incubadas a 30 °C por 48 a 72 horas. Como controle negativo do ensaio, a levedura foi transformada nas mesmas condições anteriores exceto pela ausência de DNA plasmidial.

3.11 Manipulação de RNA

3.11.1 Extração de RNA

As extrações de RNA foram feitas em *L. (L.) amazonensis*, assim como as diferentes linhagens de *S. cerevisiae* da seguinte forma: as células foram cultivadas até a fase exponencial de crescimento, foram lavadas duas vezes por centrifugação com PBS. Posteriormente os precipitados foram macerados em almofariz (previamente esterilizados), suspensos em 1 mL do reagente TRIzol® (Invitrogen) e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram acrescentados 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de TRIzol e as misturas foram homogeneizadas em vórtex por 15 segundos. Seguido de incubação por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugação 13.000 x g a 4 °C por 10 minutos. As fases aquosas (contendo o RNA) foram recuperadas e incubadas por uma hora a -70°C com 500 µL de isopropanol. Após esse período, as amostras foram centrifugadas com 13.000 x g a 4 °C por 20 minutos, e os precipitados lavados com 500 µL de etanol 75% preparado em água tratada com DEPC (0,1% de dietilpirocarbonato, H₂O-DEPC). Os RNAs foram solubilizados em 20 µL de água-DEPC e armazenados a -80 °C. As quantificações de RNA foram feitas por espectrofotometria como descrito para DNA no item 3.2.2. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão MOPS 1X (MOPS 20 mM, acetato de sódio 5 mM; EDTA 0,1 mM e formaldeído 3,5%, pH 7,0) (Figura 7).

Figura 7 - Qualidade dos RNAs ribossomais obtidos a partir de *L. (L.) amazonensis* e diferentes linhagens de *S. cerevisiae*. (A) A abreviação *L.a.* refere-se a *L. (L.) amazonensis*. (B) RNAs ribossomais das linhagens de levedura *S. cerevisiae* produzidas neste projeto.

3.11.2 Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase

As sínteses de cDNAs foram realizadas por transcrição reversa utilizando a enzima transcriptase reversa (SuperScript™ II Reverse Transcriptase – Invitrogen). Para tanto 3 µg de

RNA foi previamente tratado com DNase I, posteriormente foram adicionados ao RNA, 50 ng de “*random primers*”, 250 ng de oligo-dT, 0,5 mM de dNTP (Invitrogen) e água tratada com DEPC na quantidade suficiente para 12 µL. A mistura foi aquecida por 5 minutos a 65 °C e em seguida adicionados 4 µL de tampão (250 mM Tris-HCl pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂) para transcriptase reversa, 10 mM DTT e 40 U de inibidor de RNase (RNaseOUT™). Posteriormente a mistura foi aquecida por 2 minutos a 42 °C seguido da adição de 200 U da enzima transcriptase reversa. Por fim a mistura foi aquecida por 10 minutos a 25 °C, 50 minutos a 42 °C e 15 minutos a 70 °C (em termociclador).

3.12 PCR com molde de cDNA e eletroforese em gel de agarose

A partir dos cDNAs obtidos, foram feitas reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos que flanqueiam os genes aqui estudados. Para a reação utilizou-se os iniciadores nas concentrações de 0,2 µM, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 2 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas®), 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl (Invitrogen), 2 µL das reações de transcrição reversa e água *nuclease free* (Amresco) na quantidade suficiente para 50 µl. Em seguida, para visualização dos produtos amplificados, as amostras das reações de PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, como descrito no item 3.2.5.

4 RESULTADOS

4.1 Amplificação e clonagem das ORFs dos genes putativos para *LaPROD*H e *LaP5CDH*

Para a amplificação das ORFs dos genes em estudo foram desenhados *primers* (quadro 1) baseados no alinhamento de várias sequências disponíveis de diferentes espécies de *Leishmania* (*L.*) *major*; *L.* (*V.*) *braziliensis*; *L.* (*L.*) *infantum* e *L.* (*L.*) *mexicana*). Uma vez desenhados os primers, foram feitas as reações de PCR utilizando-se o DNA genômico de *L.* (*L.*) *amazonensis* como molde, e oligonucleotídeos que flanqueiam os genes como iniciadores. Os produtos das reações de PCR foram clonados em vetor pGEM-T-easy (Promega). Em seguida foram feitas transformações em bactérias quimiocompetentes (DH5 α) utilizando os produtos obtidos das ligações como anteriormente citado. Após o cultivo das colônias transformadas e a recuperação plasmidial, foram feitas reações de digestão com enzimas de restrição *EcoRI* para liberação de inserto e vetor. Tanto os produtos amplificados por reações de PCR quanto os produtos das digestões puderam ser visualizados quando submetidos a eletroforese em gel de agarose figura 8. A análise desses géis possibilitou a confirmação da clonagem dos genes de interesse, inicialmente utilizando-se como critério os tamanhos dos insertos (próximos aos esperados para ambas as ORFs, figura 6 A e C), e posteriormente por sequenciamento de ambos os insertos. Foram conferidos os tamanhos preditos de 1686 e 1683 pb para *LaPROD*H e *LaP5CDH* respectivamente. Também pôde ser visualizada as bandas referentes ao vetor pGEM-T-easy com 3015 pb figura 6 B e D.

Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de amplificação das ORFs de *LaPROD*H e *LaP5CDH* e de digestão das construções em vetores pGEM-T- easy. ORFs amplificadas de A) *LaPROD*H e C) *LaP5CDH*. Digestões com *EcoRI* das construções feitas em vetores pGEM-T-easy com os produtos de B) *LaPROD*H e D) *LaP5CDH* respectivamente. Os genes *LaPROD*H e *LaP5CDH* possuem 1686 e 1683 pb respectivamente, enquanto o vetor pGEM-T-easy possui 3015 pb.

4.2 Sequência e análises computacionais das ORFs putativas para *LaPROD*H e *LaP5CDH*

4.2.1 Predição computacional de similaridade com genes ortólogos

Para confirmar a identidade desses genes, com o intuito de confirmar as sequências completas de ambos os insertos, foram feitas reações de sequenciamento utilizando as combinações de oligonucleotídeos desenhados (quadro 1). As várias sequências obtidas dessas reações foram alinhadas, e foi obtida uma sequência completa para cada gene putativo. Essas sequências obtidas foram traduzidas pela ferramenta “*Translate tool*” (ExPASy Proteomics Server) e utilizadas para predição de percentual de similaridade. Através do programa “*MegAlign™*” 5.00 (DNASTAR®) foram construídos diagramas e árvores filogenéticas por alinhamento com sequências ortólogas de várias espécies, dentre elas as dos mamíferos *Homo sapiens* e *Mus musculus*, do anfíbio *Xenopus tropicalis*, dos insetos *Apis mellifera* e *Drosophila melanogaster*, do nematóide *Caenorhabditis elegans*, das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pombe*, da bactéria *Escherichia coli*, dos tripanossomatídeos *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* e de 5 espécies do gênero *Leishmania spp.* No cladograma podemos visualizar porcentagens de similaridade entre *LaPROD*H e as demais sequências das espécies de *Leishmania spp.*, com valores que variam de 91,1 a 98,8% e quando comparado com as sequências dos tripanossomas com valores aproximados a 52% (figura 9 A). Para *LaP5CDH* vemos valores de similaridade de 90,4 a 99,4% com as demais espécies de *Leishmania* e 66,6 e 67,3% com *T.cruzi* e *T. brucei* respectivamente (figura 10 A). Para ambos os genes as árvores filogenéticas apresentaram topologias nas quais houve segregação entre as espécies do gênero *Leishmania*, especialmente *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* que são classificadas isoladas no mesmo complexo (*L. mexicana*) (LAINSON; SHAW, 1987; LAINSON, 2010), (figuras 9 B e 10 B).

Figura 9 - Diagrama com percentual de similaridade e árvore filogenética da PRODh putativa de *L. (L.) amazonensis* e as proteínas ortólogas em diversos organismos. A) diagrama com percentual de identidade. B) árvore filogenética

Figura 10 - Diagrama com percentual de similaridade e árvore filogenética da P5CDH putativa de *L. (L.) amazonensis* e as proteínas ortólogas em diversos organismos. A) diagrama com percentual de identidade. B) árvore filogenética.

4.2.2 Predição da presença de domínios conservados

A detecção de sequências características das enzimas de interesse nos genes clonados é de grande relevância para sustentar as funções inferidas por semelhança com ortólogos de outras espécies. Nesse sentido, foram feitas predições da presença de domínios conservados com as sequências protéicas através da ferramenta *PROSITE* (ExPASy Proteomics Server) (SIGRIST et al., 2002). Essa predição permite identificar a presença de possíveis domínios conservados que são caracterizados como assinaturas para famílias de proteínas. Assim essa informação pode corroborar com a correta identificação das enzimas em estudo. Foram identificadas duas regiões conservada, característica da superfamília das prolina desidrogenases nas posições 10–210 e 280–560. Além disso, a análise revelou a presença de um domínio *EF-hand* na posição de 265–300, o qual também foi detectado em outras prolina desidrogenases como por exemplo a de *T. cruzi* (PAES et al., manuscrito em preparação) (figura 11 A). Os domínios *EF-hand* são estruturas da proteína com atividade de ligação ao Ca^{2+} , e menos frequente, ao Mg^{2+} . Esses sítios foram primeiramente identificados em 1973 por Kretsinger e Nockolds, e desde essa data até o momento cerca de 66 subfamílias de proteínas estão catalogadas como pertencentes à família de proteínas *EF-hand* (KAWASAKI et al., 1998; RAVASI et al., 2004). Uma das características desses domínios é o fato de que são capazes de induzir mudanças conformacionais globais na proteína em função da sua ligação ao metal: em particular, os sítios canônicos que ligam Ca^{2+} induzem mudanças conformacionais que geralmente conferem à proteína um aumento de estabilidade, e portanto, da funcionalidade (BUCHANAN et al., 1986; YAP et al., 1999; YANG et al., 2002).

A análise feita na sequência de *LaP5CDH* a partir do uso da mesma ferramenta *PROSITE* constatou a ocorrência de dois resíduos de aminoácidos conservados, que podem estar envolvidos na atividade catalítica dessa enzima: i resíduo de ácido glutâmico na posição de 301–308; ii resíduo de cisteína na posição 329–340 (figura 11 B e C). Esses resíduos são uma assinatura para a superfamília das aldeído desidrogenases (ALDH), a qual pertence a enzima *P5CDH* (PEROZICH et al., 1999). Enzimas ativas da superfamília ALDH (NAD(P)^+ dependente) catalisam a oxidação de uma ampla faixa de aldeídos que podem ser gerados a partir de diversas fontes exógenos e endógenos (VASILIOU et al., 1999). Alguns efeitos dos aldeídos são nocivos incluindo citotóxicos, mutagênese e carcinogênese. As enzimas ALDH representam um importante papel nos mecanismos de detoxificação de aldeídos pela oxidação até seus correspondentes ácidos carboxílicos (LINDAHL, 1992; VASILIOU et al., 2000; BARTELS, 2001).

Figura 11 - Domínios conservados nas sequências de PROD e P5CDH putativas de *L. (L.) amazonensis*. A) Domínio *EF-hand* de ligação ao C^{2+} na sequência de PROD. B) Sítios ativos para glutamato e cisteína na sequência de P5CDH.

4.2.3 Predição de peptídeo sinal, domínios transmembranares e depósito das sequências

Para prever a possível presença de peptídeo sinal (PS) para direcionamento mitocondrial, localização subcelular canônica para estas enzimas, (PHANG, 1985; BRANDRISS; KRZYWICKI, 1986; KIYOSUE et al., 1996; DEUSCHLE et al., 2001). foi utilizado o programa *SignalP* 3.0 (EMBL-EBI). Nessa análise computacional foi verificada a probabilidade de 91,4% de ocorrência de PS para direcionamento mitocondrial na sequência de *LaPROD*H (figura 12). Porém o mesmo programa constatou apenas 1% de probabilidade para ocorrência de PS na sequência de *LaP5CDH* (figura 13). Esse programa estima a presença e localização de sítio de clivagem para PS na sequência de aminoácidos. Esse é um peptídeo N-terminal de 15-30 aminoácidos, ao qual é clivado durante a translocação da proteína através da membrana. O PS não é identificado por uma sequência consenso, mas três regiões compositivas: uma região N-terminal (região-n) a qual amiúde contém resíduos positivamente carregados, uma região hidrofóbica (região-h) de ao menos seis resíduos e uma região C-terminal (região-c) de resíduos polares não carregados com certo grau de conservação nas regiões -3 e -1 em relação ao sítio de clivagem (EMANUELSSON et al., 2007). Adicionalmente foi feita a predição por PS a partir do programa Phobius (KÄLL et al., 2004), ao qual confirmou a presença de PS para sequência de *LaPROD*H. E constatou a presença de PS na sequência de *LaP5CDH*, localizado na região de 1-20 (região-n 1-4, região-

h 5-13 e região-c 14-20) figura 17 moldura em azul. Ainda, o programa Phobius destaca a região de 21-560 como não citoplasmática.

Figura 12 - Predição por peptídeo sinal na sequência *LaPRODH*. A análise demonstrou uma probabilidade de 91,4% de ocorrência de peptídeo sinal.

Figura 13 - Predição por peptídeo sinal na sequência *LaP5CDH*. A análise demonstrou de 1% de probabilidade de ocorrência de peptídeo sinal.

Também foram feitas predições pela presença de potenciais hélices transmembranares em ambas as sequências, mediante o uso do programa *TMHMM 2.0* (SONNHAMMER et al., 1998). Com essas análises foram detectadas três regiões de provável ocorrência transmembranar na sequência de *LaPRODH*: região de 7-29 (23 aminoácidos), região de 44-66 (23 aminoácidos) e 87-109 (23 aminoácidos) (figura 14). O software utilizado apontou para a ausência de hélices transmembranares em *LaP5CDH* (figura 15). Um segundo programa (TMPRED) (HOFMANN; STOFFEL, 1993) foi utilizado, ao qual confirmou a

presença de três hélices para *La*PROD. Não obstante, esse mesmo programa predisse duas regiões de prováveis hélices transmembranares na sequência de *La*P5CDH: na região de 190-215 (26 aminoácidos) e 198-220 (23 aminoácidos) (gráfico não mostrado).

Após a análise dos dados computacionais as sequências de PROD e P5CDH de *L.* (*L.*) amazonensis foram submetidas ao depósito no banco de dados GeneBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>) através do uso da ferramenta *Sequin* (versão 9.00, 2008). As sequências de *La*PROD e *La*P5CDH possuem os números de acesso HQ651733 e HQ404366 respectivamente.

Figura 14 - Predição por hélices transmembranares na sequência *La*PROD. Três regiões transmembranares estão marcadas com molduras vermelhas.

Figura 15 - Predição por hélices transmembranares na sequência *LaP5CDH*. A predição não detectou a ocorrência de hélices transmembranares.

4.2.4 Alinhamento e localização de domínio conservado e peptídeo sinal nas sequências *LaPRODH* e *LaP5CDH*

Com o intuito de se visualizar a exata localização das regiões dos domínios conservados e PS, foram feitos alinhamentos com as sequências de interesse de ambos os genes e as proteínas ortólogas em *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *L. tarentole* e *L. (V.) braziliensis*. Como pode ser observado na figura 16 a região de PS nas sequências de *LaPRODH* e ortólogas está emoldurada em azul e o domínio *EF-hand* em vermelho. Em ambas regiões existe uma alta conservação entre os aminoácidos. A região de PS nas sequências *LaP5CDH* e ortólogas, a qual foi detectada pelo uso do programa Phobios, está destacada com moldura em azul (figura 17). Pode-se observar que esse sítio se encontra conservado em cinco das espécies analisadas, exceto para sequência de *L. (L.) mexicana*. Os domínios conservados preditos para essas mesmas sequências estão emoldurados em vermelho (resíduo de ácido glutâmico) e em verde (resíduo de cisteína), esses domínios parecem estar conservados entre todas as espécies de *Leishmania* (figura 17).

Figura 16 - Regiões de peptídeo sinal e domínio EF-hand em *LaPROD* e ortólogos. A região em que se encontra o peptídeo sinal está emoldurada em azul, sequência MRRLPLRPAAVAFAGSARHSSMA. A região do domínio EF-hand está emoldurada em vermelho, sequência LSDAQLKEITEVLDPRKTGKVNYFEYKEMLTnALiA.

Figura 17 - Peptídeo sinal e resíduos conservados de glutamato e cisteína em *LaP5CDH* e ortólogos. Peptídeo sinal emoldurado em azul. Resíduos envolvidos em atividade catalítica da enzima: resíduo de glutamato região 301-308 de sequência GETGGKDF (emoldurada em vermelho) e resíduo conservado de cisteína região 329-340 de sequência FEFQGGKCSACS (emoldurada em verde).

4.3 Expressão de proteínas recombinantes

Com o intuito de se fazer uma posterior caracterização bioquímica da proteína recombinante, após a clonagem em pGEM-T-Easy os genes de interesse foram subclonados em vetores de expressão protéica em bactérias pRSET-C (INVITROGEN). As construções obtidas foram utilizadas para transformar bactérias competentes da cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, as quais foram posteriormente incubadas. A expressão das proteínas recombinantes foi induzida com IPTG (0,5 mM), e em seguida as células foram lisadas e precipitadas. Das amostras precipitadas foram separadas as fases protéicas solúveis e insolúveis. Posteriormente, essas amostras foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). Como pode ser observado (figura 18) obteve-se para ambas as proteínas (*LaPRODH* e *LaP5CDH*) uma banda majoritária correspondente às massas moleculares parentais previstas para as proteínas fusionadas a caudas de 6xHis. Apesar de ocorrerem bandas que evidenciam um nível basal de expressão nas amostras não induzidas,

pode ser vista uma expressão mais acentuada nas frações induzidas das proteínas. Também, segundo a observação dos géis, as fases insolúveis demonstraram conter uma maior concentração das proteínas recombinantes que as amostras solúveis, o que estaria indicando que essas proteínas se localizam preferencialmente em corpos de inclusão.

Figura 18 - Proteínas recombinantes *LaPRODH* e *LaP5CDH* resolvidas em gel de poliacrilamida. Amostras induzidas ou não com 0,5 mM de IPTG. Gel com proteínas *LaPRODH* (A) e *LaP5CDH* (B) recombinantes. Fases insolúveis números 1 e 3, fases solúveis números 2 e 4. Ambas proteínas estão assinaladas com setas vermelhas.

4.4 Ensaios de imunolocalização

O compartimento subcelular onde uma enzima se encontra, é da maior relevância para interpretar seu papel na biologia dessa célula. Em particular, é relevante saber se uma enzima está livre no citoplasma ou em algum compartimento onde o substrato é estocado ou sintetizado. Canonicamente, as enzimas ortólogas daquelas que estão sendo abordadas nesse trabalho são mitocondriais (PHANG, 1985; BRANDRISS; KRZYWICKI, 1986; KIYOSUE et al., 1996; DEUSCHLE et al., 2001). Para verificar a região de localização celular das proteínas em estudo foram preparadas culturas de *L. (L.) amazonensis* e posteriormente as mesmas foram utilizadas em ensaios de imunolocalização. As culturas foram incubadas com 100 nM do marcador mitocondrial MitoTracker[®] Red CMXRos (Molecular Probes). Esse corante é derivado de clorometil-X-rosamina que fluoresce quando oxidado dentro das células, sendo acumulado pelas mitocôndrias funcionais devido ao seu potencial de membrana. Posteriormente o grupo clorometil reage com grupos tióis presentes em peptídeos e proteínas formando um conjugado que pode ser retido após fixação por compostos baseados

em aldeído (DE LA MONTE; WANDS, 2001). Em seguida as células foram incubadas com anticorpos policlonais produzidos contra as proteínas ortólogas em *T. cruzi* (anti-*Tc*PROD_H ou anti-*Tc*P5CD_H). Finalmente, as células foram reveladas mediante incubação com anticorpos anti-IgG de camundongo (Alexa Fluor ®488 F(ab')₂), item 3.8. Ao serem visualizadas por microscopia confocal as amostras revelaram que ambas as proteínas possuem localização mitocondrial, já que colocalizaram com o marcador mitocondrial (MitoTracker®) (figura 19). Ambas as amostras também foram incubadas com o marcador DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), que se associa preferencialmente à dupla fita de DNA, em sequências com clusters de AT no menor sulco da dupla hélice (KUBISTA; AAKERMAN; NORDEN, 1987). Essa afinidade resulta em forte ligação ao DNA do cinetoplasto, por esse possuir regiões ricas em AT (SOEIRO et al., 2008; WILSON et al., 2008, PAINE et al., 2010). Dessa forma a marcação por DAPI também pode ser tomada como referência para localização mitocondrial, onde podemos ver colocalização do fluoróforo (Alexa Fluor) com DAPI (figura 19).

Figura 19 - Ensaio de imunolocalização em *L. (L.) amazonensis* com anticorpos anti-TcPRODH e anti-TcP5CDH. A) reação do anticorpo anti-TcPRODH contra LaPRODH. B) reação do anticorpo anti-TcP5CDH contra LaP5CDH. As células estão marcadas com 2 mg/mL DAPI (Invitrogen®), em azul, 100 nM de MitoTracker® Red CMXRos (Molecular Probes), em vermelho e os anticorpos policlonais marcados por Alexa Fluor em verde.

4.5 Western blotting a partir de extratos protéicos totais de *L. (L.) amazonensis*

Extratos protéicos totais de *L. (L.) amazonensis* foram preparados e utilizados para reações de *western blotting*. Assim como nas reações de imunofluorescência, para esses ensaios foram utilizados os anticorpos preparados contra as proteínas PRODH ou P5CDH de *T. cruzi*. As proteínas totais foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences), incubadas com os anticorpos e reveladas por quimioluminescência usando o reagente ECL (“ECL™ Western Blotting Analysis System”, Amersham Biosciences). Os soros pré imunes (PI) dos camundongos foram utilizados como controles negativos. Anticorpos anti-GAPDH foram utilizados como controles do ensaio. As revelações demonstraram a presença de reações dos anticorpos contra as proteínas de *L. (L.) amazonensis*. Apesar de poderem ser observadas marcações inespecíficas em ambas

membranas, as marcas mais fortes pertencem às proteínas de interesse *La*PROD_H (63,5 KDa) e *La*P5CD_H (61,8 KDa) (setas vermelhas, figura 20). Pode ser visto que nas membranas com soro PI não houve sinal dos anticorpos contra as proteínas *La*PROD_H e *La*P5CD_H. Os controles com anti-GAPDH são notados pelos sinais abaixo das proteínas de interesse, com aproximadamente 39 Kda (setas azuis, figura 20).

Figura 20 - Western blotting com anticorpos anti-*Tc*PROD_H e anti-*Tc*P5CD_H. A) reação do anticorpo anti-*Tc*PROD_H contra *La*PROD_H. B) reação do anticorpo anti-*Tc*P5CD_H contra *La*P5CD_H. I imune e PI pré imune. As proteínas de interesse e GAPDH estão indicados por setas vermelhas e azuis respectivamente.

4.6 Verificação da funcionalidade de *La*PROD_H e *La*P5CD_H por complementação de cepas nocaute de *S. cerevisiae*

Para verificar se os genes PROD_H e P5CD_H de *L. (L.) amazonensis* codificam proteínas funcionais foi avaliada a capacidade desses em complementar funcionalmente leveduras com mutações nos genes ortólogos (Put1 ou Put2) em *S. cerevisiae*. Como já mencionado as cepas utilizadas nesse projeto foram YLR142w ($\Delta put1$) e YHR037w ($\Delta put2$). Os genes clonados em pGEM-T-easy foram subclonados em vetores de expressão em leveduras pYES2. Com as construções obtidas pYES-*La*PROD_H e pYES-*La*P5CD_H foram feitas transformações em leveduras $\Delta put1$ e $\Delta put2$ respectivamente, item 3.10.3. Somadas essas transformações com as descritas no item 3.10.1 foram obtidas cepas com genótipos que foram avaliados por seleções fenotípicas. As seleções fenotípicas das cepas $\Delta put1$ e $\Delta put2$ foram realizadas considerando que as mesmas não podem crescer em meio com prolina como

única fonte de nitrogênio (BRANDRISS; MAGASANIK, 1979). Também pelo fato de possuírem auxotrofia para uracila, a qual é complementada pelo gene URA3 contido no vetor pYES2. Foram também utilizados controles como: Sc288c (selvagem), BY4741 (cepa referência, MATa, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, met15 Δ 0 e ura3 Δ 0), Δ put1 e Δ put2. Adicionalmente foram feitas transformações em Δ put1, Δ put2 e BY4741 com o plasmídeo sem o inserto, como controles. As seleções fenotípicas demonstraram que ambos os genes foram capazes de recuperar a capacidade das cepas mutantes em catabolizar a prolina como única fonte de nitrogênio. Nas placas com (NH₄)₂SO₄ como única fonte de nitrogênio (SD^{SA}) os clones 1 e 2 (Δ put1-*La*PROD_H ou Δ put2-*La*P5CD_H) crescem, assim como os controles de ambos os mutantes Δ putXpYES (Δ put1pYES ou Δ put2pYES) pois esses podem metabolizar (NH₄)₂SO₄. Porém nas placas com prolina como única fonte de nitrogênio somente os clones 1 e 2 (de ambos os genes), os controles S288C e BY4741pYES crescem. Em ambas as placas os controles Δ put1 e Δ put2 não cresceram pois são auxotróficos para prolina e uracila (figura 21).

Figura 21 - Complementação de leveduras mutantes $\Delta put1$ e $\Delta put2$ com os genes *LaPROD*H e *LaP5CDH* respectivamente. A) complementação de $\Delta put1$ com o gene *LaPROD*H. B) complementação de $\Delta put2$ com o gene *LaP5CDH*. Placas com sulfato de amônia (SD^{SA}) ou prolina (SD^{PROL}) como única fonte de nitrogênio. Em nenhuma placa foi adicionada uracila. As cepas submetidas ao crescimento são S288C (selvagem), $\Delta put1$ ou $\Delta put2$ (mutantes), $\Delta putXpYES$ (mutantes complementados para síntese de uracila), BY4741pYES (cepa de referência complementada para síntese de uracila) e clones 1 e 2 de ambos os genes ($\Delta put1$ -*LaPROD*H ou $\Delta put2$ -*LaP5CDH*).

4.7 Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase

A presença dos produtos de transcrição dos genes *LaPROD*H e *LaP5CDH* nas cepas mutantes complementadas $\Delta put1$ e $\Delta put2$ respectivamente, foram confirmadas por PCR utilizando cDNA como molde para as reações. As cepas $\Delta put1pYES$, $\Delta put2pYES$, BY4741pYES, $\Delta put1$ -*LaPROD*H, $\Delta put2$ -*LaP5CDH* e células de *L.(L.) amazonensis* foram submetidas ao método de extração de RNA por Trizol. A integridade dos RNAs foi verificada como visto na figura 7 e, posteriormente, foram feitas reações de transcrição reversa para síntese de cDNA. A seguir os cDNAs obtidos serviram como molde para reações de PCR em que foram utilizados os pares de iniciadores específicos que flanqueiam *LaPROD*H ou *LaP5CDH*. Como controles foram feitas reações a partir dos cDNAs dos mutantes $\Delta put1$,

Δ put2 e BY4741 com pYES2 sem inserto, assim como DNA de *L. (L.) amazonensis*. Os produtos das reações de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (1%). Assim, nas amostras de cDNA de *L. (L.) amazonensis* e das leveduras mutantes complementadas com *LaPROD*H ou *LaP5CDH* foram verificadas a presença de produtos amplificados com os tamanhos esperados (1686pb para *LaPROD*H e 1683pb para *LaP5CDH*). Das amostras de cDNA dos controles negativos (Δ put1pYES, Δ put2pYES e BY4741pYES) não houve amplificação dos genes (figura 22).

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de PCR a partir de moldes de cDNA de leveduras mutantes complementadas ou não e *L. (L.) amazonensis*. A) Produto de PCR com iniciadores que flanqueiam *LaPROD*H ou B) *LaP5CDH*. Produtos de PCR a partir de molde de cDNA: 2 e 7 *L. (L.) amazonensis*, 3 e 8 Δ put1*LaPROD*H e Δ put2*LaP5CDH* respectivamente, 4 e 9 Δ put1pYES e Δ put2pYES respectivamente, 5 e 10 BY4741pYES. Os poços 1 e 6 representam os marcadores padrão de bandas de DNA.

5 DISCUSSÃO

5.1 Presença das ORFs dos genes putativos para PRODH e P5CDH no genoma de *L. (L.) amazonensis*

A via prolina glutamato é bem conhecida na literatura, e os genes que codificam para as duas enzimas que participam dela tem sido sequenciados e caracterizados em diversos organismos. A existência dos genes envolvidos nessa via metabólica, no genoma de diversas espécies, pode indicar um papel funcional dessa via, onde essas células podem utilizar a L-prolina como fonte de energia e, através do seu processamento no ciclo de Krebs, como esqueletos carbonados para a obtenção de diversos metabólitos. O primeiro passo da via, no qual a L-prolina é oxidada a P5C pela PRODH, resulta na doação de um par de elétrons para o aceptor flavina adenina dinucleotídeo (FAD), rendendo FADH₂. Tem se mostrado que o FADH₂ gerado nesta reação está envolvido na produção de ATP (ADAMS; FRANK, 1980; HAGEDORN; PHANG, 1983; PANDHARE et al., 2009). Mais recentemente, no nosso laboratório, tem sido mostrado que o FADH₂ produto do primeiro passo da oxidação de prolina via PRODH por sua vez é capaz de reduzir citocromo c e de transferir esses elétrons à cadeia respiratória em *T. cruzi* em forma análoga ao complexo II. Por sua vez, o P5C pode ser convertido a glutamato (pela P5CDH). O glutamato pode ser convertido em α -cetoglutarato por ação de uma glutamato desidrogenase ou de transaminases, sendo este um intermediário do ciclo de Krebs (PHANG, 1985). Esse aminoácido também é fonte de carbono, servindo como matéria prima para síntese de outras moléculas.

Como já citado, em tripanossomatídeos, L-prolina está relacionada também a outras funções como diferenciação e tolerância ao estresse osmótico (CONTRERAS et al., 1985; TONELLI et al., 2004; ROHLOFF; DOCAMPO, 2008). Em *T. cruzi* a via prolina-glutamato foi caracterizada pelo nosso grupo, demonstrando-se também que os níveis de prolina livre intracelular estão correlacionados com a resistência ao estresse oxidativo (MAGDALENO et al., 2009; PAES et al., 2011, em fase de elaboração¹). Em *Leishmania spp.* pouco se sabe sobre a funcionalidade dessa via, apesar dos genes envolvidos já terem sido identificados em algumas espécies desse gênero (OPPERDOES; COOMBS, 2007).

¹ PAES, L. S. et al. São Paulo, 2011.

Pelo fato de *L. (L.) amazonensis* ainda não ter seu genoma sequenciado, na etapa inicial desse projeto procurou-se constatar a presença dos genes PRODH e P5CDH nessa espécie. A partir do desenho de oligonucleotídeos que flanqueiam as ORFs dos genes PRODH e P5CDH de *L. (L.) amazonensis*, pudemos amplificar os genes putativos. Inicialmente foi verificado que essas ORFs apresentaram tamanhos (em pares de bases) compatíveis com o que era esperado, tendo como referência o tamanho dos genes PRODH e P5CDH ortólogos em *L. (L.) major*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) mexicana*. Uma vez desenhados os iniciadores e obtidos os produtos de PCR, foram utilizados iniciadores capazes de hibridar em diferentes pontos internos das ORFs, com os quais foi possível sequenciar, por completo, ambos genes putativos. A obtenção das sequências exatas dos genes foi necessária para submetê-las às análises *in silico*, confirmando assim suas identidades. As sequências obtidas neste trabalho foram depositadas no banco de dados GeneBank do NCBI (linke, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>) e receberam os números de acesso HQ651733 (linke, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/HQ651733>) para *LaPRODH* e HQ404366 (linke, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/HQ404366>) para *LaP5CDH*.

5.2 Confirmação das identidades dos genes e sustento da hipótese das suas possíveis funções por verificação da presença de domínios conservados

Como citado, antes de ser iniciado o trabalho experimental, as ORFs dos dois genes foram analisadas *in silico*. Para tanto foram analisados os percentuais de similaridade com genes ortólogos e verificada a presença de domínios conservados que representam características inerentes a cada grupo de proteínas. No caso da PRODH foi identificada uma região que é característica nessas proteínas, enquanto que, no caso da P5CDH foi identificada uma região pertencente à família das aldeído desidrogenases, grupo que inclui às P5CDHs. Por outro lado, foi observado na PRODH a presença de um motivo *EF-hand*. Os motivos *EF-hand* são módulos relativamente curtos, que conferem às proteínas que os possuem a capacidade de ligar Ca^{++} com alta afinidade. Geralmente, a ligação de Ca^{++} a motivos *EF-hand* está associada à mudanças conformacionais globais da proteína, e portanto com a atividade, como foi demonstrado em trabalhos já clássicos com a calmodulina (LEVINE et al., 1983), ou com a calflagina de *T. cruzi* (PINTO et al., 2003). O clássico motivo *EF-hand* tem uma sequência curta (cerca de 30 aminoácidos), apresentando uma topologia com duas α -hélices (E e F) que flanqueiam uma região em alça que é a responsável pela ligação ao Ca^{2+} . A região em alça exibe uma configuração usualmente de doze aminoácidos em que o íon é

coordenado para ligar nas posições 1, 3, 5, 7, 9 e 12 correspondentes a X, Y, Z, -X, -Y e -Z (KAWASAKI; KRETSINGER, 1994). Esses resíduos formam a alça que pode acomodar tanto o Ca^{2+} com sete ligações em uma coordenação pentagonal bipiramidal ou Mg^{2+} com seis ligações, assumindo uma forma geométrica molecular octaédrica (LEWIT-BENTLEY; RÉTY, 2000). Como mencionado, foi observada a presença desse domínio na PRODH de *T. cruzi*, e a sua funcionalidade, em termos da sua capacidade para ligar Ca^{++} , quanto na modulação de sua atividade através da ligação de este íon, foi experimentalmente demonstrada. A presença desse domínio na PRODH de *L. (L.) amazonensis*, junto com o fato de que a proteína ortóloga em *T. cruzi* tenha a sua atividade modulada por Ca^{++} sustentam a proposta de que esse também seria o caso para a PRODH analisada ao longo desta dissertação. Ainda apreciando as análises *in silico*, quando averiguada a sequência de LaP5CDH obteve-se a predição da presença de resíduos de ácido glutâmico e cisteína, que como citado são conservados na família das ALDH e representam importante papel estrutural e funcional nessas proteínas (JÖRNVALL, 1977; PEROZICH et al., 1999). Enzimas ativas da superfamília ALDH (NAD(P)^+ dependente) catalisam a oxidação de uma ampla faixa de aldeídos alifáticos e aromáticos, que podem ser gerados a partir de fontes exógenas e endógenas (VASILIOU et al., 1999). A superfamília ALDH consiste em famílias de genes homólogos, que são conjuntos de genes com relação ortóloga e paróloga (TATUSOV et al., 1997). A P5CDH de *H. sapiens* pertence a família 4, subfamília A (ALDH4A1). Alguns efeitos dos aldeídos são nocivos incluindo os citotóxicos, mutagênese e carcinogênese. As enzimas ALDH representam um importante papel nos mecanismos de detoxificação de aldeídos pela oxidação até seus correspondentes ácidos carboxílicos (LINDAHL, 1992; VASILIOU et al., 2000; BARTELS, 2001).

Após a constatação dos dados anteriormente citados, observou-se que as sequências protéicas aqui analisadas tem as características de prolina desidrogenase e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase.

5.3 Localização subcelular

O compartimento subcelular onde uma enzima se encontra, é da maior relevância para interpretar seu papel na biologia dessa célula. Em particular, é relevante saber se uma enzima está livre no citoplasma ou em algum compartimento onde o substrato é estocado ou é sintetizado. Canonicamente, as enzimas ortólogas daquelas que estão sendo abordadas nesse trabalho são mitocondriais (PHANG, 1985; BRANDRISS; KRZYWICKI, 1986; KIYOSUE

et al., 1996; DEUSCHLE et al., 2001). Com exceção de uma pequena parcela de proteínas que são sintetizadas nas mitocôndrias ou cloroplastos, todo o restante é sintetizado por ribossomos citosólicos, e grande parte dessas proteínas não permanecem no citosol, sendo direcionadas para organelas como a mitocôndria, núcleo, peroxissomos, retículo endoplasmático e cloroplasto, em suma, grande parcela das proteínas residentes nas mitocôndrias é importada do citoplasma (onde são sintetizadas) (NEUPERT; SCHATZ, 1981; HAY et al., 1984; VAN DEN BROECK et al., 1985). Em algumas proteínas mitocondriais o sinal de direcionamento à organela de destino é um peptídeo sinal localizado na região N-terminal, e é clivado antes da pré proteína entrar na organela (SCHATZ; DOBBERSTEIN, 1996). Esses resíduos são conservados em sequências de direcionamento mitocondrial e podem ser identificados por softwares que predizem a probabilidade de ocorrência dos mesmos (EMANUELSSON et al., 2007). Com essa abordagem, foram identificadas sequências de aminoácidos que correspondem a PS em *LaPRODH* e *LaP5CDH*. A presença de regiões de hélices transmembranares (HT) também foi constatada em ambas as sequências, essas análises foram realizadas através da utilização dos programas *TMHMM 2.0* e *TMPRED*. Notou-se que em ambos os programas houve predição pela presença de três HT na sequência *LaPRODH*, contudo apenas o segundo programa citado detectou uma possível presença de duas regiões de HT na sequência de *P5CDH*. Com esses resultados é mais confiável supor que somente a *LaPRODH* deva se tratar de uma proteína ancorada à membrana mitocondrial. Realmente *PRODH* e *P5CDH* tem sido descritas como se tratando de enzimas residentes na matriz mitocondrial, sendo a *PRODH* ancorada à membrana interna da matriz (PHANG, 1985). Tem sido reportado que *P5CDH* pode ser localizada tanto na matriz como no citoplasma (BRUNNER; NEUPERT, 1969; BRANDRISS; KRZYWICKI, 1986; SCHAAP et al., 1997) ou exclusivamente na mitocôndria (HASLETT et al., 2004), não havendo até o momento citação dessa proteína em relação à sua fixação em membranas mitocondriais.

Para confirmar as análises *in silico* foram realizados ensaios de imunolocalização para desvendar a localização subcelular dessas enzimas. Culturas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram incubadas com o marcador mitocondrial MitoTracker® e com o corante de ácidos nucleicos azul fluorescente DAPI, que se liga com maior intensidade ao kDNA por ter mais afinidade a regiões de DNA que são ricas em AT. Assim pode-se considerar que ambos corantes destacam a mitocôndria, o MitoTracker® marca com maior amplitude a essa organela enquanto o DAPI se concentra na região do cinetoplasto. Quando analisadas as imagens de microscopia confocal de ambos os anticorpos (anti-*TcPRODH* ou anti-*TcP5CDH*) vemos colocalização do fluoróforo Alexa Fluor com ambos marcadores MitoTracker® e DAPI. Pode-

se notar que a fluorescência do Alexa Fluor se estende amplamente pela organela, com padrão de marcação análogo ao do MitoTracker[®]. A disposição da mitocôndria dos promastigotas é ramificada e se estende ao longo do corpo do parasita (VANNIER-SANTOS et al., 2002).

As análises computacionais das sequências protéicas de ambos os genes indicaram uma possível presença de sítios de clivagem para direcionamento mitocondrial. Esse dado em conjunto com os ensaios de imunolocalização, que demonstram imagens colocalizadas para as fluorescências do marcador mitocondrial e do fluoróforo Alexa Fluor, ratificam os dados correspondentes a literatura, que essas proteínas estão compartimentalizadas na mitocôndria.

5.4 Expressão das proteínas nativas e recombinantes

A expressão das proteínas *La*PROD_H e *La*P5CD_H foi verificada em ensaios de *western blotting* com extratos protéicos totais de *L. (L.) amazonensis*. Para tanto foram empregados os mesmos anticorpos utilizados nos ensaios de imunolocalização (anti-*Tc*PROD_H ou anti-*Tc*P5CD_H). O perfil de reação do anticorpo anti-*Tc*PROD_H contra *La*PROD_H pôde ser notado pela ocorrência de um sinal com a massa molecular esperada para essa proteína 63,5 KDa. Nota-se também a presença de um sinal inespecífico com cerca de 47 KDa, na membrana de anti-*Tc*PROD_H contra *La*PROD_H. A membrana referente à reação do anticorpo anti-*Tc*P5CD_H contra *La*P5CD_H mostrou um sinal mais específico, condizente com o esperado, cerca de 61,8 KDa, apesar de também serem notados sinais inespecíficos, porém com muito pouca intensidade. Para interpretar a presença dos sinais inespecíficos acima citados devemos ponderar, pois ambos os anticorpos foram preparados a partir de sequências referentes a PROD_H e P5CD_H de *T. cruzi*. Relembremos que essas proteínas possuem 51,9 e 66,6 % de identidade com *La*PROD_H e *La*P5CD_H, respectivamente. Sendo que o caso mais agravante se refere a PROD_H, pois quando comparada a P5CD_H, possui um percentual de similaridade inferior em relação à respectiva ortóloga em *L. (L.) amazonensis*. Considerando esses reveses, conclui-se que houve reação satisfatória dos anticorpos anti-*T. cruzi* contra as proteínas PROD_H e P5CD_H de *L. (L.) amazonensis*.

Outro modo pelo qual pudemos verificar a expressão das proteínas investigadas nesse trabalho foi feito a partir da observação dos géis de poliacrilamida com extratos protéicos totais *E. coli*. Essas células, que foram previamente transformadas com os genes putativos *La*PROD_H e *La*P5CD_H, expressaram proteínas recombinantes com massas moleculares aproximadas às preditas para ambas as proteínas. Como já citado, esses clones foram construídos com o intuito de uma posterior purificação e caracterização bioquímica das

respectivas proteínas recombinantes. Porém nos ensaios realizados até o momento verificou-se que essas proteínas se expressam prioritariamente no interior de corpos de inclusão (ítem 4.3). Quando proteínas heterólogas são expressas em *E.coli* frequentemente ocorre a formação de corpos de inclusão. Se a proteína vai assumir sua conformação nativa ou vai agregar e formar corpos de inclusão depende de uma variedade de parâmetros físico-químicos e fisiológicos como, interação com chaperonas, pH, temperatura, nível de síntese protéica, sistemas de processamento (como remoção de sítios internos) que podem estar ausentes na bactéria (SCHEIN; NOTEBORN, 1988; MITRAKI; KING, 1989; STRANDBERG; ENFORS, 1991; HENDRICK; HARTL, 1993; HARTL; HLODAN; LANGER, 1994). Enfim, vários fatores podem influenciar na formação dessas estruturas, sendo difícil inferir qual (ou quais) desses podem estar interferindo na obtenção de *La*PROD_H e *La*P5CD_H solúveis. Deste modo, faz-se necessária uma otimização das condições de crescimento e expressão para obter as proteínas em maior quantidade solúveis e posteriormente seguir com a purificação.

5.5 Avaliação da funcionalidade dos produtos codificados pelos genes PROD_H e P5CD_H de *L. (L.) amazonensis*

Tradicionalmente *Saccharomyces cerevisiae* tem servido como um dos melhores modelos eucariotos para avaliação do comportamento nutricional, através da caracterização de mutantes gerados pela interrupção de genes que estão envolvidos no metabolismo de compostos importantes para a viabilidade celular (BRACHMANN et al., 1998; LEVERENTZ et al., 2009). *S. cerevisiae* pode utilizar dezenas de compostos como fontes de nitrogênio, incluindo aminoácidos, amônia, bases nitrogenadas, uréia e derivados de purinas (COOPER, 1982). Contudo, apesar dessa versatilidade, *S. cerevisiae* utiliza preferencialmente glutamato e amônia como fontes de nitrogênio. O aminoácido prolina, dentre outros compostos, é usado com menor acuidade (LEVERENTZ et al., 2009). Apesar disso, quando as fontes preferenciais de nitrogênio se exaurem, esses organismos tendem a regular transcricionalmente seus genes para se adequar às condições nutricionais disponíveis (MAGASANIK; NEIDHARDT, 1987). A regulação nutricional relacionada ao metabolismo da prolina envolve um grupo de genes denominados PUT (Proline Ut_{il}ization). Para entrar na célula prolina pode usar dois sistemas de transporte, ambos constituídos por permeases. O primeiro sistema é inespecífico e de baixa afinidade, codificado pelo gene *GAP1* (General Amino-acid Transporter) (LASKO; BRANDRISS, 1981). O segundo é específico e de alta

afinidade, codificado pelo gene *PUT4* (MAGANA-SCHWENCKE; SCHWENCKE, 1969; JAUNIAUX et al., 1987). Após a entrada na célula, a prolina mobiliza o ativador PUT3p, o qual, em interação com esse metabólito controlará diretamente a ativação transcricional dos genes (*PUT1* e *PUT2*) envolvidos no metabolismo da via prolina-glutamato em *S. cerevisiae*. PUT3p é um ativador transcricionalmente inerte na ausência de prolina, tornando-se ativo na presença desse aminoácido (SELLICK; REECE, 2003). Na presença de fontes de nitrogênio preferenciais como amônia, glutamato e/ou glutamina, os genes *PUT* são reprimidos. Todavia em ambiente com disponibilidade limitada de nitrogênio, e prolina disponível, há um aumento da regulação dos genes *PUT1* e *PUT2*, coincidindo com a desrepressão do gene *PUT4* (MARCZAK; BRANDRISS, 1991; MAGASANIK; KAISER, 2002). A ligação da prolina ao PUT3 leva a um aumento em cerca de vinte vezes na ativação dos genes *PUT* (SELLICK; REECE, 2003).

Nesse projeto, foram utilizados mutantes com interrupções nos genes que codificam para as enzimas da via de oxidação prolina-glutamato. Esses foram empregados para verificar a habilidade funcional das enzimas codificadas pelos genes em estudo. Em *S. cerevisiae* PUT1p ou PUT2p correspondem a PROD_H e P5CD_H respectivamente (BRANDRISS; MAGASANIK, 1979). As linhagens com mutações nos genes *PUT1* ou *PUT2* foram empregadas para a análise funcional de LaPROD_H e LaP5CD_H respectivamente. Essas cepas são provenientes das deleções dos genes *PUT1* ou *PUT2* a partir da cepa de referência (BY4741 ao qual é auxotrófica para uracila). Essas deleções resultaram nos mutantes ΔPUT1 e ΔPUT2, aos quais possuem os nomes sistemáticos YLR142w e YHR037w respectivamente. Pelo fato desses mutantes possuírem a via prolina-glutamato interrompida, os mesmos não desfrutam da capacidade de catabolizar prolina como única fonte de nitrogênio. Quando verificados os resultados das complementações feitas nessas leveduras mutantes, notou-se que ambos os genes (LaPROD_H ou LaP5CD_H) foram capazes de recuperar a capacidade das células de metabolizar a prolina, sendo assim restaurada a via prolina-glutamato. O crescimento desses mutantes, complementados com os respectivos genes em estudo, foram comparados com os controles correspondentes, podendo-se deduzir que somente os controles positivos e as cepas mutantes (ΔPUT1 e ΔPUT2) transformados com os genes codificantes para LaPROD_H ou LaP5CD_H puderam crescer em meio contendo prolina como única fonte de nitrogênio. Por sua vez, os mutantes ΔPUT1 ou ΔPUT2 (contendo o plasmídeo pYES), usados como controles negativos, só foram capazes de crescer em meio contendo sulfato de amônia como única fonte nitrogênio. Sintetizando a avaliação, em cepas com deleção em

genes que participam da via prolina glutamato, somente os mutantes que tiveram em seu genótipo a presença do gene PRODH ou P5CDH de *L. (L.) amazonensis* recuperaram a funcionalidade da via metabólica acima mencionada.

Uma vez que a funcionalidade dos produtos gênicos de *LaPRODH* e *LaP5CDH* foram constatadas pelas complementações nas leveduras mutantes, foi verificada a presença dos RNAs mensageiros para os respectivos genes a partir do produto de transcrição dessas leveduras. A presença dos mRNAs específicos nas cepas de leveduras complementadas permitiu confirmar a presença e funcionalidade dos genes *LaPRODH* e *LaP5CDH* nos genótipos das leveduras mutantes complementadas com esses genes.

5.6 Considerações finais

A presença dos genes que codificam as enzimas envolvidas na via prolina-glutamato vem sendo estudada em diversos organismos, assim como a funcionalidade de seus produtos gênicos. Nesse trabalho foi feita uma investigação no que diz respeito a constatação da presença dos genes que possuem o código para a síntese das enzimas PRODH e P5CDH no genoma de *L. (L.) amazonensis*. Também, procurou-se identificar a localização dessas enzimas dentro das células e se as mesmas possuem um potencial catalítico. Em resumo, os resultados apresentados demonstraram que *L. (L.) amazonensis* possui as enzimas denominadas aqui como *LaPRODH* e *LaP5CDH* que apresentam um alto percentual de similaridade com as sequências ortólogas de outras espécies de *Leishmania*. Esse fato somado a constatação da presença de domínios conservados, considerados assinaturas para as respectivas famílias de proteínas, nos permite inferir que os genes aqui investigados possuem código para a síntese de uma prolina desidrogenase e uma Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase. Como citado, a literatura refere-se a essas enzimas como ocorrendo em compartimento mitocondrial, nesse projeto foram empregadas análises *in silico* e ensaios de imunolocalização para averiguar esse fato. Em ambos, constatou-se que *LaPRODH* e *LaP5CDH* se tratam de proteínas residentes nas mitocôndrias. Por fim, foi apurada a capacidade funcional dessas enzimas, as quais demonstraram completa revigoração dos mutantes de *S. cerevisiae* aqui empregados. Em suma, segundo os resultados obtidos, *L. (L.) amazonensis* possui os genes prolina desidrogenase e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato em seu genoma, seus produtos protéicos são ativos e habitam na mitocôndria dessa espécie.

6 CONCLUSÕES

- O genoma de *L. (L.) amazonensis* apresenta uma fase aberta de leitura (ORF) com 1686 pb que possui o código para a síntese de uma prolina desidrogenase (*LaPRODH*), número de acesso HQ651733, e uma ORF com 1683 pb com código para síntese de uma Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (*LaP5CDH*), número de acesso HQ404366.
- Foi predita uma aparente massa molecular de 63,5 KDa para *LaPRODH* e 61,8 KDa para *LaP5CDH*.
- As sequências aqui encontradas apresentaram possíveis domínios conservados, que são característicos das famílias das Prolina desidrogenases e Aldeído desidrogenases, às quais pertencem a *LaPRODH* e a *LaP5CDH* respectivamente. Esta última, apresenta um resíduo de ácido glutâmico e um resíduo de cisteína em posições características. É interessante resaltar que o gene que codifica para a *LaPRODH* apresenta uma característica observada na proteína ortóloga em *T. cruzi*: com domínio *Ef-hand* de ligação ao Ca^{2+} .
- Ambas ORFs aqui encontradas codificam para proteínas de localização mitocondrial.
- Ambas as proteínas codificadas pelos genes *LaPRODH* e *LaP5CDH*, demonstraram ser expressas em sua forma nativa (em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*) e puderam ser expressas na sua forma recombinante em clones produzidos em *E. coli*.
- Os genes *LaPRODH* e *LaP5CDH* complementaram funcionalmente os ortólogos de *S. cerevisiae*, mostrando que as proteínas por eles codificadas são ativas e capazes de restabelecer a via prolina-glutamato, até então interrompida. As mesmas proteínas demonstraram serem transcritas nesse organismo.

7 PERSPECTIVAS

- Dentre as possíveis linhas de continuação deste trabalho, considera-se de importância otimizar as condições de crescimento e expressão dos clones bacterianos contendo *LaPRODH* ou *LaP5CDH*, para se obter proteínas recombinantes solúveis em quantidade adequada para seguir com a purificação e caracterização bioquímica das mesmas. Com essa caracterização será permitido conhecer os valores cinéticos das proteínas recombinantes, como K_m V_{max} .

REFERÊNCIAS*

ADAMS, E.; FRANK, L. Metabolism of proline and the hydroxyprolines. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 1005–1061, 1980.

ALVES, C. R. et al. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote–amastigote differentiation in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 109, n. 1, p. 38–48, 2005.

ANTOINE, J. C. et al. Parasitophorous Vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infection and Immunity**, v. 58, n.3, p. 779-787, 1990.

BALANÑA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.

BARTELS, D. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? **Trends Plant Sci.**, v. 6, n. 7, p. 284–286, 2001.

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr. Mol. Med.**, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.

BAUDIN, A. et al. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 14, p. 3329-3330, 1993.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BRACHMANN, C. B. et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. **Yeast**, v. 14, n. 2, p. 115–132, 1998.

BRANDRISS, M. C.; KRZYWICKI, K. A. Amino-terminal fragments of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase direct 3-galactosidase to the mitochondrial matrix in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 6, n. 10, p. 3502-3512, 1986.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRANDRISS, M. C.; MAGASANIK, B. Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: enzyme induction by proline. **J. Bacteriol.**, v. 140, n. 2, p. 498–503, 1979.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180 p.

BRAY, P. G. et al. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 5, p. 232-239, 2003.

BRINGAUD, F.; RIVIERE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 149, n. 1, p. 1-9, 2006.

BRUNNER, G.; NEUPERT, W. Localisation of proline oxidase and Δ -pyrroline-5-carboxylic acid dehydrogenase in rat liver. **FEBS Lett.**, v. 3, n. 4, p. 283-286, 1969.

BRYCESON, A. D. M. Leishmaniasis. In: COOK, G. C. (Ed.). **Manson's tropical diseases**. London: W.B. Saunders, 1996. p. 1213-1245.

BUCHANAN, J. D.; CORBETT, R. J.; ROCHE, R. S. The thermodynamics of calcium binding to thermolysin. **Biophys. Chem.**, v. 23, n. 3-4, p. 183–199, 1986.

CASSAGO, A. et al. Identification of *Leishmania* selenoproteins and SECIS element. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 149, n. 2, p. 128–134, 2006.

CAZZULO, J. J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. **Faseb J.**, v. 6, n. 13, p. 3153-3161, 1992.

CAZZULO, J. J. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 26, n. 2, p. 157-165, 1994.

CONTRERAS et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 16, n. 3, p. 315-27, 1985.

COOPER, T. G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E. W.; BROACH, J. R. (Ed.). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: metabolism and gene expression**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. p. 39–99.

COX, Frank E.G. History of human parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 4, p. 595-612, 2002.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol.**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

DE LA MONTE, S.; WANDS, J. R. Mitochondrial DNA damage and impaired mitochondrial function contribute to apoptosis of insulin-stimulated ethanol-exposed neuronal cells. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 25, n. 6, p. 898-906, 2001.

DESJEUX, P. The increase of risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, n. 10, p. 2069-80, 2009.

DEUSCHLE, K. et al. A nuclear gene encoding mitochondrial Delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. **Plant J.**, v. 27, n. 4, p. 345–356, 2001.

DILLON, R. J.; EL-KORDY, E. Carbohydrate digestion in sandflies: alpha-glucosidase activity in the midgut of *Phlebotomus langeroni*. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v 116, n. 1, p. 35– 40, 1997.

DONAVAN, C. On the possibility of occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. **Natl. Med. J. India**, v. 7, n. 4, p. 201-202, 1994.

ELLIS, R. J.; VAN DER VIES, S. M. Molecular chaperones. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 60, p. 321–347, 1991.

EMANUELSSON, O. et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 953-971, 2007.

FAIRLAMB, A. H.; OPPERDOES, F. R. Carbohydrate metabolism in African trypanosomes, with special reference to the glycosome. In: Morgan M. J. (Ed.). **Carbohydrate metabolism in cultured cells**. New York: Plenum Publishing Corporation, 1986. p. 183–224.

LEGONTOV, P. N. et al. Selective amplification of maxicircle classes during the life cycle of *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 165, n. 2, p. 142-52, 2009.

GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 31-34, 2007.

GLASER, T. A.; MUKKADA, A. J. Proline transport in *Leishmania donovani* amastigotes: dependence on pH gradients and membrane potential. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 51, n. 1, p. 1–8, 1992.

GODARD, P. et al. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 8, p. 3065–3086, 2007.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546-552, 1996.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 15, n. 2, p. 171, 2009.

GOODWIN, L. C.; PAGE, J. E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochem. J.**, v. 37, n.2, p. 198-209, 1943.

GRIMALDI JR, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

GRIMALDI JR, G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New Word. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 41, n. 6, p. 687-725, 1989.

HAGEDORN, C. H; PHANG, J. M. Transfer of reducing equivalents into mitochondria by the interconversions of proline and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 225, n. 1, p. 95–101, 1983.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 41, p. 95-98, 1999.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, n. 4, p. 557-804, 1983.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v.18, n. 8, 2002.

HARTL, F. U.; HLODAN, R.; LANGER, T. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. **Trends Biochem. Sci.**, v. 19, n. 1, p. 20–25, 1994.

HASLETT, M. R. et al. Assay and subcellular localization of pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in rat liver. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1675, p. 81-86, 2004.

HAY, R.; BOHNI, P.; GASSER, S. How mitochondria import proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 779, p. 65-87, 1984.

HENDRICK, J. P.; HARTL, F. U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 62, p. 349–384, 1993.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis: an overview. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, n. 1, p. 50-54, 2003.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191–1199, 1999.

HILL, J. E. et al. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. **Yeast**, v. 2, n. 3, p. 163-167, 1986.

HOARE, C. A. Early discoveries regarding the parasites of oriental sore. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, p. 67–92, 1938.

HOEK, J. B.; NJOGU, R. M. The role of glutamate transport in the regulation of the pathway of proline oxidation in rat liver mitochondria. **J. Biol. Chem.**, v. 255, n. 18, p. 8711-8, 1980.

HOFMANN K.; STOFFEL, W. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, v. 374, p. 166, 1993.

HONG, M.; SIMPSON, L. Genomic organization of *Trypanosoma brucei* kinetoplast DNA minicircles. **Protist**, v. 154, n. 2, p. 265–279, 2003.

HONG, Z. et al. Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiol.**, v. 122, n. 4, p. 1129–1136, 2000.

JAUNIAUX, J. C. et al. Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of the PUT4 gene and study of PUT4 RNA levels in wild-type and mutant strains. **Eur. J. Biochem.**, v. 164, n. 3, p. 601–606, 1987.

JÖRNVALL, H. Differences between alcohol dehydrogenases. **Eur. J. Biochem.**, v. 72, n. 3, p. 443–452, 1977.

KÄLL, L.; KROGH, A.; SONNHAMMER, E. L. L. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. **Journal of Molecular Biology**, v. 338, n. 5, p. 1027–1036, 2004.

KAVI KISHOR, P. B. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, n. 3, p. 424–438, 2005.

KAWASAKI, H.; KRETSINGER, R. H. Calcium-binding proteins: EF-hands. **Protein Profile**, v. 1, n. 4, p. 343–517, 1994.

KAWASAKI, H.; NAKAYAMA, S.; KRETSINGER, R. H. Classification and evolution of EF-hand proteins. **Biometals**, v. 11, n. 4, p. 277–295, 1998.

KILLICK-KENDRICK, R. et al. The taxonomy of *Leishmania*-like parasites of reptiles. In: RIOUX J-A, (Ed.). **Leishmania, Taxonomie et phylogénèse: applications éco-épidémiologiques**. Montpellier: Colloque International, 1984. p. 143–148.

KIYOSUE, T. et al. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. **Plant. Cell**, v. 8, n. 8, p. 1323–1335, 1996.

KRASSNER, S. M.; FLORY, B. Proline metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Parasitol.**, v. 19, n. 4, p. 682–685, 1972.

KRETSINGER, R. H.; NOCKOLDS, C. E. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. **J. Biol. Chem.**, v. 248, n. 9, p. 3313-3126, 1973.

KUBISTA, M.; AAKERMAN, B.; NORDEN, B. Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy. **Biochemistry**, v. 26, n. 14, p. 4545-4553, 1987.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAINSON, R. The neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev. Pan-Amaz. Saúde**, v. 1, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographic distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The Leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. p. 1-120.

LAMOUR, N. et al. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 11902-11910, 2005.

LASKO, P. F.; BRANDISS, M. C. Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, v. 148, n. 1, p. 241-247, 1981.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of occurrence of trypanosomiasis in India. **Br. Med. J.**, v. 1, p. n. 2213, p. 1252-1254, 1903.

LEVERENTZ, M. K. et al. Mutation of a phosphorylatable residue in Put3p affects the magnitude of rapamycin-induced PUT1 activation in a Gat1p-dependent manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 36, p. 24115-24122, 2009.

LEVINE, B. A. et al. The mobility of calcium-trigger proteins and its function. **Ciba Found Symp.**, v. 93, p. 72-97, 1983.

LEWIT-BENTLEY, A.; RETY, S. EF-hand calcium-binding proteins. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 10, n. 6, p. 637-643, 2000.

L'HOSTIS, C; GEINDRE, M; DESHUSSES, J. Active transport of L-proline in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei brucei*. **Biochem. J.**, v. 291, n. 1, p. 297-301, 1993.

LINDAHL, R. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 27, n. 4-5, p. 283–335, 1992.

LUZ, Z. M. et al. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania spp.* from patients with cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 62–66, 2009.

MA, J.; PTASHNE, M. Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. **Cell**, v. 48, n. 5, p. 847–853, 1987.

MAGANA-SCHWENCKE, N.; SCHWENCKE, J. A proline transport system in *Saccharomyces chevalieri*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 173, n. 2, p. 313–323, 1969.

MAGASANIK, B.; KAISER, C. A. Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 290, n. 1–2, p. 1–18, 2002.

MAGASANIK, B.; NEIDHARDT, F. C. Regulation of carbon and nitrogen utilization. In: NEIDHARDT, F. C. et al. (Ed.). *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. v. 2. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987. p. 1318–1325.

MAGDALENO, A. et al. Actions of a Proline Analogue, L-Thiazolidine-4-Carboxylic Acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, 2009.

MAGILL, A. J. Epidemiology of leishmaniasis. **Dermatol. Clin.**, v. 13, n. 3, p. 505–523, 1995.

MANSON-BAHR, P. E. C. Old World leishmaniasis. In: COX, F. E. G. (Ed.). **The Wellcome Trust illustrated history of tropical diseases**. London: The Wellcome Trust, 1996. p. 206–217.

MARCZAK, J. E.; BRANDRISS, M. C. Analysis of constitutive and noninducible mutations of the PUT3 transcriptional activator. **Mol. Cell. Biol.**, v. 11, n. 5, p. 2609–2619, 1991.

MARR, J. J.; BERENS, R. L. Regulation of aerobic fermentation in protozoans. VI. Comparative biochemistry of pathogenic and nonpathogenic protozoans. **Acta. Trop.**, v. 34, n. 2, p. 143–155, 1977.

MATTIOLI, R. et al. Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. **Plant Mol. Biol.**, v. 66, n. 3, p. 277–288, 2008.

MAZAREB, S.; FU, Z. Y.; ZILBERSTEIN, D. Developmental regulation of proline transport in *Leishmania donovani*. **Experimental Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 341–348, 1999.

MCCONVILLE, M. J. et al. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. **TRENDS Parasitol.**, v. 23, n. 8, p. 368-375, 2007.

MCCONVILLE, M. J.; HANDMAN, E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, n. 10, p. 1047-1051, 2007.

MITRAKI, A.; KING, J. Protein folding intermediates and inclusion body formation. **Bio/Technology**, v. 7, p. 690-697, 1989.

MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1987. p. 1-119.

MORTIMER, R. K.; JOHNSTON, J. R. Genealogy of Principal Strains of the Yeast Genetic Stock Center. **Genetics**, v. 113, n. 1, p. 35-43, 1986.

MUKHERJEE, A. et al. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 145, n. 1, p. 1-10, 2006.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

MURRAY, H. W. Progress in the treatment of a neglected infectious disease: Visceral leishmaniasis. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 2, n. 2, p. 279-292, 2004.

NADERER, T. et al. Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. **PNAS**, v. 103 n. 14, p. 5502-5507, 2006.

NEUPERT, W.; SCHATZ, G. How proteins are transported into mitochondria. **Trends Biochem. Sci.**, v. 6, p. 1-4, 1981.

OPPERDOES, F. R.; COOMBS, G. H. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. **Trends Parasitol.**, v. 23, n. 4, p. 149-158, 2007.

PAINE, M. F. et al. Diamidines for human African trypanosomiasis. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v. 11, n. 8, p. 876–883, 2010.

PANDHARE, J. et al. Regulation and Function of Proline Oxidase under Nutrient Stress. **J. Cell Biochem.**, v. 107, n. 4, p. 759–768, 2009.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **The University of Chicago Press**, v. 22, n. 1, p. 1-11, 1996.

PEROZICH, J. et al. Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. **Protein Science**, v. 8, n. 1, p. 137-146, 1999.

PHANG, J. M. The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. **Curr. Top. Cell Regul.**, v. 25, p. 91-132, 1985.

PHANG, J. M., PANDHARE, J., LIU, Y. The metabolism of proline as microenvironmental stress substrate. **J. Nutr.**, v. 138, n.10, p. 2008S-2015S, 2008.

PHANG, J. M.; YEH, G. C.; HAGEDORN, C. H. The intercellular proline cycle. **Life Sci.**, v. 28, n. 1, p.53-8, 1981.

PINTO, A. P. et al. Structural characterization of a recombinant flagellar calcium-binding protein from *Trypanosoma cruzi*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1652, n. 2, p. 107-114, 2003.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento de leishmaniose: estado da arte. **Quím. Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RAVASI, T. et al. Probing the S100 protein family through genomic and functional analysis. **Genomics**, v. 84, n. 1, p. 10–22, 2004.

REINA-SAN-MARTIN, B. et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. **Nat. Med.**, v. 6, n. 8, p. 890-897, 2000.

REY L. Gaspar Vianna e a descoberta do tratamento das leishmanioses pelos antimoniais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 1-7, 1962.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 50-70.

RIDLEY, R. G. The need for new approaches to tropical disease drug discovery and development for improved control strategies. In: FAILMB, A. H; RIDLEY, R. G.; VIAL, H. J. (Ed.) **Drug against parasitic diseases**. Geneva: UNDP/World bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR): 2003. p. 13-21.

RITTIG, M. H.; BOGDAN, C. *Leishmania* host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology**, v. 16, n. 7, p. 292–297, 2000.

ROBERTS, W. L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 5, p. 1076-1082, 1998.

ROHLOFF, P.; DOCAMPO, R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 118, n. 1, p. 17-24, 2008.

ROHLOFF, P.; RODRIGUES, C. O.; DOCAMPO, R. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 126, n. 2, p. 219-30, 2003.

ROSENZWEIG, D. et al. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. **FASEB J.**, v. 22, n. 2, p. 590–602, 2008.

ROSS, R. Further notes on Leishman's bodies. **Br. Med. J.**, v.2, n. 2239, p. 5, 1903.

SACCHAROMYCES GENOME DELETION PROJECT. **Yeast deletion project overview** Disponivel em: http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/project_desc.html#cassettes. Acesso em: 20 maio de 2011.

SACKS, N.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. **Biotechnology**, v. 24, p. 104-108, 1992.

SANTOS, V. C. et al. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. **The Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 17, p. 2792-2798, 2008.

SAXENA, A. et al. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 152, n. 1, p. 53–65, 2007.

SCHAAP, P. J. et al. The *Agaricus bisporus* *pruA* gene encodes a cytosolic Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase which is expressed in fruit bodies but not in gill tissue. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 57–62, 1997.

SCHATZ, G.; DOBBERSTEIN, B. Common principles of protein translocation across membranes. **Science**, v. 271, n. 5255, p. 1519–1526, 1996.

SCHEIN, C. H.; NOTEBORN, M. H. M. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature. **Bio/Technology**, v. 6, p. 291-294, 1988.

SELLICK, C. A.; REECE, R. J. Modulation of transcription factor function by an amino acid: activation of Put3p by proline. **EMBO J.**, v. 22, n. 19, p. 5147–5153, 2003.

SHAKED-MISHAN, P. et al. Novel intracellular Sb(V) reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 6, p. 3971-3976, 2001.

SHERLOCK, I. A. et al. Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (*Marsupialia: Didelphidae*) with *Leishmania donovani* in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 79, n. 4, p. 511, 1984.

SIGRIST, C. J. et al. PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. **Brief. Bioinform.**, v. 3, n. 3, p. 265-274, 2002.

SILBER, A. M. et al. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 49, n. 6, p. 441-446, 2002.

SILBER, A. M. et al. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. **Curr. Drug Targets Infect. Disord.**, v. 5, n. 1, p. 53-64, 2005.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in south-east Brazil. **Vet. Rec.** v. 147, n. 15, p. 421-422, 2000.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SIMPSON, L. Effect of acriflavin on the kinetoplast of *Leishmania tarentolae*. Mode of action and physiological correlates of the loss of kinetoplast DNA. **J. Cell Biol.**, v. 37, n. 3, p. 660-82, 1968.

SIMPSON, L. Structure and function of kinetoplast DNA. **J. Protozoology**, v. 20, n. 1, p. 2-8, 1973.

SIMPSON, L. et al. Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing. **RNA**, v. 10, n. 2, p. 159-170, 2004.

SOARES, R. P. P.; TURCO, S. J. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 3, p. 301-330, 2003.

SOEIRO, M. N. et al. Diamidine activity against trypanosomes: the state of the art. **Curr. Mol. Pharmacol.**, v. 1, n. 2, p. 151-161, 2008.

SOLOMON, M. et al. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 56, n. 4, p. 612-616, 2007.

SONNHAMMER, E. L.; VON HEIJNE, G.; KROGH, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. **Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.**, v. 6, p. 175-182, 1998.

SOTO, J. et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 9, p. 1266-1272, 2004.

STRANDBERG, L.; ENFORS, S. Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1669-1674, 1991.

SYLVESTER, D.; KRASSNER, S. M. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 55, n. 3B, p. 443-447, 1976.

SZE'KELY, G. et al. Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. **Plant J.**, v. 53, n. 1, p. 11–28, 2008.

TANNER, J. J. Structural biology of proline catabolism. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 719-730, 2008.

TATUSOV, R. L.; KOONIN, E. V.; LIPMAN, D. J. A genomic perspective on protein families. **Science**, v. 278, n. 5338, p. 631-637, 1997.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** v. 11, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TONELLI, R. R. et al. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Microbiol.**, v. 6, n. 8, p. 733-741, 2004.

VAN DEN BROECK, G. et al. Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. **Nature** (London), v. 313, n. 6001, p. 358-363, 1985.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **J. Immunol.**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 2004.

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania spp.*: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

VASILIOU, V. et al. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. **Pharmacogenetics**, v. 9, n. 4, p. 421–434, 1999.

VASILIOU, V. et al. Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. **Chem. Biol. Interact.**, v. 129, n. 1-2, p. 1–19, 2000.

VERSLUES, P. E.; SHARMA, S. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. In: WINCHESTER, N.; MCCAULEY, D. (Ed.). **The Arabidopsis Book**. v. 8. Columbia: The American Society of Plant Biologists, 2010. p. 1-23.

VICKERMAN, K.; PRESTON T. M. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In: LUMSDEN, W. H. R.; EVANS, D. A. (Ed.). **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1976. p. 35-130.

WACH, A. et al. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 10, n. 13, p. 1793-1808, 1994.

WILSON, W. D. et al. Antiparasitic compounds that target DNA. **Biochimie**, v. 90, n. 7, p. 999–1014, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cutaneous leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/cutaneous_leishmaniasis/en/index.html>. Acesso em: 13 out. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Where does leishmaniasis occur in the world?** Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index2.html. Acesso em: 10 maio 2011.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39925–39932, 2004.

YANG, W. et al. Structural analysis, identification, and design of calcium-binding sites in proteins. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 47, n. 3, p. 344–356, 2002.

YAP, K. L. et al. Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. **Proteins**, v. 37, n. 3, p. 499-507, 1999.

YASUHIRA, S.; SIMPSON, L. Minicircle-encoded guide RNAs from *Crithidia fasciculata*. **RNA** v. 1, p. 634-643, 1995.

YOSHIDA, N.; CAMARGO, E. P. Ureotelism and ammonotelism in trypanosomatids. **J. Bacteriol.**, v. 136, n. 3, p. 1184–1186, 1978.

ZELEDON, R. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. **J. Parasitol.**, v. 46, p. 541-551, 1960.

ZILBERSTEIN, D.; GEPSTEIN, A. Regulation of L-proline transport in *Leishmania donovani* by extracellular pH. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 61, n. 2, p. 197-205, 1993.

ZILBERSTEIN, D.; PHILOSOPH, H.; GEPSTEIN, A. Maintenance of cytoplasmic pH and proton motive force in promastigotes of *Leishmania donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 36, n. 2, p. 109-117, 1989.

ZILBERSTEIN, D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 48, p. 449-470, 1994.