MAURICIO SCAVASSINI PEÑA

**Identificação de ligantes da metacaspase de *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* pela técnica de “Phage Display”**

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 do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

MAURICIO SCAVASSINI PEÑA

**Identificação de ligantes da metacaspase de *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* pela técnica de “Phage Display”**

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 do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Peña, Mauricio Scavassini.

Identificação de ligantes da metacaspase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela técnica de "Phage Display" / Mauricio Scavassini Peña. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Estudo de moléculas potencialmente moduladoras do sucesso da infecção do macrófago por *Leishmania (L) amazonensis*

Versão do título para o inglês: Identification of ligands of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* metacaspase using Phage Display.

1. *Leishmania* 2. Metacaspase 3. *Phage Display* 4. Choque térmico
5. Morte celular 6. Ligantes I. Stolf, Profa. Dra. Beatriz Simonsen
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro
III. Título.

ICB/SBIB0138/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mauricio Scavassini Peña.

Título da Dissertação: Identificação de ligantes da metacaspase de *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis* pela técnica de "Phage Display"

Orientador(a): Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

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

() 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° 392/10 referente ao projeto intitulado: *“Identificação de moduladores da metacaspase de Leishmania (Leishmania) amazonensis pela técnica de Phage Display”* sob a responsabilidade de **Mauricio Scavassini Peña**, 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, 21 de junho 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 ao meu querido pai Pedro Peña (*in memoriam*), homem que eu admiro tanto, com todas as suas virtudes e também com seus limites. Este homem, sempre pronto e atento, mostrando-me o caminho da vida, que está pela frente. Um homem alegre e brincalhão, mas também, às vezes, silencioso e pensativo, homem de fé e grande luta, sensível e generoso. Obrigado, pai, por orientar o meu caminho, feito de lutas e incertezas, mas também de muitas esperanças e sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus, aos meus pais Pedro Peña (*in memoriam*) e Ivanir Scavassini Peña, por sempre me ajudarem e acreditarem em mim, nunca me deixando desamparado.

À minha irmã, Alessandra Scavassini Peña Lima, e meu cunhado Cesar Luiz Carneiro Lima, que também sempre me deram apoio e incentivo.

À minha querida avó Florinda Spadotto Scavassini por ser tão preocupada e cuidadosa comigo e ao meu avô João Scavassini (*in memoriam*) que junto ao meu pai sempre foi um exemplo de pessoa para mim.

A Agatha Cristina Oliveira Fernandes, minha companheira e amiga, que sempre esta disposta a me ajudar.

À Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf Carboni, por ter me aceitado como aluno, e sempre sendo uma pessoa disposta a passar seu conhecimento e experiência, me direcionando e orientando sempre para o melhor caminho, contribuindo com o meu crescimento como aluno e também como pessoa.

Ao Prof. Dr. Marcello André Barcinski, e Dr. Mário de Freitas Balanco, pela amizade e por todos os ensinamentos que recebi.

Aos meus amigos de laboratório Msc Mariana Kolos Galuppo que esta sempre disposta a ajudar e contribuir em todos os sentidos e Msc Leonardo Garcia Velasquez pelos momentos de descontração e pela ajuda em muitos experimentos.

Ao Msc Jean Douglas Ferraz Cordeiro, pela amizade sincera, companheirismo e conselhos que sempre me ajudaram a encarar os problemas decorrentes da vida.

À Msc. Michelle Marini Horikawa pela ajuda e grande amizade.

À Profa. Dra Silvia Reni Bortolin Uliana pelos ensinamentos.

À Profa. Dra Silvia Beatriz Boscardin pela ajuda e ensinamentos em clonagem.

Ao Msc Márcio Massao Yamamoto, pelo seqüenciamento e momentoso de descontração e conversas.

Ao Prof. Dr. Gerhard Wunderlich, pelos ensinamentos.

Aos meus amigos do departamento Renan, Eline, Ícaro, Kelly, Keitty, Rafaella, Leandro, Soraia, Rodrigo, Rodrigo Sussman, Wesley e Danilo pelos bons momentos de descontração.

A todos os membros do corpo técnico dos Laboratórios de Biociências do Departamento de Parasitologia e aos funcionários responsáveis pela Pós-Graduação, dentre eles a Silvia, obrigada por todo o apoio e ajuda fornecido.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

Acostuma-te à lama que te espera!
O Homem, que, nesta terra miserável,
Mora, entre feras, sente inevitável
Necessidade de também ser fera.
(Augusto dos Anjos)

RESUMO

PEÑA, M. S. **Identificação de ligantes da metacaspase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* pela técnica de “Phage Display**. 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

As leishmanioses são antroponoses consideradas um grande problema de saúde pública. Entre as muitas espécies descritas como causadoras de leishmaniose humana e animal, a *Leishmania (L.) amazonensis* é um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar humana e é responsável por uma grande variação de formas clínicas. Durante o ciclo de vida da *Leishmania*, amastigotas vivem no interior de fagolisossomas presentes em células fagocíticas de hospedeiros vertebrados, enquanto promastigotas vivem no interior do vetor invertebrado. As duas formas exploraram a apoptose ou o mimetismo apoptótico como forma de reduzir a resposta inflamatória do macrófago e proliferar no hospedeiro. Proteases intracelulares como as caspases são as principais efetoras no processo apoptótico. Metacaspases (MCAs) são formas evolutivas distantes das caspases de metazoários, presentes em protozoários, plantas e fungos, e vistas como potenciais alvos para combate dos parasitas sem prejuízo do hospedeiro. Ligantes e moduladores das metacaspases são até hoje desconhecidos. O Phage Display é uma técnica baseada na expressão de proteínas sintéticas nos capsídeos de fagos, usada com o propósito de selecionar ligantes de proteínas, células ou tecidos. Produzimos a metacaspase recombinante de *Leishmania L. amazonensis* e aplicamos Phage Display para buscar peptídeos ligantes dessa enzima. Esses peptídeos permitiram identificar potenciais proteínas ligantes da MCA, como quinases e cinesinas, que fornecem informações sobre a regulação e controle de sua atividade. Futuramente testaremos se peptídeos ativadores da MCA poderão induzir apoptose do parasita e serem usados como drogas para o tratamento da leishmaniose.

Palavras- chave: *Leishmania amazonensis*. Metacaspase. Phage Display.

ABSTRACT

PEÑA, M. S. **Identification of ligands of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* metacaspase using Phage Display**. 2012. 69 p. Masters thesis (Parasithology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Leishmaniasis is considered an important public health problem. Among the many species described as causing human disease in Brazil, *Leishmania (L.) amazonensis* is an important etiologic agent of human cutaneous Leishmaniasis, causing a wide range of clinical forms. During its life cycle, *Leishmania* amastigotes live inside phagolysosomes of phagocytic cells of vertebrate hosts, while promastigotes live inside the invertebrate vector. The two forms explored apoptosis or apoptotic mimicry as ways to reduce macrophage inflammatory response and allow parasite proliferation in the vertebrate host. Intracellular proteases such as caspases are key effectors in the apoptotic process. Metacaspases (MCAs) are distant evolutionary forms of metazoan caspases found in protozoa, plants and fungi, and seen as potential targets to destroy the parasites without damage to the host. Ligands and modulators of metacaspases are so far unknown. Phage Display is a technique based on the expression of synthetic proteins in the phage capsid, and is used for selecting ligands of proteins, cells or tissues. We have produced the recombinant metacaspase of *Leishmania (L.) amazonensis* and employed Phage Display to find peptide ligands of this enzyme. These peptides led to the identification of potential binding proteins of the MCA, such as kinases and kinesin, which provide information about the regulation and control of MCA's activity. In the future we will test whether peptide activators of MCA induce apoptosis of the parasite and can be used as drugs for the treatment of leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania amazonensis*. Metacaspase. Phage Display.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo biológico e mecanismo de transmissão da Leishmaniose	16
Figura 2- Viabilidade celular de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> em fase logarítmica após choque térmico	37
Figura 3- Viabilidade celular de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> em fase estacionária após choque térmico	38
Figura 4- Atividade tripsina-like em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> em fase logarítmica após choque térmico	40
Figura 5- Atividade tripsina-like em promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> em fase estacionária após choque térmico	41
Figura 6- Localização no gene da metacaspase e sequencia do peptídeo utilizado para produção do anticorpo anti Meta 1.....	42
Figura 7- Western Blot para MCA em proteínas solúveis de promastigotas de <i>Leishmania (L.) Amazonensis</i> em fase logarítmica após choque térmico a 37°C	43
Figura 8- Western Blot para MCA em proteínas solúveis de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> em fase estacionária após choque térmico a 37°C.....	43
Figura 9- Gel de agarose 1% mostrando o produto de amplificação da MCA por PCR	45
Figura 10- SDS-PAGE 10% com proteínas totais de <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) com pet-28a contendo o inserto MetaLa.....	46
Figura 11- SDS-PAGE 10% com proteína recombinante (MetaLa)	47

Figura 12- Western Blot de proteínas totais e solúveis de <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) transformada com plasmídeo com metala, mca recombinante e proteínas solúveis de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	48
Figura 13- Representação esquemática da MCA de <i>Leishmania (L.) Major</i>	49
Figura 14- Alinhamento de todas as formas processadas da MCA de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> que contem a região correspondente ao peptídeo utilizado para obtenção do anticorpo anti Meta1	50
Figura 15- Atividade tripsina-like em 20µg de proteínas solúveis de <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) utilizando 10 µm do substrato Z-ARG-ARG-AMC	52
Figura 16- Curva de atividade cisteíno-proteinase de diferentes massas de tripsina.....	53
Figura 17- Curva de atividade cisteíno-proteinase de tripsina e MCA	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a MCA.	55
Quadro 2- Sequências de aminoácidos dos clones ligantes da MCA selecionados alinhadas pelo programa Clustal W	56
Quadro 3- Peptídios selecionados e proteínas potencialmente ligantes da MCA	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Leishmaniose	15
1.2	A sobrevivência da <i>Leishmania</i> no macrófago	16
1.3	Apoptose.....	17
1.4	Metacaspases	19
1.5	Metacaspases de <i>Leishmania</i>.....	19
1.6	A técnica de Phage Display	22
1.7	Phage Display e Metacaspase de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	24
2	OBJETIVO GERAL	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	Cultivo de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>.....	26
3.2	Medida de viabilidade por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-brometo de difenil tetrazolio).....	26
3.3	Reação em cadeia da polimerase- PCR	26
3.4	Purificação dos produtos de PCR e de digestão com enzimas de restrição.....	27
3.5	Dosagem de DNA	27
3.6	Clonagem no vetor pCR4 TOPO sequencing vector	27
3.7	Clonagem no vetor de expressão pet 28a	28
3.8	Extração de DNA plasmidial	28
3.9	Preparação de bactérias competentes	28
3.10	Transformação de bactérias DH5α e BL21 (DE3) com plasmídeos	29
3.11	Eletroforese em gel de agarose	29
3.12	Sequenciamento de DNA	29

3.13	Extração de proteínas solúveis de <i>Leishmania (L.) amazonenses</i>	30
3.14	Análise da atividade de cisteíno proteinases	31
3.15	Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida- SDS-PAGE.....	31
3.16	Western Blot	31
3.17	Obtenção da proteína recombinante MetaLa em <i>Escherichia coli</i>	32
3.18	Seleção de fagos ligantes de MCA	32
3.19	Amplificação de fagos eluídos após seleção	32
3.20	Amplificação de placas de fagos	34
3.21	Análise das sequências dos peptídeos dos fagos e identificação de potenciais ligantes da MCA.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Indução de morte celular em formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> por choque térmico.....	36
4.2	Produção da metacaspase (MetaLa) recombinante de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	44
4.3	Phage Display com bibliotecas de peptídeos para identificar ligantes da MCA de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	54
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

As leishmanioses são antroponoses consideradas um grande problema de saúde pública. Elas representam um complexo de doenças com amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair essa doença, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (BRASIL, 2007).

As formas clínicas em seres humanos são geralmente classificadas como leishmaniose cutânea localizada (LCL), cutânea difusa (LCD) e mucocutânea (LMC), conjuntamente chamadas de tegumentares, e leishmaniose visceral (LV) (REITHINGER et al., 2007). A forma clínica da doença depende tanto da espécie do parasita quanto da resposta imune do hospedeiro (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004).

Dentre as manifestações cutâneas, a LCL tipicamente apresenta-se com um nódulo que sofre ulceração progressiva até se tornar uma lesão característica, e pode variar em gravidade e aspecto clínico. Essa manifestação tem uma tendência à auto-cura, embora o tempo necessário para a cura possa variar. Ao contrário, a LCD é caracterizada por múltiplos nódulos não ulcerativos que podem se espalhar para todo o corpo do paciente, normalmente não têm tendência de auto-cura e é de difícil tratamento (REITHINGER et al., 2007).

Entre as muitas espécies de *Leishmania* já descritas como causadoras de leishmaniose humana e animal, a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é um importante agente etiológico da leishmaniose tegumentar humana no Brasil (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003) e é responsável por uma grande variedade de formas clínicas (BARRAL et al., 1991). De fato, essa espécie pode causar tanto a doença localizada quanto a difusa, dependendo do sistema imune do indivíduo infectado (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). Em alguns pacientes a LCL pode evoluir para uma ausência de resposta celular específica (anergia) a antígenos de *Leishmania*, o que permite a acentuada proliferação dos parasitos e a disseminação da infecção que caracteriza a rara leishmaniose cutânea difusa (LCD) (BRASIL, 2007). *Leishmania (L.) amazonensis* parece ter uma capacidade particular de interferir negativamente em vários mecanismos imunológicos necessários para a geração de uma resposta imune efetiva (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004).

1.2 A sobrevivência da *Leishmania* no macrófago

Durante o ciclo de vida a *Leishmania* tem duas formas: amastigota intracelular e sem flagelo externo e promastigota flagelada e extracelular. Os amastigotas vivem no interior de fagolisossomos de células fagocíticas de hospedeiros vertebrados, especialmente monócitos e macrófagos, e são ingeridos pelos vetores invertebrados flebotomíneos fêmeas durante seu repasto de sangue infectado. Nestes insetos hematófagos, o parasita desenvolve uma complexa série de modificações morfológicas, tornando-se promastigotas (figura 1) (SHAHA, 2006).

Figura 1-Ciclo biológico e mecanismo de transmissão da leishmaniose

Fonte: (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002)

A sobrevivência do amastigota no interior do macrófago é uma questão extremamente importante na patogênese da leishmaniose, já que esta célula apresenta mecanismos eficazes para o combate a parasitas, como a produção de NO e espécies reativas de oxigênio (MILLS et al., 2000). Os macrófagos apresentam grande diversidade, e dois subtipos extremos respondem de forma bastante diferente à infecção por *Leishmania*: macrófagos M1, bons

produtores de NO, que combatem mais eficientemente o parasita do que os M2, que sob estímulo produzem pouco NO (MILLS et al., 2000). De fato, macrófagos M2 são considerados supressores ou “alternativamente ativados” por inibirem a geração de produtos pró-inflamatórios (GORDON, 2001).

Além de combaterem organismos invasores, os macrófagos realizam a fagocitose de células apoptóticas, que tem sido sugerida como um processo silencioso de remoção de células sem a produção de mediadores inflamatórios (FADOK et al., 1998). De fato, a fagocitose de células apoptóticas pelos macrófagos leva ao aumento de TGF β e à redução de TNF α e de várias quimiocinas, suprimindo assim a resposta inflamatória (MCDONALD et al., 1999).

Parasitas do gênero *Leishmania* exploraram a apoptose como forma de reduzir a resposta inflamatória do macrófago e proliferarem no hospedeiro (SHAHA, 2006). A presença de promastigotas em apoptose expondo fosfatidilserina (PS) no inóculo leva à produção de TGF β , que inibe a atividade inflamatória do macrófago colaborando para a sobrevivência dos parasitas não apoptóticos e para a patogênese da leishmaniose (VAN ZANDBERGEN et al., 2006). De fato, um inóculo de promastigotas viáveis sem exposição de PS não minimiza a produção de NO pelo macrófago e com isto os parasitas são destruídos, não havendo multiplicação de amastigotas e progressão da doença (WANDERLEY et al., 2009).

Além dos promastigotas, amastigotas também são capazes de suprimir a resposta inflamatória, induzindo secreção de TGF β e reduzindo a produção de NO (WANDERLEY et al., 2006). Esse efeito é devido à exposição de fosfatidilserina (PS) na membrana do amastigota, que ao contrário do promastigota, não entra em apoptose. Esse processo foi denominado de mimetismo apoptótico por apresentar um dos fenótipos característicos da apoptose sem estar obrigatoriamente relacionado à morte celular (DE FREITAS BALANCO et al., 2001). Nos promastigotas a exposição de PS está associada à apoptose e portanto leva obrigatoriamente a morte celular (WANDERLEY et al., 2009).

1.3 Apoptose

A apoptose é o tipo mais comum de morte celular programada, sendo caracterizada por eventos como redução do tamanho da célula, exposição de fosfatidilserina (PS), aparecimento de extrusões da membrana plasmática, fragmentação do DNA e formação de

corpos apoptóticos (KROEMER et al., 2005). Análises bioquímicas tais como de fragmentação do DNA não devem, porém, ser usadas para definir a apoptose, porque este tipo de morte celular pode ocorrer sem a formação do DNA oligonucleosomal (SHAHA, 2006).

Estudos sobre a apoptose revelaram que as proteases intracelulares são as principais efetoras neste processo (LI; YUAN, 2008). Os primeiros estudos apontam para a importância das caspases (cisteino aspartato proteases) como mediadores da fase de execução da apoptose (FRITZ et al., 2006; GROSS; MCDONNELL; KORSMEYER, 1999; MIURA et al., 1993; ZOU et al., 1997). Caspases podem ser classificadas com base nas suas conhecidas funções principais em duas subfamílias: caspases pró-apoptóticas e caspases pró-inflamatórias. Caspases pró-apoptóticas (caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) são conhecidas por serem principalmente envolvidas na mediação da morte celular e pela produção de sinalizadores, enquanto que as pró- inflamatórias (caspase-1, -4, -5, -11, -12) regulam a maturação de citocinas durante a inflamação. A ativação das caspases pró-inflamatórias pode também induzir a apoptose (LI; YUAN, 2008).

Promastigotas de *Leishmania* são expostos a mudanças de temperatura durante o ciclo de vida, variando desde a temperatura no interior do vetor invertebrado (22-28 °C) até a temperatura do hospedeiro mamífero (34-37 °C). Quando expostos a temperaturas próximas às do hospedeiro mamífero esses promastigotas apresentam características ultra-estruturais e moleculares típicas de células que morrem por apoptose (ALZATE et al., 2007; MOREIRA et al., 1996; WANDERLEY et al., 2006). Outros estímulos também podem induzir a apoptose em *Leishmania*, como Miltefosina, originalmente desenvolvida como uma droga anticâncer e posteriormente introduzida com sucesso como tratamento de leishmaniose visceral causada por *Leishmania (L.) donovani* na Índia, (PARIS et al., 2004; VERMA; DEY, 2004), Curcumina, um composto de polifenóis reconhecido como uma promissora droga anticâncer (DAS, R. et al., 2008), peróxido de hidrogênio (DAS; MUKHERJEE; SHAHA, 2001) e Estaurosporina, um inibidor de proteínas quinases (SHAHA, 2006). Apesar de se aceitar que a apoptose encontrada nesses parasitas seja semelhante à descrita para mamíferos (ALZATE et al., 2007; ARNOULT et al., 2002; MOREIRA et al., 1996), pouco foi elucidado sobre as vias e as proteínas envolvidas. Comparações entre genomas revelaram que a grande maioria das proteínas (especialmente as da via Bcl-2/Bax) envolvidas na apoptose de mamíferos aparentemente não são codificadas no genoma de *Leishmania* ou de outros protozoários relacionados (IVENS et al., 2005).

1.4 Metacaspases

Metacaspases (MCAs) são formas evolutivas distantes das caspases de metazoários que foram identificadas a partir de análises da sequência de caspase e parecem estar restritas às plantas, fungos e protozoários (AMBIT et al., 2008). São cisteíno peptidases do clã CD, família C14 (AMBIT et al., 2008). Em termos de sequência, MCAs tem pouca similaridade com as caspases, mas predições de estrutura secundária indicam dobramentos similares a caspase-3 e caspase-1 (UREN et al., 2000). Outra semelhança com as caspases é a presença da subunidade p20 e da díade catalítica histidina/cisteína (H/C) conservada em todas as caspases (UREN et al., 2000).

Em termos de função e atividade observam-se grandes diferenças entre MCAs e caspases: enquanto caspases têm especificidade por substratos com um ácido aspártico na posição P1, MCAs de plantas (VERCAMMEN et al., 2004) e de *Leishmania* (GONZALEZ et al., 2007) têm especificidade por substratos com arginina/ lisina. arginina.

A composição de aminoácidos das MCAs tem permitido classifica-las em dois grupos principais: MCAs tipo I, que contem dominos ricos em prolinas, e MCAs tipo II, que carecem dos dominios de prolinas mas contem uma inserção de aproximadamente 200 aminoácidos no C-terminal da subunidade p20 (VERCAMMEN et al., 2004). Semelhante às caspases, algumas MCAs de plantas, fungos e parasitas do gênero *Leishmania* requerem um auto processamento para se tornarem ativas (GONZALEZ et al., 2007; MADEO et al., 2002; VERCAMMEN et al., 2004). Desde sua descoberta há cerca de 10 anos, verificou-se que MCAs não são apenas responsáveis por eventos de morte celular, mas também podem regular outros processos celulares.

1.5 Metacaspases de *Leishmania*

Considerando as sequências de MCA dos tripanosomatídeos com o genoma completamente seqüenciado, MCA de *Leishmania* mostra maior identidade com MCA de *Trypanosoma brucei* 5 (52%) e de *Trypanosoma cruzi* 5 (61%), organismos que possuem 5 e 17 genes de MCA, respectivamente. O significado desta identidade dentro da família dos tripanosomatídeos não é bem conhecido (LEE et al., 2007). Em *Trypanosoma brucei* existem 5 MCAs, e a expressão da MCA4 em células de *Saccharomyces cerevisiae* nas quais o gene MCA endógeno havia sido deletado produziu manifestações fenotípicas tais como retardo do

crescimento, disfunção mitocondrial e morte clonal (SZALLIES; KUBATA; DUSZENKO, 2002). Esta MCA4 foi localizada no núcleo de *Saccharomyces cerevisiae*, sugerindo que a proteína poderia controlar a transcrição de genes, afetando a biogênese mitocondrial. (SZALLIES et al., 2002), sendo por isso fundamental para o ciclo de vida. Já em *Leishmania (L.) major* a MCA foi localizada em diferentes compartimentos intracelulares dependendo da fase do ciclo celular do parasita: foi encontrada em vesículas citoplasmáticas durante a intérfase e associada ao cinetoplasto e núcleo durante a mitose (AMBIT et al., 2008). Curiosamente, o peptídeo sinal N-terminal da MCA de *Leishmania (L.) major* tem uma sequência para localização mitocondrial que foi confirmada pela expressão do fragmento em fusão com uma proteína GFP (GONZALEZ et al., 2007; ZALILA et al., 2011).

Em *Leishmania (L.) major* foi demonstrado que a MCA é expressa tanto em formas promastigotas quanto em amastigotas (AMBIT et al., 2008). Tentativas de gerar formas promastigotas com deleção do gene de MCA foram falhas, sugerindo que este gene é essencial para a sobrevivência do parasita (AMBIT et al., 2008). De fato, com o aumento de sua expressão em promastigotas de *Leishmania (L.) major* ocorre um atraso significativo no crescimento dos parasitas, bem como defeitos na citocinese e geração de parasitas com ploidias anômalas (AMBIT et al., 2008).

A MCA de *Leishmania* apresenta uma região carboxi-terminal com domínio rico em prolina, também encontrada em uma das MCAs de *T. cruzi* (*T. cruzi* metacaspase-5) (KOSEC et al., 2006). O papel deste domínio rico em prolina é desconhecido, mas sua presença em algumas MCAs sugere que possa estar envolvido na interação entre proteínas. Além disso, a MCA pode sofrer um processo de auto clivagem similar o que ocorre em caspases de mamíferos (EARNSHAW; MARTINS; KAUFMANN, 1999), que pode contribuir para o aumento de sua capacidade catalítica (GONZALEZ et al., 2007).

Leishmania (L.) major, uma das responsáveis pela leishmaniose cutânea, possui no genoma apenas um gene de MCA (www.genedb.org). Por outro lado, *Leishmania (L.) donovani*, uma das espécies responsáveis pela leishmaniose visceral, apresenta duas MCAs. Em *Leishmania (L.) donovani* a diferença entre as duas MCAs, denominadas MCd1 e MCd2, é a presença de dois aminoácidos na região carboxi-terminal da MCd1, que resulta em um domínio rico em prolina um pouco maior (LEE et al., 2007). Nessa espécie a expressão do mRNA de MCd1 foi significativamente maior em amastigotas axênicas do que em promastigotas. Tal aumento poderia explicar os níveis mais elevados de atividade “tripsina-like” em amastigotas, sugerindo que essa proteína desempenha um papel mais importante na fase parasitária de mamíferos do que na fase do inseto vetor (LEE et al., 2007). Quando

silenciado, o gene de MCd1 leva o promastigota a um quadro de estresse fisiológico, interrupção no ciclo celular e morte celular programada, assim demonstrando que mesmo apresentando duas MCAs, a *Leishmania (L.) donovani* não sobrevive sem MCd1 (RAINA; KAUR, 2012). Ao contrário do observado para MCA de *Leishmania (L.) major*, as MCd1 e MCd2 não sofrem auto processamento nem mesmo após a indução de morte celular programada por peróxido de hidrogênio, e podem ser localizadas em vesículas citoplasmáticas tanto em formas promastigotas quanto em formas amastigotas axênicas (LEE et al., 2007).

O efeito do estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio como ativador de MCA foi demonstrado em uma complementação funcional de *Saccharomyces cerevisiae* mutante nula para MCA e complementada com a MCA de *Leishmania (L.) major* (LmjMCA) (GONZALEZ et al., 2007). Essa levedura mutante era mais resistente ao estresse oxidativo do que a levedura selvagem, e ela recuperou a sensibilidade ao tratamento e a exposição de fosfatidilserina (PS) quando complementada com MCA de *Leishmania (L.) major*, sendo esta recuperação dependente da atividade catalítica desta enzima (GONZALEZ et al., 2007). Recentemente foi mostrado que Miltefosina induz a morte celular com características de apoptose e a superexpressão de MCA em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (KHADEM VATAN; GHARAVI; SAKI, 2012). O envolvimento da MCA na apoptose foi reforçado pelos achados de que a exposição a peróxido de hidrogênio é mais letal em *Leishmania (L.) donovani* que superexpressa uma de suas duas MCAs (LEE et al., 2007) e a exposição de fosfatidilserina (PS) é maior em *Leishmania (L.) major* que superexpressa a região catalítica da MCA (ZALILA et al., 2011). Tentativas de gerar uma *Leishmania* mutante nula para MCA foram inviáveis mesmo em *Leishmania (L.) donovani* que contem duas MCAs (AMBIT et al., 2008; RAINA; KAUR, 2012), sugerindo que o gene é essencial para o parasita.

Estes resultados sugerem que MCA pode ter mais de uma função em diferentes compartimentos celulares e que tem um papel importante no ciclo celular (GONZALEZ, 2009). Além disso, mostram que agentes químicos podem modificar o perfil de expressão ou a atividade catalítica da MCA em *Leishmania*.

Nenhum estudo sobre MCA foi publicado especificamente para *Leishmania (L.) amazonensis*. O genoma dessa espécie apresenta um único gene de MCA com 99% de similaridade com o gene de *Leishmania (L.) mexicana*, 93% com *Leishmania (L.) donovani*, 92% com *Leishmania (L.) major*, 92% com *Leishmania (L.) chagasi*, 91% com *Leishmania (L.) infantum* e 85% com *Leishmania (V.) braziliensis* (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) (NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2012).

A presença de MCAs em *Leishmania* e em outros protozoários parasitas como *T. cruzi* e *Plasmodium*, mas não em seus hospedeiros vertebrados, impulsiona o estudo dessas proteínas e de suas vias de ativação com a perspectiva de identificação de potenciais novas drogas (GONZALEZ et al., 2007).

1.6 A técnica de Phage Display

O Phage Display é uma técnica baseada na expressão de proteínas sintéticas nos capsídeos de fagos. Esses fagos tornam-se veículos de expressão que trazem a sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de interesse e tem a capacidade de se replicar. Com a utilização de Phage Display, um grande número de sequências de nucleotídeos é convertido em populações de diferentes peptídeos e proteínas que podem ser selecionados para as propriedades desejadas (WILLATS, 2002).

A técnica de Phage Display foi usada pela primeira vez em 1985 por Smith. Utilizando essa técnica, sequências de DNA de interesse ou aleatórias são inseridas no genoma de um fago filamentosos de tal forma que a proteína codificada é expressa em fusão com proteínas do capsídeo do fago, por exemplo com a proteína III (GUO et al., 2010). Os fagos ou bacteriófagos são vírus que infectam uma variedade de bactérias GRAM negativas usando o pilus sexual como receptor. As partículas de bacteriófagos filamentosos das linhagens M13 f1 e fd, que infectam *Escherichia coli* via pilus F, consistem em uma fita simples de DNA envolta por uma cápsula protéica. Um bacteriófago viável expressa aproximadamente 2700 cópias da proteína codificada pelo gene 8 (g8 ou pVIII, uma proteína de 50 aminoácidos) e de 3 a 5 cópias do gene 3 (p3 ou pIII, proteína de 406 aminoácidos) (MACDOUGALL; BEIGHTON; RUSSELL, 1991), além de outras proteínas.

Existem três tipos principais de bibliotecas de Phage Display, cujos produtos expressos no fago são proteínas, anticorpos ou peptídeos (WILLATS, 2002). O isolamento de sequências baseado na afinidade de ligação do fago a uma molécula (seleção sobre um alvo imobilizado), célula ou tecido alvo é feita por um processo de seleção geralmente feito *in vitro* denominado *Biopanning* (BENHAR, 2001; PARMLEY; SMITH, 1988). Por essa triagem, bibliotecas de fagos são expostas a alvos de interesse a fim de seletivamente capturar fagos aderidos. Ao longo de sucessivas adesões, lavagens, eluições e ampliações, a população de fagos é cada vez mais seletiva em relação ao alvo em questão (WILLATS, 2002).

O Phage Display tem sido utilizado para diversos fins: identificação de interações proteína-ligante, incluindo a seleção de agonistas e antagonistas, definição de epitopos de anticorpos monoclonais, seleção de substratos ou inibidores de enzimas, aprimoramento das propriedades de enzimas, seleção de alvos para a inibição de angiogênese tumoral, desenvolvimento de vacinas e identificação de candidatos a drogas ou alvos específicos para entrega de drogas para diversas doenças, incluindo as infecciosas (KURZEPA et al., 2009). Este método tem várias vantagens: o elevado número de proteínas que podem ser expressas, a alta flexibilidade, a possibilidade de realizar a seleção *in vitro* e *in vivo*, e até mesmo sobre moléculas inorgânicas. Além disso, a técnica é eficaz, rápida, barata, fácil de controlar, e não requer equipamentos especiais (KURZEPA et al., 2009).

As bibliotecas normalmente usadas para identificação de ligantes de proteínas são as bibliotecas de peptídeos. Peptídeos selecionados contra um alvo particular têm um papel na identificação do motivo necessário para ligação (STEVENS et al., 1988) e do ligante natural desse alvo. A seleção sobre uma proteína específica tem como intuito encontrar reguladores ou ligantes deste alvo (PETTER et al., 2008), sobre uma célula, encontrar marcadores específicos (GALILI; DEVEMY; RAZA, 2008; HSIUNG et al., 2008), e sobre um tecido *ex vivo* (BIDLINGMAIER et al., 2009) ou *in vivo* (HOUSTON et al., 2001), encontrar marcadores para diagnóstico ou tratamento.

A probabilidade de se encontrar um ligante em uma biblioteca de peptídeos é uma função da afinidade pela molécula selecionada, havendo normalmente uma grande chance de se identificar bons ligantes (CORTESE et al., 1995). A identificação de peptídeos ligantes de uma proteína essencial para um organismo, por exemplo uma enzima, permite entender os mecanismos de regulação de sua atividade e fornece potenciais formas de controle da viabilidade desse organismo.

Neste projeto nos propomos a aplicar a técnica de Phage Display com bibliotecas de peptídeos para identificar ligantes da MCA de *Leishmania (L.) amazonensis*. Os achados deverão fornecer informações sobre a complexa regulação da apoptose nesses protozoários, e possíveis ativadores da MCA poderão eventualmente ser usados como drogas para indução da morte do parasita sem efeitos colaterais para o hospedeiro vertebrado.

1.7 Phage Display e metacaspase de *Leishmania (L.) amazonensis*

A metacaspase é uma proteína essencial em *Leishmania* que participa de processos importantes como divisão celular e apoptose. A participação dessa enzima nos diferentes processos deve depender do contexto celular, o qual pode afetar sua localização, processamento, e/ou ligação a fatores que regulam sua atividade catalítica. Esses fatores não são conhecidos, e sua identificação contribuirá para entendermos mecanismos que determinam sobrevivência ou morte do parasita. Além disso, a presença da metacaspase em *Leishmania* mas não em seus hospedeiros vertebrados a torna um alvo de estudo com a perspectiva de identificação de potenciais novas drogas. (GONZALEZ et al., 2007).

Neste projeto buscamos analisar a relação entre a atividade da metacaspase e a morte de *Leishmania (L.) amazonensis* por choque térmico. Além disso, clonamos e expressamos a metacaspase recombinante dessa espécie, a qual foi usada para busca de ligantes pela técnica de Phage Display com bibliotecas de peptídios. Os potenciais ligantes dessa proteína devem fornecer informações sobre a complexa regulação da apoptose nesses protozoários, e poderão eventualmente ser usados para produzir indutores da morte do parasita sem efeitos colaterais para o hospedeiro vertebrado.

2 OBJETIVO GERAL

Analisar a relação entre metacaspase e morte celular por choque térmico em *Leishmania (L.) amazonensis* e identificar ligantes dessa enzima utilizando a proteína recombinante e a técnica de Phage Display.

Etapas cumpridas para atingirmos esse objetivo:

Parâmetros analisados:

- avaliação da atividade e abundância da MCA durante morte celular programada de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* nas fases logarítmica e estacionária por choque térmico;
- produção da MCA recombinante de *Leishmania (L.) amazonenses*;
- identificação de ligantes da MCA de *Leishmania (L.) amazonenses* pela técnica de *Phage Display*;
- utilização dos peptídeos selecionados para verificar modulação da MCA e efeito sobre formas promastigotas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

Promastigotas da cepa LV79 (WHO type – MPRO/1972/M1841) de *Leishmania (L.) amazonensis* foram cultivados em estufa de 24 °C em meio Warren completo pH 7,2: 37 g/L de Brain Heart Infusion (Difco laboratories., Franklin Lakes, NJ.,USA), 0,1 mg/mL de ácido fólico (Sigma., St. Louis, MO., USA), 0,01 g/L de hemina (Sigma) dissolvida em 2N NaOH, autoclavado por 15 minutos a 121 °C, acrescido de 20 µg/mL de gentamicina e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). A cada sete dias os parasitas foram repicados para a densidade de 2×10^6 /mL.

3.2 Medida de viabilidade por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-brometo de difenil tetrazolio)

Promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* na densidade de 5×10^7 parasitas/mL foram incubados em solução salina tamponada pH 7,4 [116mM de NaCl, 10mM de CaCl, 5,4 mM de KCl, 0,8 mM de MgSO₄, 5,5 mM de D-glicose, 50 mM de MOPS [3-[(N-Morpholino)] ácido propano sulfônico] a 22, 34 e 37 °C durante diferentes períodos de tempo. Foram então centrifugadas a 600 x g por 10 minutos a 4 °C e ressuspensos em tampão PBS para 2×10^6 em 100µl. Cada 100 µl foram transferidos para poços de placa de 96 poços, acrescentou-se 20 µl de MTT (Sigma, solução 5mg/mL preparada em PBS) e incubou-se a 26 °C durante 50 minutos. Após a incubação adicionou-se 100 ul de SDS 10% a cada poço e as placas foram analisadas em espectrofotômetro para microplacas de cultura BioTek ELx800 (Biotek., Winooski, VT, USA) para absorbância em 595 nm e referência de 655 nm (MOSMANN, 1983).

3.3 Reação em cadeia da polimerase- PCR

A reação para amplificação do gene de metacaspase (MetaLa) foi feita com 70 ng de DNA genômico de *Leishmania (L.) amazonensis* utilizando-se oligonucleotídeos desenhados com base nas extremidades 5' e 3' da sequência do gene de *Leishmania (L.) mexicana* depositada no Gene DB: MetaLaF 5'ATGGCAGACTTTCTTGATATTTTGGGG3' e

MetaLaR 5'TTACCCAGGCGGAGCCG3'. Para a reação foram utilizados 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl, 200 µM de dNTPs, 2 U da enzima *Taq Platinum* polimerase, 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl (LifeTechnologies., Carlsbad, CA, USA) e H₂O *nuclease free* para o volume final de 100µL. A reação foi feita em termociclador (Mastercycler gradient – Eppendorf) com uma etapa inicial de desnaturação por 4 minutos a 94 °C, seguida de 21 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 94 °C, associação dos oligonucleotídeos por 45 segundos a 58 °C, extensão de 4 minutos a 72 °C. Ao término dos 21 ciclos foi feita incubação a 72 °C por 10 minutos para o término da extensão.

3.4 Purificação dos produtos de PCR e de digestão com enzimas de restrição

Uma vez feita a análise dos produtos de PCR e produtos de digestão enzimática em géis de agarose (seção 3.11), os fragmentos do tamanho esperado foram removidos dos géis com o auxílio de um estilete sob luz ultravioleta. Para extração do DNA da agarose utilizou-se o QIAquick gel extraction kit (Qiagen., Hilden, NW, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante.

3.5 Dosagem de DNA

A quantificação do DNA foi realizada por leitura em espectrofotômetro NanoDrop (Spectrophotometer ND-1000) a 260 nm e 280 nm. O fator utilizado para a conversão de DO260 em concentração de DNA foi de 50 µg/mL por cada unidade de DO260, como já descrito (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) As razões entre as leituras Abs 260nm/Abs 280nm foram calculadas para se verificar a pureza do DNA. A amostra foi considerada pura quando os valores estavam entre 1,8 e 2,0.

3.6 Clonagem no vetor pCR4 TOPO sequencing vector

Este vetor de clonagem para bactéria é um plasmídeo linearizado que possui as extremidades coesivas com uma desoxi-timidina na fita 3' para facilitar a ligação de produtos de PCR (que tem um nucleotídeo A adicionado pela Taq polimerase). Possui ainda genes de resistência a ampicilina e canamicina. Possui também um gene *ccdB* letal para *Escherichia coli* que não é expresso quando interrompido pela ligação do produto da PCR, e dessa forma as colônias formadas são exclusivamente de bactérias recombinantes contendo plasmídeo com

inserto. O vetor pCR4TOPO foi usado para clonagem do produto de PCR contendo a metacaspase, obtido como descrito na seção 3.3. A ligação foi feita conforme as instruções do fabricante e a confirmação dos clones com metacaspase foi feita por digestão com a enzima *EcoRI FastDigest* (Fermentas., Waltham, MA, USA), conforme descrito pelo fabricante, e por seqüenciamento usando os oligonucleotídeos já descritos.

3.7 Clonagem no vetor de expressão pET 28^a

Os clones de *pCR4 TOPO sequencing vector* (LifeTechnologies) contendo inserto da MetaLa e o vetor de expressão pET 28a foram digeridos com enzima de restrição *Eco RI FastDigest* (Fermentas) conforme o protocolo descrito pelo fabricante. Este vetor possui todas as características dos vetores de expressão do sistema pET, e também regiões codificadoras de sequências de 6 histidinas nas regiões 3' e 5' do polylinker, que podem ou não ser mantidas dependendo do quadro de leitura do inserto. No caso da clonagem do gene MetaLa, apenas a seqüência de histidinas 5' foi preservada.

3.8 Extração de DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial em pequena escala foi feita pelo plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare., Waukesha, WI, USA) seguindo o protocolo do fabricante. O plasmídeo foi quantificado no aparelho Nanodrop (Thermo Scientific., Waltham, MA, USA) e visualizado em gel de agarose 1%.

3.9 Preparação de bactérias competentes

Uma colônia de bactérias *Escherichia coli* DH5 α ou BL21 (DE3) foi inoculada em 3 ml de meio de cultura LB (LifeTechnologies) e incubada por 16 horas a 37 °C, sob agitação constante (200 rpm). Os 3 mL de inóculo foram então diluídos em 200 mL meio LB e incubados a 37 °C sob agitação constante até que a DO₆₀₀ estivesse entre torno de 0,6-0,8. O recipiente contendo as bactérias foi então incubado em gelo por 30 minutos. Seguiu-se uma centrifugação a 1.400 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, as bactérias ressuspensas em 75 mL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M e incubadas em gelo por 12 horas. Seguiu-se nova centrifugação nas mesmas condições anteriores e, após desprezar-se o sobrenadante, o precipitado bacteriano foi ressuspenso em 2 mL de 0,1 M de CaCl₂ e 15%

glicerol. As bactérias foram então dispensadas em alíquotas de 50 µL, congeladas rapidamente e armazenadas a -70 °C.

3.10 Transformação de bactérias DH5α e BL21 (DE3) com plasmídeos

Para as transformações de bactérias com DNA plasmidial 5 µL da reação de ligação foram adicionados a tubos de microcentrifuga contendo alíquotas de 20 µL de bactérias competentes e 75 µL da solução de 0,1 M CaCl₂. Após incubação em gelo por 30 minutos, os tubos foram colocados a 42 °C por exatamente 40 segundos e recolocados em gelo por 5 minutos. Em seguida, acrescentaram-se 100 µL de meio LB e os tubos foram incubados a 37 °C durante 1 hora sob agitação. O volume total da mistura foi aplicado em placas de LB (LifeTechnologies) 1,5% de Agar (Sigma) contendo 50 µg/mL de canamicina e estas foram incubadas a 37 °C durante a noite.

3.11 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação, os insertos extraídos de gel, os plasmídios a serem utilizados para clonagem e os foram submetidos à eletroforese horizontal. As amostras de DNA foram preparadas em tampão de amostra 6X Orange DNA Loading Dye (Fermentas). A eletroforese foi realizada em gel de agarose (LifeTechnologies) nas concentrações de 1,0% ou 2,0% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato e 1 mM EDTA) sob voltagem de 80 volts. O gel foi mantido durante 15 minutos em tampão TAE com brometo de etídio (0,75 g/mL) (Sigma) e fotografado no ImageQuant 300 Capture (GE Healthcare). Como referência para o tamanho dos produtos de amplificação, insertos extraídos de gel e plasmídios foi utilizado O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

3.12 Sequenciamento de DNA

Realizado para verificação da orientação e quadro de leitura (“frame”) dos genes amplificados e clonados e para obtenção da sequência de nucleotídeos dos insertos dos fagos M13 selecionados. Foram utilizados os oligonucleotídeos M13 ou T7 direto e reverso e 96-M13 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG -3 (Amersham Biosciences., Waukesha, WI, USA), e o kit de sequenciamento de DNA Big Dye Terminator™ 3.1 (Applied Biosystems., Foster City, CA, USA) 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. Os DNAs foram ressuspensos em 10 µl de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático ABIS 3100 (Applied Biosystems). As análises das seqüências foram feitas utilizando-se o programa computacional SeqMan™ II 5.00 (DNASTAR®).

3.13 Extração de proteínas solúveis de *Leishmania (L.) amazonenses*

Proteínas solúveis de *Leishmania (L.) amazonensis* para quantificação de atividade de Cisteíno proteinase foram obtidas incubando-se 10⁸ parasitas em 200 µL de tampão de lise pH 7,2 (20 mM de PIPES [Piperazine-N, N'- bis 2-ethane-sulfonic acid (Sigma)] 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA [ácido tetra acético diamino etileno (Merck., Whitehouse Station, NJ. USA)], 0,1% de CHAPS [3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane-sulfonate (Sigma)], 10% sacarose, 0,1% de Triton X-100 (Sigma), acrescido de PMSF [Phenylmethylsulfonyl fluoride (Sigma)] para 1mM, 2µM de Pepstatina A (Sigma) e 50µM de digitonina (Merck) em gelo por 30 minutos. Após o tempo de incubação, o lisado foi centrifugado a 16.000 x g a 4 °C por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi mensurada utilizando o reagente Bradford (BioRad., Hercules, CA, USA). Os lisados foram armazenados a -70 °C.

Para a obtenção de proteínas solúveis para Western Blot foram utilizados 10⁹ parasitas em 300 µL de tampão PBS (2,6 mM NaH₂PO₄; 7,4 mM Na₂HPO₄; 140 mM NaCl) pH 7,2 acrescido de coquetel inibidor de protease ProteoBlock 1:100 (ProteoBlock™ Inhibitor Cocktail – Fermentas). As amostras foram submetidas a 8 ciclos de congelamento em Nitrogênio líquido e descongelamento em banho Maria a 42 °C, e o lisado foi centrifugado a 16.000 x g a 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi mensurada utilizando o reagente Bradford (BioRad). Os lisados foram armazenados a -70 °C.

3.14 Análise da atividade de Cisteíno proteinases

Para cada extrato foram usados 1,5 mL de tampão para medida de atividade pH 8.0 (50 mM de Tris-HCl, 15 mM de NaCl, 5mM de Ditioneitol (DTT) (GE Healthcare) e 10mM de CaCl). Cubetas com tampão foram pré-incubadas por 1 minuto a 30,5 °C. Amostras de proteínas solúveis de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e substrato sintético para cisteíno-proteinases Z-Arg-Arg-AMC para 10 µM finais foram acrescentados às cubetas, que foram mantidas em temperatura controlada de 30,5 °C. A leitura foi monitorada continuamente em um fluorímetro Hitachi F-4500 com comprimento de onda de 380 nm para excitação e 460 nm para emissão. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência por minuto (UAF/min).

3.15 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida- SDS-PAGE

O gel de separação foi feito usando 10% acrilamida, 0,375 M de Tris pH 8,8, 0,1 % de SDS, 0,1% de persulfato de amônio e 0,04% de TEMED. Após sua polimerização aplicou-se o gel de empilhamento contendo 5% de acrilamida, 0,125M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % de SDS, 0,1 % de persulfato e 0,1% de TEMED, seguido do pente.

As amostras foram preparadas acrescentando-se tampão de amostra para 1x final (2,5% SDS, 0,25 M Tris/HCl pH 6.8, 0,625% azul de bromofenol, 5% 2β-mercaptoetanol, 0,625% glicerol), fervidas a 95 °C por 5 min e aplicadas nas canaletas do gel. A eletroforese foi realizada a 60 V para o gel de concentração 5% e a 100V para o gel de concentração de 10%, em tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl, 250 mM de glicina e 0,1% de SDS). O gel foi corado com azul de Coomassie (40% metanol, 10% ácido acético, 0,1% Coomassie BBlue R250) à temperatura ambiente e descorado com solução de 20% etanol e 5% ácido acético.

3.16 Western Blot

Ensaaios de Western Blot foram realizados para confirmar a presença da proteína MetaLa. As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE, seção 3.15) e as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose. A transferência foi feita em tampão de pH 8,2 contendo 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, 0,1% SDS, por 1 hora a 100 V (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979) utilizando-se o equipamento “Mini Trans-Blot” (Bio-Rad). A membrana foi corada com o corante Ponceau S (5% Ácido. Acético

e 0,2% Ponceau S) para confirmar a transferência das proteínas, descorada com água e armazenada a -20°C .

A membrana foi bloqueada com 5% leite em pó em PBS 0,05% Tween 20 por 1 hora, e em seguida incubada com o anticorpo primário [Meta1, Meta2, Meta purificado em coluna de Proteína G Sepharose (GE) ou anti-histidina (LifeTechnologies)] diluído em 2,5% leite em PBS 0,05% Tween 20 por 2 horas. Em seguida foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos com PBS 0,05% Tween 20 e incubou-se com anticorpo secundário também diluído em 2,5% leite em PBS 0,05% Tween 20 por 1 hora. Realizaram-se 3 lavagens como já descrito e a membrana foi incubada com substrato ECL (Amersham™ ECL™ detection systems, GE) por 5 minutos e exposta em filme de raio X (GE) para revelação.

3.17 Obtenção da Proteína Recombinante MetaLa em *Escherichia coli*

Uma colônia de *Escherichia coli* da linhagem BL21 (DE3) contendo o plasmídeo pET-28a com o inserto MetaLa foi inoculada em 15ml de meio LB líquido contendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina e incubada a temperatura de 37°C sob agitação constante em agitador orbital com velocidade de 200 rpm durante 24 horas. A cultura foi então diluída 50 vezes em 500 mL de LB líquido contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina e mantida a 37°C sob agitação até atingir uma DO (densidade óptica) de 0,6 em comprimento de onda de 600 nm. Em seguida induziu-se a expressão da proteína com adição de IPTG (LifeTechnologies) para 1mM final e incubação a 18°C por 24 horas (condição determinada após padronização com confirmação da indução por SDS-PAGE 10%). As bactérias foram coletadas por centrifugação a $3.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C e ressuspensas em 25 mL de tampão de sonicação (NaH_2PO_4 57 mM, NaCl 1,2 M pH 7,0) acrescido de lisozima para 0,4 mg/mL e PMSF para 1 mM. Para rompê-las utilizou-se o sonicador Unique Ultrasonic modelo DES500 na potência 48 por 5 minutos, mantendo-se a amostra em gelo por 5 minutos, e repetindo o procedimento quatro vezes. Os lisados foram centrifugados a 10.000 rpm (Sorvall rotor SS-34) durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado foi filtrado em um filtro de 0,45 μM e analisado por SDS-PAGE 10%.

O produto filtrado foi passado duas vezes em uma coluna de Níquel Ni-NTA (Qiagen) e lavado com 1000 mL de tampão 57 mM NaH_2PO_4 pH 6,0, 128 mM NaCl, 20 mM imidazol e 10% glicerina. As proteínas retidas foram eluídas da coluna com um gradiente de imidazol nas concentrações de 200 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM em tampão de lavagem e dialisadas contra o tampão de sonicação (57 mM NaH_2PO_4 , 1,2M NaCl pH 7,0). O material

recuperado após a diálise foi passado novamente pela coluna de Níquel Ni-NTA (Qiagen), eluído e quantificado pelo método de Bradford (Bio Rad).

3.18 Seleção de fagos ligantes de MCA

Para a seleção dos fagos ligantes da MCA, utilizou-se uma biblioteca randômica de peptídeos de 7 aminoácidos (“Ph.D -7 - New England Biolabs., Ipswich, MA, USA”), cujos peptídios são expressos na proteína III do capsídeo do fago. 15 µg de MCA na concentração de 100 µg/mL em 0.1 M NaHCO₃ pH 8,6 foram adsorvidos no poço de uma placa de 96 poços (Costar® EIA/RIA High binding) por incubação por toda a noite a 4 °C em um recipiente contendo papel toalha umidificado. A placa foi bloqueada com 150 µL de um tampão de bloqueio (0.1 M NaHCO₃ pH 8,6 e 5 mg/mL BSA) por 1 h a 4 °C, e lavada seis vezes com TBST (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% volume/volume de Tween 20). Foram acrescentados a cada poço 2×10^{11} fagos da biblioteca de peptídeos diluídos em 100 µL de TBST, e a placa foi mantida sob agitação por 1h a temperatura ambiente. Fagos não ligantes foram removidos pela lavagem da placa por dez vezes com TBST. Os fagos ligantes foram eluídos por incubação com 200 µL de *Escherichia coli* (ER2738) em fase de crescimento exponencial (OD₆₀₀= 0,5) por 5 minutos. Para a titulação dos fagos eluídos foram utilizadas diluições (10^3 , 10^4 e 10^5) em meio de cultura com *Escherichia coli* (ER2738) e plaqueamento em meio LB Agar (10 g de Bacto-Triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl e 15 g Bacto-Agar / litro) contendo IPTG (0,2 mM) e X-gal (40 µg/mL), juntamente com 3 mL de Agar Top (10 g de Bacto-Triptona, 5 g de extrato de levedura, 5g de NaCl e 7,5 g Bacto-Agar / litro). Após a incubação em estufa por toda a noite a 37 °C, as placas que apresentaram coloração azul (expressão do gene da β-galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738 e quebra do substrato X-Gal) foram contadas para obtenção dos títulos de recuperação de fagos (número de placas azuis multiplicado pelo fator de diluição).

3.19 Amplificação de fagos eluídos após seleção

O restante do volume de fagos eluídos foi utilizado para amplificação. Os fagos foram diluídos em 20 mL de cultura de *Escherichia coli* (ER2537) em fase inicial de crescimento (OD₆₀₀ 0,01- 0,05), e incubados por 4-5 horas em agitador com temperatura a 37 °C. A cultura foi transferida para um tubo Oak Ridge (Sorvall®, 50 mL) e centrifugada (10 min, 12.000 x g). As bactérias assim precipitadas foram descartadas e o sobrenadante transferido para um

tubo limpo e re-centrifugado. O sobrenadante recuperado foi transferido para um tubo estéril, adicionou-se 20% do volume de PEG/NaCl (20% peso/volume de Polietileno glicol-8000, 2,5M NaCl) e a mistura permaneceu em repouso por 12 horas a 4 °C. Para a precipitação dos fagos a mistura foi centrifugada 15 minutos a 12.000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi centrifugado rapidamente para que o sobrenadante residual pudesse ser removido. O precipitado foi ressuspensão em 1 mL de TBS, transferido para um microtubo e centrifugado por 5 minutos a 12.000 x g a 4°C para precipitar os resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo para a adição de PEG/NaCl (1/6 do volume). A mistura foi incubada em gelo por 1 hora e então centrifugada (10 min, 16.000 x g, 4 °C). O sobrenadante foi descartado e a centrifugação foi repetida para remoção de sobrenadante residual. O precipitado foi ressuspensão em 200 µL de TBS, obtendo-se então o eluato amplificado, pronto para a titulação.

Os fagos reamplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados em um segundo ciclo e assim subsequentemente, por um total de três ciclos, sendo que a partir do segundo ciclo a estrigência do tampão de lavagem foi aumentada de 0,1% para 0,5% de Tween-20 em todas as lavagens. Para as titulações dos fagos amplificados foram utilizados 10 µL dos fagos, as diluições (10^9 10^{10} e 10^{11}) foram incubadas com 200 µL de *Escherichia coli* (ER2738) em fase de crescimento exponencial por 5 minutos e plaqueadas em meio LB Agar contendo IPTG (0,2 mM) e X-gal (40 µg/mL), juntamente com 3 mL de Agarose Top. Após a incubação em estufa por toda a noite a 37 °C, as placas azuis foram contadas para a obtenção dos títulos (número de placas azuis multiplicado pelo fator de diluição).

3.20 Amplificação de placas de fagos

As placas que apresentaram coloração azul foram reamplificadas separadamente para o armazenamento e extração de DNA dos clones selecionados. Para isso, cada placa isolada obtida do 3º ciclo foi colocada em tubo de polipropileno de 15 mL contendo 4 mL de meio de cultura LB com *Escherichia coli* em fase inicial de crescimento (OD_{600} 0,01- 0,05) e incubada por 12 horas à 37 °C, sob agitação. O tubo foi centrifugado por 15 minutos a 2.000 x g para a coleta do sobrenadante da cultura. 1 mL deste foi transferido para outro tubo, adicionou-se 1 mL de Glicerol e armazou-se a -20 °C. O restante foi transferido para outro tubo no qual foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de polietileno glicol-8000, 2,5 M NaCl) e incubou-se por 12 horas à 4 °C. O tubo foi centrifugado por 15 minutos a 16.000 x g a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi ressuspensão em 100 µL de Tampão Iodeto (10

mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 4 M NaI). Foram adicionados 250 µL de etanol absoluto, incubando-se o tubo por 10 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação por 10 minutos a 16.000 x g e descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugando-se mais uma vez por 10 minutos a 16.000 x g. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 30 µl de água estéril. A qualidade do DNA presente nas amostras foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 1% e sequência determinada por sequenciamento como descrito na seção 3.12.

3.21 Análise das seqüências dos peptídeos dos fagos e identificação de potenciais ligantes da MCA

As seqüências dos peptídeos dos fagos selecionados (ligantes da MCA) foram analisadas considerando-se o número de vezes que um mesmo peptídeo apareceu e determinando-se os domínios semelhantes de três ou mais aminoácidos entre os peptídeos. Essas análises foram feitas utilizando a ferramenta Clustal W (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, 2012).

A análise da similaridade com proteínas conhecidas foi feita utilizando-se o banco de dados BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2012), critério *Search for short, nearly exact matches* para análises de pequenas seqüências. Foi analisada a identidade entre a seqüência do peptídeo e a seqüência no banco de dados, selecionando-se as com maior *score*.

Os peptídeos considerados mais importantes foram os que apareceram duas ou mais vezes. As proteínas consideradas potenciais candidatas a ligantes da MCA foram aquelas de alto *score* identificadas como semelhantes a dois ou mais peptídeos (mesmo que as seqüências destes fossem diferentes), e as que apresentavam localização ou função compatível com reguladores/ligantes da MCA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indução de morte celular em formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* por choque térmico

Induzimos promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* à morte celular por choque térmico e avaliamos a viabilidade celular por quantificação colomimétrica de um produto (formazan) formado pela redução do sal tetrazólico MTT pela enzima succinato desidrogenase ligada à membrana interna mitocondrial (TOWBIN et al., 1979). Esta metodologia tem sido empregada em vários sistemas celulares, e o número de células viáveis é proporcional à redução do MTT (BERRIDGE; TAN, 1993). Com o intuito de estudar os efeitos do choque térmico em promastigotas em fase logarítmica e estacionária, estes foram expostos a temperaturas de 22 °C (temperatura em que são mantidos em cultura), 34 °C (condição não letal para o parasita) e 37 °C (temperatura letal para o parasita) (MOREIRA et al., 1996).

No experimento mostrado na figura 2 a morte celular de promastigotas em fase logarítmica (terceiro dia de cultivo) foi induzida com choque térmico a 34 °C e 37 °C por diferentes períodos.

Figura 2- Viabilidade celular de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em fase logarítmica após choque térmico

Análise da viabilidade celular de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* após choque térmico nas temperaturas de 34 °C e 37 °C. Parasitas coletados durante a fase logarítmica (terceiro dia de cultura) foram submetidos a choque térmico durante 4 horas, Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de três experimentos independentes. $*=p\leq 0,05$.

Fonte: Peña (2012)

Obtivemos aproximadamente 85% de células viáveis após uma hora a 34 °C e a 37 °C. Após duas horas de choque a viabilidade celular a 37 °C caiu para próximo de 55% enquanto que à temperatura de 34 °C se manteve em 85%. Após três horas a 34 °C existiu uma queda da viabilidade celular para próximo de 75% e a 37 °C a viabilidade manteve-se próxima de 50%, e após quatro horas as viabilidades celulares nas duas temperaturas foram semelhantes às de três horas de choque.

Induzimos morte celular também de promastigotas em fase estacionária de crescimento (sexto dia de cultivo) com choque térmico a 34 °C e 37 °C por diferentes tempos (figura 3).

Figura 3 - Viabilidade celular de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em fase estacionária após choque térmico

Análise da viabilidade celular de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* após choque térmico à temperatura de 34 °C e 37 °C. Parasitas coletados durante a fase estacionária (sexto dia de cultura) foram submetidos ao choque térmico durante 4 horas, Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de três experimentos independentes. *=p≤0,05.

Fonte: Peña (2012)

Obtivemos aproximadamente 90% de células viáveis após uma e duas horas a 34 °C e 37 °C. Após três e quatro horas de choque a viabilidade celular em ambas as temperaturas diminuiu sendo aproximadamente 60% a 34 °C e 50% a 37 °C. A diferença entre a viabilidade celular após duas e três horas em temperatura de 37 °C foi estatisticamente significativa.

O padrão de queda de viabilidade com choque térmico foi bastante semelhante nos parasitas das fases logarítmica e estacionária. Em ambas as fases de crescimento os promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* apresentaram uma resistência ao choque térmico com temperatura de 34 °C durante as primeiras duas horas, e nas duas ultimas horas existiu uma queda na porcentagem de parasitas viáveis, sendo esta queda mais acentuada nos parasitas da fase estacionária. Promastigotas na fase logarítmica incubados em temperatura de 37 °C apresentaram sensibilidades semelhantes com choques de duas, três e quatro horas, enquanto que os de fase estacionária tiveram maior sensibilidade a partir de três horas de exposição. Este dado mostra que promastigotas na fase estacionária suportam um maior tempo à temperatura de 37 °C do que os de fase logarítmica, dado que já foi descrito em um trabalho com promastigotas de *Leishmania (L.) donovani* (ALZATE et al., 2007).

A maior abundância de promastigotas metacíclicos, resistentes a temperaturas mais altas, na fase estacionária da cultura justifica a maior sobrevivência ao choque térmico. Sabe-se que o choque térmico em *Leishmania (L.) donovani* induz a formação de superóxido

(ALZATE et al., 2007). Uma enzima que pode estar associada à resistência ao choque térmico é a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas a radicais de oxigênio. Foi mostrado que promastigotas estacionários de *Leishmania (L.) chagasi* expressam níveis mais elevados de SOD em relação à promastigotas em fase logarítmica (PARAMCHUK et al., 1997). Uma maior atividade da SOD deve diminuir a concentração de superóxido nos parasitas estacionários, corroborando nossas observações de que estes parasitas são mais resistentes à indução da morte celular por choque térmico. Outros trabalhos demonstraram que formas promastigotas em fase estacionária de *Leishmania (L.) donovani* são mais resistentes à lise por soro humano, (FRANKE et al., 1985), e que promastigotas de *Leishmania (L.) major* em fase estacionária tem maior expressão de MCA em comparação com promastigotas em fase logarítmica e amastigotas (AMBIT et al., 2008).

Como já mencionamos na introdução, o choque térmico promove um processo de morte celular em promastigotas de *Leishmania* semelhante à apoptose de eucariotos superiores (ALZATE et al., 2006; MOREIRA et al., 1996), e este processo está relacionado com a atividade catalítica da MCA, ou seja, com uma atividade “tripsina-like” (especificidade por arginina) (GONZALEZ et al., 2007; LEE et al., 2007; ZALILA et al., 2011). Com o intuito de avaliar a atividade da MCA após choque térmico em *Leishmania (L.) amazonensis* e correlaciona-la com a morte dos parasitas, medimos a atividade “tripsina-like” de promastigotas em fase logarítmica e estacionária submetidos a choque térmico a 34 °C e 37 °C. Os dados são mostrados nas figuras 3 e 4.

Figura 4 - Atividade tripsina-like em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em fase logarítmica após choque térmico

Atividade tripsina-like em 1,5 µg de proteínas citosólicas solúveis de promastigotas na fase logarítmica (terceiro dia de cultura), induzidos a morte celular por choque térmico nas temperaturas de 34 °C e 37 °C ou mantidos na temperatura de 22 °C (controle). Quantificação feita em fluorímetro utilizando 10 µM do substrato sintético para cisteíno-proteinases (Z-Arg-Arg-AMC). Resultados apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência por minuto (uaf/min). Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de três experimentos independentes. *= $p \leq 0,05$.

Fonte: Peña (2012)

Parasitas na fase logarítmica (figura 4) apresentaram um aumento na atividade tripsina like no choque térmico a 37 °C em comparação com o controle (22 °C) em todos os tempos de choque térmico, embora o aumento não tenha sido significativo com duas horas de choque. Após duas e três horas de choque a 34 °C os parasitas apresentaram ligeiro aumento (não significativo) na atividade em relação ao controle.

Figura 5 - Atividade tripsina-like em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em fase estacionária após choque térmico

Atividade tripsina-like em 1,5 µg de proteínas citosólicas solúveis de promastigotas na fase estacionária (sexto dia de cultura), induzidos a morte celular por choque térmico á temperaturas de 34 °C e 37 °C, ou mantidos a 22 °C (controle). Quantificação feita em fluorímetro utilizando 10 µM do substrato sintético para cisteíno-proteinases (Z-Arg-Arg-AMC). Resultados apresentados em unidades arbitrária de fluorescência por minuto (uaf/min). Análise estatística utilizada: ANOVA. Resultado de três experimentos independentes. *= $p \leq 0,05$.

Fonte: Peña (2012)

Observamos que para parasitas na fase estacionária (figura 5) existiu um aumento na atividade tripsina-like com choque térmico de 37 °C por uma hora tanto em relação ao controle quanto a temperatura de 34 °C. Quando mantidos na densidade estabelecida para o experimento durante duas horas houve aumento da atividade em qualquer das temperaturas, mesmo a 22°C. Esse achado curioso sugere que a alta densidade de parasitas em fase estacionária pode aumentar a atividade tripsina-like. Após três horas a 37 °C existiu uma queda significativa comparada com o controle e com 34 °C. Após quatro horas observamos uma queda na atividade em todas as temperaturas. Visto que a viabilidade dos parasitas (figura 3) não sofreu uma queda comparável com a da atividade, podemos postular que a MCA estaria sofrendo alguma regulação específica, talvez por processamento, que reduz sua atividade e possibilita o desempenho de outras funções nos promastigotas nesta fase de crescimento. De fato, sabe-se que a MCA pode participar da morte celular independente de sua atividade catalítica, e que participa de outros processos além da morte celular em *Leishmania*. Em *Leishmania (L.) major* a MCA pode se localizar na mitocôndria (AMBIT et al., 2008; ZALILA et al., 2011) e concentra-se no cinetoplasto e no núcleo durante a mitose. A super expressão da MCA causa defeitos na segregação do cinetoplasto, divisão nuclear e citocinese, retardando o crescimento e gerando células com ploidias aberrantes, mostrando ser

essencial para divisão nuclear e celular (AMBIT et al., 2008). Para o choque a temperatura de 34 °C só existiu aumento da atividade em relação ao controle após três horas de tratamento. Já foi mostrado que a atividade da MCA de *Leishmania* aumenta quando o parasita entra em processo de morte celular (GONZALEZ et al., 2007). Comparando os dados de MTT (figuras 2 e 3) e de atividade tripsina-like (figuras 4 e 5) de promastigotas submetidos a choque térmico, mostramos que a atividade da MCA de *Leishmania (L.) amazonensis* é maior na temperatura mais letal para o parasita (37 °C). Essas observações corroboram o envolvimento da MCA na morte celular programada por choque térmico.

A morte celular induzida por choque térmico, peróxido de hidrogênio ou por drogas como Miltefosina e Curcumina mostrou-se capaz de ativar um processamento da MCA de *Leishmania (L.) major* (GONZALEZ et al., 2007; ZALILA et al., 2011). Para avaliar se havia mudanças nos níveis ou no padrão de processamento da MCA de *L. (L.) amazonensis* após o choque térmico a 37 °C fizemos um Western Blot para metacaspase. Para isso, utilizamos um anticorpo denominado anti Meta 1, obtido a partir de imunização de coelhos com um peptídeo sintético desenhado com base em uma região da sequência da MCA de *Leishmania (L.) amazonensis* mostrada na figura 6 e extratos de promastigotas das duas fases submetidos a diferentes tempos de choque térmico. Os resultados para parasitas em fase logarítmica e estacionária são mostrados nas figuras 7 e 8, respectivamente.

Figura 6 - Localização no gene da metacaspase e sequência do peptídeo utilizado para produção do anticorpo anti Meta 1

```
MADLFDILGI GAVATLIPML ANGLLLVDRP KRVDINAGRR LIHTVRPIIP YRAPVPYTGG
RVRALFIGIN YTGTRNALRG CVNDVGSM LG TLQQITFPIS ECCILVDDPS FPGFSAMLTR
ENIIKHMLWL TGDVRPGDVL FFHESGHGGQ TKAKRDTEEK YDQC LIPLDH IGNGSILDDD
LFLMLVAPLP PGVRMTCVFD CCHSASMLDL PFSYVTPRVG GGGAREYMQQ VRRGNFSNGD
VVMFSGCTDS GTSADVQNGG HANGAATLAF TWSLLNTHGF SYLNILLKTR EELRKKGRVQ
VPQLTSSKPI DLYKPFSLFG MITVNTSM MH CVPQQYHQPP QSLPPQVMPP PMGYPAYVPR
PPQSYYP PPQ RQVWGSGYPA QEYLAQRIPV QQATPGVSGC PTSQYLPAPP SAPYAPPPPA
QYGPQQPPPA QYTFGPLPPR
```

Fonte: Peña (2012)

Figura 7 - Western Blot para MCA em proteínas solúveis de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em fase logarítmica após choque térmico a 37°C

Fonte: Peña (2012)

Figura 8 - Western Blot para MCA em proteínas solúveis de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em fase estacionária após choque térmico a 37°C

Fonte: Peña (2012)

Na fase logarítmica (figura 7) existe um padrão de bandas similar após choque térmico e no controle (22 °C). Esse padrão é caracterizado por duas bandas conspícuas próximas de 55 e 50 kDa em todos os tempos de incubação, e por essas bandas e duas adicionais de aproximadamente 36 e 40 kDa em duas e três horas de incubação nas duas temperaturas.

Na fase estacionária (figura 8) o padrão de bandas também é semelhante com e sem choque térmico. Em todas as incubações com exceção da de uma hora a 22 °C observamos bandas de 55 e 50 kDa e bandas próximas de 40, 36 e 22 kDa. Em todas as temperaturas e

tempos a banda de 55 kDa é a mais intensa, seguida pela de 50 kDa. As três bandas menores devem ser resultado o processamento da MCA e são sempre menos intensas, sendo as intensidades de 40 e 36 kDa normalmente semelhantes. No controle de 1 hora as bandas de 40 kDa e de 36 kDa não são visíveis, e após o choque térmico de 4 horas a banda de 40 kDa não é visível, embora a de 36 kDa seja.

Os resultados apresentados sugerem que o choque térmico nas condições adotadas não altera o processamento da MCA de *Leishmania (L.) amazonensis*. Além disso, mostramos que promastigotas na fase estacionária, mesmo sem choque térmico, apresentam um maior processamento da MCA, visto que apresentam mais bandas do que os de fase logarítmica. A comparação do padrão do Western blot com os dados de atividade tripsina-like (figuras 4 e 5) sugere que o processamento que origina as bandas de 40, 36 e 22 kDa não está associado a mudanças na atividade da enzima.

4.2 Produção da metacaspase (MetaLa) recombinante de *Leishmania (L.) amazonenses*

Para obtenção da MCA recombinante de *Leishmania (L.) amazonensis* clonamos o gene completo em um vetor de expressão em bactéria.

Desenhamos oligonucleotídeos iniciadores para amplificar o gene completo da MCA com base na sequência disponível de *Leishmania (L.) mexicana*, e o produto da PCR obtido apresentou o tamanho esperado próximo de 1323 pb, como mostrado na figura 9.

Figura 9 - Gel de agarose 1% mostrando o produto de PCR amplificado com oligonucleotídeos de MCA

Produto de PCR amplificado com oligonucleotídeos de MCA.

Fonte: Peña (2012)

O produto da reação de PCR foi clonado em vetor de seqüenciamento pCR4 TOPO e os plasmídeos resultantes foram usados para transformar bactérias *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes. A identidade dos insertos como metacaspase foi confirmada por seqüenciamento. Um dos plasmídeos confirmados foi digerido com enzima de restrição *EcoRI* para liberação do inserto que foi então clonado no vetor de expressão pET 28a, que gera uma proteína de fusão contendo uma sequência de histidinas. Os plasmídeos obtidos foram usados em transformações de bactérias *Escherichia coli* BL21 (DE3) quimiocompetentes. Selecionamos os clones contendo o plasmídeo pET-28a com o inserto MetaLa, que foram induzidos com IPTG em diferentes concentrações, temperaturas e tempos. O resultado obtido após padronização da melhor condição de indução é mostrado na figura 10

Figura 10 - SDS PAGE 10% com proteínas totais de *Escherichia coli* BL21 (DE3) com pET-28a contendo o inserto MetaLa

Amostra não induzida (1) e induzida (2) com 0,1 mM de IPTG durante 24 horas a 18 °C.

Fonte: Peña (2012)

Os resultados mostrados no gel acima são intrigantes. Nota-se a ausência de uma banda induzida do tamanho esperado próximo de 47,2 kDa, tamanho descrito para MCA integra de *Leishmania (L.) major* (GONZALEZ et al., 2007), e a presença de uma proteína induzível com IPTG com o tamanho de aproximadamente 25 kDa, menor do que o esperado para a forma processada da MCA de *Leishmania (L.) amazonensis*, que seria de 31 kDa (GONZALEZ et al., 2007; ZALILA et al., 2011).

O extrato induzido por IPTG foi submetido à purificação em coluna de níquel. O resultado da purificação da proteína recombinante em coluna de níquel é mostrado na figura 11. Observamos uma proteína purificada com tamanho próximo de 55 kDa, portanto maior que o esperado em comparação ao da MCA de *Leishmania (L.) major*, e a proteína com o tamanho próximo de 25 kDa, já vista no extrato induzido antes da purificação (figura 10).

Figura 11 - SDS PAGE 10% com proteína recombinante (MetaLa)

MetaLa purificadas pela coluna de Níquel Ni-NTA (Qiagen) e eluída com 500 mM de imidazol.

Fonte: Peña (2012)

A partir desses resultados acreditamos que a bactéria tenha produzido uma MCA cuja maior parte sofreu processamento, o que justificaria a não visualização da banda da proteína íntegra e a presença da banda de 25 kDa no extrato induzido. Após a purificação, a proteína íntegra estaria enriquecida pela ligação à coluna e por isso foi visualizada. Este evento de processamento da MCA de *Leishmania* já foi descrito em outros trabalhos (GONZALEZ, 2009; GONZALEZ et al., 2007; LEE et al., 2007; ZALILA et al., 2011). Uma outra hipótese é que alguma protease bacteriana tenha processado a MCA, com isto formando fragmentos próximos de 25 kDa. Este tipo de evento já foi visto em células de *Saccharomyces cerevisiae* transfectadas com a MCA de *Leishmania (L.) major*, nas quais foram encontrados produtos de processamento (GONZALEZ et al., 2007), e também em *Escherichia coli* na qual houve um processamento da MCA recombinante de *Arabidopsis thaliana* (CASTILLA et al., 1995).

A identidade dessa proteína como MCA foi confirmada por Western Blot utilizando o anticorpo anti Meta 1, como mostrado na figura 12.

Figura 12 - Western Blot de proteínas totais e solúveis de *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformada com plasmídeo com MetaLa, MCA recombinante e proteínas solúveis de promastigotas de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*

TB proteínas totais de bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) MetaLa não induzida com IPTG, **T** proteínas totais de *E. coli* BL21 (DE3) MetaLa induzida com 0,1 mM de IPTG durante 24 horas a 18 °C, **S** proteínas solúveis de *E. coli* BL21 (DE3) induzida com 0,1 mM de IPTG durante 24 horas a 18 °C, **R** MCA recombinante (MetaLa) purificada em coluna de níquel, **T-**, **S-** e **R-** controles apenas com anticorpo secundário. Para extratos bacterianos usamos anti Meta 1 diluído 1:6400, para a proteína recombinante 1: 1600

Fonte: Peña (2012)

Na figura 12 observamos que proteínas totais e solúveis de *Escherichia coli* BL21 (DE3) com MetaLa induzidas com IPTG apresentaram duas bandas reconhecidas pelo anticorpo anti-Meta 1, uma próxima de 55-60 kDa e outra próxima de 25 kDa., semelhante às observadas na MCA recombinante (MetaLa) purificada em coluna de níquel. Um trabalho recente (ZALILA et al., 2011) demonstrou por Western Blot o processamento da MCA de *Leishmania* (*L.*) *major*, *Leishmania* (*V.*) *guyanensis*, *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, *Leishmania* (*S.*) *tarentolae* e *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*. Em todas as espécies de *Leishmania* analisadas o Western Blot mostrou duas bandas mais fortes, uma próxima de 31 kDa e outra banda próxima de 14 kDa, sendo este dado o único da MCA de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* publicado até hoje. Este trabalho mapeou todos os possíveis sítios importantes para a maturação da MCA de *Leishmania* (*L.*) *major* e definiu três regiões da MCA (figura 13): o domínio N-terminal que pode codificar um *mitochondrial localization signal* (MLS) já demonstrado para MCA de *Leishmania* (*L.*) *major* (AMBIT et al., 2008), o qual é clivado de forma independente da sua atividade de auto processamento; um domínio catalítico que pode ser suficiente para induzir a morte celular em *Leishmania* e cuja super expressão pode aumentar a sensibilidade dos parasitas a espécies reativas de oxigênio; e a região C- terminal que consiste de uma extensão rica em prolinas. Estas três regiões e os sítios para a maturação da MCA de *Leishmania* (*L.*) *major* são conservados na MCA de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*. Com estas informações mapeamos todas as formas da MCA processada (figura

14) e mostramos os possíveis tamanhos preditos pela análise da sequência de aminoácidos (programa DNASTar protean).

Figura 13 - Representação esquemática da MCA de *Leishmania (L.) major*

Domínio N-terminal (N-ter) (cinza claro) com o sinal de localização mitocondrial (MLS), um domínio catalítico (preto), com a díade H147 e C202, e uma região C-terminal (C-ter) rica em prolina (cinza escuro). As setas indicam os locais de clivagem.

Fonte: Zalila et al. (2011)

Figura 14 - Alinhamento de todas as formas processadas da MCA de *Leishmania (L.) amazonensis* que contem a região correspondente ao peptídeo utilizado para obtenção do anticorpo anti Meta1

Sequências de aminoácidos foram alinhadas usando a ferramenta ClustaW. Argininas na posição P1 de potenciais sítios de clivagem (vermelho), díade catalítica H e C (amarelo), domínio N-terminal (azul), região C-terminal (preto) e sequência correspondente ao peptídeo utilizado para produção do anticorpo anti Meta1 (verde).

Fonte: Peña (2012)

Levando em consideração a localização do peptídeo utilizado para produção do anticorpo, este reconheceria oito formas da MCA processada cujos tamanhos variam de 24.16 kDa até 41.46 kDa (média de tamanho próxima a 33.22 kDa), e a forma não processada com tamanho estimado de 51.84 kDa. No Western Blot mostrado na figura 12 extratos totais e solúveis de *Escherichia coli* BL21 (DE3) expressando MetaLa induzida com IPTG apresentaram duas bandas reconhecidas pelo anticorpo, sendo uma próxima de 55-60 kDa e outra próxima de 25 kDa. Acreditamos que a banda próxima de 55-60 kDa seja da MCA integra, embora o tamanho previsto seja de 51.84 kDa. A diferença entre o tamanho teórico e o aparente da MCA no Western Blot e SDS PAGE pode ser explicado pela presença de um

domínio rico com prolina. Este aminoácido apresenta uma cadeia lateral ligada ao nitrogênio da amida, introduzindo uma estrutura em anel com 5 átomos (pirrolidina) na cadeia peptídica que restringe a liberdade rotacional do aminoácido que o precede diminuindo da mobilidade eletroforética da proteína (LEE et al., 2007; RENFRANZ; BECKERLE, 2002).

A banda próxima de 25 kDa pode ser um dos produtos de processamento da MCA. De fato, baseando-se na figura 14 existem três formas da MCA processada que apresentam tamanhos próximos a 25 kDa, contendo apenas a região catalítica sem as regiões N- terminal e C- terminal. Outras formas processadas que contem a região rica em prolinas podem ter uma mobilidade eletroforética afetada e portanto tamanhos diferentes dos teóricos. No Western Blot da figura 12 também foram observadas duas bandas próximas de 55-60 kDa e 25 kDa para a proteína recombinante, que devem corresponder à forma íntegra com o tamanho de 51.84 kDa e uma forma processada que mantém a sequência de seis histidinas de tamanho teórico de 36.14 kDa. Mais uma vez observamos tamanhos diferentes dos previstos no Western Blot e no SDS PAGE

Buscamos então verificar se a MetaLa produzida em bactéria tinha função enzimática. Para isso, medimos a atividade “tripsina-like” de proteínas solúveis de bactérias transformadas com o vetor de expressão vazio, com o vetor contendo o gene da MCA e não transformadas. Os resultados são mostrados na figura 15.

Figura 15 - Atividade tripsina-like em 20µg de proteínas solúveis de *Escherichia coli* BL21 DE3 utilizando 10 µM do substrato Z-Arg-Arg-AMC

Extratos de proteínas solúveis de bactérias transformadas ou não com os vetores de expressão pET 28a e pET 28a MetaLa induzidas ou não com 0,1mM de IPTG a 18 °C durante 24 horas. Quantificação feita em fluorímetro utilizando 10 µM do substrato sintético para cisteíno-proteinases Z-Arg-Arg-AMC. Resultados apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência por minuto (uaf/min), como média e desvio de um experimento com triplicatas técnicas.

Fonte: Peña (2012)

Em bactérias com o vetor pET 28a e em bactérias sem o vetor induzidas ou não com IPTG houve uma atividade basal “tripsina-like” de enzimas que não a MCA (figura 9). As bactérias transformadas com MetaLa apresentam maior atividade tripsina-like do que as demais. Essa atividade pode ter sido aumentada pelo processamento da MetaLa por enzimas bacterianas com atividade tripsina-like durante a indução, gerando uma forma com maior capacidade catalítica. Outra hipótese seria que o pH bacteriano proporcionaria uma condição ideal para a atividade de MetaLa mesmo em sua forma íntegra, o que promoveria seu auto processamento e conseqüente aumento da atividade. Essa hipótese é reforçada pela informação de que a atividade de MCA é variável de acordo com o pH do ambiente (CASTILLA et al., 1995). Curiosamente, a atividade de extratos bacterianos contendo MetaLa induzidos com IPTG é significativamente menor do que sem IPTG. Uma possível explicação para esse achado é que o IPTG aumentou muito a expressão da MCA, o que levou a um processamento excessivo gerando fragmentos sem atividade catalítica.

Ao contrário dos extratos de bactérias transformadas com MetaLa, a proteína recombinante purificada não apresentou atividade tripsina-like (dados não mostrados). Nossos dados de Western Blot nos levam a acreditar que a proteína produzida pela bactéria e

purificada em coluna de histidina seja de fato a MetaLa íntegra, mas que após purificação ela não sofra o processamento responsável pelo aumento de atividade tripsina-like. É possível que a forma íntegra não apresente atividade tripsina-like porque é necessário um processamento para induzir a atividade catalítica, como já observado para *Leishmania (L.) major* (GONZALEZ et al., 2007). Em *Leishmania* foi descrito que a liberação de enzimas lisossomais é um possível mecanismo de morte (ZANGGER; MOTTRAM; FASEL, 2002) e que a ruptura da membrana lisossômica liberaria uma grande quantidade de catepsina que poderia processar a MCA. Estes resultados sugerem que a MCA pode ser clivada por outras enzimas, o que leva à maturação de seu sítio catalítico. Para verificar essa hipótese, incubamos a MetaLa recombinante com tripsina para induzir esse processamento. Inicialmente fizemos uma curva de tripsina com o intuito de avaliar qual seria a menor quantidade da enzima capaz de clivar o substrato para cisteíno-proteinases emitindo uma fluorescência detectável (figura 16). A menor quantidade de tripsina usada, 0,001µg, foi capaz de emitir uma média de 30 unidades arbitrárias fluorescentes por minuto.

Figura 16 - Curva de atividade cisteíno-proteinase de diferentes massas de tripsina

Quantificação feita em fluorímetro utilizando 10 µM do substrato sintético para cisteíno-proteinases (Z-Arg-Arg-AMC). Resultados apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência por minuto (uaf/min), como média e desvio de um experimento com triplicatas técnicas.

Fonte: Peña (2012)

Utilizando a menor quantidade de tripsina capaz de clivar o substrato emitindo fluorescência, nós pré incubamos 5 µg, 25 µg e 125 µg de MCA com tripsina por 1 hora em tampão de atividade a 37 °C e posteriormente medimos a fluorescência no fluorímetro (figura 17).

Figura 17 - Curva de atividade cisteíno-proteinase de tripsina e MCA

Atividade tripsina-like em 5 µg de de MCA recombinante pré-incubada com 0,001 ug tripsina (Promega) por 1 h a 37 °C. Quantificação feita em fluorímetro utilizando 10 µM do substrato sintético para cisteíno-proteinases (Z-Arg-Arg-AMC). Resultados apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência por minuto (uaf/min), como média e desvio de um experimento com triplicatas técnicas.

Fonte: Peña (2012)

A quantidade de 5µg da MCA apresentou a maior atividade cisteíno protease, a única significativamente elevada em relação à da tripsina. Curiosamente, 125 µg de MCA não apresentaram nem mesmo atividade semelhante à da tripsina. Uma hipótese é que o excesso de MCA impeça que a tripsina clive o substrato e que este mesmo excesso iniba a atividade da MCA. Uma outra hipótese é a de que o excesso de MCA leve a autoclivagens excessivas gerando fragmentos sem atividade. Esta hipótese é reforçada pelo observado na figura 15, na qual mostramos que o extrato bacteriano contendo MetaLa induzido com IPTG tem atividade significativamente menor do que sem IPTG, sugerindo também que o excesso de MCA leve à redução da atividade e portanto da capacidade de clivar o substrato sintético para cisteíno-proteinases.

4.3 Phage Display com bibliotecas de peptídeos para identificar ligantes da MCA de *Leishmania (L). amazonensis*

Para selecionar os fagos ligantes a MCA foi utilizada a Biblioteca Ph.D.TM- 7 Phage Display Peptide Library Kit (New England Biolabs). A biblioteca foi incubada diretamente sobre a proteína MCA recombinante (MetaLa) imobilizada em placa, seguindo as orientações do fabricante. O processo de seleção foi repetido por três ciclos com a biblioteca 7 e em todas as etapas a eluição de fagos foi feita por infecção bacteriana. No quadro 1 mostramos um

aumento no número de fagos eluídos ao longo dos ciclos de seleção com MCA, indicando um enriquecimento sucessivo.

Quadro 1 - Seleção dos fagos com peptídeos ligantes a MCA.

Biblioteca	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Proteína
7	$17,8 \times 10^5$ pfu	20×10^5 pfu	26×10^5 pfu	MCA

Títulos (em pfu= unidades formadoras de placas) obtidos no processo de biopanning.

Fonte: Peña (2012)

Após o terceiro ciclo de seleção sobre a MCA selecionamos aleatoriamente 50 fagos para seqüenciamento. O DNA extraído dos fagos foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para verificar sua qualidade e foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop - Thermo Scientific). As sequências dos insertos dos 50 fagos foram convertidas em aminoácidos e as sequencias peptídicas resultantes foram alinhadas com o auxílio do programa Clustal W (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE,2012), para identificar possíveis motivos peptídicos (domínios semelhantes) enriquecidos durante o processo de seleção por Phage Display. Os resultados são mostrados no quadro 2.

Quadro 2 - Sequências de aminoácidos dos clones ligantes a MCA selecionados alinhadas pelo programa Clustal W

Peptídeo	Frequência Observada	Clustal W
ATWVSPY	2/50	ATWVSPY----
SVSPISH	1/50	S--VSPISH--
STSPESA	2/50	S--TSPESA--
GVQSPHF	4/50	---GVQSPHF--
QSFWFHA	1/50	----QSFWFHA
VPFPSAS	2/50	--VPFPSAS--
AFPSPTD	1/50	--AFPSPTD--
FPPFQTQ	1/50	----FPPFQTQ--
GSTPNWH	2/50	----GSTPNWH--
ALHGPTP	1/50	-ALHGPTP----
VALSAPY	1/50	--VALSAPY--
YAAHRSH	5/50	---YAAHRSH--
QFATQSH	1/50	---QFATQSH--
TNPHLNW	1/50	---TNPHLNW--
NHRPHLD	1/50	--NHRPHLD--
DFHHASM	1/50	---DFHHASM--
GHYASGC	1/50	---GHYASGC--
IDPQTIH	2/50	---IDPQTIH--
ISPQTPT	1/50	---ISPQTPT--
TPLTPHQ	1/50	----TPLTPHQ--
GIHTLMG	2/50	---GIHTLMG--
YIPTAMK	1/50	---YIPTAMK--
KFPAINQ	5/50	---KFPAINQ--
APSFTKH	1/50	----APSFTKH--
HSAHENS	1/50	---HSAHENS--
LIAASNN	1/50	---LIAASNN--
NSHSMPF	1/50	---NSHSMPF--
TSSHAPL	1/50	---TSSHAPL--
LPPSSRM	1/50	---LPPSSRM--
VIIVPPA	1/50	---VIIVPPA--
VAPWEKL	1/50	---VAPWEKL--
QIGYQRA	1/50	---QIGYQRA--
ADRAWAR	2/50	---ADRAWAR--

Sequência dos peptídeos dos fagos ligantes a MCA representada na primeira coluna, frequência de cada sequência na segunda coluna e alinhamento pelo programa Clustal W na terceira coluna, no qual aminoácidos: verdes = polares, vermelhos = hidrofóbicos, azuis = ácidos, rosas = básicos

Fonte: Peña (2012)

Como podemos observar no quadro 2, dentre as 50 sequências de peptídeos duas se repetiram cinco vezes, uma se repetiu quatro vezes e sete sequências se repetiram duas vezes. O alinhamento obtido mostrou que quatro sequências de três aminoácidos consecutivos se repetiram em mais de uma sequência de fago. Considerando a grande diversidade de fagos da biblioteca usada ($2,7 \times 10^9$) sequências distintas distribuídas nos 2×10^{11} fagos usados), as repetições encontradas indicam que ao longo de três ciclos existe uma seleção de algumas

sequências de três resíduos de aminoácidos consecutivos assim como de peptídeos com maior afinidade pela MCA. As sequências que se repetiram mais de uma vez (dois ou mais fagos iguais) ou que apresentaram trincas de aminoácidos compartilhadas com outro peptídeo foram escolhidas para análise. Essas 15 sequências peptídicas foram usadas para busca por identidade em bancos de proteínas não redundantes de qualquer organismo e especificamente de *Leishmania* (NCBI).

Visto que os resultados dessa busca geraram inúmeras proteínas candidatas, escolhemos para futuras análises aquelas já descritas em *Leishmania* e algumas proteínas de outros organismos que tem funções especialmente interessantes como potenciais ligantes de metacaspase e que tem pelo menos três aminoácidos iguais ao homólogo de *Leishmania*. O quadro 3 mostra proteínas candidatas selecionadas por esses critérios. Apresentamos nela as sequências dos fagos e informações sobre a proteína. Quando a proteína selecionada não era de *Leishmania* buscamos a proteína homóloga de *Leishmania* e transcrevemos a região correspondente ao peptídeo.

Quadro 3 - Peptídeos selecionados e proteínas potencialmente ligantes da MCA.

Sequência dos Peptídeos	Organismo	Número de acesso	Proteína candidata	Max score	Seq. da Proteína	Descrição da proteína
ADRAWAR	<i>Leishmania donovani</i>	gi 322496980 CBZ32050.1	<i>ras family protein-like protein</i>	20.6	RAWAR	Removem moléculas de ubiquitina
ADRAWAR	<i>Leishmania major</i>	gi 197724328 ACH72814.1	<i>mitochondrial edited mRNA stability factor 1</i>	20.6	DRAWA	Ativador deGTPase
ADRAWAR	<i>Leishmania mexicana</i>	gi 322489534 	<i>serine peptidase, clan SB, family S8-like protein</i>	20,6	RAWAR	Inibição do crescimento por regulação da tradução
AFPSPTD	<i>Leishmania donovani</i>	gi 322500084 CBZ35160.1	<i>6-phosphogluconolactonase</i>	19.3	FPSPT	Família semelhante ema de tripsina-proteases
AFPSPTD	<i>Leishmania mexicana</i>	gi 322491788 CBZ27061.1	<i>kinesin</i>	18.9	AFPSPT	regulação de íon de zinco para a atividade de isopeptidase para liberar ubiquitina de proteínas ubiquitinadas
ATWVSPY	<i>Leishmania infantum</i>	gi 146098297 XP_001468387.1	<i>delta-12 fatty acid desaturase</i>	19.7	ATWVS	Regula processos celulares como proliferação, divisão, diferenciação

ATWVSPY	<i>Anaerolinea thermophila</i>	gi 320160743 YP_004173967.1	<i>threonine dehydratase</i>	25.2	ATW SPY	Promove o início da degradação de aminoácidos e a remoção de nitrogênio
	<i>Leishmania major</i>	gi 157864267 XP_001680844.1	<i>putative serine-threonine dehydratase</i>	56.2	AT	
ATWVSPY	<i>Leishmania major</i>	gi 157864147 XP_001680787.1	<i>kinesin</i>	23.1	ATWVS P	Transporte intracelular e na divisão celular
GIHTLMG	<i>Leishmania mexicana</i>	gi 322492700 CBZ27977.1	<i>metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3</i>	20.6	IH LMG	Degradação de peptídeos liberados pelo proteassoma
GVQSPHF	<i>Leishmania donovani</i>	gi 322497871 CBZ32947.1	<i>ubiquitin hydrolase</i>	20.2	QSPHF	A expressão parece ser dependente da temperatura, alteram a fluidez da membrana celular
GVQSPHF	<i>Leishmania major</i>	gi 157877608 XP_001687121.1	<i>protein kinase</i>	18.0	G QSPH	Regula processos celulares como proliferação, divisão, diferenciação
IDPQTIH	<i>Leishmania major</i>	gi 157875514 XP_001686146.1	<i>cysteine-leucine rich protein</i>	18.0	IDP TI	Regulador negativo do sinal via de transdução
ISPQTPT	<i>Cyanothec sp.</i>	gi 218441415 YP_002379744.1	<i>serine/threonine protein kinase</i>	22.7	SPQTPT	Regula processos celulares como proliferação, divisão, diferenciação
	<i>Leishmania mexicana</i>	gi 322488579 CBZ23826.1	<i>putative protein kinase</i>		TPT	
STSPESA	<i>Leishmania major</i>	gi 157877343 XP_001686993.1	<i>glycosyl hydrolase</i>	20.6	TSPESA	Cliva a porção C terminal de um amido ou de uma glicoproteína
STSPESA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	gi 151941774 EDN60130.1	<i>GTPase-activating protein</i>	23.1	STSPES A	Ativador deGTPase
	<i>Leishmania mexicana</i>	gi 322493673 CBZ28963.1	<i>GTPase activator-like protein</i>	52.4	SA	
SVSPISH	<i>Sporothrix schenckii</i>	gi 342305312 BAK55719.1	<i>cytochrome oxidase subunit 2</i>	21.8	VSPISH	Domínio N-terminal da citocromo C oxidase
	<i>Leishmania donovani</i>	gi 50957201 AAT91063.1	<i>cytochrome oxidase subunit 2</i>		VSPISH	
SVSPISH	<i>Leishmania donovani</i>	gi 322497135 CBZ32206.1	<i>protein kinase</i>	18.0	SV P SH	Regula processos celulares como proliferação, divisão, diferenciação
TNPHLNW	<i>Leishmania major</i>	gi 157870912 XP_001684006.1	<i>phosphoglycan galactosyltrans.6</i>	18.9	HLNW	Síntese de oligossacáridos 1 e 2

TNPHLNW	<i>Leishmania mexicana</i>	gi 322490901 CBZ26165.1	<i>cyclophilin-like protein</i>	16.8	PHLN	Acelera o enrolamento de proteínas e catalisando a isomerização cis-trans
TNPHLNW	<i>Leishmania major</i>	gi 157865052 XP_001681234.1	<i>cyclin I; serine peptidase family S51, peptidase E</i>	16.8	PHLN	Degrada peptídeos intracelulares ou importados para a célula como fontes de nutrientes
TNPHLNW	<i>Leishmania mexicana</i>	gi 322489251 CBZ24507.1	<i>protein kinase</i>	17.6	PHLN W	Regula processos celulares como proliferação, divisão, diferenciação.
VPFPSAS	<i>Leishmania major</i>	gi 157875920 XP_001686327.1	<i>G-actin binding protein</i>	18.9	PFPSA	Interage com monômeros e filamentos de actina.
VPFPSAS	<i>Leishmania major</i>	gi 157875050 XP_001685932.1	<i>protein kinase</i>	21.8	VPFPSA	Regula processos celulares como proliferação, divisão, diferenciação
VPFPSAS	<i>Leishmania infantum</i>	gi 146076344 XP_001462903.1	<i>serine-threonine protein kinase</i>	18.9	PFPSA	Regula processos celulares como proliferação, divisão, diferenciação
VPFPSAS	<i>Leishmania major</i>	gi 157866216 XP_001681814.1	<i>kinesin</i>	19.3	VPFPS	Transporte intracelular e divisão celular
YAAHRSH	<i>Leishmania mexicana</i>	gi 322494717.1	<i>kinesin</i>	18	AAHR H	Transporte intracelular e divisão celular

Fonte: Peña (2012)

Dentre as proteínas escolhidas, cinco apresentaram similaridade com proteínas quinases (quadro 3), que são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas em treonina, serina (quinase específica para Ser/Thr) ou tirosina (quinase específica para Tyr) pela transferência de um grupo fosfato de ATP e, em casos excepcionais, de GTP. A fosforilação destes resíduos é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares, sendo um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas. Em eucariotos, proteínas quinases estão envolvidas em uma grande variedade de funções incluindo metabolismo, expressão de genes, diferenciação e transporte (DURRENBERGER; WONG; KRONSTAD, 1998; THOMASON et al., 1998), no entanto, não existem muitas informações disponíveis para parasitas da ordem Kinetoplastida (NAULA et al., 2001). Duas subunidades catalíticas de proteínas quinases A (PKAC) de *Leishmania (L.) major* foram descritas com papel regulador (SIMAN-TOV et al., 1996; SIMAN-TOV; IVENS; JAFFE, 2002) e uma subunidade de *Leishmania (L.) donovani* foi descrita como reguladora PKA (PKAR), a qual parece modular a metaciclologênese do parasita e a autofagia resultante da falta de nutrientes

(BHATTACHARYA; BISWAS; DAS, 2008, 2012). O processo de autofagia é importante para a degradação de proteínas e organelas durante a diferenciação celular e privação de nutrientes, sendo bem estudada em *Saccharomyces cerevisiae* e em várias células de mamíferos.

Alguns estudos foram realizados avaliando o papel de autofagia na diferenciação de parasitas da ordem Kinetoplastida (BESTEIRO et al., 2006; WILLIAMS et al., 2006). Peptídeos antimicrobianos com potencial terapêutico foram capazes de induzir a autofagia em *Leishmania (L.) donovani* (BERA et al., 2003). Além disso, o silenciamento de genes para cisteína peptidases CPA e CPB em *Leishmania (L.) mexicana* interferiu na autofagia e na metaciclogênese do parasita (WILLIAMS et al., 2006). A autofagia é um dos eventos regulados por um grupo de serina-treonina-quinases conhecidas como proteínas TOR (CUTLER et al., 2001; PATTINGRE et al., 2008). Já foram demonstradas três quinases TOR em *Leishmania (L.) major*, das quais TOR1 e TOR2 são genes essenciais e TOR3 é necessária para a biogênese de acidocalcisomas e infectividade (MADEIRA DA SILVA; BEVERLEY, 2010). Em células de mamíferos sabe-se que as subunidades reguladoras de proteínas quinases podem interagir com m-TOR durante a maturação do autofagossoma, e a exclusão desta quinase leva a deficiência de autofagia (MAVRAKIS et al., 2006, 2007).

Não há relatos de que a MCA de *Leishmania* seja regulada por proteínas quinases e nem de sua participação no processo de autofagia, porém esta enzima, como já falado, está envolvida na morte celular, mais especificamente por apoptose. A interferência da proteína quinase na metaciclogênese pode ter relação com MCA pelo fato de promastigotas em fase estacionária expressarem mais MCA (AMBIT et al., 2008). O fato de vários peptídeos ligantes a MCA terem similaridade com quinases pode ser um indicativo de que estas enzimas tenham capacidade de interagir com a MCA podendo ativa-la ou desativa-la por fosforilação.

Dentre as sequências analisadas no banco de dados quatro peptídeos apresentaram similaridade com cinesinas, que constituem uma família muito grande de proteínas intracelulares motoras com diversas funções como o tráfico e reorganização do citoesqueleto e formação dos fusos, além de atuarem em componentes estruturais e de sinalização em células eucarióticas superiores (HIROKAWA, 1998; MAZUMDAR; MISTELI, 2005) e desempenharem papéis importantes também em parasitas (IVENS et al., 2005; WICKSTEAD; GULL, 2006). Com o sequenciamento completo do genoma de tripanosomatídeos identificou-se em *Leishmania (L.) major* 20 sequências de cinesinas (WICKSTEAD; GULL, 2006). A cinesina denominada 39 (LdK39) foi identificada em *Leishmania (L.) donovani* tanto em formas promastigotas quanto amastigotas, localizada no

citoesqueleto cortical (GERALD; COPPENS; DWYER, 2007). Em *Leishmania (L.) major* foi identificada uma cinesina-13, membro de uma família de proteínas caracterizadas por atividades de despolimerização essenciais na mitose (WORDEMAN, 2005). Além de sua importância para a mitose do parasita, a super expressão da cinesina-13 em *Leishmania (L.) major* resultou no encurtamento flagelar e seu silenciamento gerou flagelos mais longos (BLAINEAU et al., 2007). Já foi mostrado que a MCA de *Leishmania (L.) major* está associada com componentes do citoesqueleto e que sua superexpressão leva a uma parada do crescimento rápido e defeitos na mitose, segregação de cinetoplasto e citocinese. Essas informações sugerem uma associação da MCA com filamentos do citoesqueleto, o que poderia ser a explicação para o grave comprometimento da divisão celular quando a MCA é superexpressa (AMBIT et al., 2008). Nossos achados de uma possível ligação física entre a MCA e as cinesinas explicariam como essas proteínas regulariam a divisão celular do parasita, formação flagelar, tráfico e reorganização do citoesqueleto.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste projeto mostramos que o choque térmico a 37 °C aumentou a atividade da metacaspase de *Leishmania (L) amazonensis*, embora não tenha alterado a expressão e o processamento desta proteína. Esses dados sugerem que esse estímulo afeta a atividade da enzima por um mecanismo independente de sua tradução e processamento.

Nós clonamos e expressamos a metacaspase de *Leishmania (L) amazonensis* em sistema bacteriano e identificamos um padrão de processamento semelhante ao encontrado em extratos de promastigotas do parasita. A enzima recombinante foi usada para busca de ligantes por Phage Display utilizando uma biblioteca de peptídios. Dentre os potenciais ligantes identificados por comparação com bancos de dados de proteínas de *Leishmania* encontramos diversas quinases e a proteína cinesina. Quinases participam da metaciclologênese do parasita e da autofagia resultante da falta de nutrientes. Dezenas de genes de cinesinas foram identificados no genoma de *Leishmania*, e já foi descrita a participação dessas proteínas na divisão celular do parasita, formação flagelar, tráfego e reorganização do citoesqueleto. A conhecida participação da metacaspase de *Leishmania* em processos de divisão celular e apoptose corrobora nossos achados de quinases e cinesinas como seus potenciais ligantes e possivelmente reguladores.

Temos como perspectivas produzir peptídeos sintéticos correspondentes às sequências de quinases e cinesinas identificadas como ligantes da MCA. Esses peptídeos serão usados em experimentos de choque térmico com promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis* para verificar sua participação na modulação da atividade da MCA. Além disso, pretendemos analisar se esses peptídeos afetam a morte celular e o processamento da metacaspase.

REFERÊNCIAS*

- ALZATE, J. F. et al. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. **Apoptosis**, v. 11, n. 2, p. 161-171, 2006.
- ALZATE, J. F. et al. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 152, n. 2, p. 192-202, 2007.
- AMBIT, A. et al. An essential role for the *Leishmania* major metacaspase in cell cycle progression. **Cell Death Differ.**, v. 15, n. 1, p. 113-122, 2008.
- ARNOULT, D. et al. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. **Cell Death Differ.**, v. 9, n. 1, p. 65-81, 2002.
- BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.
- BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnol. Adv.**, v. 19, n. 1, p. 1-33, 2001.
- BERA, A. et al. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 127, n. 1, p. 23-35, 2003.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Arch Biochem. Biophys.**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.
- BESTEIRO, S. et al. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 16, p. 11384-11396, 2006.
- BHATTACHARYA, A.; BISWAS, A.; DAS, P. K. Role of intracellular cAMP in differentiation-coupled induction of resistance against oxidative damage in *Leishmania donovani*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 44, n. 5, p. 779-794, 2008.
- BIDLINGMAIER, S. et al. Identification of MCAM/CD146 as the target antigen of a human monoclonal antibody that recognizes both epithelioid and sarcomatoid types of mesothelioma. **Cancer Res.**, v. 69, n. 4, p. 1570-1577, 2009.
- BLAINEAU, C. et al. A novel microtubule-depolymerizing kinesin involved in length control of a eukaryotic flagellum. **Curr. Biol.**, v. 17, n. 9, p. 778-782, 2007.

* De acordo com:

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

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância de leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília, 2007.
- CASTILLA, J. J. et al. Leishmania donovani: in vitro culture and $[1H]$ NMR characterization of amastigote-like forms. **Mol. Cell Biochem.**, v. 142, n. 2, p. 89-97, 1995.
- CORTESE, R. et al. Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 6, n. 1, p. 73-80, 1995.
- CUTLER, N. S. et al. The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. **Mol. Biol. Cell**, v. 12, n. 12, p. 4103-4113, 2001.
- DAS, M.; MUKHERJEE, S. B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. **J. Cell Sci.**, v. 114, pt. 13, p. 2461-2469, 2001.
- DAS, R. et al. WITHDRAWN:Curcumin, a dietary polyphenol, emerges as a novel inhibitor of DNA topoisomerase I of kinetoplastid parasite Leishmania donovani. **Biochem. J.**, v. 13, p. 879-882, 2008.
- DE FREITAS BALANCO, J. M. et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Curr. Biol.**, v. 11, n. 23, p. 1873, 2001.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 9, p. 692, 2004.
- DURRENBERGER, F.; WONG, K.; KRONSTAD, J. W. Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in Ustilago maydis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 10, p. 5684-5689, 1998.
- EARNSHAW, W. C.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 383-424, 1999.
- EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. **CLUSTALW**. Disponível em: <<http://ebi.ac.uk/clustalw>>. Acesso em: 4 de fevereiro 2012.
- FADOK, V. A. et al. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. **Cell Death Differ**, v. 5, n. 7, p.551-562, 1998.
- FRANKE, E. D. et al. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant Leishmania promastigotes. **J. Immunol.**, v. 134, n. 4, p. 2713-2718, 1985.
- FRITZ, J. H. et al. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nat. Immunol.**, v. 7, n. 12, p. 1250-1257, 2006.
- GALILI, N.; DEVEMY, E.; RAZA, A. Isolation of specific and biologically active peptides that bind cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). **J. Hematol. Oncol.**, v. 1, p. 8, 2008.

GERALD, N. J.; COPPENS, I.; DWYER, D. M. Molecular dissection and expression of the LdK39 kinesin in the human pathogen, *Leishmania donovani*. **Mol. Microbiol.**, v. 63, n. 4, p. 962-979, 2007.

GEYSEN, H. M.; RODDA, S. J.; MASON, T. J. The delineation of peptides able to mimic assembled epitopes. **Ciba Found. Symp.**, v. 119, p. 130-149, 1986.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO MDE, L. American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 1, p. 71-80 2003.

GONZALEZ, I. J. Metacaspases and their role in the life cycle of human protozoan parasites. **Biomedica**, v. 29, n. 3, p. 485-493, 2009.

GONZALEZ, I. J. et al. *Leishmania major* metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. **Int. J. Parasitol.** v. 37, n. 2, p. 161-172, 2007.

GORDON, J. Mononuclear phagocytes in immune defence. **Fundamental Immunol.**, v. 6, p. 162, 2001.

GROSS, A.; MCDONNELL, J. M.; KORSMEYER, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. **Genes. Dev.**, v. 13, n. 15, p. 1899-1911, 1999.

GUO, Y. et al. Construction of bifunctional phage display for biological analysis and immunoassay. **Anal Biochem.**, v. 396, n. 1, p. 155-157, 2010.

HIROKAWA, N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 519-526, 1998.

HOUSTON, P. et al. Homing markers for atherosclerosis: applications for drug delivery, gene delivery and vascular imaging. **FEBS Lett**, v. 492, n. 1-2, p. 73-77, 2001.

HSIUNG, P. L. et al. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted heptapeptide and confocal microendoscopy. **Nat. Med.**, v. 14, n. 4, p. 454-458, 2008.

IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005.

KHADEM VATAN, S.; GHARAVI, M. J.; SAKI, J. Miltefosine induces metacaspase and PARP genes expression in *Leishmania infantum*. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 5, p. 442-448, 2012.

KOSEC, G. et al. Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 145, n. 1, p. 18-28, 2006.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ**, v. 12 Suppl 2, p. 1463-1467, 2005.

KURZEPA, A. et al. Molecular modification of T4 bacteriophage proteins and its potential application: review. **Folia Microbiol. (Praha)**, v. 54, n. 1, p. 5-15, 2009.

- LEE, N. et al. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 10, p. 1745-1757, 2007.
- LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6194-6206, 2008.
- MACDOUGALL, J. H.; BEIGHTON, D.; RUSSELL, R. R. Cloning and expression of protease genes from *Treponema denticola* in *Escherichia coli*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 6, n. 5, p. 270-274, 1991.
- MADEIRA DA SILVA, L.; BEVERLEY, S. M. Expansion of the target of rapamycin (TOR) kinase family and function in *Leishmania* shows that TOR3 is required for acidocalcisome biogenesis and animal infectivity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n. 26, p. 11965-11970, 2010.
- MADEO, F. et al. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. **Mol. Cell**, v. 9, n. 4, p. 911-917, 2002.
- MAVRAKIS, M. et al. Depletion of type IA regulatory subunit (RI α) of protein kinase A (PKA) in mammalian cells and tissues activates mTOR and causes autophagic deficiency. **Hum Mol. Genet.**, v. 15, n. 19, p. 2962-2971, 2006.
- MAZUMDAR, M.; MISTELI, T. Chromokinesins: multitasking players in mitosis. **Trends Cell Biol.**, v. 15, n. 7, p. 349-355, 2005.
- MCDONALD, P. P. et al. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF- β in macrophages that have ingested apoptotic cells. **J. Immunol.**, v. 163, n. 11, p. 6164-6172, 1999.
- MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 206-224, 2004..
- MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J. Immunol.**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000.
- MIURA, M. et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 653-660, 1993.
- MOREIRA, M. E. et al. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **J. Cell Physiol.**, v. 167, n. 2, p. 305-313, 1996.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **BLAST**. Disponível em:

< <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 20 de março 2012.

NAULA, C. et al. Spontaneous dimerization and leucine-zipper induced activation of the recombinant catalytic domain of a new adenylyl cyclase of *Trypanosoma brucei*, GRESAG4.4B. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 112, n. 1, p. 19-28, 2001.

PARAMCHUK, W. J. et al. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 90, n. 1, p. 203-221, 1997.

PARIS, C. et al. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 3, p. 852-859, 2004.

PARMLEY, S. F.; SMITH, G. P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**, v. 73, n. 2, p. 305-318, 1988.

PATTINGRE, S. et al. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. **Biochimie.**, v. 90, n. 2, p. 313-323, 2008.

PETTER, C. et al. Phage display screening for peptidic chitinase inhibitors. **J. Mol. Recognit.**, v. 21, p. 401-409 2008.

RAINA, P.; KAUR, S. Knockdown of LdMC1 and Hsp70 by antisense oligonucleotides causes cell-cycle defects and programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Mol. Cell Biochem.**, v. 359, n. 1-2, p. 135-149, 2012.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

RENFRANZ, P. J.; BECKERLE, M. C. Doing (F/L)PPPPs: EVH1 domains and their proline-rich partners in cell polarity and migration. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 14, n. 1, p. 88-103, 2002.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat. Rev. Immunol.**, 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.

SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 233-244, 2006.

SIMAN-TOV, M. M. et al. Cloning from *Leishmania major* of a developmentally regulated gene, c-lpk2, for the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 77, n. 2, p. 201-215, 1996.

SIMAN-TOV, M. M.; IVENS, A. C.; JAFFE, C. L. Molecular cloning and characterization of two new isoforms of the protein kinase A catalytic subunit from the human parasite *Leishmania*. **Gene**, v. 288, n. 1-2, p. 65-75, 2002.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-1317, 1985.

STEVENS, T. L. et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, v. 334, n. 6179, p. 255-258, 1988.

SZALLIES, A.; KUBATA, B. K.; DUSZENKO, M. A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Lett.**, v. 517, n. 1-3, p. 144-150, 2002.

THOMASON, P. A. et al. An intersection of the cAMP/PKA and two-component signal transduction systems in *Dictyostelium*. **EMBO J.**, v. 17, n. 10, p. 2838-2845, 1998.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

UREN, A. G. et al. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. **Mol. Cell**, v. 6, n. 4, p. 961-967, 2000.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 37, p. 13837-13842, 2006.

VERCAMMEN, D. et al. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 44, p. 45239-45336, 2004.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.

WANDERLEY, J. L. et al. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis* in mammalian hosts. **J. Immunol.**, v. 176, n. 3, p. 1834-1839, 2006.

WANDERLEY, J. L. et al. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5733, 2009

WICKSTEAD, B.; GULL, K. A "holistic" kinesin phylogeny reveals new kinesin families and predicts protein functions. **Mol. Biol. Cell**, v. 17, n. 4, p. 1734-1743, 2006.

WILLATS, W. G. Phage display: practicalities and prospects. **Plant Mol. Biol.**, v. 50, n. 6, p. 837-854, 2002.

WILLIAMS, R. A. et al. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. **Mol. Microbiol.**, v. 61, n. 3, p. 655-674, 2006.

WORDEMAN, L. Microtubule-depolymerizing kinesins. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 17, n. 1, p. 82-88, 2005.

ZALILA, H. et al. Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in *Leishmania major*. **Mol. Microbiol.**, v. 79, n. 1, p. 222-239, 2011.

ZANGGER, H.; MOTTRAM, J. C.; FASEL, N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? **Cell Death Differ.**, v. 9, n. 10, p. 1126-1139, 2002.

ZOU, H. et al. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. **Cell**, v. 90, n. 3, p. 413, 1997.