



Universidade de Brasília
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular
Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro

**Expressão heteróloga, citolocalização e modelagem
molecular da otubaína, uma deubiquitinase predita de
*Leishmania chagasi***

Dissertação de Mestrado

Bruna Cândido Guido

Brasília
2011

Bruna Cândido Guido

**Expressão heteróloga, citolocalização e modelagem
molecular da otubaína, uma deubiquitinase predita de
*Leishmania chagasi***

Orientadora: Profa. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Patologia
Molecular da Universidade de Brasília para a
obtenção do título de Mestre em Patologia
Molecular.

Brasília
2011

Dedico este trabalho aos grandes amores da minha vida:
meus pais, Guido e Dirce, minhas irmãs,
Geovana e Janaina, meus sobrinhos, Kaique e Arthur
e meu amor, Diego.
Amo vocês!!!

Agradecimentos

A Profa. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos, por me aceitar como sua aluna e pela orientação durante todo o tempo. Por ser bastante presente e por suas inúmeras exigências. Isso com certeza me fez ir mais longe. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Jaime Martins de Santana e a todos os companheiros de laboratório, os quais contribuíram para a minha formação e desenvolvimento, por terem me ensinado grande parte de tudo que sei.

A Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca e a todos os seus alunos que também sempre foram grandes companheiros de grupo e por todo auxílio prestado.

Ao Prof. Dr. José Raimundo Corrêa e ao Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau, pela colaboração e auxílio prestados, contribuindo enormemente para o trabalho.

As grandes amigas que conquistei nesse período, Brina, Isabel e Raquel, por tornarem os meus dias muito mais fáceis e agradáveis, pelas inúmeras risadas durante os almoços, por me ensinarem tantas coisas, pela força e pelos conselhos que me deram. Muito obrigada!

A minha grande ajudante e amiga Clênia, por ter me acompanhado desde o início me auxiliando em grande parte do trabalho.

Aos amigos André, Hugo e Thiago pela amizade, pelos conhecimentos que dividiram comigo e por resolverem todos os problemas que todas as meninas juntas não conseguiam resolver.

As minhas amigas, Bárbara, Joice, Lilian e Lívia, que mesmo distantes estão sempre presentes nas minhas melhores lembranças. Por terem feito da minha graduação um período inesquecivelmente bom.

Aos meus pais, José Luís Guido e Dirce G. Cândido Guido, por me amarem incondicionalmente e por me apoiarem sempre. Por dedicarem suas vidas a mim e as minhas irmãs. Por nunca medirem esforços para nos fazerem felizes. Pelas tão suadas horas de trabalho que possibilitaram todo o meu desenvolvimento. Enfim, por serem os meus grandes exemplos. Eu não seria nada e não chegaria a lugar algum se não fosse por vocês. Muito obrigada! Amo vocês!

As minhas queridas irmãs, Geovana e Janaina, que cuidaram de mim com amor e dedicação desde que nasci e por serem minhas grandes companheiras. Por todo apoio, amizade, cumplicidade e por me proporcionarem tantos momentos felizes. Amo vocês!

Aos meus lindos sobrinhos, Kaique e Arthur, por encherem minha vida de alegria e me fazerem a tia mais feliz do mundo.

Aos meus cunhados, Marco Aurélio e Rogério, pela amizade e por terem se tornado meus irmãos.

A toda a minha família, meus avós, tios e primos por fazerem parte da minha vida e contribuírem para a minha felicidade.

A minha sogra, Neusa de Fátima, por todo apoio e carinho durante esses anos.

A minha Mel, por tornar todo o estresse diário pequeno perto de seus saltos e rodopios sempre que me vê chegando em casa.

Ao amor da minha vida, Prof. Dr. Diego Nolasco, por sua extrema paciência, pela dedicação e pelo carinho. Por sempre me mostrar o lado bom da vida, mesmo que este seja um tanto quanto difícil de ser notado. Por todo amor e amizade que me fazem tão feliz. Além de tudo isso, muito obrigada por conduzir todos os ensaios relativos à modelagem e à dinâmica molecular contribuindo indescritivelmente para este trabalho. Amo você demais!

Ao CNPq, CAPES, FAPDF e FINATEC pelo financiamento deste trabalho.

A Deus, por tantas graças e oportunidades concedidas a mim durante todos os segundos da minha vida.

"Seja a mudança que você quer ver no mundo."

Dalai Lama

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Angstrom
AMC	7-amino-4-metil-cumarina
AMT	Tampão 100 mM ácido acético, 100 mM MES e 200 mM Tris-HCl
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
pb	Pares de bases
Da	Dalton
DC	Célula dendrítica
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
DH5α	Linhagem celular de <i>E. coli</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	Ditiotreitol
DUB	Enzima deubiquitinante
E-64	L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HEPES	Ácido (2-hidroxietil)-piperazina etanosulfônico
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LIT	Liver Infusion Tryptose
LPS	Lipopolissacarídeo
NBT	Nitro-azul-tetrazólico
NK	<i>Natural Killer</i>
OD	Densidade óptica
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	“Phosphate Buffered Saline” - Tampão fosfato 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,2
PCR	Reação de polimerização em cadeia

PDB	Banco de dados de proteína
PKDL	Leishmaniose dérmica pós-calazar
PMN	Célula polimorfonuclear
rpm	Rotações por min
rOtuLc	Otubaína recombinante de <i>L. chagasi</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS/PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
TCR	Receptor de célula T
TLR	Receptores do tipo <i>toll</i>
TGF- β	Fator de transformação do crescimento β

AMINOÁCIDO	SÍMBOLOS	
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

ÍNDICE GERAL

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Leishmanioses	01
1.1.1. Leishmaniose Cutânea	04
1.1.2. Leishmaniose Cutâneo-Mucosa	04
1.1.3. Leishmaniose Visceral	04
1.1.3.1. Leishmaniose Visceral Americana	05
1.2. Modulação da resposta imunológica na leishmaniose	06
1.3. Tratamento das leishmanioses	08
1.4. Proteases	10
1.4.1. Cisteíno proteases	12
1.5. Ubiquitinação <i>versus</i> deubiquitinação	13
1.5.1. Ubiquitinação	13
1.5.2. Deubiquitinação	17
1.5.2.1. Deubiquitinases	18
1.5.2.2. Deubiquitinases da família do tumor ovariano	19
1.5.2.2.1. Otubaína	20
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
4. METODOLOGIA	26
4.1. Cultura de <i>Leishmania chagasi</i>	26
4.2. Extração de DNA genômico	26
4.3. Clonagem gênica	26
4.4. Expressão heteróloga e purificação da proteína recombinante	27
4.5. Ensaio eletroforético	28
4.6. Produção de anticorpos	29
4.7. Preparo do extrato de promastigotas de <i>L. chagasi</i>	29
4.8. <i>Immunoblot</i>	29
4.9. Imunofluorescência	30

4.9.1. Citolocalização da otubaína em promastigotas de <i>L. chagasi</i>	30
4.9.2. Ensaio de colocalização da otubaína com a catepsina B de <i>L. chagasi</i>	31
4.10. Determinação da atividade proteolítica	31
4.11. Alinhamento múltiplo da otubaína	32
4.12. Modelagem molecular por homologia	32
4.13. Dinâmica molecular	33
4.13.1. Parâmetros da Simulação	33
5. RESULTADOS	34
5.1. Identidade e similaridade entre as otubaínas de diferentes organismos	34
5.2. Clonagem do gene da otubaína de <i>L. chagasi</i>	35
5.3. Expressão da otubaína recombinante de <i>L. chagasi</i>	37
5.4. Purificação da rOtuLc solúvel	40
5.5. Produção de anticorpos contra a rOtuLc	42
5.6. Citolocalização da otubaína em promastigotas de <i>L. chagasi</i>	43
5.7. Colocalização da otubaína de <i>L. chagasi</i> com a cisteíno protease lisossomal, catepsina B de <i>T. cruzi</i>	45
5.8. Determinação da atividade proteolítica presente no extrato de <i>L. chagasi</i>	46
5.9. Modelo proposto para a estrutura da otubaína de <i>L. chagasi</i>	49
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	64
8. PERSPECTIVAS	65
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

Resumo

As leishmanioses, doenças infecciosas causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, apresentam manifestações clínicas diversas e tratamento de difícil administração com efeitos colaterais severos. Estas doenças ainda representam um relevante problema de saúde pública que somado a questão do tratamento, refletem a necessidade de se avançar na pesquisa e na busca por novos fármacos. As proteases, enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas e cadeias polipeptídicas, desempenham alguns papéis-chaves nos parasitos protozoários como na transição do ciclo de vida, invasão do hospedeiro, evasão imune do parasito e na patogênese de doenças parasitárias. Neste contexto, este trabalho se focaliza no estudo da otubaína de *Leishmania chagasi*, uma cisteína protease pertencente às enzimas deubiquitinantes (DUBs). Algumas DUBs são essenciais na imunomodulação e regulação da resposta inflamatória. A otubaína 1 de humanos, por exemplo, possui como substrato a proteína E3 GRAIL associada à anergia dos linfócitos. Este trabalho teve como objetivo a clonagem e expressão da otubaína recombinante de *L. chagasi* (rOtuLc) bem como sua citolocalização, caracterização de sua atividade e proposição da sua estrutura por modelagem e dinâmica molecular. O gene da OtuLc foi amplificado e seu produto clonado no vetor de expressão, pET-19b, expresso em *E. coli* BL21 (DE3). A rOtuLc foi induzida com 0,1 mM IPTG, a 16 °C por 16 h. A proteína recombinante solúvel foi purificada em coluna de agarose-níquel. Anticorpos anti-OtuLc foram produzidos em camundongos e sua especificidade foi confirmada por *immunoblot*. A imunocitolocalização da OtuLc em promastigotas de *L. chagasi* revelou sua localização em vesículas e uma marcação pontual de forte intensidade na região anterior, próximo ao cinetoplasto. Testes de atividade da rOtuLc contra os substratos Ub-AMC e Z-LRGG-AMC foram realizados e a rOtuLc mostrou-se inativa. Finalmente, a modelagem molecular por homologia e os ensaios de dinâmica molecular de equilíbrio indicaram que a OtuLc é composta por 10 hélices α e 1 folha β , de 4 fitas, e mantém conservado o posicionamento dos resíduos da tríade catalítica, estando o resíduo Cys81 no início de uma hélice α direita próxima à fita β onde se encontram os resíduos His261 e Asn263. Estes resultados iniciais poderão servir como ferramentas de grande valia para uma avaliação futura do potencial quimioterápico da OtuLc.

Abstract

Leishmaniasis are infectious diseases caused by intracellular protozoa of the genus *Leishmania* which have different clinical manifestations and treatment difficult to administer with serious secondary effects. These diseases still represent a significant public health problem and together with the difficulties encountered in the current treatment reflect the need to advance the search for new drugs. Proteases, enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds of proteins and polypeptide chains, play key roles in some protozoan parasites such as life cycle transition, host invasion, parasite immune evasion and parasitic diseases pathogenesis. In this context, this work focuses on studying *Leishmania chagasi* otubain, a cysteine protease belonging to deubiquitinating enzyme (DUBS). Some DUBs are essential in immunomodulation and regulation of the inflammatory response. The human otubain 1, for example, has the GRAIL E3 protein as substrate, associated with anergy in lymphocytes. The aim of this work was the cloning and expression of recombinant *L. chagasi* otubain (rOtuLc), the verification of its cytolocalization, the activity characterization and the structure proposition by molecular modeling and dynamics. The OtuLc gene was amplified and the product cloned into the expression vector pET-19b expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Expression of recombinant protein condition was 0,1 mM IPTG, 16 °C for 16 h. The soluble recombinant protein was purified by nickel-agarose column. Anti-OtuLc antibodies were produced in mice and its specificity was confirmed by immunoblot. Cytolocalization of OtuLc in *L. chagasi* promastigotes revealed vesicular pattern localization and a high-intensity point labeled in the anterior region near the kinetoplast. rOtuLc activity tests against Ub-AMC and Z-LRGG-AMC substrates were performed and the recombinant protein was found to be inactive. Finally, homology molecular modeling and molecular dynamics assay indicated that OtuLc is composed of 10 α helices and 1 β sheet and retains the conserved residues of catalytic triad positioning with Cys81 residue at the beginning of a right handed α helix near to His261 and Asn263 at the β sheet. These initial results may serve as valuable tools for future assesment of the chemotherapeutic potential of OtuLc.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses compreendem um espectro de doenças infecciosas causadas por espécies de *Leishmania* pertencentes à ordem Kinetoplastida, caracterizada pela presença de um cinetoplasto rico em DNA mitocondrial, e à família Trypanosomatidae. Estas doenças afetam homens e outros mamíferos em regiões tropicais e subtropicais do mundo (DESJEUX, 2004). As espécies desse gênero podem ser divididas em dois subgêneros, *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*), as quais diferem principalmente no sítio de desenvolvimento do parasito dentro dos insetos vetores (revisado por SACKS; KAMHAWI, 2001).

Segundo a Organização Mundial de Saúde esta doença ameaça, atualmente, 350 milhões de homens, mulheres e crianças em 88 países no mundo. É estimado que aproximadamente 1,6 milhão de pessoas sejam acometidas todos os anos (WHO, 2008). As leishmanioses são endêmicas na África, Sudeste da Ásia, Oriente Médio, Sul da Europa e Américas Central e do Sul. As leishmanioses são associadas com aproximadamente 70.000 mortes por ano (DESJEUX, 2004) e compõem a lista das doenças negligenciadas, (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>). Mais de 20 milhões de pessoas são infectadas e 0,5 milhão é afetado pela leishmaniose visceral (VL) letal (MCCONVILLE; HANDMAN, 2007).

O gênero *Leishmania* é formado por 30 espécies, das quais 20 são patogênicas para os humanos (CUPOLILLO et al., 2000). A leishmaniose é primariamente uma zoonose sendo, dessa forma, que para a maioria das espécies, os humanos são hospedeiros acidentais (ASHFORD, 2000). Os principais reservatórios para os parasitos são animais selvagens e domésticos. A doença pode ser transmitida para humanos e outros hospedeiros vertebrados pela picada de fêmeas de 30 espécies diferentes de flebotomíneos, durante o seu repasto sanguíneo, quando estas estão infectadas pelos parasitos (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; CROFT et al., 2006; EL-SAFI et al., 2006).

No inseto vetor, as *Leishmanias* replicam-se como células flageladas móveis e extracelulares, conhecidas como promastigotas, as quais residem primariamente no trato

alimentar dos insetos (BESTEIRO et al., 2007). Neste ambiente, duas formas podem ser distinguidas: a forma multiplicativa, mas não infectiva aos mamíferos, denominada promastigota procíclica (Fig. 1A), presente no intestino do inseto; e a forma não multiplicativa, capaz de infectar mamíferos, os promastigotas metacíclicos (Fig. 1B), encontrados na parte anterior do intestino dos insetos bem como na sua probóscide. Os promastigotas metacíclicos são inoculados no hospedeiro mamífero pela picada dos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. A saliva destes insetos contém fatores com ação quimiotática para monócitos e células imunorreguladoras, com capacidade de interagir com os macrófagos, aumentando sua proliferação e impedindo sua ação efetora na destruição dos parasitos (BESTEIRO et al., 2007). Os parasitos são então fagocitados por macrófagos e transformam-se em amastigotas, células replicativas intracelulares, de morfologia arredondada e flagelo atrofiado (Fig. 1C). Esta forma reside dentro dos vacúolos parasitóforos, os quais apresentam características lisossomais. Na ausência de controle parasitário pela célula hospedeira, esta se rompe e os amastigotas são liberados no meio extracelular e serão posteriormente fagocitados por outros macrófagos. A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre quando formas amastigotas são ingeridas pelos insetos durante o repasto sanguíneo. Nos insetos, os amastigotas transformam-se novamente em formas promastigotas metacíclicas infectivas, completando o ciclo de vida (Fig. 2) (BESTEIRO et al., 2007; NEVES et al., 2005).

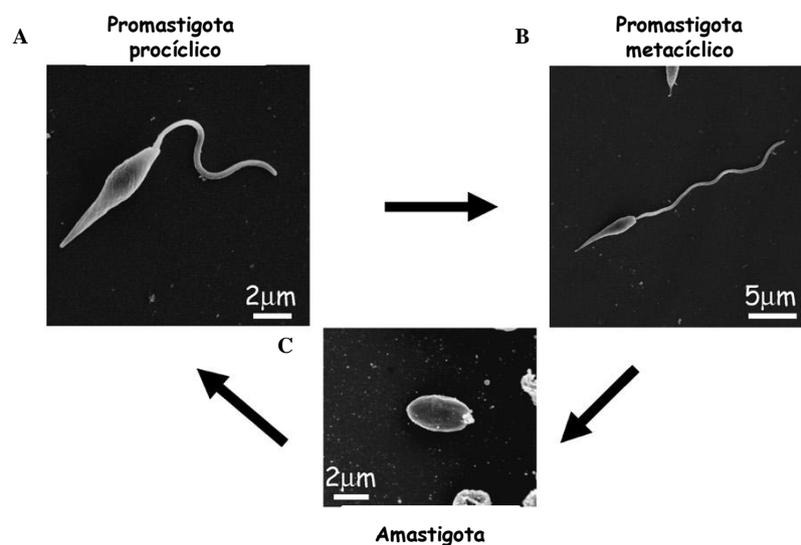


Figura 1. Mudanças na forma do parasito durante o ciclo de vida. Microscopia eletrônica de varredura mostrando os principais estágios do ciclo de vida de *Leishmania major*: **A)** promastigota procíclica, **B)** promastigota metacíclica e **C)** amastigota (Adaptado de BESTEIRO et al., 2007).

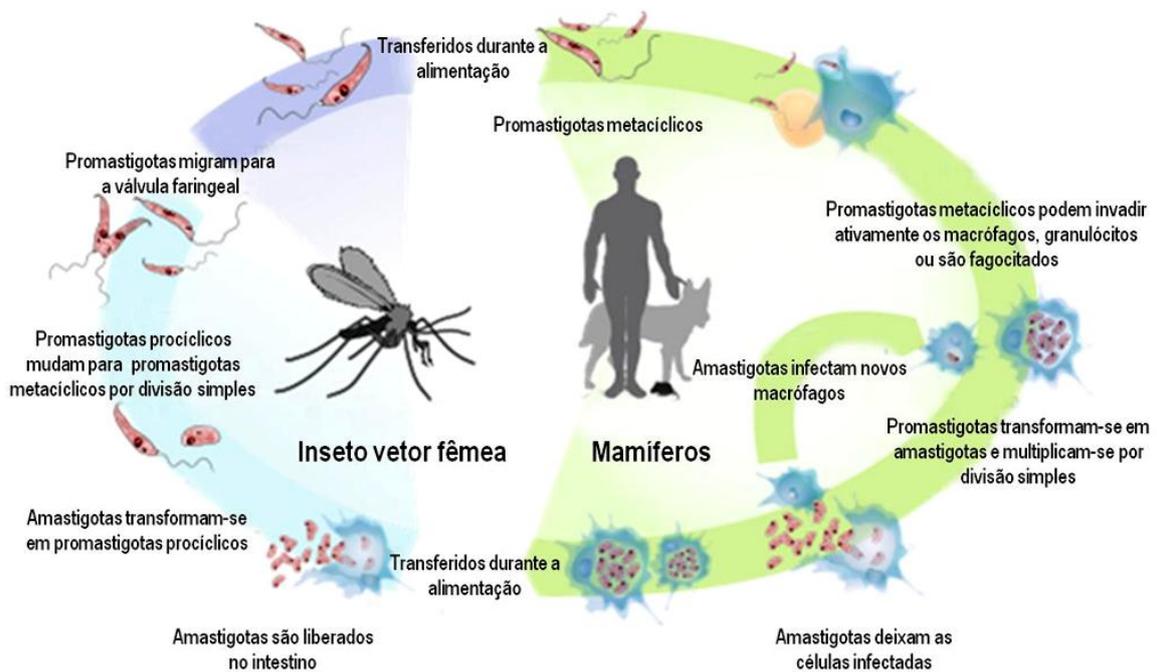


Figura 2. Ciclo de vida das espécies de *Leishmanias*. Adaptado de WHO (VILLARREAL, 2008).

Estas formas de desenvolvimento representam uma adaptação às mudanças nas condições ambientais encontradas pelos parasitos dentro de seus hospedeiros. Durante essas transições, as leishmanias são expostas a muitas variações na disponibilidade e tipo de nutrientes, pH, temperatura, bem como na disponibilidade de oxigênio. A estratégia adotada pelos parasitos para sobreviver a essas mudanças é o desenvolvimento dessas diferentes formas altamente especializadas e adaptadas, as quais se diferem em seus requerimentos nutricionais, taxa de crescimento, habilidade em se dividir, na expressão regulada de suas moléculas de superfície, bem como na sua morfologia (BESTEIRO et al., 2007).

O quadro clínico das leishmanioses está geralmente associado com as espécies de parasitos particulares, enquanto os resultados clínicos são fortemente determinados pela resposta imune à infecção no hospedeiro, influenciada por fatores genéticos (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006). Dessa forma, as leishmanioses foram tradicionalmente classificadas em três principais entidades clínicas: cutânea, tegumentar e visceral (EVANS, 1993):

1.1.1. Leishmaniose Cutânea

A forma cutânea da doença é responsável por mais de 50% dos novos casos de leishmaniose. Ocorre a formação de úlceras na pele no sítio da picada do inseto vetor, geralmente nos locais do corpo que ficam mais expostos como rosto, nuca, braços e pernas. A lesão, geralmente, cicatriza-se espontaneamente dentro de três a seis meses, tempo este que pode variar entre as espécies causadoras e entre os indivíduos (KEDZIERSKI et al., 2006; ROBERTS et al., 2000).

As espécies responsáveis por esse tipo de leishmaniose são *L. major*, *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. aethiopica*, entretanto as espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis* e *L. peruviana* também podem causar esta forma de leishmaniose. Algumas espécies também são conhecidas por causar a doença cutânea não cicatrizante, conhecida como leishmaniose cutânea difusa, como é o caso da *L. aethiopica*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*. Esta forma da doença geralmente ocorre em hospedeiros anérgicos com o sistema imune debilitado. A infecção é caracterizada por uma lesão primária, a qual se espalha envolvendo múltiplas áreas da pele, com um amplo número de parasitos presentes na lesão (KEDZIERSKI et al., 2006; ROBERTS et al., 2000).

1.1.2. Leishmaniose Cutâneo-Mucosa

A leishmaniose cutâneo-mucosa, ou mucocutânea, é geralmente causada pela espécie *L. braziliensis*. Esta forma ocorre geralmente em decorrência da leishmaniose cutânea que pode apresentar-se até mesmo após anos da lesão inicial ter cicatrizado. Após se dar a cura da lesão inicial na pele ocorre o desenvolvimento de lesões metastáticas tardias que podem levar a destruição total ou parcial das membranas mucosas. A leishmaniose mucocutânea, se não tratada de forma adequada, pode levar à deformidades severas ou mesmo à morte (KEDZIERSKI et al., 2006)

1.1.3. Leishmaniose Visceral

Leishmaniose visceral ou calazar compreende à forma mais severa e é geralmente fatal. *L. infantum*, *L. chagasi* e *L. donovani* são as principais espécies

responsáveis por esta forma da doença. Os sintomas são febre, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia (WILSON & STREIT, 1996). Se não tratada, a doença apresenta alta taxa de mortalidade causada principalmente por imunossupressão e infecções secundárias. Alguns indivíduos podem ainda desenvolver uma síndrome não comum conhecida como leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), a qual aparece poucos anos após a cura completa da leishmaniose visceral. Pacientes com PKDL são considerados a maior fonte de parasitos para novas infecções, pois abrigam grande quantidade de parasitos na pele, os quais estão acessíveis aos insetos (EL-HASSAN et al.; KEDZIERSKI et al., 2006).

1.1.3.1 Leishmaniose Visceral Americana

A leishmaniose visceral é altamente prevalente no mundo, sendo endêmica em 62 países nos quatro continentes, a maioria dos quais classificados como em desenvolvimento, onde existem cerca de 200 milhões de pessoas expostas ao risco. Cerca de 90% dos casos mundiais estão concentrados na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 2008). No Brasil, esta doença é causada pela espécie *Leishmania chagasi*, a qual é endêmica no Nordeste e mais recentemente se espalhou para outras regiões (LINDOSO, 2006, NEVES et al., 2005).

A identidade de *L. chagasi* tem sido objeto de questionamento desde 1999, com base nos estudos de Maurício e colaboradores. Muitos autores consideram-na como espécie sinonímia de *L. infantum* (NEVES et al., 2005).

Estima-se a ocorrência de 500.000 novos casos por ano em todo o mundo, segundo dados da OMS. No Brasil, foi relatada a ocorrência média de 3.100 novos casos por ano, sendo que aproximadamente 54% deles são em crianças menores de 10 anos.

L. chagasi é um parasito de células do sistema mononuclear fagocitário (SMF), principalmente do baço, fígado, linfonodo e medula óssea. Entretanto, no curso da infecção, outros órgãos e tecidos podem ser afetados, como intestino, sangue, pulmões, rins e pele. Nas fases mais avançadas da doença são raros os órgãos onde não se encontra o parasito (NEVES et al., 2005).

1.2. Modulação da resposta imunológica na leishmaniose

Sabe-se que as leishmanioses, independente da terapia aplicada, ou se sua apresentação é cutânea ou mucosa, por exemplo, são doenças dependentes da resposta imune como um todo. O padrão da resposta imune do hospedeiro à presença do parasito poderá determinar parcialmente a forma da doença, sua história natural e sua resposta à terapia escolhida.

O genoma de *Leishmania* é composto de 34 a 36 pares de cromossomos contendo aproximadamente 8.160 genes (IVENS et al., 2005). Análises globais de sua expressão gênica indicam que a grande maioria de seu genes (~ 95%) é expressa constitutivamente em todos os estágios da vida e os poucos genes de amastigotas identificados são relativamente específicos para determinadas espécies de *Leishmania* (COHEN-FREUE et al., 2007). Dessa forma, os dados obtidos para uma determinada espécie de *Leishmania* podem não ser aplicáveis à outra espécie.

A predisponibilidade genética à susceptibilidade ou resistência à infecção por *L. major* em camundongos correlaciona-se com a dominância da resposta Th2 dirigida por IL-4, que causa doença, ou com uma resposta Th1 dominada por IFN- γ e dirigida por IL-12, que promove a cicatrização e remoção dos parasitos (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

As células T CD4⁺ podem ser classificadas em T helper 1 (Th1) ou T helper 2 (Th2) quanto ao padrão de citocinas secretadas. As células Th1 secretam grandes quantidades de IFN- γ e citocinas pró-inflamatórias associadas e as Th2 secretam grandes quantidades de IL-4 e citocinas associadas que promovem a produção de anticorpos pelas células B. As citocinas Th1/Th2 podem regular de forma cruzada as respostas uma da outra. Um desbalanço das respostas Th1/Th2 pode contribuir para a patogênese de várias infecções, respostas alérgicas e doenças auto-imunes (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

Um exemplo desta correlação, é que estudos com animais mostraram que a infecção por *L. major* pode causar uma infecção letal mediada por células Th2 em camundongos BALB/c, mas uma lesão auto-cicatrizante mediada por Th1 em camundongos C57BL/6 e C3H, enquanto *L. amazonensis* geralmente causa lesão não-cicatrizante progressiva em todas as cepas de camundongos (MCMAHON-PRATT;

ALEXANDER, 2004) devido à insuficiência de IL-4/IL-10 na imunidade inata e adquirida (JI et al., 2003).

Foi mostrado em modelo de infecção por *Leishmania* em camundongos, que as células do sistema imune (macrófagos, células dendríticas (DCs), células *natural killer* (NK), e células T CD4⁺, CD8⁺), citocinas (interferon (IFN- γ) e interleucina (IL-12)) e moléculas efetoras (óxido nítrico produzido pela óxido nítrico sintase induzida (iNOS), são componentes chaves na resposta imune ao parasito (BOGDAN et al., 1993; SOLBACH; LASKAY, 2000). Os macrófagos são as principais células hospedeiras para a replicação da *Leishmania* e a célula efetora para matar o parasito. Entretanto, os efeitos causados pelo parasito se estendem para as células dendríticas, as quais são críticas para a apresentação de antígenos, co-estimulação de células-T e desenvolvimento eficaz das respostas Th1 adquiridas (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002) (BRANDONISIO et al., 2004).

No caso de infecção por *L. major*, após a injeção de promastigotas na pele, os neutrófilos são recrutados para o sítio de infecção dentro de horas e constituem a maior parte do infiltrado celular dentro dos primeiros dias de infecção (BEIL et al., 1992). Embora as células polimorfonucleares (PMNs) possam constituir uma das mais precoces fontes de IL-12 em camundongos C57BL/6 resistentes, possivelmente por meio da ativação dos receptores do tipo toll (TLR) 2, 7 e 9 (CHARMOY et al., 2007), alguns PMNs poderiam agir na transferência dos parasitos para os macrófagos, promovendo a produção de TGF- β pelos macrófagos e estabelecendo a infecção nos mesmos (GUEIRARD et al., 2008; VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

Diversos subconjuntos de células dendríticas (DCs) também estão envolvidos na infecção por *Leishmania* em sua forma promastigota. As células dendríticas plasmocitóides (pDCs), por exemplo, embora não façam a endocitose dos promastigotas, podem ser ativadas pela liberação do DNA genômico do parasito para produzir quantidades consideráveis de IFN- α/β bem como de IL-12 de modo dependente de TLR9 (SCHLEICHER et al., 2007). Já as células dendríticas mielóides e as derivadas de monócitos podem eficientemente engolfar os promastigotas, servindo como fonte crítica de produção de IL-12 precoce (MISSLITZ et al., 2004; RITTER; OSTERLOH, 2007). As células dendríticas ativadas podem ainda migrar para os linfonodos, ativar as células *Natural killers* (NKs) em repouso, de modo dependente de contato, e levá-las a produzir IFN- γ (LEÓN et al., 2007). As interações cognatas entre

múltiplos tipos de células inatas e citocinas, nos sítio de infecção e nos linfonodos de drenagem, são requeridas para a ativação apropriada da resposta protetora do tipo Th1 contra a invasão de patógenos. Entretanto, a magnitude da ativação das células dendríticas e das células Th1 *in vivo* variam grandemente dependendo das espécies dos parasitos envolvidos (SOONG, 2008) (Fig. 3).

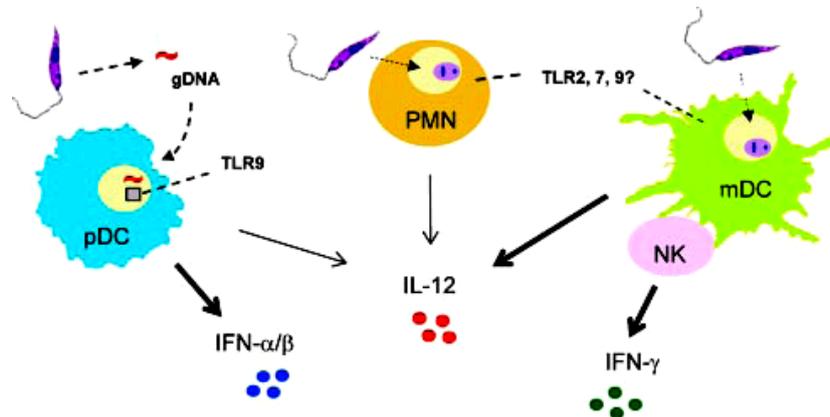


Figura 3. Visão esquemática da modulação da resposta imune durante a infecção por *Leishmania*. Hierarquia dentro dos diferentes tipos de células, receptores e citocinas na ativação da imunidade inata e adaptativa nos estágios iniciais da infecção por promastigotas de *Leishmania* (SOONG, 2008).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são altamente adeptos a manipular as vias de sinalização dos macrófagos para subverter as funções desta célula, e assim sendo, alguns mediadores pró-inflamatórios são induzidos em macrófagos infectados (GREGORY et al., 2008). Estes incluem quimiocinas específicas, as quais se acredita ter um papel crucial no recrutamento de células inflamatórias, incluindo macrófagos que os parasitos podem subseqüentemente invadir para propagar a infecção (ANTONIAZI et al., 2004).

1.3. Tratamentos das leishmanioses

O tratamento para as leishmanioses é uma questão bastante difícil, uma vez que, a *Leishmania* presente no homem está na forma amastigota, que é a forma intracelular obrigatória de macrófagos (MARQUES et al., 2007; ROCHA et al., 2005). Os antimoniais pentavalentes foram introduzidos na quimioterapia das leishmanioses em 1940 e perduram até hoje como tratamento de primeira escolha. Entretanto, esses medicamentos apresentam efeitos colaterais indesejados e graves, como náuseas,

mialgia, artralgia e hepatotoxicidade, sua administração é parenteral e têm altos custos (ALVAR et al., 2006). Além disso, existem relatos de resistência a esses medicamentos, sendo esse um fenômeno crescente em todas as formas de leishmaniose (BRENDLE et al., 2002; CROFT et al., 2006), em especial em áreas endêmicas para a doença, como a Índia, por exemplo.

A pentamidina, a anfotericina B e a anfotericina B lipossomal, quimioterápicos de segunda escolha, também possuem alta toxicidade, altos custos e são de difícil administração (GUERIN et al., 2002).

A anfotericina B, apesar de ser um potente agente para a leishmaniose visceral e ser a droga escolhida em casos de resistência aos antimoniais, por razões farmacocinéticas desconhecidas, não é tão eficaz no tratamento das leishmanioses cutânea ou tegumentar. Devido aos inúmeros e freqüentes efeitos colaterais da anfotericina sob a forma de desoxicolato, novas formulações foram desenvolvidas e encontram-se atualmente disponíveis comercialmente. Uma dessas formulações é a anfotericina B lipossomal. Entretanto, seu elevado custo não permite seu uso rotineiro nos serviços de saúde de países em desenvolvimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; VALDERRAMA et al., 2005). Quanto à pentamidina, sua eficácia é inferior a dos antimoniais pentavalentes e anfotericina B e suas reações adversas são maiores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Ambas as linhas de tratamento são de difícil administração, uma vez que suas formulações são parenterais. Isto culmina no abandono do tratamento pelo paciente, já que a população amplamente acometida pertence às regiões rurais com limitada assistência médica (BERMAN, 2003; FRÉZARD et al., 2008).

Nas duas últimas décadas, mais atenção vem sendo dedicada à busca por drogas orais que possam minimizar as complicações associadas à administração parenteral (AMATO et al., 2008). Numerosas drogas vêm sendo reportadas como efetivas como, por exemplo, a miltefosina, um análogo da fosfatidilserina. A miltefosina foi utilizada no tratamento da leishmaniose visceral na Índia (SUNDAR et al., 2002) e sua eficácia clínica para a leishmaniose cutânea no Novo Mundo foi investigada em testes conduzidos nas Américas do Sul e Central (MACHADO et al., 2010). Dados destes testes mostram que a taxa de cura da leishmaniose cutânea após o tratamento com miltefosina varia entre as espécies de *Leishmania* e também entre a mesma espécie em diferentes áreas endêmicas (MACHADO et al., 2010).

Este cenário mostra a necessidade do desenvolvimento de fármacos eficientes, com o mínimo de efeitos secundários e acessíveis à população de baixa renda, a principal acometida pela doença. Como estratégia de busca de alvos potenciais para novos fármacos, nosso grupo de pesquisa concentra-se no estudo do papel de proteases no desenvolvimento e virulência de patógenos, principalmente os tripanossomatídeos *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosma brucei*.

Neste trabalho de mestrado foi iniciado o estudo de caracterização de uma cisteína protease pertencente a uma família de enzimas envolvidas no processo de deubiquitinação, a otubaina de *L. chagasi*. A seguir, será apresentada uma revisão bibliográfica sobre o processo de ubiquitinação *versus* deubiquitinação, precedida de uma breve descrição sobre proteases.

1.4 Proteases

As proteases, também chamadas de peptidases, são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas e cadeias polipeptídicas (TURK, 2006). As enzimas proteolíticas estão presentes em todos os sistemas biológicos, desde vírus até os eucariotos superiores. Elas desempenham um papel fundamental na regulação de diversos processos biológicos como digestão, coagulação sanguínea, processamento hormonal, processamento de precursores relacionados à síntese de colágeno, renovação protéica, morte celular programada, e são ainda essenciais para a homeostase celular (CHANG, et al., 2007; DICKINSON, 2002).

As enzimas proteolíticas podem ser classificadas como exopeptidases ou endopeptidases, de acordo com a localização de sua ação catalítica (HOOPER, 2002; RAWLINGS et al., 2010). Contudo, existem peptidases que possuem tanto atividade exopeptídica quanto endopeptídica. As peptidases também podem ser classificadas quanto às suas especificidades, seus mecanismos catalíticos e suas relações evolutivas (BARRETT; RAWLINGS, 1991).

Existem dois sistemas para a classificação das enzimas proteolíticas, sendo eles o Enzyme Commission (EC) da International Union of Biochemistry and Molecular Biology e o sistema MEROPS de famílias e clãs de peptidases (BARRETT, 2001).

No sistema EC, as enzimas estão divididas em seis classes: (1) Oxidoreduases, (2) Transferases, (3) Hidrolases, (4) Liasas, (5) Isomerases e (6) Ligases. As peptidases

são classificadas como hidrolases e formam a subclasse 3.4 (BARRETT, 2001). De acordo com o mecanismo catalítico, que está relacionado ao principal resíduo funcional do grupo químico envolvido no processo de hidrólise, as proteases podem ser descritas como aspártico-peptidases, cisteíno-peptidases, serino-peptidases, metalo-peptidases treonino-peptidases e glutâmico-peptidases. Atualmente, existem sete tipos de peptidases dentro desta forma de classificação onde as treonino-peptidases (ABADJIEVA et al., 2000) e as glutâmico-peptidases (FUJINAGA et al., 2004) foram adicionadas recentemente ao grupo, juntamente com as peptidases de processo catalítico desconhecido.

O sistema MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) de classificação de peptidases foi desenvolvido em 1993 (RAWLINGS; BARRETT, 1993) e publicado em 1996 como bancos de dados na rede mundial de computadores (BARRETT, 2001). Nele, as peptidases são identificadas, classificadas e distribuídas de forma hierárquica em clãs e famílias, baseado na relação evolutiva e na estrutura das enzimas. Cada peptidase possui um código identificador que começa com uma letra indicadora do tipo catalítico da peptidase (A: aspártico, C: cisteíno, M: metalo, S: serino, T: treonino, U: desconhecido ou P: mais de um dos tipos T, C e S). O identificador do clã é complementado por uma segunda letra adicional, escrita em sequência (Ex: CA). O identificador da família é complementado por um número (Ex: C65). No banco de dados do MEROPS, o identificador de cada peptidase começa com o identificador da família e é completado com um número decimal (Ex: C65.001) (BARRETT, 2001).

As proteases e seus inibidores são modelos experimentais populares por estarem envolvidos em quase todas as vias e redes biológicas. A perda de sua regulação está implicada em uma ampla gama de doenças (DRAG; SALVESEN, 2010). Algumas das proteases mais conhecidas incluem a trombina e a plasmina nas coagulopatias e nos distúrbios hemorrágicos (KRISHNASWAMY, 2005; RIJKEN; LIJNEN, 2009); metaloproteases de matriz (MMPs) no câncer e na inflamação (OVERALL; DEAN, 2006; HU et al., 2007); renina e ACE na hipertensão (DUSING; SELLERS, 2009); proteases de estafilococos e estreptococos nas infecções necróticas da pele e na destruição da homeostase (IMAMURA et al., 2004; MAISEY et al., 2008) e as cisteíno proteases catepsinas, caspases e o proteassoma no câncer e na neurodegeneração (GREEN; EVAN, 2002; ADAMS; KAUFFMAN, 2004; MOHAMED; SLOANE, 2006;).

Para os pontos de vista biológico e do design de drogas, as características mais importantes de uma protease é sua habilidade em reconhecer e processar seu substrato ou substratos putativos (DRAG; SALVESEN, 2010).

As proteases desempenham também papéis chaves nos parasitos protozoários como na transição do ciclo de vida, invasão do hospedeiro, evasão imune do parasito e na patogênese de doenças parasitárias (GRELLIER et al., 2001; BASTOS et al., 2009).

1.4.1. Cisteíno proteases

As cisteíno proteases formam um grupo de enzimas que contém um resíduo de cisteína localizado no sítio ativo, que é composto normalmente pela tríade catalítica Cys-His-Asn. Em geral, elas estão localizadas no citosol e em compartimentos lisossomais de diversos tecidos de animais, plantas e microrganismos.

Algumas famílias principais do grupo são de importância médica tais como: família C1 da papaína que está relacionada à osteoporose, respostas imunes e progressão e metástase do câncer; família C3 da picornaína que está envolvida na hepatite e na poliomielite; família C13 da legumaína que está associada com a apresentação de antígenos; família C14 das caspases que possuem papel crucial como mediadoras de apoptose; família C10 da streptopaína e C25 da gingipaína são importantes nas doenças infecciosas (BARRETT; RAWLINGS, 2001; KREPELA, 2001; MCKERROW, 1999; MCKERROW et al., 1993; RAWLINGS et al., 2010). A papaína, pertencente à família C1, é a enzima mais estudada do grupo das cisteíno-peptidases. As calpaínas (família C2), enzimas dependentes de cálcio, apresentam estruturas altamente conservadas e são encontradas em animais vertebrados e invertebrados. Além disso, mostram alta homologia em sua região C-terminal com a família das calmodulinas em consequência da presença de um sítio de ligação ao cálcio, responsável pelo efeito do cálcio na atividade (BARRETT; RAWLINGS, 1991).

As cisteíno-peptidases possuem o sítio ativo composto por uma tríade catalítica, onde um intermediário covalente é formado após a ação de ativação do resíduo de cisteína por um resíduo de histidina em um nucleófilo (DUNN, 2001). Essa classe de enzimas proteolíticas é fortemente inibida por p-cloromercuriobenzoato (pCMB) e L-

trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano (E-64), além de outros agentes tais como iodoacetamida, leupeptina, cistatina e quimostatina (BOND; BUTLER, 1987).

Sabe-se da existência de pelo menos 50 cisteíno proteases no genoma de *Leishmania* (SWENERTON et al., 2010). Dentre as cisteíno proteases já estudadas deste protozoário, a metacaspase é essencial para a progressão do ciclo celular de *Leishmania* e a firme regulação dos níveis de sua expressão é requerida para a proliferação desses parasitos (AMBIT et al., 2008). Outras famílias de cisteíno proteases já bem caracterizadas de *Leishmania* são as da catepsina L-like A (CPA) e B (CPB) e da catepsina B-like C (CPC), as quais são encontradas em grandes organelas lisossomais, denominadas megassomos, no estágio amastigota. A deleção dos genes *cpc* de *L. mexicana* sugeriram que o papel primário das proteases CPC é facilitar a invasão dos macrófagos pelos promastigotas (SOUZA et al., 1994; BART et al., 1997; MOTTRAM et al., 2004).

Inúmeros trabalhos demonstram a importância das cisteíno proteases no ciclo de vida ou patogenicidade de parasitos dentro da célula hospedeira, o que faz destas enzimas alvos interessantes no desenvolvimento de quimioterápicos para diversas doenças (DUBIN et al., 2005; EAKIN et al., 1993; HELLBERG et al., 2002; MCKERROW et al., 1999; OCÁDIZ et al., 2005; SAJID; MCKERROW, 2002). Em muitos parasitos, as cisteíno proteases agem extracelularmente, ajudando o parasito na invasão tecidual, no ganho de nutrientes e/ou na evasão do sistema imune do hospedeiro (RZYCHON et al., 2004; SAJID; MCKERROW 2002). Estas enzimas possuem uma ampla diversidade funcional, como adaptabilidade a diferentes substratos e estabilidade em diversos ambientes biológicos.

1.5. Ubiquitinação versus deubiquitinação

1.5.1. Ubiquitinação

As proteínas, nas células eucariotas, são sujeitas a uma ampla variedade de modificações pós-traducionais, que aumentam grandemente a diversidade funcional e a dinâmica do proteoma. Dentre essas modificações podem ser citadas a ligação de pequenas moléculas tais como grupos fosfato, acetil, metil, ou até certas proteínas, ligadas transitoriamente (HOCHSTRASSER, 2000; PICKART, 2001; XU; PENG,

2006). A ubiquitina foi a primeira proteína relatada por participar deste tipo de modificação e é a melhor compreendida nos dias de hoje.

Durante os últimos 20 anos, tornou-se óbvio que o principal mecanismo de degradação seletiva de proteínas envolve essa modificação pós-traducional de proteínas pela ubiquitina (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998).

O processo de proteólise seletiva consiste basicamente de três passos: identificação de proteínas a serem degradadas, marcação destas proteínas para degradação por meio da ligação de uma molécula de ubiquitina (ubiquitinação) e a entrega destas para o proteassoma, um complexo multiprotéico que irá degradar e reciclar a ubiquitina (WILKINSON, 2000).

O proteassoma 26S consiste em dois complexos, o 20S (formado por sete subunidades α e sete subunidades β) e o 19S (formado por seis ATPases e doze subunidades não ATPásicas) (PICKART; COHEN, 2004). O complexo 20S é bem caracterizado como formador do núcleo catalítico e o complexo regulatório 19S, acredita-se ser responsável pelo reconhecimento e desenovelamento do substrato (KAISER; HUANG, 2005), como pode ser visualizado na figura 4.

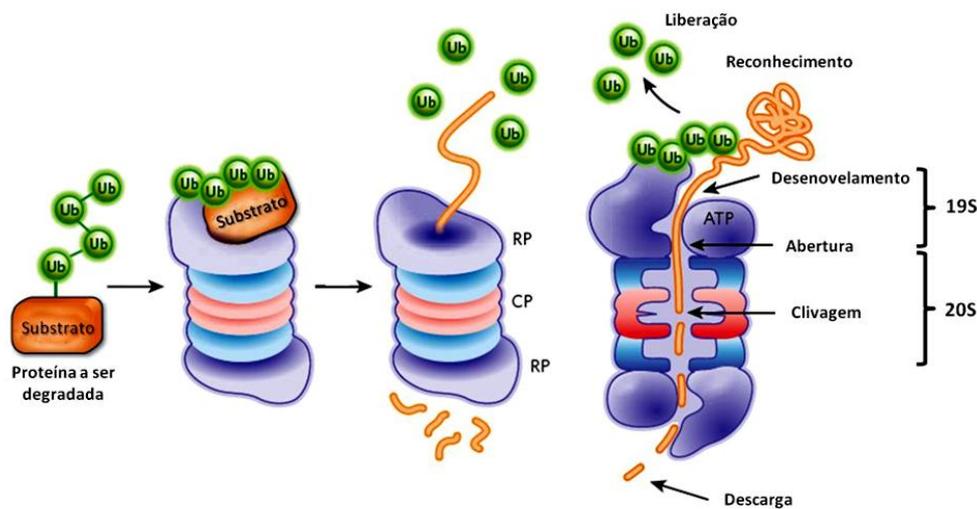


Figura 4. Degradação de proteínas poliubiquitinadas via proteassoma 26S e ilustração esquemática de seus complexos 19S e 20S. Proteínas marcadas para a degradação por cadeias de ubiquitina são reconhecidas pelos receptores de ubiquitina tanto da partícula regulatória (RP) do proteassoma 26S quanto das proteínas adaptadoras que se associam reversivelmente com a proteína poliubiquitinada e com as subunidades proteassômicas específicas. Dentro da RP (complexo 19S), as ATPases desenovelam a proteína e a translocam para a partícula central (complexo 20S) que abriga os sítios proteolíticos em uma câmara interna. O substrato é então clivado em pequenos peptídeos e a ubiquitina é normalmente reciclada pelas DUBs que se ligam a ela ou são intrínsecas à RP (Adaptado de HOCHSTRASSER, 2009).

O proteassoma já foi reportado em diversas espécies de *Leishmania*, como *L. mexicana* (ROBERTSON, 1999), *L. major* (BOUZAT et al., 2000), *L. chagasi* (SILVA-JARDIM et al., 2004) e *L. donovani* (CHRISTENSEN et al., 2000). A presença de homólogos aos genes da ubiquitina e proteassoma de eucariotos no genoma de *Leishmania* (geneDB, www.genedb.org) foi relatada. Silva-Jardim e colaboradores (2004) mostraram que a inibição do proteassoma de *L. chagasi* pela lactacistina ou pela clasto-lactacistina- β -lactona, que são inibidores altamente específicos da atividade proteolítica do proteassoma (FENTEANY et al., 1995), tem um grande impacto no crescimento *in vitro* de promastigotas e na replicação do parasito dentro da célula.

A ubiquitina é uma proteína de 76 aminoácidos, a qual é amplamente distribuída e altamente conservada entre os eucariotos. Entre as ubiquitinas de fungo e humana há uma diferença de apenas três aminoácidos. A ubiquitina é covalentemente ligada à resíduos de lisina de substratos protéicos em um processo de múltiplos passos. Se apenas uma molécula de ubiquitina é ligada à proteína, denomina-se monoubiquitinação, um processo que é de grande importância no tráfego de proteínas, mas que também regula o brotamento de retrovírus e modula diretamente a função da proteína (HICKE, 2001). Já, se várias moléculas de ubiquitina são ligadas, o processo denomina-se poliubiquitinação.

Ubiquitinação é um processo reversível que desempenha papéis chaves nas cascatas de transdução de sinal e na determinação da estabilidade de proteínas. Este processo de conjugação da ubiquitina à proteína alvo de forma covalente é acompanhado por uma série de reações. Primeiramente uma enzima ativadora de ubiquitina (E1) forma uma ligação de tiol éster com a molécula de ubiquitina de modo ATP dependente. O motivo ubiquitina é então transferido para uma das doze enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) e então para a proteína-alvo específica por meio da ação de diversas centenas de ubiquitina ligases (E3), levando à formação de uma ligação isopeptídica entre a glicina da região C-terminal da ubiquitina e o grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina da proteína alvo (PICKART, 2001; WILKINSON, 1995) (Fig. 5). Nos humanos, há aproximadamente 600 ubiquitina ligases E3 que garantem a especificidade de seleção do substrato.

Após a adição da primeira molécula de ubiquitina ao substrato, diversas outras ubiquitinas podem ser adicionadas essencialmente pela repetição da mesma reação bioquímica, mas com a diferença de que as pontes isopeptídicas são formadas entre a

glicina 76 da ubiquitina ativada e o grupo ε de um dos sete resíduos internos de lisina da ubiquitina (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 or Lys63) já ligada ao substrato (SOARES et al., 2004). Alternativamente, a região N-terminal pode ser usada para ampliar as cadeias de ubiquitina. Todas as ligações formadoras dessas cadeias existem em eucariotos (MEIERHOFER et al., 2008; PENG et al., 2003), entretanto apenas as ligações à Lys48 e Lys63 foram bem estudadas (IKEDA; DIKIC, 2008).

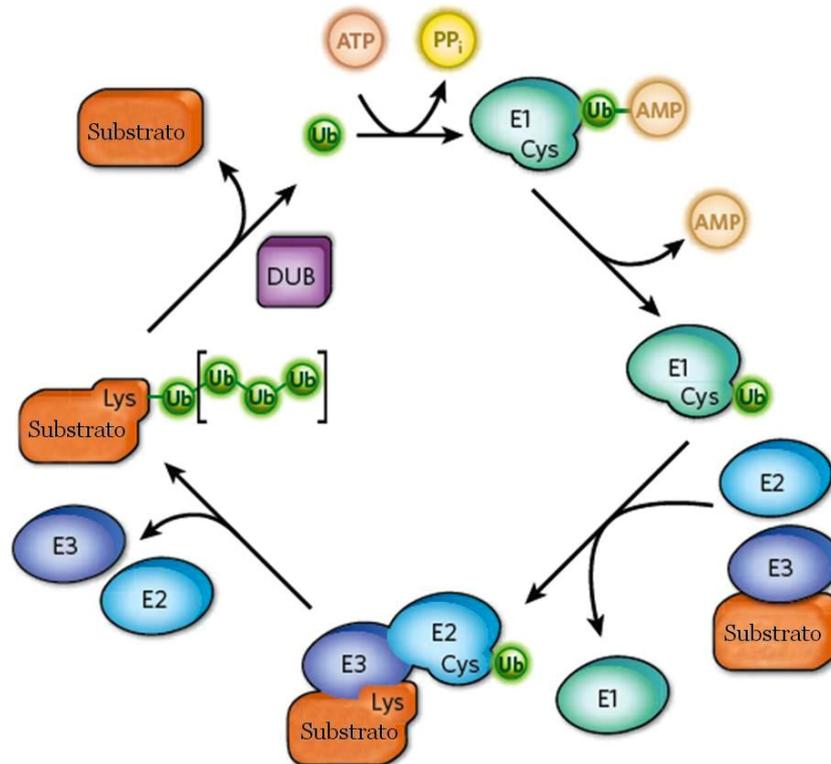


Figura 5. Reações e enzimas envolvidas no processo de ubiquitinação. A ubiquitina é ativada por uma enzima ativadora de ubiquitina (E1) e transferida para o substrato protéico pela enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e ubiquitina ligase (E3), resultando na ligação de uma única molécula (monoubiquitinação) ou na síntese de cadeias de ubiquitina (poliubiquitinação) (Adaptado de HOCHSTRASSER, 2009).

As cadeias de ubiquitina ligadas à lisina 48 geralmente marcam os substratos protéicos para degradação via proteassoma 26S. Isto acontece para substratos que precisam ser eliminados para o bom funcionamento da progressão do ciclo celular, controle de qualidade das proteínas, transdução de sinal e ritmo circadiano. Já as ligadas à lisina 63 ou 29 medeiam várias funções não degradativas, como o tráfego de proteínas,

interações proteína-proteína e ativação funcional de fatores de sinalização (ADHIKARI et al., 2007; HAGLUND; DIKIC, 2005; HERSHKO; CIECHANOVER, 1998). A monoubiquitinação também medeia vários processos celulares não degradativos, tais como endocitose de receptores, reparo e replicação do DNA e transcrição gênica (SIGISMUND et al., 2004) (Fig. 6).

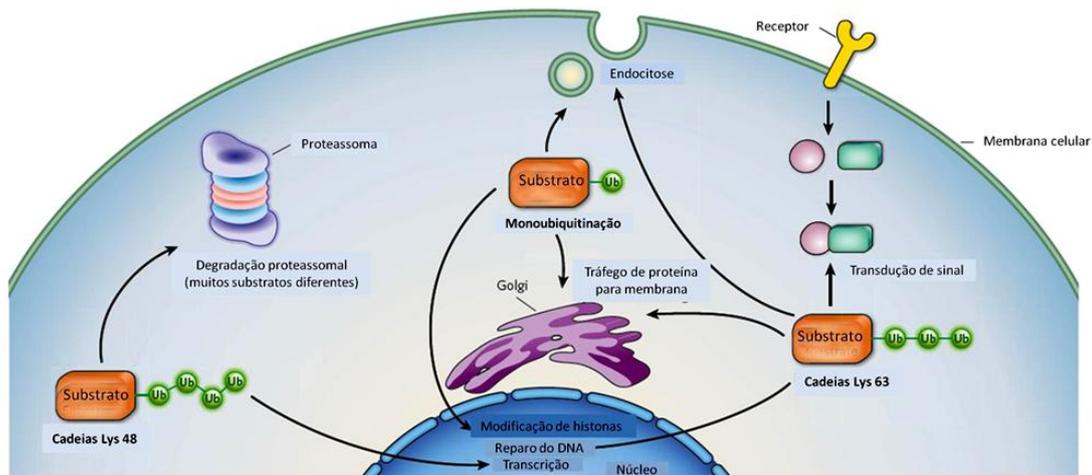


Figura 6. Processos celulares que dependem da ubiquitinação. Cadeias de ubiquitinas K-48 ligadas são mais comumente associadas com a degradação proteassômica, mas também podem regular a transcrição por um mecanismo não-proteolítico. Cadeias de ubiquitina ligadas à K-63 participam da transdução de sinal, tráfego de proteínas para a membrana, endocitose e reparo do DNA. A monoubiquitinação substrato-específica regula todos esses processos bem como a transcrição gênica modulada pela cromatina (Adaptado de HOCHSTRASSER, 2009).

1.5.2. Deubiquitinação

A ubiquitinação é um processo altamente dinâmico e é balanceado pela desconjugação da ubiquitina por enzimas deubiquitinantes (DUBs) (KAISER; HUANG, 2005), também chamadas de deubiquitinases. A deubiquitinação é o processo pelo qual as cadeias de ubiquitinas são desconjugadas de proteínas ubiquitinadas, revertendo o processo de ubiquitinação e regenerando as moléculas de ubiquitinas livres. DUBs são proteases que clivam cadeias de ubiquitina de substratos protéicos ou do resto de sua degradação.

Embora, o papel da deubiquitinação seja menos estudado, vários grupos de pesquisa demonstraram o papel imunorregulatório de DUBs. Como exemplo, podemos

citar a otubaína, que é uma família de DUBs recentemente identificada que pertence à superfamília de proteínas do tumor ovariano (OTU) (NANAO, 2004). A otubaína tem como substrato a proteína E3 GRAIL, uma proteína relacionada com a anergia de linfócitos (SOARES et al., 2004). Outro exemplo é a proteína A20, um regulador negativo da inflamação, uma vez que degrada as ubiquitinas ligadas a TRAF6 e IKK γ , fatores que quando ubiquitinados ativam uma cascata de fosforilação que resulta na liberação do fator de transcrição NF- κ B responsável pela transcrição de vários genes de citocinas inflamatórias (BOONE et al., 2004; MAURO et al., 2006).

O genoma humano codifica aproximadamente 100 deubiquitinases, embora muitas delas permaneçam com suas funções desconhecidas (NIJMAN et al., 2005). As DUBs juntamente com as enzimas ubiquitinantes E1, E2 e E3 e o proteassoma formam o conhecido sistema ubiquitina-proteassoma (KAISER; HUANG, 2005).

1.5.2.1. Deubiquitinases

As enzimas deubiquitinantes, descobertas há mais de 15 anos, apresentam um papel central em uma grande variedade de processos celulares, desde o controle da degradação protéica até o desenvolvimento tecidual. Um exemplo é o desenvolvimento do olho da *Drosophila* por meio da deubiquitinação de porções líquidas por porções graxas e por meio da regulação da degradação da p53 pela protease ubiquitina-específica associada ao herpesvírus (USP7/HAUSP) (CHEN et al., 2002; LI et al., 2002).

Baseado na estrutura de seus domínios, as enzimas deubiquitinantes foram divididas em cinco famílias: as ubiquitina carboxi-terminal hidrolases (UCHs), proteases ubiquitina específicas (USPs), proteases relacionadas com o tumor ovariano (OTUs), proteases com domínio protéico da doença Machado-Joseph (MJDs), todas estas sendo cisteíno proteases, e as metaloenzimas contendo o domínio JAB1/PAB1/MPN (JAMMs) (NIJMAN et al., 2005). Estas enzimas possuem especificidade de substrato conferida pelos diferentes domínios de interação protéica, pela especificidade por cadeias de ubiquitinas ligadas pela lisina 48 ou pela lisina 63, além da variação de expressão e de localização subcelular (SUN, 2008).

A maioria das DUBs catalisa uma reação proteolítica entre o grupo ϵ -amino da Lys e a região C-terminal da ubiquitina. As famílias de DUBs pertencentes às cisteíno

proteases possuem dois ou três resíduos de aminoácidos cruciais no seu sítio catalítico, constituindo uma díade ou tríade catalítica, respectivamente. Nestas enzimas, a proximidade com as cadeias laterais da His diminui o pKa da Cys catalítica, permitindo um ataque nucleofílico nas ligações isopeptídicas. O terceiro resíduo (geralmente Asn ou Asp) alinha-se e polariza a His catalítica, o que nem sempre é essencial para a atividade destas enzimas, como exemplificado pela proteína 3 induzida pelo fator de necrose tumoral α (TNFAIP3, também conhecida como A20) (KOMANDER; BARFORD, 2008).

1.5.2.2. Deubiquitinases da família do tumor ovariano

A família do tumor ovariano (OTU) compreende a mais de 100 proteínas de diferentes organismos (EDELMAAN et al., 2009), sendo a segunda maior família de DUBs dos mamíferos, composta de 24 membros no genoma humano. O primeiro gene desta família foi identificado em *Drosophila melanogaster*, o qual tem o papel de regular o desenvolvimento dos ovários. As OTUs de mamíferos foram posteriormente descobertas a partir da homologia do domínio OTU (SUN, 2008).

Esta família de enzimas deubiquitinantes vem atraindo muita atenção devido a presença de sequências conservadas encontradas em vírus, bactérias, plantas, fungos e humanos, bem como devido ao seu papel na infecção viral (FRIAS-STACHELI et al., 2007).

Diversos membros da família OTU possuem atividade de deubiquitinação, como por exemplo, Cezanne (zinc finger celular anti-NF- κ B), TRABID, A20, VCIP135, DUBA, otubaína e proteases virais contendo o domínio OTU (WANG, et al., 2009). Dentre essas, A20, DUBA, otubaína 1 e Cezanne, estão envolvidos na regulação da resposta imune (SUN, 2008). A proteína A20 é um inibidor da via de sinalização do NF- κ B (BEYAERT et al., 2000), enquanto que a otubaína 1 é um regulador chave da anergia das células T por meio da GRAIL ubiquitina ligase do tipo RING (SOARES et al., 2004).

1.5.2.2.1. Otubaína

Das mais de 100 proteínas com o domínio OTU identificadas, as otubaínas estão entre as poucas que apresentam atividade deubiquitinante *in vitro* ou *in vivo* (EVANS et al., 2003; FRIAS-STACHELI et al., 2007; KAYAGAKI et al., 2007). A otubaína é uma cisteíno-peptidase, do clan CA e da família C65 e compartilha alto grau de homologia com sequências de diferentes espécies.

A otubaína 1 de humanos cliva tetra Ub ligadas a isopeptídeos, mas não cliva di Ub (EDELHANN et al., 2009). Já a otubaína 2 de humanos é inativa *in vitro* contra substratos ligados à peptídeos e isopeptídeos (BALAKIREV et al., 2003), mas cliva Ub-AMC (NANAO et al., 2004). As otubaínas 1 (31kDa) e 2 (27kDa) de humanos não apresentam nenhuma similaridade com nenhuma outra DUB conhecida, mas são similares entre si, e ambas têm o domínio OTU (BALAKIREV et al., 2003). Estas proteínas são codificadas por dois genes que estão localizados nas posições cromossômica 11q13.1 (otubaína 1) e 14q32.12 (otubaína 2) (HUBBARD et al., 2002).

As principais diferenças entre as duas otubaínas são a longa extensão N-terminal da otubaína 1 e a curta extensão C-terminal da otubaína 2. A extensão C-terminal da otubaína 2 inibe sua atividade proteolítica e parece estar envolvida na regulação da mesma na célula, visto que a remoção de 5 resíduos desta região logo abaixo do domínio OTU conservado produz uma proteína enzimaticamente ativa (BALAKIREV et al., 2003).

Estas proteínas possuem a tríade catalítica conservada sendo composta por cisteína, histidina e aspartato ou asparagina, que as caracterizam como cisteíno proteases (MAKAROVA et al., 2000). Análises de sequência mostram que a otubaína carrega vários dos principais domínios conservados: o domínio do tumor ovariano (OTU) no qual há a tríade catalítica de cisteíno proteases; o motivo de interação com a ubiquitina (UIMs) (HOFMANN; FALQUET, 2001); o domínio associado à ubiquitina (UBAs) (HOFMANN; BUCHER, 1996) geralmente encontrado em proteínas da via da ubiquitina; o sinal de localização nuclear putativo (NLSs) e o motivo LxxLL consenso (onde x pode ser qualquer aminoácido), o qual medeia a ligação de co-ativadores transcricionais à ligantes de receptores nucleares (HEERY et al., 1997)

A otubaína1 de humanos (Otu1Hs) possui uma isoforma, ARF1 (quadro de leitura alternativo 1), e estas, possuem em comum a porção C-terminal, contudo, o

domínio OTU intacto está ausente nesta isoforma (SOARES et al., 2004). Tanto a otubaína 1 quanto a ARF1 se ligam a GRAIL, uma das principais E3 ligases a ser induzida em células T sob condições anérgicas (LIN; MAK, 2007), mas têm efeitos opostos na regulação da auto-ubiquitinação e na degradação de GRAIL. Embora a otubaína 1 seja uma DUB, ela promove, ao invés de inibir, a auto-ubiquitinação (K48) e a proteólise de GRAIL (SOARES et al., 2004). Esta função inesperada da otubaína 1 pode ser mediada por outra DUB, USP8, que se liga e deubiquitina GRAIL. Entretanto, a atividade deubiquitinante da otubaína 1 parece ser importante, pois a ARF1 que não possui o domínio OTU e portanto não possui atividade deubiquitinante da otubaína, tem um papel oposto ao dela. Dessa forma, foi proposto que ambas as isoformas podem atuar na regulação do destino e da função de GRAIL (SOARES et al., 2004).

Esta DUB foi a primeira a ser relacionada à regulação da anergia de células T. A anergia é um importante tipo de tolerância periférica que pode ser induzida pela ligação do receptor de célula T (TCR) na ausência de sinais co-estimulatórios (SOARES et al., 2004).

As E3 ligases parecem regular negativamente a função ou expressão das moléculas sinalizadoras proximais de TCR, tais como a fosfolipase $C\gamma 1$ e proteína quinase C- θ , atenuando, portanto, a produção de IL-2 e a proliferação das células T (LIN; MAK, 2007). GRAIL também é expressa por células T reguladoras e parece ter um papel na produção das populações de células T reguladoras induzíveis na periferia (MACKENZIE et al., 2007). Consistente com sua habilidade em induzir a degradação de GRAIL por meio da poliubiquitinação da lisina 48, a otubaína promove a ativação das células T quando é superexpressa em células T de camundongos, enquanto a superexpressão de ARF1 inibe a ativação de células T (SOARES et al., 2004).

A Otu1Hs é bastante específica, clivando preferencialmente ubiquitinas ligadas à lisina 48 (K48) com relação à cadeias de ubiquitina ligadas à lisina 63 (K63), K29 ou K11, ou poliubiquitinas α -ligadas, o que pode dever-se à estreita cavidade do sítio P1'. Identificação por espectrometria de massa dos parceiros de interação celular sugerem que a otubaína 1 pode estar envolvida no processamento e na adesão e morfologia celular (EDELDMANN et al., 2009; WANG et al., 2009).

Além de estar envolvida na indução da anergia de linfócitos T CD4⁺ por meio da interação com a proteína E3 ligase GRAIL e com a protease específica da ubiquitina (USP8) (SOARES et al., 2004), estudos recentes mostraram que a Otu1Hs é expressa de

forma onipresente na maioria dos tecidos, o que sugere seu envolvimento em outros processos biológicos não restritos aos tecidos linfóides. De fato, segundo Stanisic e colaboradores (2009), a otubaína 1 interage com o receptor de estrógeno alfa (ER α), deubiquitina este receptor, nas células e *in vitro*, e reprime sua atividade transcricional em ensaios repórter transitórios como parte de sua regulação negativa da atividade de ER α (STANISIC et al., 2009). A otubaína 1 também regula este receptor endogenamente tanto por regular a transcrição gênica do mesmo em células Ishikawa, quanto por estabilizar a proteína de ER α na cromatina. Outro papel já estudado das otubaínas 1 e 2 de humanos é que ambas regulam negativamente a indução do IFN do tipo I induzida por vírus e a resposta celular antiviral por meio da deubiquitinação das proteínas TRAF3 e TRAF6 (LI et al., 2010).

Além disso, evidências prévias sugeriram que a mudança na expressão da otubaína 1 pode alterar a susceptibilidade à invasão bacteriana por *Yersinia enterocolitica*, efeito este que é dependente de sua atividade catalítica e de sua habilidade em estabilizar a forma ativa de RhoA (membros da família gênica homóloga à ras A) anteriormente à invasão. YpkA e Otu1Hs modulam a estabilidade de RhoA de formas opostas, levando, portanto, ao rearranjo do citoesqueleto que pode estar envolvido na entrada da bactéria. Durante este processo, Otu1Hs é fosforilada, uma modificação pós-traducional que modula sua habilidade em estabilizar RhoA (EDELDMANN et al., 2010). Dessa forma, a susceptibilidade de invasão por *Yersinia* aumenta significativamente com a superexpressão do tipo selvagem da Otu1Hs (EDELDMANN et al., 2010). Também foi proposto que a otubaína pode ser um substrato para a atividade serino ou treonino quinase de YpkA (JURIS et al., 2006).

Estudos recentes mostraram que a Otu1Hs também tem um papel que é independente de seu sítio catalítico. Nakada e colaboradores (2010) descobriram que a Otu1Hs é um modulador fisiológico do reparo do DNA e que sua depleção pode atenuar o defeito do reparo do DNA associado à inibição de ATM (NAKADA et al., 2010). De forma surpreendente, a otubaína 1 inibe a resposta de quebra da dupla-fita do DNA independentemente de sua atividade catalítica o que pode dever-se à sua habilidade em reconhecer a ubiquitina.

No genoma de *L. major* três famílias de deubiquitinases podem ser identificadas, C65 (otubaína), C12 e C19 (ambas ubiquitina carboxihidrolases), todas da classe de cisteíno proteases. Esta última apresenta 16 sequências no genoma com uma grande

variedade de massas moleculares preditas e domínios (peptídeo sinal, exonuclease, zinc finger, etc) (MOTTA, F.N. – dados não publicados).

O gene da otubaina de *Leishmania chagasi* está localizado no cromossomo 17 e possui uma fase aberta de leitura de 813 pares de base, codificando uma proteína de 270 aminoácidos com massa predita de 30,32 kDa. Visto a possibilidade desta protease em modular a sinalização celular em processos essenciais para a infectividade ou viabilidade do parasito, a proposta deste trabalho foi iniciar os estudos desta DUB de *Leishmania chagasi*.

2. JUSTIFICATIVA

As doenças infecto-contagiosas têm se tornado um sério problema de saúde pública tanto em países industrializados como em desenvolvimento. Os últimos anos foram marcados pelo surgimento de surtos endêmicos, epidêmicos e até mesmo pandêmicos, ocasionados por agentes infecciosos já conhecidos. Dentro deste quadro podemos destacar as leishmanioses, doenças que ainda representam um grave problema de saúde pública no Brasil e estão na lista de doenças negligenciadas.

Os tratamentos mais eficazes para as leishmanioses além de causarem muitos efeitos colaterais, por muitas vezes até a morte súbita, ainda apresentam altos custos e a resistência a esses medicamentos tem se tornado emergente. Este cenário mostra a necessidade do desenvolvimento de fármacos eficientes, menos tóxicos, e acessíveis à população de baixa renda, a principal acometida pela doença. Até o momento, pouco se sabe sobre o amplo espectro de funções apresentadas pela otubaína e nenhum estudo de caracterização da mesma foi realizado em tripanossomatídeos.

Dessa forma, a caracterização da otubaína e o entendimento de como esta proteína pode atuar na relação parasito-hospedeiro é de grande relevância visto que a mesma pode representar um potencial alvo para o desenvolvimento de quimioterápicos capazes de interromper a progressão da doença.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar a otubaína de *L. chagasi* sob o prisma da busca de alvos com a possibilidade de inovação no tratamento da infecção causada por *L. chagasi*, agente causador da leishmaniose visceral nos países da América do Sul.

Neste contexto, as seguintes etapas foram traçadas e realizadas:

- Clonar o gene *otulc* e expressar a enzima recombinante em sistema heterólogo em *Escherichia coli*.
- Purificar a enzima recombinante
- Produzir anticorpos específicos contra a enzima purificada e determinar sua imunogenicidade.
- Identificar a localização intracelular da OtuLc na forma promastigota do parasito e fazer sua colocalização com marcadores lisossomais.
- Propor um modelo tridimensional de OtuLc pelos métodos de modelagem e dinâmica molecular.

4. METODOLOGIA

4.1. Cultura de *Leishmania chagasi*

Promastigotas de *Leishmania chagasi* foram cultivados em meio LIT (*Liver Infusion Trypton*) suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado e 100 µg/mL de gentamicina a 28 °C.

4.2. Extração de DNA genômico

O DNA genômico da forma promastigota de *Leishmania chagasi* foi extraído segundo protocolo adaptado de Medina-Acosta e Cross (MEDINA-ACOSTA; CROSS, 1993). Primeiramente, 5×10^7 células foram separadas por centrifugação 1.300 x g por 10 min e lavadas 3x com PBS. O pellet obtido foi ressuscitado em 150 µL de tampão TELT (50 mM TrisHCl, pH 8,0; 62,5 mM EDTA, pH 9,0; 2,5 M LiCl; 4% Triton X-100) e incubado à temperatura ambiente por 5 min. Após, a mesma quantidade de fenol/clorofórmio equilibrado em água foi adicionada ao tubo que ficou sob fraca agitação por 5 min. As fases foram separadas por centrifugação a 13000 x g por 5 min e a fase aquosa foi recuperada e a ela foi adicionado 300 µL de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 5 min. Após 10 min de centrifugação a 13.000 x g, o pellet foi lavado com etanol absoluto e novamente centrifugado e o etanol descartado. O pellet foi seco e finalmente ressuscitado em 250 µL de tampão TE (10 mM TrisHCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0) contendo 20 µg/mL de ribonuclease pancreática e incubado à 37 °C por 30 min.

4.3. Clonagem gênica

O fragmento de DNA de 813 pares de bases correspondente à fase aberta de leitura (Open Reading Frame - ORF) do gene da otubaína (*otulc*) foi amplificado por Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) usando os iniciadores 5'-ccaacaCTCGAGATGGATGAGGGACTGCCAAT-3' (senso) e 5'-ctatgaaGGATCCTCACCCGGGTCCCCGCC-3' (anti-senso) - (letras minúsculas, bases aleatórias; sublinhado, sítio de restrição; negrito, códon de iniciação). Os primers

incluíram os sítios de restrição 5'*Xho*I e 3'*Bam*HI para clonagem direcional no vetor de expressão pET-19b. A PCR foi realizada em um volume final de 50 µL, composta de 50 ng de DNA genômico de *L. chagasi*, 10 pmol dos iniciadores senso e anti-senso específicos do gene, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ e 4 unidades de Taq polimerase (Invitrogen). O seguinte programa de amplificação foi utilizado: 94 °C por 3 min, 30 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 2,5 min. A extensão de poliadenilação foi desenvolvida a 72 °C por 5 min. Para assegurar a fidelidade da amplificação por PCR, uma nova reação foi realizada com a enzima de alta fidelidade, Elongase® (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O produto da amplificação obtido, de aproximadamente 813 pb, foi ligado ao vetor de clonagem PCRII-TOPO (Invitrogen) por 16 h a 14 °C e então, transformado por choque térmico na cepa DH5α de *Escherichia coli*. As células submetidas ao processo de transformação foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo ampicilina (50 µg/mL), IPTG (0,5 mM) e X-Gal (80 µg/mL), e incubadas por toda a noite em estufa a 37 °C. As colônias resultantes foram triadas por PCR de colônia para verificar a clonagem. O DNA plasmidial das colônias de bactérias positivas foi submetido à análise de restrição enzimática com *Xho*I e *Bam*HI para confirmação da clonagem e, após, extraído usando o kit *HiPure Plasmid DNA Purification* (Invitrogen). A região codificante do gene *otulc* obtida foi subclonada no vetor de expressão pET-19b (Novagen). Este vetor contém uma região que codifica uma cauda composta por dez resíduos de histidina, expressa junto com a proteína alvo na sua extremidade N-terminal. Após a clonagem, o novo plasmídeo recombinante foi novamente transformado em *E. coli* DH5α por choque térmico. As células submetidas ao processo de transformação foram plaqueadas em meio LB-ágar com ampicilina (50 µg/mL) e crescidas em estufa a 37 °C por 16 h. Todas as colônias da placa foram crescidas individualmente em meio LB líquido contendo ampicilina, submetidas à extração do DNA, e novamente o teste de restrição enzimática foi realizado para confirmação da clonagem.

4.4. Expressão heteróloga e purificação da proteína recombinante

Para a expressão de OtuLc recombinante, o plasmídeo pET-19b-OtuLc foi transformado em células de *Escherichia coli* BL21 (DE3). As células transformadas

foram crescidas em meio LB suplementado com 50 µg/mL de ampicilina a 37 °C . As células foram induzidas a Abs₆₀₀ de 0,6 com isopropil-1-β-D-galactopiranosídeo (IPTG). As condições ótimas de expressão foram obtidas por ensaio em diferentes temperaturas (16 °C, 20 °C, e 37 °C), concentrações de IPTG (1 mM; 0,5 mM; 0,1 mM e 0,05 mM) e tempos de indução (3 h, 5 h e 16 h) a 200 rpm.

A cultura de bactérias foi centrifugada a 3000 x g por 15 min e após o sobrenadante descartado, as bactérias foram ressuspensas com tampão de lise (50 mM NaH₂PO₄, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazol e 0,2% lisozima) para purificação em resina Agarose-Níquel (Sigma). Concentrações efetivas dos seguintes inibidores de proteases foram adicionadas ao tampão para evitar a degradação da proteína recombinante: 1 µM de pepstatina (inibidor de aspártico protease) e 0,5 mM AEBSF (inibidor de serino protease). A lise das bactérias foi realizada por sonicação (3 ciclos com amplitude entre 40 e 50, pulsos de 7 segundos com intervalos de 1 segundo entre si, por um período de 3 min) no gelo e o homogenato foi centrifugado a 16.000 x g por 10 min.

A coluna agarose-níquel *HIS-Select® Nickel Affinity Gel* (Sigma), previamente equilibrada, foi carregada com o sobrenadante (fração solúvel), contendo a OtuLc recombinante (rOtuLc). A coluna foi extensivamente lavada com tampão (50 mM fosfato de sódio, 300 mM cloreto de sódio) em diferentes pHs com concentrações crescentes de imidazol (10 – 80 mM) e a rOtuLc foi eluída com 400 mM de imidazol. As proteínas solúveis purificadas foram analisadas em gel SDS/PAGE (12%) sob condições desnaturantes e redutoras, seguida da coloração do gel com Azul de Coomassie.

4.5. Ensaio eletroforético

As proteínas foram analisadas por meio de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 12% (SDS/PAGE) sob condições desnaturantes e redutoras. Às amostras a serem analisadas foi acrescentado tampão de amostra de proteína 5X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; SDS 2%; β-mercaptoetanol 5%; Azul de bromofenol 0,08% e Glicerol 30%), e as mesmas foram fervidas por 5 min. Para a eletroforese, utilizou-se tampão de corrida 1X (25 mM Tris; 191 mM Glicina e SDS 0,1%). Após a eletroforese, o gel foi corado com Azul de Coomassie. Como padrão utilizou-se o marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen).

4.6. Produção de anticorpos

A proteína solúvel purificada foi administrada intradermicamente em 5 camundongos machos BALB/c para a produção de anticorpos. Antes do primeiro desafio, amostras de sangue foram coletadas, os soros foram separados das mesmas, diluídos em glicerol (1:1) e estocados a -20 °C. Os animais receberam quatro doses do antígeno em intervalos de 15 dias. A primeira imunização constituiu-se de 5 µg de rOtuLc homogeneizada em adjuvante completo de Freund. As duas imunizações seguintes consistiram de 5 µg de rOtuLc purificada homogeneizada em adjuvante incompleto de Freund. A última imunização ocorreu com 1 µg da rOtuLc purificada sem adjuvante. Os soros imunes foram coletados após 5 dias do último desafio, diluídos em glicerol (1:1) e analisados por *immunoblot* para avaliar a produção de anticorpos específicos, tanto contra o extrato solúvel e insolúvel de *L. chagasi* quanto contra a proteína recombinante obtida da purificação.

4.7. Preparo do extrato de promastigotas de *L. chagasi*

A cultura da forma promastigota de *L. chagasi* foi centrifugada a 5.000 x g por 15 min, e após, lavada três vezes com PBS. O *pellet* foi ressuscitado em solução de PBS contendo coquetel de inibidores de protease - *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche) e congelado e descongelado repetidas vezes em nitrogênio líquido a fim de lisar as células. Em seguida, as células lisadas foram centrifugadas a 15.000 x g por 10 min para separar as porções solúvel e insolúvel. O sobrenadante contendo o extrato solúvel foi separado e o sedimento (extrato insolúvel) foi ressuscitado com PBS em quantidade igual ao resultante do extrato solúvel.

4.8. *Immunoblot*

A proteína solúvel purificada, rOtuLc, ou o extrato solúvel e insolúvel de promastigotas de *L. chagasi* foram submetidos a SDS/PAGE 12% (previamente descrito). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond-C Extra*, Amersham) utilizando tampão de transferência 1X (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol e 0,1% SDS). Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h com PBS/leite 5% para o bloqueio de ligações

inespecíficas. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens de 5 min cada com PBS. A membrana foi então incubada com anticorpo primário, sendo este o anti-His tag na concentração de 1:1.000 (para confirmar a expressão da rOtuLc) ou o soro pré-imune ou imune (para confirmar a produção de anticorpos contra a proteína recombinante) na concentração de 1:100 em solução de PBS/leite 1% por 16 h. A seguir, a membrana foi lavada novamente 3x com PBS e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina - *Goat Anti-mouse IgG alkaline Phosphatase Conjugate* (Novagen) na concentração de 1:3.000. A membrana foi então incubada no tampão da fosfatase alcalina por 10 min e os imunocomplexos formados foram revelados com o substrato da fosfatase-alcalina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-1-fosfato/Nitro Blue Tetrazolina - NBT/BCIP (Promega).

4.9. Imunofluorescência

4.9.1. Citolocalização da otubaína em promastigotas de *L. chagasi*

Para determinar a citolocalização da proteína OtuLc na forma promastigota de *L. chagasi*, ensaios de imunofluorescência indireta foram realizados utilizando o anticorpo específico contra a rOtuLc. Para tal, a cultura foi centrifugada a 2.000 x g por 10 min e, então, lavada três vezes com PBS filtrado e o sedimento ressuspendido em paraformaldeído 3,7% diluído em PBS por 30 min. Posteriormente, os parasitos foram fixados em lâmina, previamente lavada com EtOH 70% e H₂O milli-Q e carregada com solução 0,1% de poli-Lisina por 30 min. Em seguida, os parasitos foram permeabilizados com solução de Triton 0,1% em PBS por 10 min e a lâmina foi lavada três vezes com PBS. Para o aumento do sinal de fluorescência, 100 µL de *Enhancer* (Invitrogen) foi adicionado à lâmina por 30 min. A lâmina foi lavada com PBS e bloqueada com PBS/leite 5% durante 30 min. As lâminas foram, então, incubadas com o anticorpo primário monoespecífico anti-OtuLc por 2 h na diluição 1:100 em PBS/leite 1%. Após 3 lavagens com PBS, incubou-se as lâminas com anticorpo secundário (*goat anti-mouse IgG antibody*) conjugado com *Alexa Fluor 488* (Invitrogen) diluído 1:400 por 2 h. Após lavagem com PBS e posteriormente com H₂O milli-Q, as lâminas foram montadas com *ProLong® Gold antifade* contendo DAPI (Invitrogen) e observadas em microscópio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

4.9.2. Ensaio de colocalização da otubaína com a catepsina B de *L. chagasi*

O mesmo ensaio de imunofluorescência indireta, citado acima, foi utilizado para avaliar se a otubaína estaria localizada em compartimentos lisossomais. Para tal, foi feita a colocalização da otubaína com a catepsina B de *T. cruzi* (cisteíno-protease lisossomal), com a diferença de que no presente teste, promastigotas de *L. chagasi* foram incubados primeiramente com anticorpo específico anti-rOtuLc (1:100) em PBS/leite 1% por 2 h e após 3 lavagens com PBS as lâminas foram incubadas com anti-rCatB_Tc produzida em coelho (1:200) por 16 h a 4 °C. No dia seguinte, após 3 lavagens com PBS as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (*goat anti-mouse IgG antibody*) conjugado com *Alexa Fluor 488* (Invitrogen) diluído 1:400 por 2 h e posteriormente com o anticorpo secundário (*goat anti-rabbit IgG antibody*) conjugado com *Alexa Fluor 594* (Invitrogen) diluído 1:400 por mais 2 h. Após estes passos prosseguiu-se com o procedimento já citado no tópico anterior.

4.10. Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica da OtuLc recombinante (300 ng) ou nativa (extrato solúvel correspondente a 5×10^6 promastigotas) foi testada utilizando os substratos fluorescentes Ubiquitina-AMC (Ub-AMC, 0,1 – 2,5 μ M) ou Z- Leu-Arg-Gly-Gly-AMC (Z-LRGG-AMC, 20 μ M) em diferentes condições. A leitura da intensidade de fluorescência de AMC livre foi realizada em placas de 96 poços no espectrofluorímetro Spectramax M2_e (Molecular Devices), por excitação a 380 nm e emissão a 460 nm.

Extrato solúvel do parasito foi pré-incubado com 1 μ M do inibidor ubiquitina-aldeído ou com inibidores das principais classes de proteases (cisteíno, serino, aspártico ou metalo protease): E-64 (50 μ M), AEBSF (0,1 mM), Pepstatina (1 μ M), Bestatina (10 μ M), por 30 min e a atividade foi monitorada utilizando 20 μ M Z-LRGG-AMC em uma cinética de 20 min.

Para avaliar a influência do pH na atividade enzimática, rOtuLc ou extrato solúvel de promastigotas foi incubado com 20 μ M Z-LRGG-AMC em tampão AMT (100 mM ácido acético, 100 mM MES e 200 mM Tris-HCl) pH 4, 5, 6, 7, 7.5, 8 ou 9 em um volume final da reação de 100 μ L. Este mesmo experimento foi realizado na presença de 50 μ M de E-64 ou 5 mM de AEBSF.

4.11. Alinhamento múltiplo da otubaína

O alinhamento da sequência proteica da otubaína de *Leishmania chagasi* (NCBI - CAM59837.1) com as de outros organismos foi realizado com o auxílio do software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.htm>).

4.12. Modelagem molecular por homologia

A modelagem molecular por homologia de estruturas de proteína é um método computacional com potencial para construir um modelo 3D para uma proteína de estrutura desconhecida, o alvo, baseada em uma ou mais proteínas relacionadas de estruturas conhecidas, os moldes ou *templates*, com precisão e confiança comparáveis a estruturas experimentais de baixa resolução a partir da sequência de aminoácidos (FISER et al., 2002; GREER, 1981; JOHNSON et al., 1994; MARTÍ-RENOM et al., 2000; SALI; BLUNDELL, 1993; TRAMONTANO et al., 2001).

A modelagem molecular consiste basicamente em quatro passos: identificação e seleção de proteínas moldes, alinhamento das sequências primárias, construção das coordenadas atômicas do modelo e validação da estrutura.

A busca pelo *template* para construir o modelo tridimensional da otubaína de *Leishmania chagasi* foi feita no PDB - Protein Data Bank – (<http://www.rcsb.org.pdb>) sendo este, a proteína otubaína 1 de humanos sob o código 2ZFY (EDELMANN et al., 2009). O alinhamento da sequência alvo (OtuLc) com o molde (Otu1Hs) foi feito por meio da utilização do software ClustalW. Após essas etapas, o modelo foi construído por meio da utilização do servidor Swiss Model e todas as figuras estruturais foram geradas no programa VMD (HUMPHREY et al., 1996).

A qualidade do modelo predito determina a informação que pode ser extraída dele. Assim, estimar a precisão do modelo 3D da proteína é essencial para interpretá-lo. O modelo pode ser avaliado como um todo bem como em regiões individuais, com base na similaridade entre as sequências do *template* e do alvo, observando resíduos importantes em regiões da proteína como o sítio ativo e sua conservação (SÁNCHEZ; SALI, 1998). Um requerimento básico para um modelo é ter uma boa qualidade estereoquímica. O modelo OtuLc foi validado utilizando o programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1996).

4.13. Dinâmica molecular

A dinâmica molecular consiste na solução das equações de movimento de Newton para um sistema de N átomos interagentes. As equações são resolvidas simultaneamente em todos os passos da dinâmica, enquanto o sistema é mantido sob condições imutáveis de temperatura e pressão. As coordenadas dos átomos simulados são gravadas em intervalos regulares e, dadas em função do tempo, representam a trajetória do sistema. Ao longo da simulação o sistema tem a tendência de evoluir para um estado de equilíbrio, não necessariamente o seu mínimo global de energia. Por meio da análise dessa trajetória de equilíbrio, muitas propriedades macroscópicas podem ser extraídas dos arquivos de saída da dinâmica molecular (VAN DER SPOEL et al., 2006).

4.13.1. Parâmetros da Simulação

A simulação foi realizada fazendo uso do pacote computacional GROMACS 4 – *Groningen Machine for Chemical Simulations* (HESS et al., 2008). O arquivo de coordenadas espaciais da proteína foi construído por meio de modelagem molecular por homologia, como citado anteriormente, fazendo uso do servidor SWISS-MODEL (ARNOLD et al., 2006). O *ensemble* simulado foi composto pela macromolécula otubaína de *L. chagasi* imersa em 16.613 moléculas de água do tipo SPC – *Single Point Charge* – (BERENDSEN et al., 1981). No intuito de neutralizar a carga do sistema, foram introduzidos 16 íons de sódio.

O sistema em estudo foi contido por uma caixa cúbica com arestas de 81 Å. Foram executadas duas etapas de minimização de energia, uma por meio do algoritmo do Gradiente Conjugado (2 ns) e outra por meio do algoritmo Steepest Descent (2 ns). Após a etapa de minimização de energia, o sistema passou por uma normalização de pressão e temperatura, usando o integrador Stochastic Dynamics (SD) (2 ns cada). O sistema com energia já minimizada e temperatura e pressão equilibradas passou por um passo de restrição de posição, usando o integrador Molecular Dynamics (MD) (2 ns).

A caixa, contendo o *ensemble* descrito, foi submetida à dinâmica molecular de equilíbrio por um tempo de 20 ns à temperatura de 300 K e condições de volume e pressão imutáveis.

5. RESULTADOS

5.1. Identidade e similaridade entre as otubaínas de diferentes organismos

A sequência de aminoácidos da proteína otubaína de *L. chagasi* (CAM59837.1) foi alinhada com a sequência das otubaínas de *L. braziliensis* (CAM37967.1), *L. major* (CAJ04142.1), *T. cruzi* (XP_816450.1) e com a otubaína 1 (AAO27702.1) e 2 (AAO27703.1) de *H. sapiens* (Fig. 7). De acordo com o alinhamento, a OtuLc possui maior identidade com a otubaína de *L. major* (97%) seguido de *L. braziliensis* (83%) e *T. cruzi* (37%). Já com as otubaínas 1 e 2 de humanos, a OtuLc apresentou apenas 25% e 19% de identidade, respectivamente.

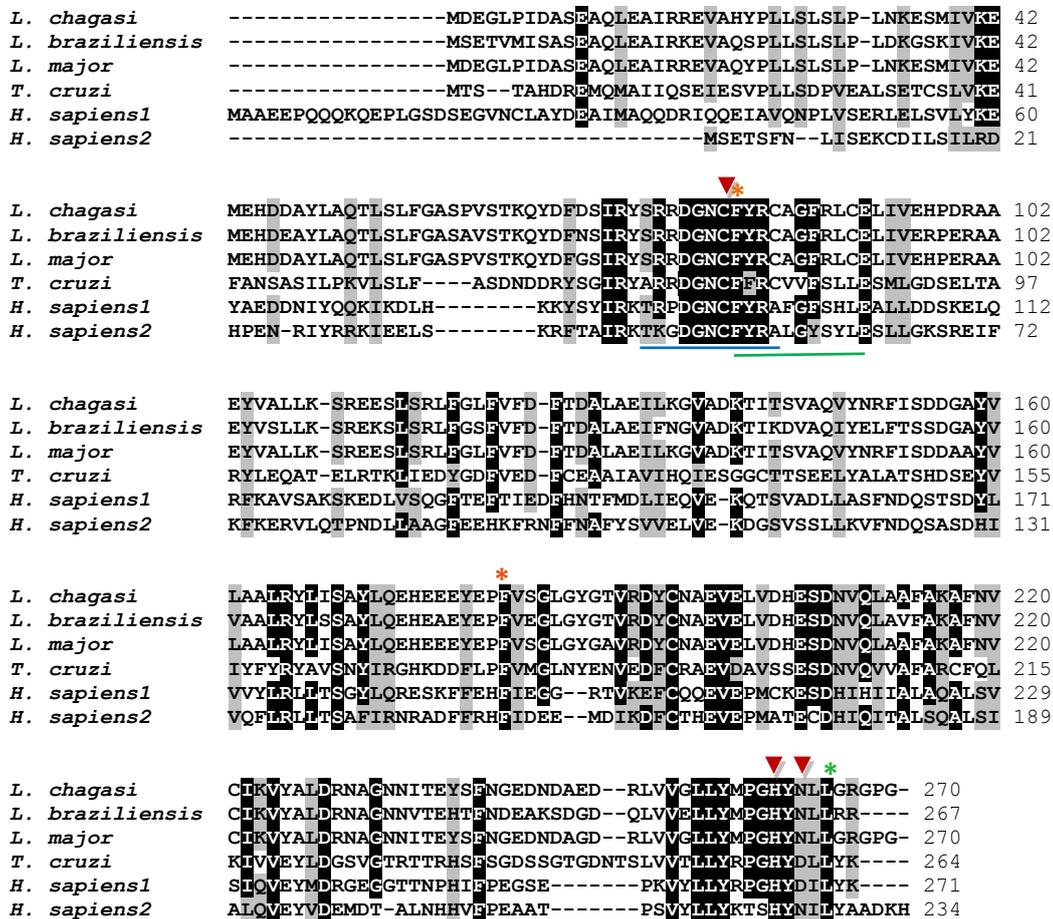


Figura 7. Alinhamento das sequências de otubaína de diferentes organismos. As sequências de aminoácidos disponíveis no NCBI de *Leishmania infantum ou chagasi* (CAM59837.1), *Leishmania braziliensis* (CAM37967.1), *L. major* (CAJ04142.1), *Trypanosoma cruzi* (XP_816450.1), *Homo sapiens 1* (AAO27702.1) e *Homo sapiens 2* (AAO27703.1) foram alinhadas usando o programa ClustalW. Os aminoácidos marcados em preto apresentam pelo menos 60% de identidade, e os marcados em cinza apresentam pelo menos 60% de similaridade. A linha azul embaixo da sequência marca o domínio OTU (tumor ovariano) de *L. chagasi* e a

verde o motivo de interação à ubiquitina (UIM). As setas indicam a tríade catalítica putativa presente em cisteíno proteases. Os asteriscos representam mutações (laranja: F→S; verde: L→P) presentes na sequência da OtuLc verificadas por meio do sequenciamento do gene *otulc* após sua clonagem no vetor pET-19b.

A otubaína de *L. chagasi* conserva o domínio do tumor ovariano (OTU) e o motivo de interação com a ubiquitina (UIMs) (Fig. 7), entretanto, diferentemente da otubaína de humanos, não possui o domínio associado à ubiquitina (UBAs), o sinal de localização nuclear putativo (NLSs) e o motivo LxxLL.

5.2. Clonagem do gene da otubaína de *L. chagasi*

O gene que codifica a OtuLc foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *L. chagasi*. A análise eletroforética da PCR apresentou um fragmento de DNA de aproximadamente 813 pares de base, correspondente ao gene da OtuLc (Fig. 8).

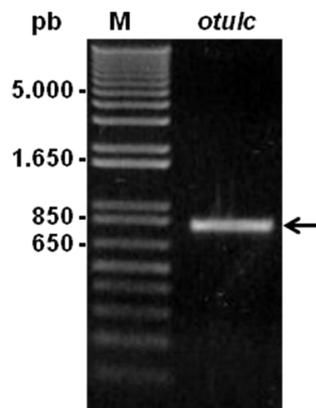


Figura 8. Amplificação do gene *otulc* por PCR. O gene *otulc* (813pb) foi amplificado utilizando os iniciadores específicos desenhados, a partir do DNA genômico de *Leishmania chagasi* com análise em gel de agarose 0,8% (coluna 1). M, marcador *1kb plus DNA ladder* (Invitrogen).

Após amplificado o gene *otulc*, o inserto foi purificado e inserido no vetor de clonagem pCRII-TOPO e o produto foi transformado em *E. coli* na cepa DH5 α e plaqueado em meio LB ágar suplementado com 50 μ g/mL de ampicilina a fim de impedir o crescimento de bactérias contaminantes não resistentes à ampicilina. O uso do antibiótico é necessário para que no meio cresça somente as bactérias com pCRII-TOPO, um plasmídeo que possui um gene de resistência à ampicilina. Após a incubação a 37 °C observaram-se colônias e uma delas foi escolhida para a realização da

minipreparação de DNA plasmideal, uma técnica que consiste na lise celular para que se obtenha o plasmídeo íntegro, pois isto permite que seja observado se o inserto de interesse foi clonado no vetor.

Após a minipreparação de plasmídeo da colônia selecionada, foi realizada uma digestão com as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI*, cujos sítios estão presentes nas sequências dos iniciadores usados na amplificação e cuja análise em gel de agarose 0,8% (p/v) demonstrou um fragmento único (Fig. 9A). Nas colunas 1 e 2, observa-se, respectivamente, a digestão com as enzimas *XhoI* e *BamHI*, onde o resultado é uma banda de 4,7 kb. Isto indica que o plasmídeo pCRII-TOPO, molécula dupla de DNA circular, foi linearizado e que o tamanho corresponde ao pCRII-TOPO (3,9 kb) com o gene *otulc* (813 pb) clonado. A coluna 3 representa a dupla digestão com *XhoI* e *BamHI*, com a liberação do gene *otulc* e do vetor de clonagem, de aproximadamente 813 pb e 3900 pb, respectivamente.

O gene *otulc* obtido da clonagem no pCRII-TOPO foi subclonado no vetor de expressão pET-19b nos sítios *XhoI* e *BamHI* com a finalidade de se obter a proteína OtuLc recombinante (rOtuLc) para estudos funcionais. A confirmação da clonagem se deu por meio do sequenciamento da amostra e a partir da análise em gel de agarose 0,8% (p/v) (Fig. 9B).

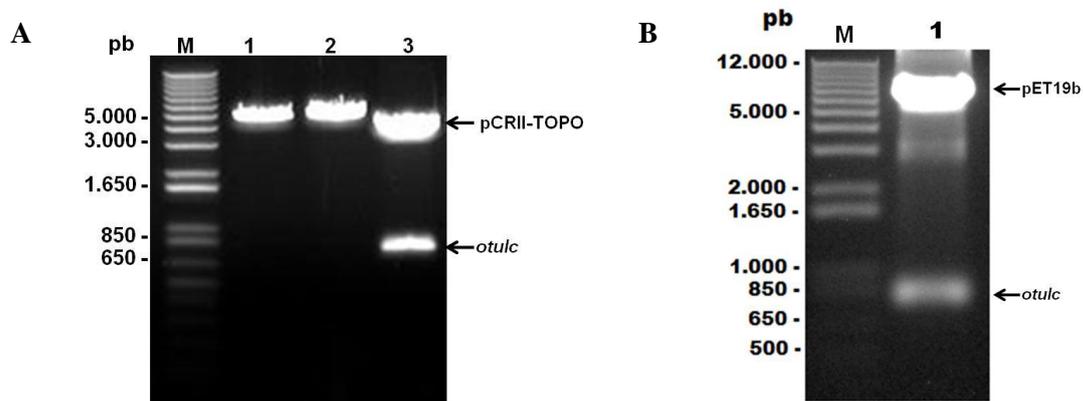


Figura 9. Clonagem no do gene *otulc*. A) Clonagem de *otulc* no vetor de clonagem pCRII-TOPO. O plasmídeo pCRII-TOPO contendo em sua sequência o gene *otulc* obtido por minipreparação plasmidial foi digerido no sítio *XhoI* (coluna 1), *BamHI* (coluna 2) ou dupla digestão nos sítios *XhoI* e *BamHI* (coluna 3), evidenciando a liberação do gene *otulc* e do vetor de clonagem. B) Subclonagem de *otulc* no vetor de expressão pET-19b. Dupla digestão do pET-19b nos sítios *XhoI* e *BamHI*. Confirmação da clonagem pela liberação do inserto e do pET-19b (coluna 1). Análise em gel de agarose 0,8%. M, marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen).

5.3. Expressão da otubaina recombinante de *L. chagasi*

Para a expressão da proteína rOtuLc, o plasmídeo pET-19b contendo o gene *otulc* foi transformado em *E. coli* BL21 (DE3) e algumas colônias foram induzidas com diferentes concentrações de IPTG a intervalos de temperaturas variadas. Como controle, o pET-19b vazio também foi induzido juntamente com as tentativas de expressão. O primeiro teste ocorreu com indução de três colônias com 1 mM IPTG, a 37 °C por 3 h (Fig. 10).

A análise em gel SDS/PAGE 12% demonstrou que as três colônias obtiveram expressão relativamente alta da rOtuLc na porção insolúvel do extrato total de *E. coli*, verificada pela presença de uma banda de massa molecular de aproximadamente 37 kDa (Fig. 10), indicando grande formação de corpos de inclusão. Apesar de a massa molecular predita ser 30,3 kDa, foi observada uma banda de 37 kDa. Este aumento deve-se à fusão da cauda de 10 histidinas à rOtuLc, adicionada pelo pET-19b ao inserto e importante por se ligar à coluna devido à afinidade ao níquel.

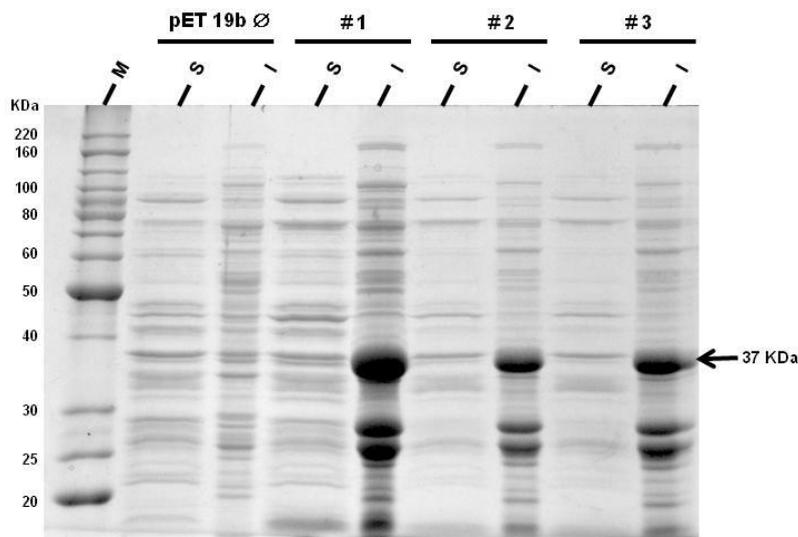


Figura 10. Ensaio eletroforético da indução da proteína rOtuLc a 37 °C. Extratos solúvel (S) e insolúvel (I) de 3 colônias positivas de *E. coli* - BL21 (DE3) para o pET-19b/*otulc* (#1, #2, #3) induzidos com 1 mM de IPTG a 37 °C por 3 h. A análise foi realizada por meio de gel SDS/PAGE (12%) sob condições redutoras. A seta indica a banda correspondente à rOtuLc. Coloração com azul de comassie. M, marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen).

Visando a obtenção de proteína na porção solúvel, as bactérias contendo a construção pET-19b/*otulc* foram induzidas com diferentes concentrações de IPTG (0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM), durante períodos distintos (3 h e 5 h) a 20 °C (Fig. 11). Os melhores resultados foram obtidos nas induções com 0,1 mM de IPTG, onde é possível observar que a proteína rOtuLc foi mais expressa na porção solúvel quando comparada à porção insolúvel (Fig. 11). Posteriormente, outros testes de indução foram realizados no intuito de otimizar a expressão da rOtuLc solúvel. Dessa forma, concentrações de IPTG variando de 0,1 mM a 1,0 mM foram testadas por um intervalo maior de tempo (16 h) e à temperatura de 16 °C (Fig. 12). Tendo em vista este resultado, o protocolo otimizado para a expressão da rOtuLc solúvel foi estabelecido a partir da indução com 0,1 mM IPTG a 16 °C por 16 h, uma vez que temperaturas mais baixas por um período de indução maior demonstraram-se mais efetivos na expressão da rOtuLc.

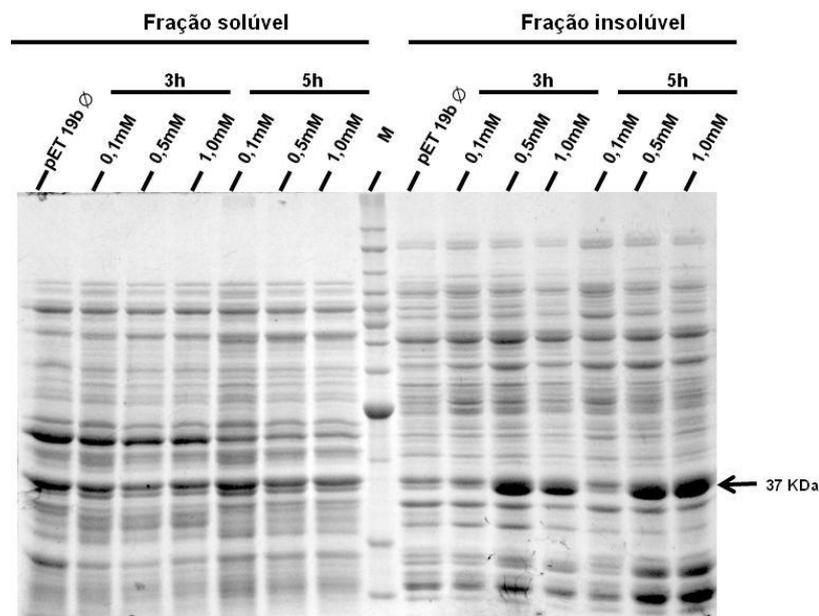


Figura 11. Ensaio eletroforético do teste de indução com diferentes concentrações de IPTG durante 3 e 5 h. Extratos solúvel e insolúvel de colônias positivas de *E. coli* - BL21 (DE3) para o pET-19b/*otulc* induzidos com 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM de IPTG a 20 °C por 3 h e 5 h, foram submetidos a SDS/PAGE (12%) sob condições desnaturantes e redutoras. A seta indicada representa a banda de 37 kDa correspondente à rOtuLc nas diferentes condições. Coloração: azul de comassie. M, marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen).

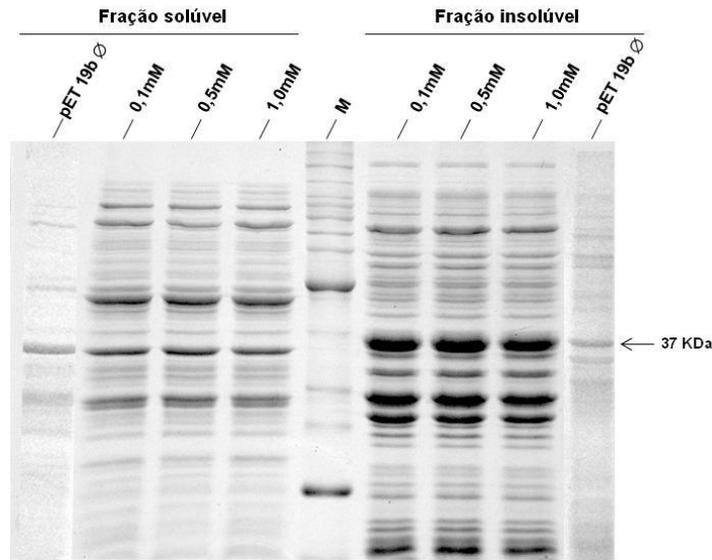


Figura 12. Ensaio eletroforético do teste de indução com diferentes concentrações de IPTG durante 16 h. Extratos solúvel e insolúvel de colônias positivas de *E. coli* - BL21 (DE3) para o pET-19b/*otulc* induzidos com 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM de IPTG a 16 °C por 16 h, foram submetidos a SDS/PAGE (12%) sob condições desnaturantes e redutoras. A seta indicada representa a banda de 37 kDa correspondente à rOtuLc nas diferentes condições. Coloração: azul de comassie. M, marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen).

A expressão de rOtuLc foi confirmada a partir de um *immunoblot* contra o extrato insolúvel de *E. coli* (DE3) induzido com 0,5 mM de IPTG a 20 °C por 3 h, utilizando anti-His tag como anticorpo primário e como anticorpo secundário o anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina - *Goat Anti-mouse IgG alkaline Phosphatase Conjugate* (Novagen). Foi observado que o anti-His tag reconheceu a banda do tamanho esperado da otubaína (~ 37 kDa) (Fig. 13).

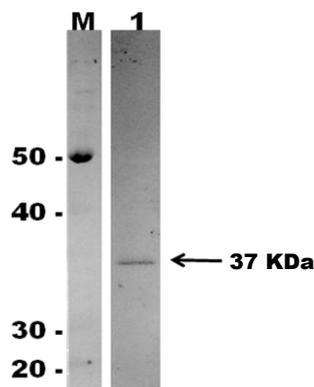


Figura 13. Reconhecimento da rOtuLc pela cauda de histidinas. *Immunoblot* realizado com Ac anti-His tag do extrato insolúvel de *E. coli* - BL21 (DE3) para o pET-19b/*otulc* induzidos com 0,5 mM de IPTG a 20 °C por 3 h (coluna 1). A seta indica a rOtuLc fusionada à cauda de histidina. M, marcador *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen).

5.4. Purificação da rOtuLc solúvel

As purificações da rOtuLc foram realizadas, a partir do protocolo otimizado, em resinas agarose-níquel das marcas Novagen e Sigma. Com a resina *HIS-Select® Nickel Affinity Gel* da Sigma, a OtuLc foi obtida com maior grau de pureza do que pôde ser observado com o *His•Bind® Purification Kit* da Novagen (dados não mostrados).

Após passar o extrato solúvel da rOtuLc na coluna, a resina foi lavada com tampão contendo concentrações crescentes de imidazol para que fossem retiradas proteínas inespecíficas ligadas à resina. A eluição da rOtuLc foi realizada com tampão contendo 400 mM de imidazol em pH 8,0 (Fig. 14). O imidazol é utilizado para as lavagens e eluições por ser um competidor da histidina (que naturalmente possui o grupo imidazol) na ligação da proteína à resina devido a sua afinidade pelos íons de níquel.

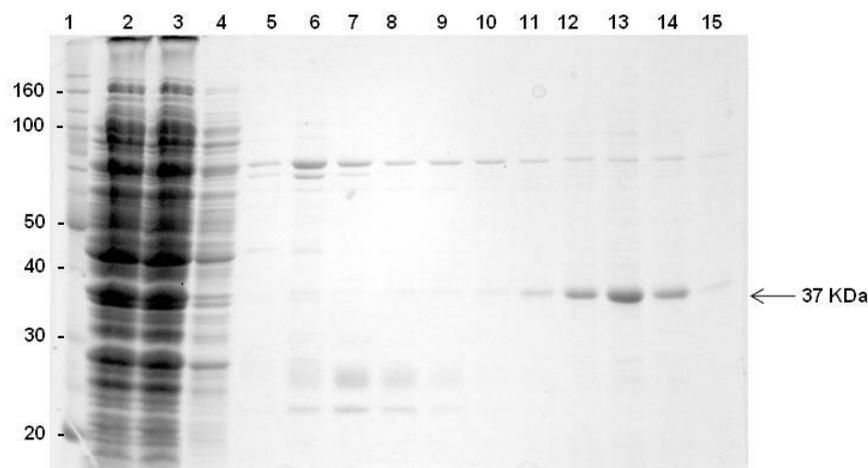


Figura 14. Purificação da rOtuLc com a resina *HIS-Select® Nickel Affinity Gel* pH 8,0. SDS/PAGE (12%) sob condições redutoras da purificação do extrato solúvel da colônia positiva de *E. coli* - BL21 (DE3) para o pET-19b/*otulc* induzidos com 0,1 mM de IPTG a 16 °C por 16 h. 1- Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). 2- Extrato total solúvel da bactéria. 3- Fração do extrato não ligada à resina. 4 e 5- Lavagens inicial e final da resina com 10 mM de imidazol. 6-12- Lavagens com 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 80 mM e 100 mM de imidazol, respectivamente. 13-15- Eluições da rOtuLc com 400 mM de imidazol. A seta indica a proteína purificada.

Novos testes de purificação foram conduzidos no intuito de obter a proteína mais limpa, livre de contaminantes. A mesma resina *HIS-Select® Nickel Affinity Gel* foi utilizada, entretanto, o pH do tampão fosfato usado tanto para equilibrar e lavar a coluna

quanto para eluir a proteína foi alterado a fim de verificar se este fator influenciava na purificação. Dois diferentes pHs foram testados, 6,0 (Fig. 15 A) e 9,0 (Fig. 15 B). As amostras foram analisadas em gel SDS/PAGE 12% e foi observado que a proteína rOtuLc foi obtida mais pura e em maior quantidade na purificação utilizando o tampão de pH 9,0. Dessa forma este último protocolo padronizado foi adotado para a obtenção da rOtuLc pura.

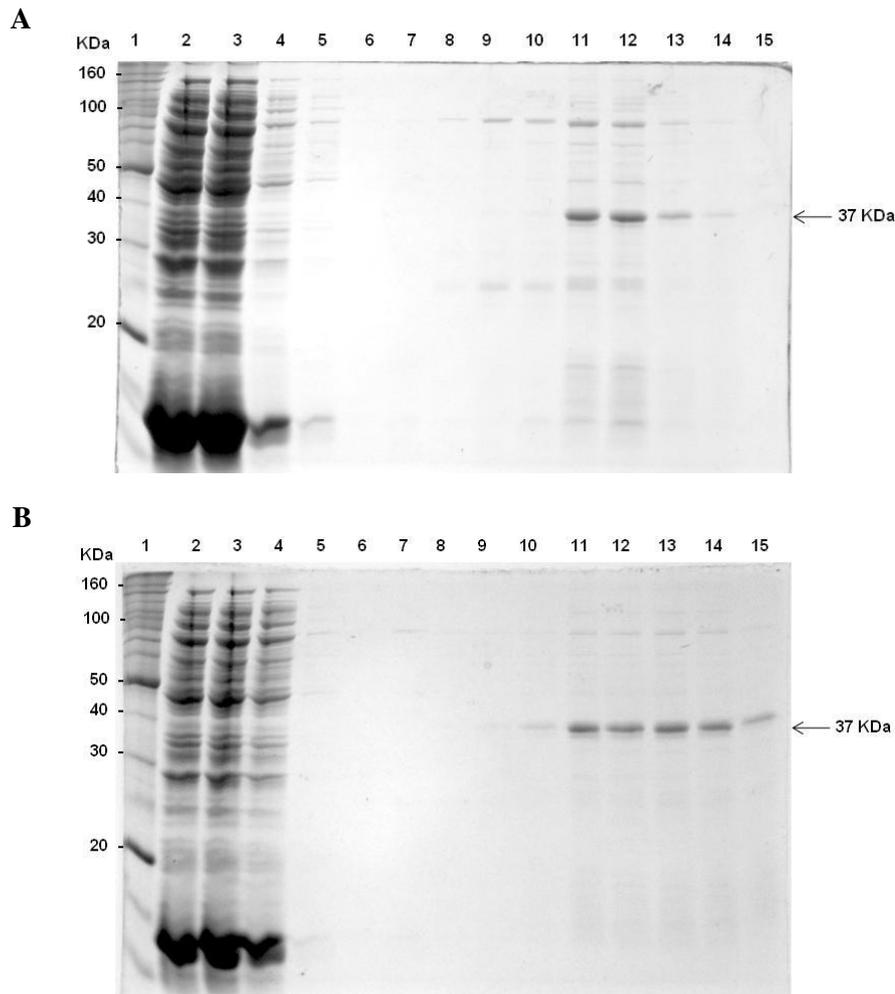


Figura 15. Purificação da rOtuLc com a resina *HIS-Select® Nickel Affinity Gel* e pH 6,0 (A) e 9,0 (B). SDS/PAGE (12%) sob condições desnaturantes e redutoras da purificação do extrato solúvel da colônia positiva de *E. coli* - BL21 (DE3) para o pET-19b/*otulc* induzidos com 0,1 mM de IPTG a 16 °C por 16 h. 1- Marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). 2- Extrato total solúvel da bactéria. 3- Fração do extrato não ligada à resina. 4 e 5- Lavagens inicial e final da resina com 10 mM de imidazol. 6 e 7- Lavagens inicial e final com 20 mM de imidazol. 8 e 9- Lavagens com 40 mM e 60 mM, respectivamente. 10-14- Eluições da rOtuLc com 400 mM de imidazol. 15- Eluição com 1M de imidazol. A seta indica a proteína purificada.

5.5. Produção de anticorpos contra a otubaína recombinante de *L.chagasi*

Para avaliar a imunogenicidade da rOtuLc, a enzima purificada foi injetada em 5 camundongos isogênicos. A produção de anticorpos foi monitorada por *immunoblot* realizados com a enzima recombinante e com pequena amostra do soro coletado 5 dias após a terceira e o desafio na quarta imunização. Como observado na Fig. 16, o soro produzido foi específico, pois reconheceu a proteína recombinante em extrato solúvel da bactéria contendo o plasmídeo pET19b-*otuLc* com a massa esperada de 37 kDa. No extrato de *L. chagasi*, observamos também uma só banda marcada, no entanto, esta apresentou massa molecular estimada em 45 kDa. Os soros pré-ímmunes não reagiram com nenhuma proteína de bactéria ou do parasito, indicando que otubaína foi imunogênica no camundongo.

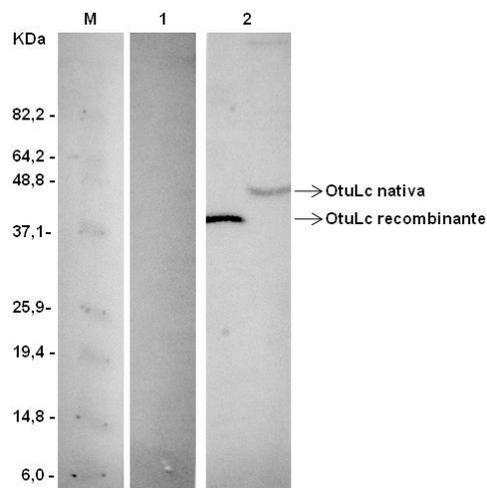


Figura 16. *Immunoblot* contra a otubaína recombinante e nativa de *L. chagasi*. *Immunoblot* com os soros pré-ímmune(1) e ímmune (2) na concentração de 1:100 contra o extrato solúvel de *E. coli* - BL21 (DE3) contendo o pET-19b/*otulc* induzido com 0,1 mM de IPTG a 16 °C por 16 h e contra o extrato solúvel de promastigotas de *Leishmania chagasi* (nativa). M, marcador *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen).

5.6. Citolocalização da otubaina em promastigotas de *L. chagasi*

Para determinar a localização intracelular da OtuLc em promastigotas de *L. chagasi*, o soro específico contra a proteína recombinante foi utilizado em ensaios de imunofluorescência indireta sobre os parasitos. O soro pré-imune foi utilizado como controle. As imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência mostraram uma marcação específica do soro anti-OtuLc nos parasitos, na qual a OtuLc parece estar presente em vesículas em algumas regiões citoplasmáticas dos promastigotas (Fig. 17 A-D). Foi observada nos parasitos, com grande frequência, uma marcação pontual de forte intensidade que se destaca perante vesículas menores marcadas, na região anterior próximo ao cinetoplasto (Fig. 17 C). Os parasitos incubados com o soro pré-imune apresentaram apenas a marcação do DNA nuclear e do cinetoplasto pelo DAPI (Fig. 17 E-H).

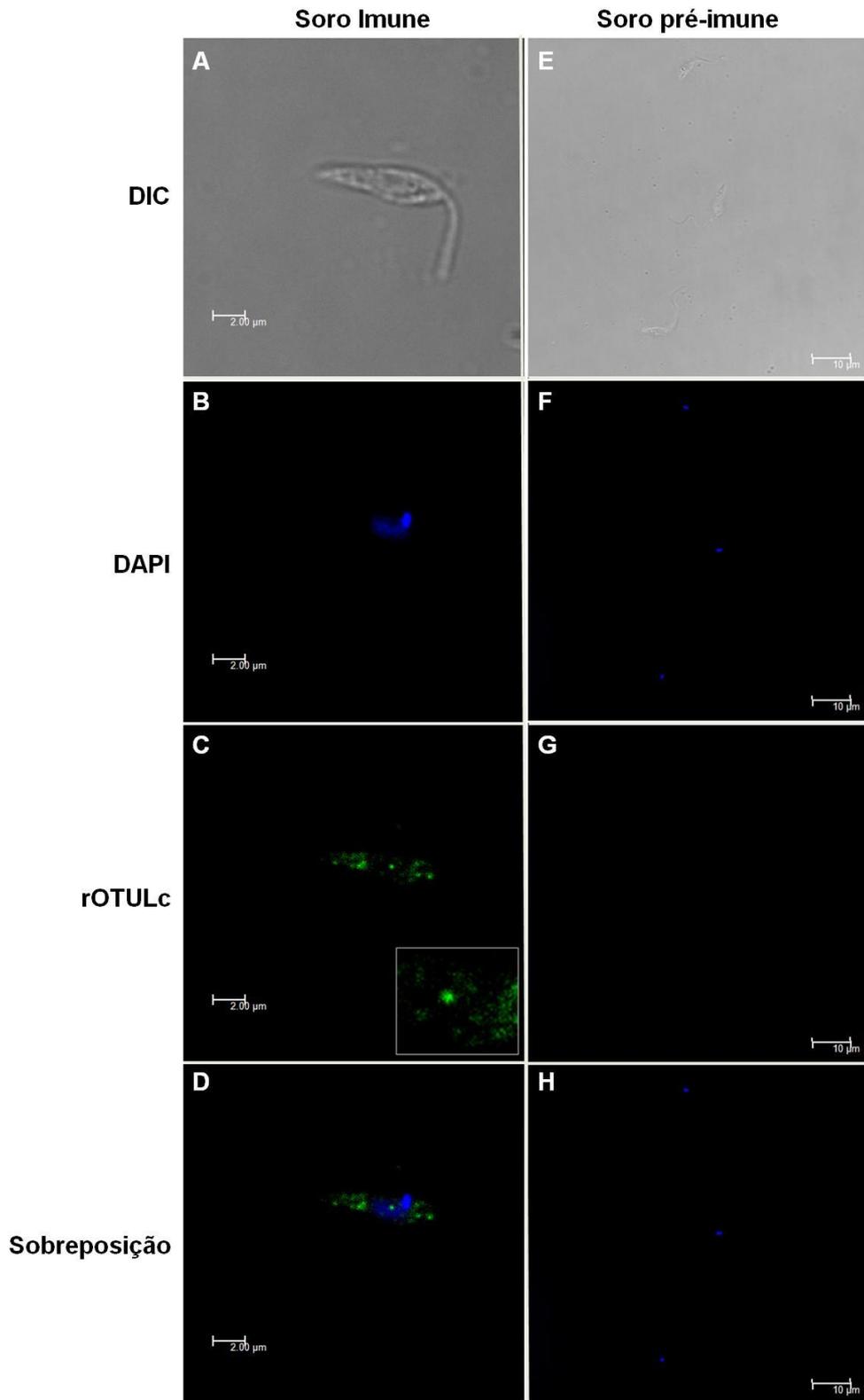


Figura 17. Citolocalização da otubaína em promastigotas de *L. chagasi*. A imunofluorescência foi realizada utilizando soro imune (A-D) ou soro pré-imune (E-H) e revelada com conjugado contendo *Alexa 488* (verde). A e E) Contraste diferencial de fase (DIC) em campo claro. B e F) Marcação do DNA dos parasitos com DAPI. C) Marcação com anticorpo anti-rOtuLc. G) Soro pré-imune. D e H) Sobreposição do DAPI com rOtuLc.

5.7. Colocalização da otubaína de *L. chagasi* com a cisteína protease lisossomal, catepsina B de *T. cruzi*

Com o objetivo de avaliar se a proteína otubaína de *L. chagasi* estaria presente em compartimentos lisossomais, foi realizado um experimento de colocalização da mesma com a proteína catepsina B utilizando soro anti-catepsina B de *T. cruzi* produzido em coelho (RESTREPO, 2001).

Por meio da análise das imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência foi possível verificar que essas proteínas não estão colocalizadas. Apesar da catepsina B estar presente em vesículas em quase todo o citoplasma do parasito (Fig. 18 D), a otubaína se encontra em vesículas diferentes. (Fig. 18 A-F).

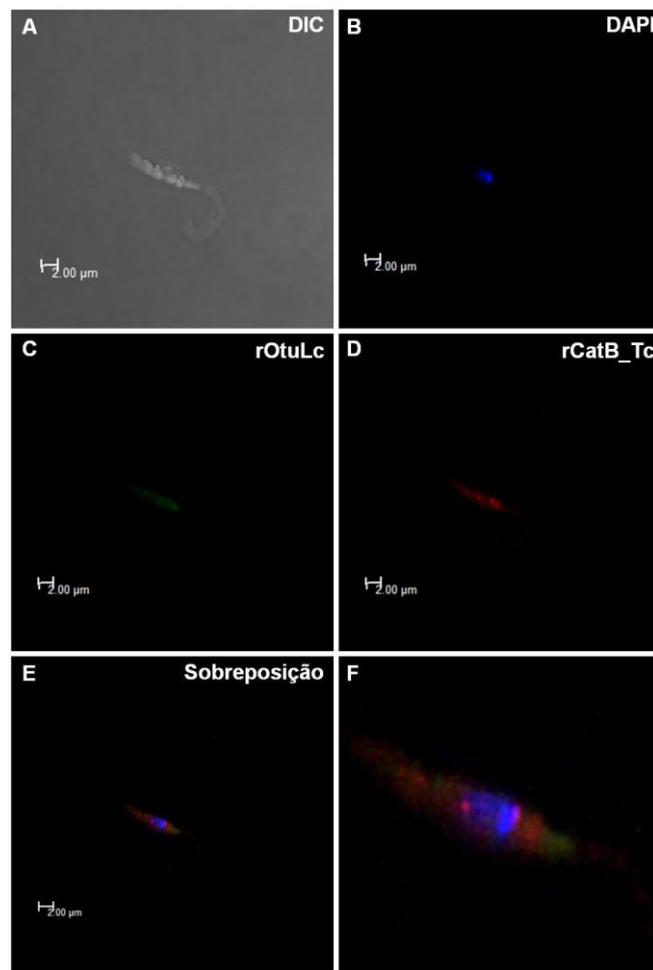


Figura 18. Sobreposição das proteínas otubaína de *L. chagasi* e catepsina B de *T. cruzi*. A imunofluorescência foi realizada utilizando soro imune contra as proteínas recombinantes OtuLc e CatB_Tc. **A)** Contraste diferencial de fase (DIC) em campo claro. **B)** Marcação do DNA do parasito com DAPI. **C)** Marcação com soro imune contra rOtuLc e **D)** contra rCatB_Tc. **E)** Sobreposição das marcações. **F)** Aumento da imagem de sobreposição das marcações.

5.8. Determinação da atividade proteolítica presente no extrato de *L. chagasi*

Inúmeros testes para caracterização da atividade enzimática da otubaína recombinante de *L. chagasi* foram procedidos utilizando os substratos típicos de otubaínas, Ub-AMC e Z-LRGG-AMC, entretanto a rOtuLc mostrou-se inativa em todas as condições testadas.

Os testes com a enzima recombinante foram inicialmente realizados com tampão Tris-HCl pH 7,5, tendo em vista que os testes enzimáticos para caracterização da otubaína 1 de humanos foram feitos neste mesmo tampão (WANG et al., 2009). A partir de então, foram testados individualmente, diferentes tampões ajustados para uma ampla gama de pHs, diferentes concentrações de enzima e substrato e a enzima não apresentou atividade alguma em qualquer das condições.

Dessa forma, os mesmos testes realizados com a rOtuLc purificada foram realizados utilizando o extrato solúvel de *L. chagasi*, no intuito de avaliar a atividade do extrato contra o substrato Z-LRGG-AMC. Estes testes foram realizados em uma ampla gama de pHs (4,0 – 9,0) fazendo uso do tampão AMT (100mM ácido acético, 100mM MES e 200mM Tris-HCl) e pôde-se observar que o extrato de promastigotas de *L. chagasi* apresentou atividade ótima contra o substrato testado em pH 7,5, apresentando também atividade, porém mais baixa, em pH 5,0 (Fig. 19).

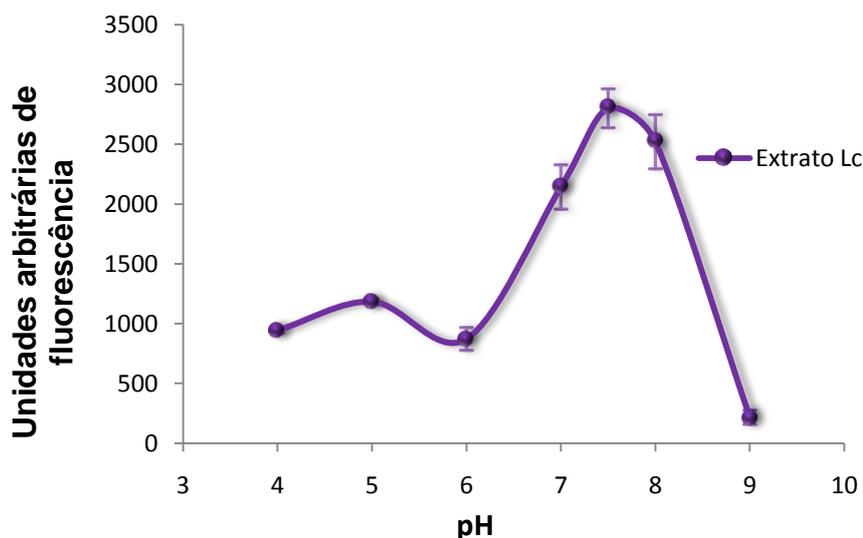


Figura 19. Influência do pH na atividade enzimática do extrato de promastigotas de *L. chagasi* contra o substrato Z-LRGG-AMC. Para o teste enzimático foi utilizado tampão AMT com pH variando de 4,0 a 9,0.

A fim de verificar a qual classe de proteases pertencia a enzima responsável pela atividade no extrato, foi realizado um teste da atividade enzimática do extrato de promastigotas previamente incubado com os inibidores E-64 (50 μ M), AEBSF (0,1 mM), Pepstatina (1 μ M), Bestatina (10 μ M) por 30 min, contra o substrato Z-LRGG-AMC, em tampão HEPES 25 mM (pH 7,5). A partir da análise desses resultados, foi possível observar que, em pH 7,5, a enzima responsável pela atividade no extrato pertence à classe das serino-proteases, tendo em vista que o inibidor AEBSF foi capaz de inibir 64% da sua atividade (Tabela 1).

Tabela 1. Inibição da atividade do extrato solúvel de promastigotas de *L. chagasi* em pH 7,5 por inibidores de proteases

Inibidor	Concentração	Inibição (%)
Sem	-	0
E-64	50 μ M	0
Pepstatina	1 μ M	0
AEBSF	0,1 mM	64
Bestatina	10 μ M	11

Como a otubaína pertence à classe das cisteíno proteases, realizamos um teste para avaliar a inibição da atividade do extrato em pH variando de 4,0 à 9,0 por E-64. Assim, foi observado que em pH ácido o E-64 inibiu pela metade a atividade relativa do extrato, entretanto em pH neutro e básico essa atividade relativa permaneceu inalterada com a presença do inibidor (Fig. 20).

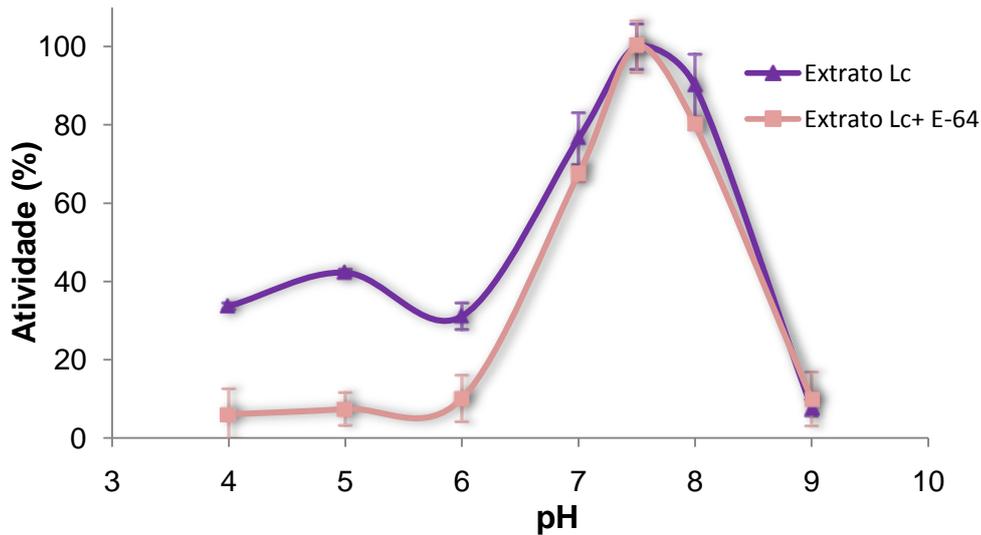


Figura 20. Inibição da atividade relativa do extrato de promastigotas de *L. chagasi* pelo inibidor de cisteíno protease (E-64). Para o teste enzimático foi utilizado tampão AMT com pH variando de 4,0 a 9,0.

Por fim, para avaliar se a cisteíno protease ativa no extrato de promastigotas em pH mais ácido poderia ser a otubaína, o extrato foi previamente incubado com o inibidor específico de enzimas deubiquitinantes, ubiquitina-aldeído (Ub-Al), e a atividade foi testada contra o substrato Z-LRGG-AMC. Os resultados indicaram uma redução da atividade de 6,43% em pH 7,5, e de 25% em pH 6,0 (Fig. 21), sugerindo a existência de alguma deubiquitinase ativa, ainda que fracamente, em pH ácido .

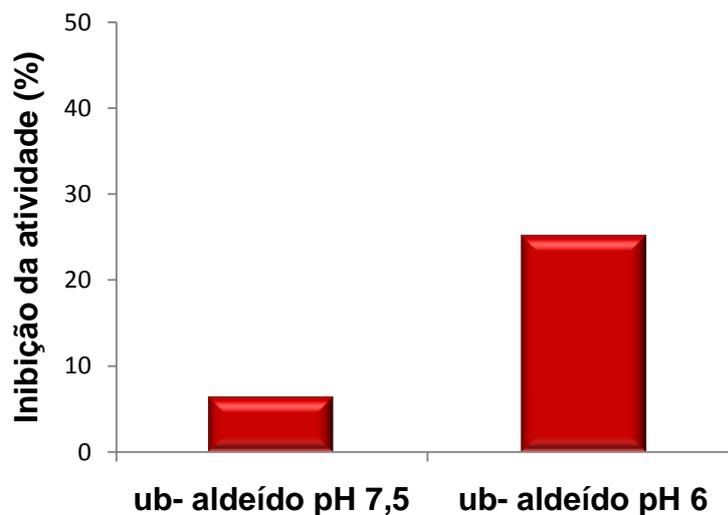


Figura 21. Inibição da atividade relativa do extrato de promastigotas de *L. chagasi* pelo inibidor específico de enzimas deubiquitinantes (Ub-Al) em pH 7,5 e 6,0.

5.9. Modelo proposto para a estrutura da Otubaína de *L. chagasi*

A Dinâmica Molecular consiste na observação da evolução temporal do sistema em estudo. A análise das trajetórias fornece suporte para a compreensão dos fatores que contribuem para a variabilidade e estabilidade conformacional da proteína.

Como a estrutura simulada foi construída por modelagem molecular por homologia, existia uma semelhança muito grande entre a otubaína de *L. chagasi* e a estrutura utilizada como *template*. A dinâmica molecular de equilíbrio possibilitou, dessa forma, um relaxamento desta macromolécula, levando a estrutura a um estado de energia livre mais baixa, no intuito de fazer com que fossem adotadas características próprias da otubaína de *L. chagasi* e não somente da otubaína 1 humana.

A estrutura da otubaína de *L. chagasi* é composta por 10 hélices α e 4 fitas β que juntas formam a folha β responsável pela estabilização da porção central da proteína (Fig. 22).

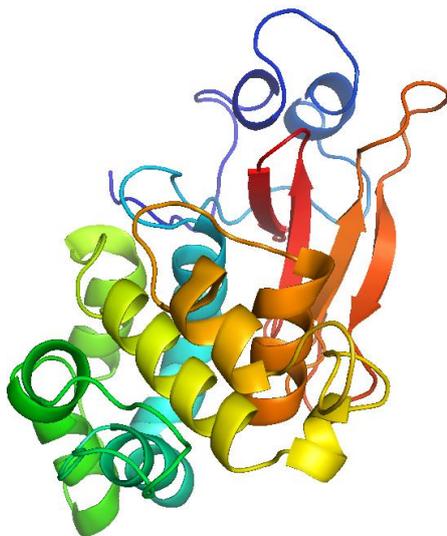


Figura 22. Modelo proposto da estrutura tridimensional da otubaína de *L. chagasi*. A estrutura está colorida de azul escuro (N-terminal) à vermelho (C-terminal).

É nessa porção central que se estabelece a tríade catalítica formadora do sítio de ligação ao substrato. A tríade catalítica é formada pelos resíduos Cys81, His261 e Asn263 (Fig. 23).

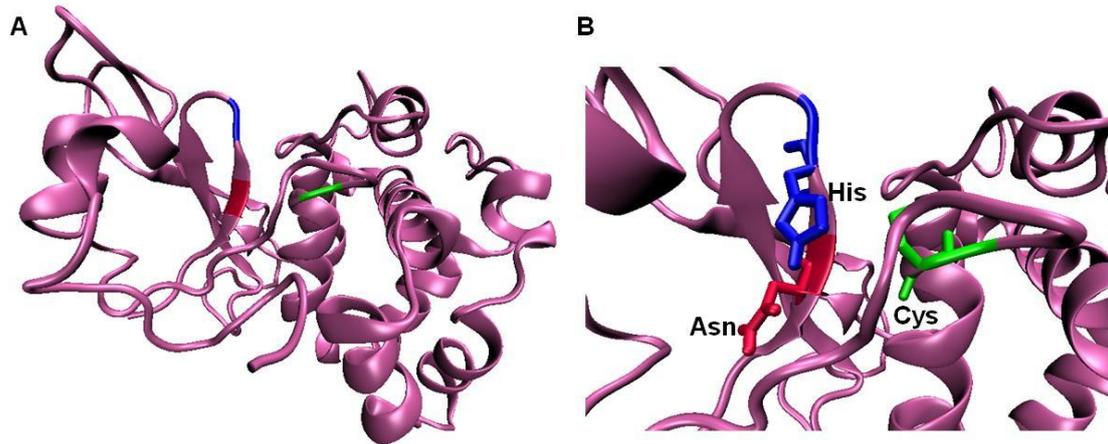


Figura 23. Modelo proposto da estrutura de OtuLc (A) evidenciando a tríade catalítica formada pela Cys81 (verde), His261 (azul) e Asn263 (vermelho) (B).

O resíduo Cys81 está no início de uma hélice α direita (right handed helix) que está próxima à fita β onde se encontram os resíduos His261 e Asn263. O fato de essa porção ter estruturas secundárias bem definidas confere estabilidade à região do sítio catalítico, garantindo a existência de um bolsão permanente de ligação do substrato.

O alinhamento das sequências da otubaína de *L. chagasi* e da otubaína 1 humana mostrou uma identidade de 25%. Como o arquivo de coordenadas da OtuLc utilizado na dinâmica molecular foi construído por modelagem molecular por homologia, fazendo uso da estrutura da otubaína 1 humana, a similaridade já era bastante esperada. No entanto, com o processo de relaxamento da macromolécula, dirigido pela dinâmica molecular, a estrutura da OtuLc adotou uma conformação diferente da conformação adotada pela otubaína 1 humana (Fig. 24).

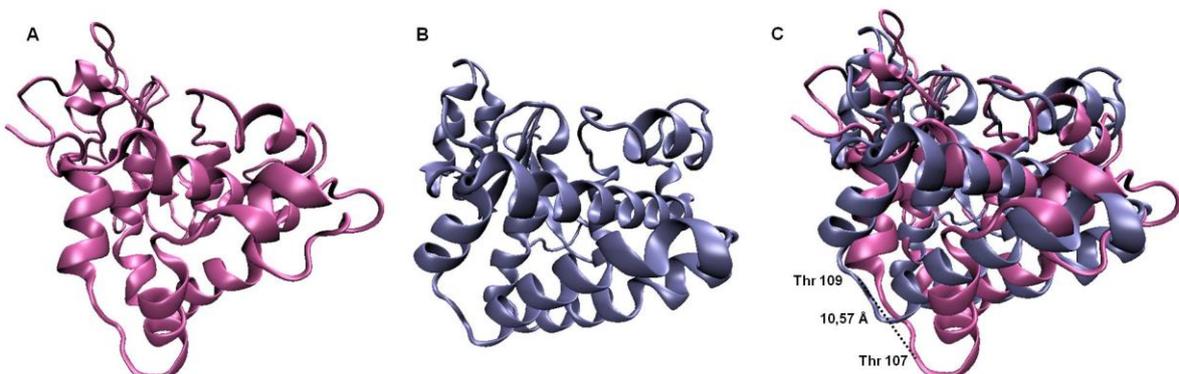


Figura 24. Comparação entre as estruturas da otubaína de *L. chagasi* e otubaína 1 humana. A) Modelo da estrutura da OtuLc (rosa). B) Otu1Hs (2ZFY) (azul). C) Sobreposição das duas estruturas evidenciando a diferença de posição dos resíduos de treonina (Thr) correspondente nas duas estruturas, com um deslocamento observado de 10,57 Å.

Diferenças significativas entre as estruturas podem ser observadas. A desestruturação da porção em curva da hélice α inferior, mostrada na figura 24, é uma modificação evidente. Já o desenovelamento do N-terminal não pode ser entendido como uma mudança conformacional relevante, posto que a inexistência dos primeiros 39 resíduos na estrutura utilizada como *template*, visto que a mesma foi retirada para facilitar a cristalização da Otu1Hs (EDELMANN et al., 2009), acarretou em uma instabilidade dessa porção da proteína.

O desvio médio quadrático - *Root Mean Square Deviation* (RMSD) - é a medida da distância entre as cadeias principais de duas ou mais proteínas sobrepostas. No estudo das conformações de proteínas globulares é bastante comum efetuar medidas da similaridade de estruturas tridimensionais por meio do RMSD das coordenadas atômicas dos carbonos α após a sobreposição das macromoléculas que estão sendo comparadas.

A sobreposição das duas estruturas (Fig. 24 C) mostra um RMSD máximo de 6,23 Å. A estrutura da otubaína 1 humana é uma estrutura cristalográfica, enrijecida por conta da compactação inerente ao processo de cristalização, o que acarreta na incapacidade de acomodação da estrutura e sua respectiva adequação ao ambiente. Já estruturas submetidas à dinâmica molecular passam por processos de ajustes, dirigidos sempre por restrições bioquímicas e estruturais.

Um ajuste bastante evidente é o referente ao volume da macromolécula. O volume total da otubaína de *L. chagasi* (Fig. 25) foi calculado para toda trajetória e mostrou uma diminuição média de aproximadamente $3,9 \cdot 10^{-5} \text{nm}^3/\text{ps}$ em relação ao volume inicial.

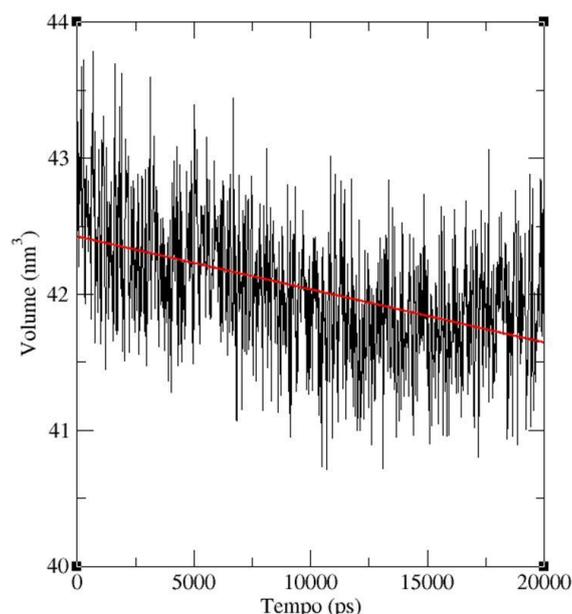


Figura 25. Variação do volume da proteína em função do tempo durante a dinâmica molecular. A inclinação negativa da reta de ajuste de curva (regressão linear) indica uma diminuição no volume da proteína à medida que o sistema evolui no tempo.

Foi realizada, também, a determinação da área acessível ao solvente (Fig. 26), que corresponde à área removida de solvente devido às interações entre os resíduos da própria proteína. Ao se enovelar, a proteína se contrai, o que acarreta na diminuição de $2,7 \times 10^{-4} \text{ nm}^2/\text{ps}$ da área acessível ao solvente, caracterizando assim a separação das porções hidrofóbicas e hidrofílicas.

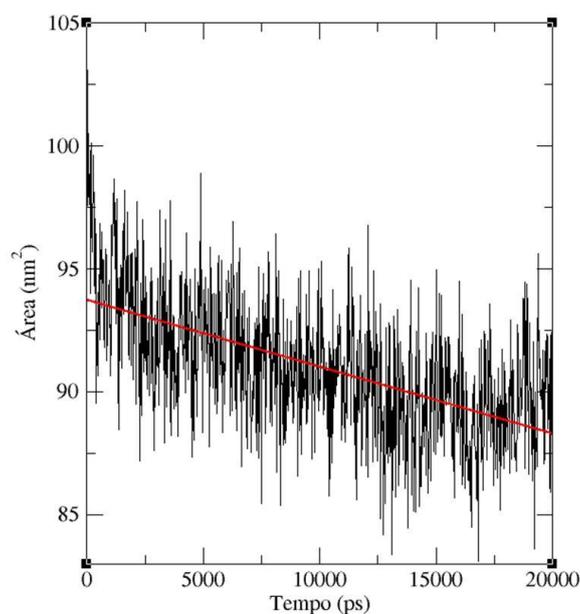


Figura 26. Área da proteína OtuLc acessível ao solvente em função do tempo. A inclinação negativa da reta de ajuste de curva (regressão linear) indica uma diminuição na área da proteína OtuLc que fica exposta ao solvente à medida que o sistema evolui no tempo.

As constatações feitas a partir das análises do volume da proteína e de sua área acessível ao solvente são corroboradas pela análise do raio de giro da estrutura ao longo da simulação (Fig. 27). O raio de giro fornece uma idéia sobre o grau de compactação do sistema. A reta de ajuste de curva mostra uma diminuição de aproximadamente $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ nm/ps}$.

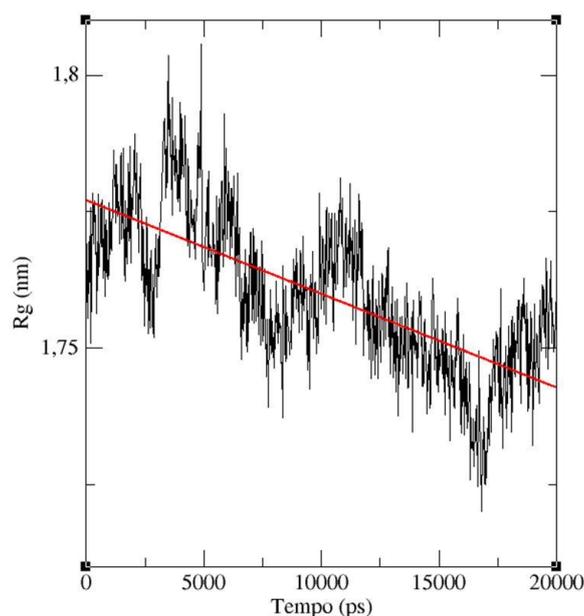


Figura 27. Raio de giro da proteína em função do tempo. A inclinação negativa da reta de ajuste de curva (regressão linear) indica uma diminuição no raio de giro da proteína OtuLc à medida que o sistema evolui no tempo.

A diminuição no raio de giro se dá por conta das ligações feitas pelos resíduos de aminoácidos ao longo da dinâmica. Ligações como pontes de hidrogênio colaboram para a diminuição do volume do sistema e, assim, aumentam o grau de compactação da proteína.

O número de pontes de hidrogênio cresce significativamente ($1,0 \times 10^{-3}$ pontes/ps) à medida que o sistema evolui (Fig. 28). Estas ligações aumentam tanto a estabilidade do sistema quanto seu grau de compactação e são ainda responsáveis pela manutenção da estabilidade de conformações estruturais, quaisquer que sejam.

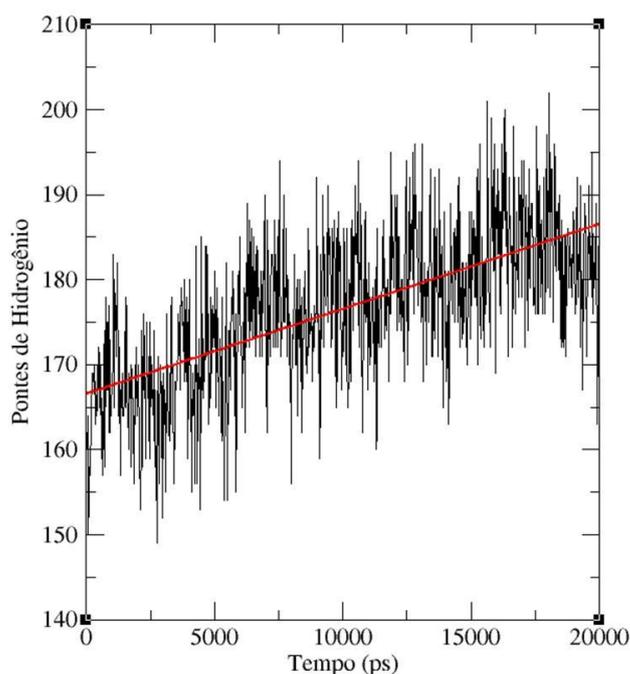


Figura 28. Número de pontes de hidrogênio entre elementos das cadeias laterais em função do tempo. A inclinação positiva da reta de ajuste de curva (regressão linear) indica um aumento no número de pontes de hidrogênio feitas entre resíduos do peptídeo à medida que o sistema evolui no tempo.

Tomando a estrutura da otubaína 1 humana como referência, foi calculado o RMSD ao longo do tempo para toda trajetória (Fig. 29). A reta de ajuste linear de curva mostra um crescimento de aproximadamente $1,15 \cdot 10^{-5} \text{ nm/ps}$ na diferença entre as duas estruturas em comparação.

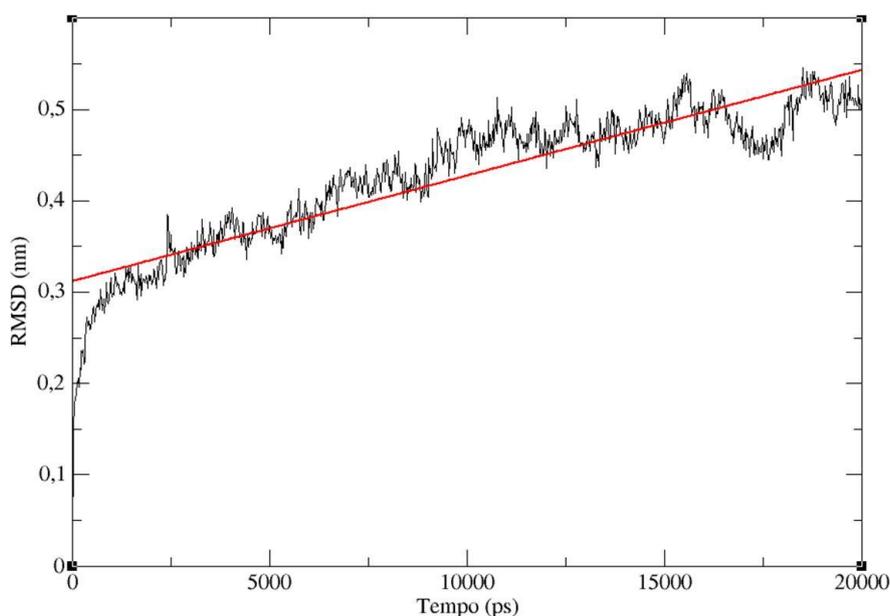


Figura 29. RMSD entre as estruturas da otubaína 1 humana e a otubaína de *L. chagasi*.

Uma modificação proeminente pode ser observada no posicionamento do loop que contém a Thr107 na otubaina de *L. chagasi* e a Thr109 na otubaina 1 humana. A sobreposição das estruturas (Fig. 24 C) mostra um deslocamento de mais de 10 Å no posicionamento destes dois resíduos.

6. DISCUSSÃO

A otubaína, enzima deubiquitinante que atua na remoção da ubiquitina em proteínas, pertence ao clan CA e à família C65. De acordo com o MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>), banco de dados sobre peptidases, este clan possui diversas famílias de cisteíno proteases, da qual a C65 faz parte, e possuem estruturas similares à papaína (RAWLINGS et al., 2010). A superfamília das proteases do tumor ovariano possui resíduos conservados de cisteína, histidina e aspartado ou asparagina que definem a tríade catalítica putativa das cisteíno proteases (MAKAROVA et al., 2000).

A partir da análise do alinhamento múltiplo de sequências foi possível verificar que a otubaína de *L. chagasi* apresenta muitos resíduos conservados com a otubaína de outras espécies de *Leishmania* (97% com *L. major* e 83% com *L. braziliensis*), entretanto apresenta baixa identidade com as otubaínas de *H. sapiens* (25% com Otu1Hs e 19% com Otu2Hs). Esta distância filogenética é bastante interessante, pois pensando num desenho racional de moléculas terapêuticas, ela pode contribuir para o desenvolvimento de moléculas que afetem a funcionalidade da enzima do parasito com menores efeitos secundários para o hospedeiro.

O gene da otubaína foi clonado primeiramente no vetor de clonagem (pCRII-TOPO) e em seguida no vetor de expressão (pET-19b). Este vetor foi escolhido neste trabalho por possuir uma sequência de dez histidinas na sua região N-terminal, ao invés das seis usuais presentes nos outros vetores, o que teoricamente aumentaria a afinidade da proteína recombinante à coluna de Agarose-Níquel. Para a clonagem de *otulc* no vetor pET-19b foram realizadas diversas tentativas, em nosso laboratório, variando condições de preparo do inserto, de ligação no vetor, bem como diversos protocolos de preparo e transformação de bactérias competentes. Todas as tentativas foram improdutivas e por esse motivo o produto de clonagem (OtuLc + pCRII-TOPO) foi enviado para a empresa americana *GeneScript*, onde o gene foi clonado, pela mesma estratégia, utilizando as enzimas de restrição *XhoI* e *BamHI*, no vetor pET-19b.

No que se refere à expressão da rOtuLc solúvel, diversas condições foram testadas para a sua otimização. As variáveis testadas foram: temperatura (16 °C a 37 °C) e concentração do indutor IPTG utilizada (0,05 mM a 1,0 mM). A melhor condição testada foi a indução a 16 °C com 0,1 mM de IPTG e ainda assim a proteína foi pouco

expressa. De forma parecida, a otubaina 1 de humanos teve sua melhor expressão a 15 °C e 0,05 mM de IPTG segundo dados obtidos por Edelman e colaboradores (2009).

Após otimização da expressão de rOtuLc, o próximo passo foi padronizar um protocolo para a sua purificação. As primeiras tentativas foram realizadas utilizando a coluna de purificação agarose-níquel *His•Bind® Purification Kit* (Novagen), entretanto, esta mostrou-se ineficaz para a purificação desta enzima, tendo em vista que as frações eluídas ainda permaneciam com muitas outras bandas além da proteína de interesse.

As purificações subsequentes foram realizadas, então, utilizando a coluna agarose-níquel *HIS-Select® Nickel Affinity Gel* (Sigma), a qual se apresentou bem mais eficaz para a purificação desta proteína. A superioridade desta resina sobre a anterior, já foi constatada em outros estudos do nosso grupo, pois ela apresenta um espaçador de carbonos entre a matriz de agarose e o Ni⁺² que melhora a ligação de caudas de His menos expostas. A rOtuLc foi obtida em maiores quantidades e mais pura, visto que menos proteína era perdida durante as lavagens. A partir de então, esta coluna foi utilizada para todas as purificações posteriores. Visto que a histidina muda sua protonação em função do pH, testamos tampões para purificação da rOtuLc em vários pHs no intuito de otimizar ainda mais a sua purificação. A partir desse experimento, foi constatado que o tampão fosfato apesar de tamponar melhor em pHs mais neutros, em pH 9,0 foi o que apresentou melhor resultado. Isso é devido, provavelmente, ao fato que em pHs mais alcalinos a histidina sofre desprotonação que resulta numa carga líquida mais negativa, o que teoricamente aumenta a sua afinidade pelo Ni⁺².

Apesar de todos estes esforços na tentativa de melhorar a expressão/purificação da rOtuLc, consideramos que o seu rendimento é baixo, estimado em 300 µg de proteína pura por litro de cultura de bactéria.

Uma alternativa para tentar solucionar esta questão do rendimento de produção da rOtuLc seria realizar a sua clonagem em um vetor de expressão com a cauda de histidina na região C-terminal, como por exemplo o pET22-b. Isso porque a cauda de histidinas localizada na porção N-terminal da rOtuLc, quando no pET-19b, pode ficar menos exposta por interagir com a estrutura da proteína, diminuindo a sua ligação ao níquel da coluna. Desta forma, ela é facilmente eliminada durante as lavagens e não suporta concentrações de imidazol maiores, necessárias para eliminar as outras proteínas inespecificamente ligadas à coluna.

Com relação à marcação em *immunoblot* da rOtuLc comparada a da proteína nativa no extrato solúvel de promastigotas, foi possível perceber que a massa das proteínas marcadas foi diferente. Os anticorpos contra rOtuLc produzidos em camundongos reconheceram a otubaina no extrato solúvel de bactéria com massa de aproximadamente 37 kDa, o que representa a massa predita da otubaina de *L. chagasi* adicionada da massa da cauda de dez histidinas.

O soro imune testado em *immunoblot* contra o extrato de *L. chagasi* reconheceu também apenas uma banda, entretanto esta apresentou uma massa de aproximadamente 45 kDa. Essa massa aumentada da OtuLc nativa pode estar relacionada a diversos fatores. A primeira hipótese é de que isso pode ser devido a modificações pós-traducionais realizadas pelo parasito, que a bactéria é incapaz de fazê-las. A otubaina 1 de humanos, por exemplo, pode ser pós-traducionalmente modificada, levando a mudanças na sua massa molecular aparente e evidenciando a interação com a proteína YpkA (EDELMANN et al., 2010).

A sequência da OtuLc passou por uma análise dos prováveis sítios de fosforilação para serinas, treoninas e tirosinas utilizando o servidor NetPhos 2.0 (BLOM et al., 1999) e os resíduos S60, S63, S75, S110, S114, Y159, Y179 e T190 apresentaram um *score* bastante alto ($>0,84$) indicando serem prováveis sítios de fosforilação e, além disso, a maioria desses resíduos apresentam um posicionamento na estrutura proposta da OtuLc favorável à ocorrência dessas modificações pós-traducionais visto que estão expostas na superfície da macromolécula.

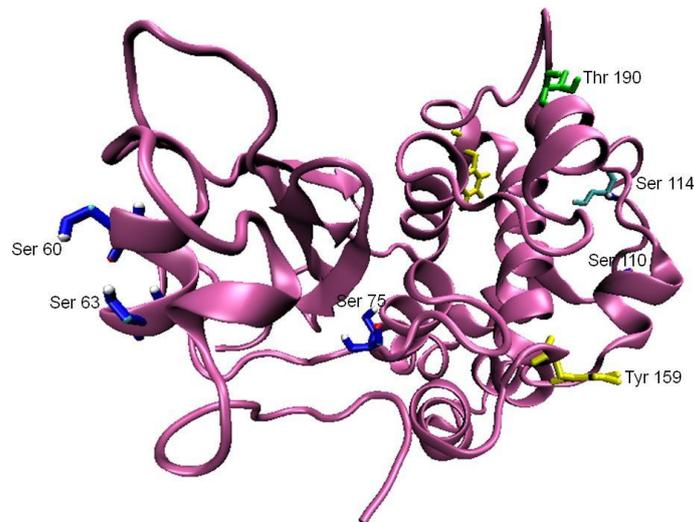


Figura 30. Possíveis resíduos de serina, treonina e tirosina que podem ser fosforilados na otubaina de *L. chagasi*.

Em adição, dados baseados na observação do padrão de migração diferencial sugeriram, por meio do tratamento com a proteína fosfatase, que a forma de 37 kDa da Otu1Hs pode conter múltiplos sítios de fosforilação (JURIS et al., 2006). Interessantemente, a otubaína 1 é fosforilada em células HeLa por uma serino/trenino cinase desconhecida, sugerindo então que a Otu1 é regulada pela fosforilação *in vivo* (POZUELO RUBIO et al., 2004).

Outra hipótese seria a de que a OtuLc nativa pode ter um quadro aberto de leitura diferente do que é proposto no seqüenciamento do genoma do parasito e por simples análise de alinhamento de seqüências de otubaínas de outras espécies já estudadas, como a humana. Analisando mais detalhadamente a região 5'UTR de OtuLc pudemos observar que o último códon de parada (*stop codon*) está a uma distância de 273 pb a montante do códon de iniciação predito. Assim, é possível que a tradução de OtuLc comece no códon -267 o que resultaria em um aumento de massa de aproximadamente 10 kDa. Segundo dados de Soares e colaboradores (2004) por meio da análise do cDNA da amostra de diversos tecidos por PCR, foram detectadas duas isoformas da otubaína 1, uma com 815 pb e outra maior com 950 pb. Além disso, análises por *immunoblot* com anticorpo anti-otubaína 1 mostraram isoformas adicionais. A menor, de 815 pb, era 100% homóloga à seqüência que codifica a otubaína, enquanto que o produto maior de PCR representou uma espécie de mRNA que tinha 210 pb adicionais codificando uma seqüência na região central do mRNA. Análises da seqüência do produto de PCR maior mostraram ainda um quadro aberto de leitura alternativo (*alternative reading frame*) que provavelmente é usado pra produzir a proteína de 35 kDa, o qual incorpora outro códon AUG no éxon 2, ao invés da presença do AUG original anterior usado pela isoforma menor (SOARES et al., 2004).

Uma terceira hipótese é que a otubaína poderia estar ligada a moléculas de ubiquitina (di-Ub), com massa unitária predita de 8,6 kDa, apresentando dessa forma o aumento na massa molecular identificada pelo *immunoblot*.

Para verificar se alguma dessas hipóteses ou outras estaria realmente ocasionando a migração diferencial da OtuLc nativa, um gel bidimensional foi feito com o extrato solúvel de promastigotas de *L. chagasi*. Em seguida fizemos a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose a fim de realizar um *immunoblot* com o anti-rOtuLc o que permitiria marcar um *spot* isolado para posteriormente ser identificado por espectrometria de massa. Contudo, tivemos

problemas durante a etapa de transferência e não conseguimos resultados satisfatórios para realizar as análises desejadas.

A imunocitocalização indicou que a OtuLc está localizada em vesículas espalhadas no citoplasma do parasito com uma freqüente marcação pontual de forte intensidade localizada na região anterior, próxima ao cinetoplasto. Essa marcação vesicular poderia refletir uma localização em endossomos/lisossomos. Assim, procedemos um ensaio de colocalização desta proteína com a catepsina B, protease lisossomal, que mostrou que estas duas enzimas não estão presentes nos mesmos locais do parasito, visto que as vesículas de ambas não se sobrepueram. A princípio, isso sugere que a otubaína de *L. chagasi* não está localizada em compartimentos lisossomais, porém, outros marcadores lisossomais e de outras organelas devem ser testados para confirmar a sua localização no parasito. Um fator a ser considerado para investigar a localização em endossomo/lisossomo é a atividade ótima do extrato de *L. chagasi*, contra um substrato de otubaínas, em pH ácido. Além disso, estes ensaios deverão ser realizados em formas amastigotas para determinar o padrão de marcação específico do estágio.

Das mais de 100 proteínas com domínio OTU identificadas, as otubaínas estão entre as poucas que apresentam atividade deubiquitinante *in vitro* ou *in vivo* (EVANS et al., 2003; FRIAS-STAHILI et al., 2007; KAYAGAKI et al., 2007). A Otu1Hs cliva cadeias de tetra Ub em ligações isopeptídicas, mas não cliva diUb (EDELHANN et al., 2009). A Otu2Hs é inativa *in vitro* contra substratos peptídicos e isopeptídicos (BALAKIREV et al., 2003), mas cliva Ub-AMC (NANAQ et al., 2004). Já a Otu1 de fungos cliva Ub-AMC e cadeias de poli-Ub ligadas à lisina 48, mas não as ligadas à lisina 63 (RUMPF; JENTSCH, 2006). Neste trabalho, vários testes de atividade foram realizados a fim de determinar a atividade específica da OtuLc recombinante, entretanto, esta mostrou-se inativa. A atividade da otubaína 1 humana é modulada por fosforilação, em particular na Tyr26, que determina a função desta proteína por interferir na sua atividade enzimática, ligação à ubiquitina ou reconhecimento do substrato (EDELHANN et al., 2010). Como modificações pós-traducionais de proteínas recombinantes produzidas em bactérias são praticamente inexistentes, isso poderia explicar a falta de atividade da rOtuLc.

Outro fato, talvez o mais provável, que justifique a perda da atividade da enzima recombinante foi a presença de três substituições de bases na sequência de OtuLc que

resultaram em três mudanças de aminoácidos (Fig. 7 – asteriscos). Estas mudanças foram observadas após o alinhamento da sequência original, do genoma publicado (genedb.org/leish), com a sequenciada a partir do gene clonado no vetor PCRII-TOPO, sendo elas Phe82 → Ser, Phe182 → Ser e a última Leu265 → Pro. Existe a possibilidade de que os resíduos substituintes não alterem o enovelamento geral da enzima, uma vez que ela foi produzida na sua forma solúvel. Porém, estes talvez exerçam influência no posicionamento dos resíduos formadores da tríade catalítica e consequentemente na sua interação com o substrato. Além disso, duas dessas substituições ocorreram em resíduos muito próximos aos resíduos da tríade. Phe82, por exemplo, fica contíguo a Cys, e a Leu265 fica a um resíduo de distância da Asn, ambos da tríade catalítica. Esses resíduos mutados são altamente conservados em todos os organismos, como pode ser observado no alinhamento múltiplo de sequências (Fig. 7) o que reforça nossa análise. Uma mutação que resulte na substituição de um aminoácido em uma posição crítica na molécula da proteína pode ter consequências danosas para o desempenho da sua função (MARZZOCO e TORRES, 2007).

Ao contrário da rOtuLc que não foi ativa contra o substrato de otubaínas, Z-LRGG-AMC, o extrato solúvel de promastigotas apresentou atividade ótima contra este substrato peptídico em pH 7,5, e outro pico de atividade em pH 5,0. Em pH 7,5 apenas o inibidor de serino protease, AEBSF, reduziu significativamente essa atividade no extrato, já o E-64, inibidor de cisteíno proteases, reduziu significativamente a atividade em pH ácido (4,0 – 6,0). Para termos parâmetros para quantificar e qualificar a atividade de OtuLc, adquirimos a rOtuHs, a ubiquitina-AMC e o inibidor específico de deubiquitinases, Ub-Al (Boston Biochem). No entanto, a rOtuHs estava completamente inativa no protocolo padrão preconizado pelo fabricante o que inviabilizou a comparação da atividade e certificação da qualidade do inibidor Ub-Al. Quando este inibidor foi utilizado, a atividade no extrato contra Z-LRGG-AMC reduziu de forma mais considerável em pH ácido (25%). Isto não é nenhuma prova conclusiva, mas pode ser um indício de que a proteína otubaína pode estar presente em sua forma ativa no extrato de *L. chagasi* e que tenha melhor atuação em pHs ácidos, assim como outras cisteíno proteases do parasito como as catepsinas B e L (SOMANNA et al., 2002). Estes resultados de inibição juntos indicam também que outras cisteíno proteases do parasito também são capazes de clivar o substrato Z-LRGG-AMC em pH ácido e ainda, que serino proteases têm habilidade parecida em pH 7,5.

O enovelamento de proteínas (*protein folding*) é um processo físico-químico através do qual a estrutura de uma proteína assume a sua configuração funcional (VOET; VOET, 1995). A organização espacial da proteína é resultante do tipo de aminoácidos que a compõe e de como eles estão dispostos uns em relação aos outros. Assim, o enovelamento é um processo que leva a macromolécula de um estado não enovelado à sua configuração tridimensional de menor energia livre (ANFINSEN et al., 1954). Dessa forma, o estudo da estrutura tridimensional de proteínas é de fundamental importância para a compreensão de seus mecanismos de ação, o que implicará no entendimento dos fenômenos relacionados à suas atividades.

De acordo com os dados obtidos da dinâmica molecular, foi possível observar que a OtuLc assim como a Otu1Hs, Otu2Hs e Otu1 de fungo possui os resíduos da tríade catalítica em posições conservadas, onde a Cys localiza-se no início de uma hélice α direita e os outros dois resíduos, His e Asn (nos casos de OtuLc e Otu2Hs) e Asp (em Otu1Hs e Otu1 de fungo) localizam-se na fita β próxima à hélice onde se situa a Cys.

Em muitas cisteíno proteases, o terceiro resíduo da tríade costuma ser postulado para orientar a histidina do sítio-ativo ou estabilizar o íon de imidazol que é gerado pela desprotonação da cisteína do sítio-ativo (NANAŌ et al., 2004). Entretanto, assim como ocorre na otubaína 2 de humanos, a cadeia lateral da Asp78 é bem distante da His261 do sítio ativo para interagir diretamente com a mesma. Já a Asn263, altamente conservada em todas as sequências de otubaína conhecidas (Asp em Otu1Hs e Otu1 de fungos), localiza-se mais próxima a His e pode assumir esse papel, sendo correspondente, então, ao terceiro resíduo da tríade catalítica.

Além dos três resíduos do sítio catalítico conservados (LECAILLE et al., 2002), outra característica comum à estrutura tridimensional de cisteíno proteases é a existência de uma estrutura bilobada com o sítio catalítico localizado na reentrância dos lobos (RAWLINGS et al., 2010; WIEDERANDERS, 2003). No modelo de OtuLc, estes lobos são separados por uma folha de quatro fitas β que fica entre uma pequena região N-terminal helicoidal consistindo de 2 hélices α e uma grande região helicoidal composta de 8 hélices α , assim como já descrito por Aquea e colaboradores (2008).

Como pôde ser visto pelas análises realizadas após a dinâmica molecular a OtuLc adotou características próprias que fez com ela se diferenciasse da Otu1Hs que foi usada como *template*, o que é mostrado pela diminuição de seu volume, área

acessível ao solvente e raio de giro, e pelo aumento do número de pontes de hidrogênio formadas entre os resíduos da proteína bem como de seu RMSD. Após verificarmos se a rOtuLc com três, dois ou um aminoácidos corrigidos tornar-se-á ativa, poderemos usar estas isoformas para validar experimentalmente o modelo da OtuLc, por meio de simulação das mutações juntamente com encaixe do substrato ou inibidor específico no sítio catalítico. Caso estas isoformas apresentem diferenças nos parâmetros enzimáticos, elas serão ferramentas úteis no estudo funcional de OtuLc.

7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem concluir a respeito da otubaína de *L. chagasi* que:

- Apesar do gene *otulc* ter sido corretamente clonado, com um quadro aberto de leitura de aproximadamente 813 pb, ele apresentou três mutações de bases que ocasionaram na substituição de três aminoácidos, as quais podem justificar a perda da atividade da enzima recombinante;
- A proteína rOtuLc foi expressa solúvel, com massa molecular de aproximadamente 37 kDa, porém com baixo rendimento e inativa;
- A atividade do extrato de promastigotas de *L. chagasi* sobre o substrato Z-LRGG-AMC indica a presença de enzimas deubiquitinantes ativas e com melhor desempenho em pHs ácidos, assim como outras cisteíno proteases do parasito;
- A OtuLc está localizada em vesículas espalhadas no citoplasma do parasito com marcação pontual de forte intensidade na região anterior, próxima ao cinetoplasto e não colocaliza com a proteína catepsina B, o que a princípio sugere que a otubaína de *L. chagasi* não estaria localizada em compartimentos lisossomais;
- O modelo tridimensional da estrutura da otubaína de *L. chagasi* é composto por 10 hélices α e 1 folha β , de 4 fitas. Esta folha β parece ser responsável pela estabilização da porção central da proteína e a estrutura como um todo mantém conservado o posicionamento dos resíduos da tríade catalítica, estando o resíduo Cys81 no início de uma hélice α direita (right handed helix) próxima à fita β onde se encontram os resíduos His261 e Asn263.

8. PERSPECTIVAS

As perspectivas propostas para a continuidade deste trabalho são:

- Repetir os testes de atividade com a rOtuLc após correção das mutações e caso a mesma esteja ativa, realizar experimentos para verificar a influência do pH, temperatura e íons na sua atividade bem como calcular K_m e K_{cat} da mesma;
- Realizar experimentos de imunocitocalização e *immunoblot* na forma amastigota para avaliar o padrão de expressão da OtuLc nesta forma;
- Realizar experimentos de colocalização da OtuLc com outros marcadores endossomais/lisossomais ou de outras organelas para confirmar a sua localização;
- Repetir o gel 2D com a finalidade de verificar o motivo da massa molecular mais elevada da OtuLc nativa;
- Realizar simulações de dinâmica molecular do complexo OtuLc-Ub no intuito de calcular a energia livre de ligação entre as duas macromoléculas e verificar a estabilidade conformacional do complexo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADJIEVA, A.; HILVEN, P.; PAUWELS, K.; CRABEEL, M. The yeast ARG7 gene product is autoproteolyzed to two subunit peptides, yielding active ornithine acetyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 15, p. 11361-11367, 2000.
- ADAMS, J.; KAUFFMAN, M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). **Cancer Investigation**, v. 22, p. 304–311, 2004.
- ADHIKARI, A.; XU, M.; CHEN, Z. J. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3214-3226, 2007.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 61, n. 05, p. 223-274, 2006.
- AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; NETO, V. A.; NICODEMO, A. C. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, v. 105, p. 1-9, 2008.
- AMBIT, A.; FASEL, N.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, p. 113–122, 2008.
- ANFENSEN, C. B.; REDFIELD, R. R.; CHOATE, W. L.; PAGE, J.; CARROLL, W. R. Studies on the Gross Structure, Cross-Linkages, and Terminal Sequences in Ribonuclease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 207, n. 1, 1954.
- ANTONIAZI, S.; PRICE, H. P.; KROPP, P.; et al. Chemokine gene expression in toll-like receptor-competent and -deficient mice infected with *Leishmania major*. **Infection and immunity**, v. 72, n. 9, p. 5168-74, 2004.
- AQUEA, F.; GUTIERREZ, F. MEDINA, C.; ARCE-JOHNSON, P. A novel Otubain-like cysteine protease gene is preferentially expressed during somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. **Mol Biol Rep**, v. 35, p. 567–573, 2008.
- ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195-201, 2006. Oxford University Press.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, 2000.
- BARRETT, A. J. Proteolytic Enzymes: nomenclature and classification. In: BEYNON, R.; BOND, J. S. **Proteolytic Enzymes – A Practical Approach**. 2. ed. New York: Oxford University Press, p. 1-20. 2001.
- BALAKIREV, M. Y.; TCHERNIUK, S. O.; JAQUINOD, M.; CHROBOCZEK, J. scientific report. **European Molecular Biology Organization**, v. 4, n. 5, 2003.
- BARRETT, A J; RAWLINGS, N D. Types and families of endopeptidases. **Biochemical Society transactions**, v. 19, n. 3, p. 707-15, 1991.

- BARRETT, A J; RAWLINGS, N D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **Biological Chemistry**, v. 382, n. 5, p. 727-733, 2001.
- BART, G.; FRAME, M. J.; CARTER, R.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. **Mol. Biochemical Parasitology**. v. 88, p. 53–61, 1997.
- BASTOS, I. M. D. ; NEVES, D. ; LIMA, M. M. ; SANTANA, J. M. **Perspectives in Drug Development for Chagas Disease Therapy**. In: Antonio Teixeira; Marina Vinaud; Ana Maria Castro. (Org.). *Emerging Chagas Disease*. 1 ed. : Benthan e-Books, p. 145-155, 2009.
- BEIL, W. J.; MEINARDUS-HAGER, G.; NEUGEBAUER, D. C.; SORG, C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 52, n. 2, p. 135-142, 1992.
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; HERMANS, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. (B. Pullman, Ed.) **Intermolecular Forces**, v. 11, n. (Suppl. 1), p. 331-338, 1981.
- BERMAN, J. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 397-401, 2003.
- BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A M.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063-75, 2007.
- BEYAERT, R; HEYNINCK, K; VAN HUFFEL, S. A20 and A20-binding proteins as cellular inhibitors of nuclear factor-kappa B-dependent gene expression and apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 8, p. 1143-1151, 2000.
- BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1351-1362, 1999.
- BOGDAN, C; GESSNER, A.; RÖLLINGHOFF, M. Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. **Immunobiology**, v. 189, n. 3-4, p. 356-396, 1993.
- BOND, J. S.; BUTLER, P. E. Intracellular proteases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, p. 333-64, 1987.
- BOONE, D. L.; TURER, E. E.; LEE, E. G.; et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. **Nature Immunology**, v. 5, n. 10, p. 1052-1060, 2004.
- BOUZAT, J. L.; MCNEIL, L. K.; ROBERTSON, H. M.; et al. Phylogenomic analysis of the alpha proteasome gene family from early-diverging eukaryotes. **Journal of molecular evolution**, v. 51, n. 6, p. 532-43, 2000.

- BRANDONISIO, O.; SPINELLI, R.; PEPE, M. Dendritic cells in Leishmania infection. **Microbes and infection Institut Pasteur**, v. 6, n. 15, p. 1402-1409, 2004.
- BRENDLE, J. J.; OUTLAW, A.; KUMAR, A.; et al. Antileishmanial Activities of Several Classes of Aromatic Dications. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 797-807, 2002.
- CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 6, p. 674-688, 2001.
- CHANG, W. S. W.; WU, H. R.; YEH, C. T.; WU, C. W.; CHANG, J. Y. Lysosomal cysteine proteinase cathepsin s as a potential target for anti-cancer therapy. **Journal of cancer molecules**, v. 3, n. 1, p. 5-14, 2007.
- CHARMOY, M.; MEGNEKOU, R.; ALLENBACH, C.; et al. Leishmania major induces distinct neutrophil phenotypes in mice that are resistant or susceptible to infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 2, p. 288-299, 2007.
- CHEN, X.; ZHANG, B.; FISCHER, J. A. A specific protein substrate for a deubiquitinating enzyme: Liquid facets is the substrate of Fat facets. **Genes & Development**, v. 16, n. 3, p. 289-294, 2002.
- CHRISTENSEN, C. B.; JØRGENSEN, L.; JENSEN, A. T.; et al. Molecular characterization of a Leishmania donovani cDNA clone with similarity to human 20S proteasome a-type subunit. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1500, n. 1, p. 77-87, 2000.
- COHEN-FREUE, G.; HOLZER, T. R.; FORNEY, J. D.; MCMASTER, W. R. Global gene expression in Leishmania. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1077-1086, 2007.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Society**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.
- CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. A revised classification for Leishmania and Endotrypanum. **Parasitology today Personal ed**, v. 16, n. 4, p. 142-144, 2000.
- DELANO, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System. ,2002. **DeLano Scientific**. Disponível em: <<http://www.pymol.org>>. .
- DESJEUX, P. Focus: Leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 9, p. 692-693, 2004.
- DICKINSON, D. P. Cysteine Peptidases of Mammals: Their Biological Roles and Potential Effects in the Oral Cavity and Other Tissues in Health and Disease. **Critical Reviews in Oral Biology Medicine**, v. 13, n. 3, p. 238-275, 2002.
- DRAG, M.; SALVESEN, G. S. Emerging principles in protease-based drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, p. 690-701, 2010.
- DUBIN, A.; MAK, P.; DUBIN, G.; et al. New generation of peptide antibiotics. **Acta biochimica Polonica**, v. 52, n. 3, p. 633-8, 2005.

- DUNN, B. M. Determination of protease mechanism. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic Enzymes**. A Practical Approach, 2. ed. Oxford: Oxford University Press, Cap. 4, p. 77-104. 2001.
- DUSING, R.; SELLERS, F. ACE inhibitors, angiotensin receptor blockers and direct renin inhibitors in combination: a review of their role after the ONTARGET trial. **Current Medical Research and Opinion**, v. 25, p. 2287–2301, 2009.
- EAKIN, A. E.; MCGRATH, M. E.; MCKERROW, J H; FLETTERICK, R. J.; CRAIK, C S. Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 9, p. 6115-6118, 1993.
- EDELMANN, M. J.; IPHOEFER, A.; AKUTSU, M.; et al. Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination. *Society*, v. 390, p. 2-4, 2009.
- EDELMANN, M. J.; KRAMER, H. B.; ALTUN, M.; KESSLER, B. M. Post-translational modification of the deubiquitinating enzyme otubain 1 modulates active RhoA levels and susceptibility to *Yersinia* invasion. **FEBS Journal**, v. 277, p. 2515-2530, 2010.
- EL-HASSAN, A. M.; MEREDITH, S. E.; YAGI, H. I.; et al. Sudanese mucosal leishmaniasis: epidemiology, clinical features, diagnosis, immune responses and treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 6, p. 647-52, 1995.
- EL-SAFI, S.; KHEIR, M. M.; BUCHETON, B.; et al. Genes and environment in susceptibility to visceral leishmaniasis. **Comptes Rendus Biologies**, v. 329, n. 11, p. 863-870, 2006.
- EVANS, T. G. Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 7, p. 527–546. 1993.
- EVANS, P. C.; SMITH, T. S.; LAI, M.-J.; et al. A novel type of deubiquitinating enzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 25, p. 23180-23186, 2003.
- FENTEANY, G.; STANDAERT, R. F.; LANE, W. S.; et al. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5211, p. 726-31, 1995.
- FISER, A.; FEIG, M.; BROOKS, C. L.; SALI, A. Evolution and physics in comparative protein structure modeling. **Accounts of chemical research**, v. 35, n. 6, p. 413-21, 2002.
- FRIAS-STAHOLI, N.; GIANNAKOPOULOS, N. V.; KIKKERT, M.; et al. Ovarian tumor domain-containing viral proteases evade ubiquitin- and ISG15-dependent innate immune responses. **Cell host microbe**, v. 2, n. 6, p. 404-416, 2007.
- FRÉZARD, F.; MARTINS, P. S.; BARBOSA, M. C. M.; et al. New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 102, n. 4, p. 656-65, 2008.

FUJINAGA, M.; CHERNEY, M. M.; OYAMA, H.; ODA, K.; JAMES, M. N. G. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3364-3369, 2004.

GREER, J. Comparative model-building of the mammalian serine proteases. **Journal of molecular biology**, v. 153, n. 4, p. 1027-42, 1981.

GREGORY, D. J.; GODBOUT, M.; CONTRERAS, I.; FORGET, G.; OLIVIER, M. A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 4, p. 1071-1081, 2008.

GREEN, D. R.; EVAN, G. I. A matter of life and death. **Cancer Cell**, v. 1, p. 19–30, 2002.

GRELLIER, P.; VENDEVILLE, S.; JOYEAU, R.; BASTOS, I. M. D.; DROBECQ, H.; FRAPPIER, F. ; Teixeira, A.R. L.; SCHREVEL, J.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C.; SANTANA, J. M. *Trypanosoma cruzi* Prolyl Oligopeptidase Tc80 Is Involved in Nonphagocytic Mammalian Cell Invasion by Trypomastigotes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 50, p. 47078-47086, 2001.

GUEIRARD, P.; LAPLANTE, A.; RONDEAU, C.; MILON, G.; DESJARDINS, M. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 100-111, 2008.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

HAGLUND DIKIC I, K. Ubiquitylation and cell signaling. **EMBO Journal**, v. 24, p. 3353-3359, 2005.

HEERY, D. M.; KALKHOVEN, E.; HOARE, S.; PARKER, M. G. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 733-736, 1997.

HELLBERG, A.; NOWAK, N.; LEIPPE, M.; TANNICH, E.; BRUCHHAUS, I. Recombinant expression and purification of an enzymatically active cysteine proteinase of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **Protein Expression and Purification**, v. 24, n. 1, p. 131-137, 2002.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 425-79, 1998.

HESS, B.; KUTZNER, C.; VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435-447, 2008.

HICKE, L. Protein regulation by monoubiquitin. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 3, p. 195-201, 2001.

HOCHSTRASSER, M. Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 8, p. E153-E157, 2000.

HOFMANN, K.; BUCHER, P. The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 21, n. 5, p. 172-173, 1996.

HOFMANN, K.; FALQUET, L. A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 6, p. 347-350, 2001.

HOOPER, N. M. Proteases: a primer. **Essays in Biochemistry**, v. 38, p. 1-8, 2002.

HU, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; SANG, Q. X.; Opdenakker, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nature Review Drug Discovery**, v. 6, p. 480-498, 2007.

HUBBARD, T.; BARKER, D.; BIRNEY, E.; et al. The Ensembl genome database project. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 38-41, 2002.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p.33-38, 1996.

IKEDA, F.; DIKIC, I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. **EMBO Reports**, v. 9, n. 6, p. 536-542, 2008.

IMAMURA, T.; POTEPA, J.; TRAVIS, J. Activation of the kallikrein-kinin system and release of new kinins through alternative cleavage of kininogens by microbial and human cell proteinases. **Biological Chemistry**, v. 385, p. 989-996, 2004.

IVENS, A. C. et al., The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, p. 436, 2005.

Ji, J.; SUN, J.; SOONG, LYNN. Impaired Expression of Inflammatory Cytokines and Chemokines at Early Stages of Infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4278-4288, 2003.

JOHNSON, M. S.; SRINIVASAN, N.; SOWDHAMINI, R.; BLUNDELL, T L. Knowledge-based protein modeling. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 1-68, 1994.

JURIS, S. J.; SHAH, K.; SHOKAT, K.; DIXON, J. E.; VACRATISIS, P. O. Identification of otubain 1 as a novel substrate for the *Yersinia* protein kinase using chemical genetics and mass spectrometry. **FEBS Letters**, v. 580, p. 179-183, 2006.

KAISER, P.; HUANG, L. Global approaches to understanding ubiquitination. **Genome biology**, v. 6, n. 10, p. 233, 2005.

KAYAGAKI, N.; PHUNG, Q.; CHAN, S.; et al. DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. **Science**, v. 318, n. 5856, p. 1628-1632, 2007.

KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. Leishmania vaccines: progress and problems. **Parasitology**, v.133, p. S87-S112, 2006.

KOMANDER, D.; BARFORD, D. Structure of the A20 OTU domain and mechanistic insights into deubiquitination. **Society**, v. 85, n. 2, p. 77-85, 2008.

KREPELA, E. Cysteine proteinases in tumor cell growth and apoptosis. **Neoplasma**, v. 48, n. 5, p. 332-349, 2001.

KRISHNASWAMY, S. Exosite-driven substrate specificity and function in coagulation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, p. 54-67, 2005.

LASKOWSKI, R. A.; RULLMANN, J. A.; MACARTHUR, M. W.; KAPTEIN, R.; THORNTON, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 8, n. 4, p. 477-486, 1996.

LECAILLE, F.; KALETA, J.; BRÖMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4459-4488, 2002.

LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519-531, 2007.

LI, M.; CHEN, D.; SHILOH, A.; et al. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. **Nature**, v. 416, n. 6881, p. 648-653, 2002.

LI, S.; ZHENG, H.; MAO, A.-PING; et al. Regulation of Virus-triggered Signaling by OTUB1- and OTUB2-mediated Deubiquitination of TRAF3 and TRAF6 *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 7, p. 4291-4297, 2010.

LIN, A. E.; MAK, T. W. The role of E3 ligases in autoimmunity and the regulation of autoreactive T cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 6, p. 665-673, 2007.

LIPOLDOVÁ, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 4, p. 294-305, 2006.

MACHADO, P. R.; AMPUERO, J.; GUIMARÃES, L. H.; VILLASBOAS, L.; et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by leishmania braziliensis in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, p. e912, 2010.

MACKENZIE, D. A.; SCHATNER, J.; LIN, J.; et al. GRAIL is up-regulated in CD4+ CD25+ T regulatory cells and is sufficient for conversion of T cells to a regulatory phenotype. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9696-9702, 2007.

MAISEY, H. C.; DORAN, K. S.; NIZET, V. Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, p. 27, 2008.

- MAKAROVA, K. S.; ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 2, p. 50-52, 2000.
- MARQUES, N.; CABRAL, S.; SÁ, R.; et al. LEISHMANIOSE VISCERAL E INFECÇÃO POR VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA Na Era da Terapêutica Anti-Retroviral de Alta Eficácia. **Acta Medica Portuguesa**, p. 291-298, 2007.
- MARTÍ-RENOM, M. A.; STUART, A. C.; FISER, A.; et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 29, n. 1, p. 291-325, 2000.
- MARZOCCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 386 p. 2007.
- MAURO, C.; PACIFICO, F.; LAVORGNA, A.; et al. ABIN-1 binds to NEMO/IKK γ and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 27, p. 18482-18488, 2006.
- MCCONVILLE, M. J.; HANDMAN, E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1047-51, 2007.
- MCKERROW, J. H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 6, p. 833-837, 1999.
- MCKERROW, J. H.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 639-644, 1999.
- MCKERROW, J. H.; SUN, E.; ROSENTHAL, P. J.; BOUVIER, J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. **Annual Review of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 821-853, 1993.
- MCCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania* major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunological Reviews**, v. 201, p. 206-224, 2004.
- MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. A. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple “mini-prep” procedure. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 59, n. 2, p. 327-9, 1993.
- MEIERHOFER, D.; WANG, X.; HUANG, L.; KAISER, P. Quantitative analysis of global ubiquitination in HeLa cells by mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 10, p. 4566-4576, 2008.
- MISSLITZ, A. C.; BONHAGEN, K.; HARBECKE, D.; et al. Two waves of antigen-containing dendritic cells in vivo in experimental *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 3, p. 715-725, 2004.

- MOHAMED, M. M.; SLOANE, B. F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 764–775, 2006.
- MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 375–81, 2004.
- NAKADA, S.; TAI, I.; PANIER, S.; et al. Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. **Nature**, v. 466, n. 7309, p. 941-946, 2010.
- NANAO, M. H.; TCHERNIUK, S. O.; CHROBOCZEK, J.; DIDEBERG, O.; BALAKIREV, M. Y. scientific report. **EMBO Reports**, v. 5, n. 8, p. 5-10, 2004.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia humana**. 11a ed., Atheneu, 2005.
- NIJMAN, S. M. B.; LUNA-VARGAS, M. P. A.; VELDS, A.; et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. **Cell**, v. 123, n. 5, p. 773-786, 2005.
- OCÁDIZ, R.; OROZCO, E.; CARRILLO, E.; et al. EhCP112 is an Entamoeba histolytica secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 221-232, 2005.
- OVERALL, C. M.; DEAN, R. A. Degradomics: systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. **Cancer Metastasis Review**, v. 25, p. 69–75, 2006.
- PENG, J.; SCHWARTZ, D.; ELIAS, J. E.; et al. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 8, p. 921-926, 2003.
- PICKART, C. M. Mechanisms underlying ubiquitination. **Annual Review of Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 503-533, 2001.
- PICKART, CECILE M; COHEN, R. E. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 3, p. 177-187, 2004.
- POZUELO RUBIO, M.; GERAGHTY, K. M.; WONG, B. H. C.; et al. 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. **The Biochemical journal**, v. 379, n. Pt 2, p. 395-408, 2004.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical journal**, v. 290, p. 205-218, 1993.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Database issue, p. D227-D233, 2010.
- RAWLINGS, N.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Database issue, p. D227-D233, 2010.

- RESTREPO, G. E. C. Caracterização bioquímica da catepsina B de trypanosoma cruzi. Brasília, 73 f. 2001.
- RIJKEN, D. C.; LIJNEN, H. R. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, p. 4–13, 2009.
- RITTER, U.; OSTERLOH, A. A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 196, n. 1, p. 51-59, 2007.
- ROBERTS, L. J.; HANDMAN, E.; FOOTE, S. J. Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. **British Medical Journal**. v.30, p. 801-4, 2000.
- ROBERTSON, C. D. The Leishmania mexicana proteasome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 49-60, 1999.
- ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 12, n. 6-7, p. 514-535, 2005.
- RUMPF, S.; JENTSCH, S. Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. **Molecular Cell**, v. 21, n. 2, p. 261-269, 2006.
- RZYCHON, MALGORZATA; CHMIEL, D.; STEC-NIEMCZYK, J. Modes of inhibition of cysteine proteases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 51, n. 4, p. 861-873, 2004.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453-483, 2001.
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-58, 2002.
- SAJID, M; MCKERROW, J H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002.
- SALI, A; BLUNDELL, T L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of molecular biology**, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.
- SCHLEICHER, U.; LIESE, J.; KNIPPERTZ, I.; et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 4, p. 893-906, 2007.
- SIGISMUND, S.; POLO, S.; DI FIORE, P. P. Signaling through monoubiquitination. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 286, n. 0070-217X (Print) LA - eng PT - Journal Article PT - Research Support, Non-U.S. Gov't PT - Review RN - 0 (Proto-Oncogene Proteins) RN - 0 (Ubiquitin) RN - EC 2.7.1.112 (Receptor Protein-Tyrosine Kinases) RN - EC 6.3.2.- (Proto-Oncogene Proteins c-cbl) RN, p. 149-185, 2004.

SILVA-JARDIM, I.; HORTA, M. F.; RAMALHO-PINTO, F. J. The Leishmania chagasi proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. **Acta tropica**, v. 91, n. 2, p. 121-30, 2004.

SOARES, L.; SEROOGY, C.; SKRENTA, H.; et al. Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL. **Nature Immunology**, v. 5, n. 1, p. 45-54, 2004.

SOLBACH, W; LASKAY, T. The host response to Leishmania infection. **Advances in Immunology**, v. 74, p. 275-317, 2000

SOMANNA, A.; MUNDODI, V.; GEDAMU, L. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from Leishmania donovani complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25305-12, 2002

SOONG, L. Modulation of Dendritic Cell Function by Leishmania. **The Journal of Immunology**, v. 180, n.7, p. 4355-60, 2008.

SOUZA, A. E.; BATES, P. A.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Null mutants for the Imcpa cysteine proteinase gene in Leishmania mexicana. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 63, p. 213–20, 1994.

STANISIĆ, V.; MALOVANNAYA, A.; QIN, J.; LONARD, D. M.; O'MALLEY, B. W. OTU Domain-containing ubiquitin aldehyde-binding protein 1 (OTUB1) deubiquitinates estrogen receptor (ER) alpha and affects ERalpha transcriptional activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 24, p. 16135-45, 2009.

SUN, S.-C. Deubiquitylation and regulation of the immune response. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 7, p. 501-11, 2008.

SUNDAR, S, J. H. A.; THAKUR, C. P.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H.; et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, p. 1739–1746, 2002.

SWENERTON, R. K.; ZHANG, S.; SAJID, MOHAMMED; et al. The Oligopeptidase B of Leishmania regulates parasite enolase and immune evasion. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 1, p. 429-40, 2010.

SÁNCHEZ, ROBERTO; SALI, ANDREJ. Large-scale protein structure modeling of the Saccharomyces cerevisiae genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 23, p. 13597-13602, 1998

TRAMONTANO, A.; LEPLAE, R.; MOREA, V. Analysis and assessment of comparative modeling predictions in CASP4. **Proteins**, v. Suppl 5, p. 22-38, 2001.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 785-799, 2006.

VALDERRAMA, J. A.; ZAMORANO, C.; GONZÁLEZ, M. F.; PRINA, E.; FOURNET, A. Studies on quinones. Part 39: Synthesis and leishmanicidal activity of acylchloroquinones and hydroquinones. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4153-9, 2005.

VAN DER SPOEL, D.; VAN MAAREN, P. J.; LARSSON, P.; TÎMNEANU, N. Thermodynamics of hydrogen bonding in hydrophilic and hydrophobic media. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 9, p. 4393-4398, 2006..

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004.

VOET, D. & VOET, J., **Biochemistry**. 2a ed. Ed. Wiley, 1392 p. 1995.

WANG, T.; YIN, L.; COOPER, E. M.; et al. Evidence for Bidentate Substrate Binding as the Basis for the K48 Linkage Specificity of Otubain 1. **Journal of Molecular Biology**, v. 386, n. 4, p. 1011-1023, 2009.

WIEDERANDERS, B. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 3, p. 691-713, 2003.

WILKINSON, K D. Roles of ubiquitinylation in proteolysis and cellular regulation. **Annual Review of Nutrition**, v. 15, p. 161-189, 1995.

WILKINSON, K D. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 11, n. 3, p. 141-8, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The global burden of disease: 2004 update. Geneva. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva. 2010.

XU, P.; PENG, J. Dissecting the ubiquitin pathway by mass spectrometry. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, n. 12, p. 1940-1947, 2006.