



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

Otubáina de *Leishmania infantum* : atividade enzimática, super-expressão e caracterização funcional

CLÊNIA DOS SANTOS AZEVEDO

Brasília – DF

2016

CLÊNIA DOS SANTOS AZEVEDO

Otubáina de *Leishmania infantum* : atividade enzimática, super-expressão e caracterização funcional

Orientadora: Prof^a. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília – DF

2016

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Interação Patógeno - Hospedeiro –
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, com apoio financeiro do
CNPq, CAPES e FAP-DF.

Things are much more marvelous than the scientific method allows us to conceive.

Barbara McClintock

Dedico à minha família amada.

Agradecimentos

À minha orientadora profa. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos, por todos esses anos de orientação, conselhos e aprendizado. Obrigada por ter me conduzido na vida acadêmica e científica nesses primeiros 7 anos (primeiros, pois ainda temos muito a fazer).

Às Profas. Dras. Carla Nunes e Flávia Nader Motta e ao Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau pelo apoio e por sempre se mostrar tão prestativos. Obrigada por contribuírem para minha formação nessa jornada. Obrigada especialmente à profa. Dra. Carla pela receptividade na minha estadia em Paris, serei eternamente grata!

Ao Prof. Dr. Jaime Martins de Santana por todo apoio prestado e pelo compartilhamento sempre que possível de toda sua experiência.

Ao Prof. Dr. Philippe Grellier por me orientar no meu estágio no Muséum National d'Histoire Naturelle. Obrigada pelo exemplo de excelência científica, por me ensinar a questionar e por ampliar meus horizontes como cientista.

Às minhas colegas do Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro, Adriana Alfani, Camila Lasse, Deborah Santos, Graziella Figueiredo, Marta Rosa, Milene Andrade, Natalia Gil e Yanna Praça pelo apoio e aprendizado diários. E obrigada especialmente por entender minha tática organizacional de ocupar todas as bancadas do laboratório! E, é claro, às minhas colegas do Grupo Malária Molecular, Luz Elena, Thuany Moura, Ana Caroline Toledo pelos momentos de descontração.

À Raquel Negreiros, Bruna Guido, Paula Beatriz e Hugo Almeida por toda disposição em me ajudar sempre que precisei. Obrigada por compartilhar comigo o conhecimento de vocês nesses anos.

Ao Jhonata Pereira por me ajudar no desenvolvimento do projeto da OtuLi.

À prof. Dra. Kelly Magalhães e ao MSc. Rafael Corrêa pela colaboração nos testes de imunologia.

Ao prof. Dr. Diego Nolasco pela colaboração na modelagem e dinâmica molecular.

Ao CNPq, CAPES e FAP-DF pelo financiamento deste trabalho.

Ao meu pai, Cláudio Azevedo, e à minha mãe, Maria da Paz Azevedo, pelo exemplo constante de luta e de dignidade. Obrigada pela dedicação incondicional à nossa família.

Aos meus irmãos incríveis, Cláudio e Claudiane, por todo o amor, por todo carinho e por toda dedicação. Obrigada pelo cuidado diário, sem medir esforços.

Aos meus sobrinhos, Johny Azevedo, Enzo Azevedo, Sophia Amorim e Olívia Amorim, obrigada pelo estímulo de me fazer querer ser um ser humano melhor diariamente.

Last but definitely not least, ao Brenno Henrique pelo companheirismo e amor durante esta caminhada longa. Além de tudo, pela compreensão nos momentos difíceis. Você continua sendo incrível para mim.

Lista de abreviaturas e siglas

AMC	7-amino-4-metil-cumarina
DAPI	4'6-diamidino-2-phenilyndole
E-64	L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano
HCl	Ácido clorídrico
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IPTG	Isopropil-1- β -D-galactopiranosídeo
kDa	Kilodalton
LC	Leishmaniose Cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
NaCl	Cloreto de sódio
NEM	N-etilmaleimida
NTD	Doença Tropical Negligenciada
PBS	Phosphate Buffered Saline
RMSD	Desvio médio quadrático
rOtuLi	Otubaína recombinante de <i>Leishmania infantum</i>
SDS/PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento- β
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - α
WHO/OMS	Organização Mundial de Saúde
WT	Wild-type (selvagem)

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Lista de abreviaturas e siglas.....	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
Leishmanioses	1
Imunopatogenia	5
Aspectos epidemiológicos	6
Tratamento.....	8
Organização genômica e manipulação genética	10
Alvos moleculares para a quimioterapia das leishmanioses.....	12
Ubiquitinação e Deubiquitinação.....	13
Otubáina.....	18
JUSTIFICATIVA.....	23
OBJETIVOS	25
METODOLOGIA	27
Análise de sequências	27
Cultura celular.....	27
Extração de DNA genômico dos parasitos.....	27
Amplificação do gene <i>otubáina</i> de <i>L. infantum</i>	28
Ligação dos produtos de PCR ao pLEXSY-hyg2.....	29
Transformação bacteriana.....	30
Análise dos clones positivos da clonagem.....	30
Transfecção dos cassetes FLAG-OtuLi-hyg, OtuLi-hyg e LinpLEXSY-hyg	31
Confirmação da integração genômica por PCR	32
Curva de crescimento das formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	33
Expressão da rOtuLi em <i>E. coli</i> e purificação.....	33
Modelagem por homologia e dinâmica molecular da OtuLi WT, OtuLi Δ 1, OtuLi Δ 2 e OtuLi Δ 3	34
Produção de anticorpo policlonais anti-OtuLi	34
Atividade enzimática e inibição da rOtuLi	34
Preparação dos extratos proteicos de <i>L. infantum</i>	35
Análise por <i>Western blot</i>	35
Detecção fluorescente da mitocôndria de <i>L. infantum</i>	36
Imunocitocalização	36
Estimulação de macrófagos peritoniais pela rOtuLi <i>in vitro</i>	37
Coloração e quantificação da biogênese de corpúsculos lipídicos por Oil Red.....	38
Dosagens de Citocinas	38
Análise estatística	38
Considerações éticas.....	38

RESULTADOS	40
Análise comparativa da sequência de OtuLi.....	40
Clonagem do gene <i>otuli</i> no vetor pLEXSY-hyg2	41
Preparação dos cassetes FLAG-OtuLi-hyg, OtuLi-hyg e LinpLEXSY-hyg	44
Inserção da cópia extra de otubaina nas formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	44
Confirmação da inserção da cópia extra de <i>otuli</i> por PCR	45
Confirmação da expressão da cópia extra de OtuLi por <i>western blot</i>	45
Citocalização da cópia extra de OtuLi em formas promastigotas de <i>L. infantum</i> ..	47
Crescimento dos parasitos transfectados	48
Produção de soro imune contra a OtuLi recombinante.....	49
Imunofluorescência da OtuLi de formas promastigotas selvagens com marcação da mitocôndria e da PDI	50
Atividade e inibição enzimáticas da rOtuLi contra substrato proteico ligado pela lisina 48 (K48).....	52
Modelagem molecular comparativa da OtuLi WT, OtuLi Δ 1, OtuLi Δ 2 e OtuLi Δ 3.....	54
Indução de resposta inflamatória pela rOtuLi.....	56
DISCUSSÃO	60
CONCLUSÃO	69
PERSPECTIVAS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

RESUMO

Enzimas deubiquitinantes (DUBs) desempenham um papel importante na regulação da degradação de proteínas e de outros processos não-degradativos, por desconjugação de ubiquitina (Ub) de proteínas marcadas, como a modulação da resposta imune, a sinalização da quebra da dupla fita do DNA e endocitose. Explorar o papel de deubiquitinação em *Leishmania infantum* demonstra uma alternativa promissora para procurar novos alvos terapêuticos para a leishmaniose, já que a quimioterapia utilizada é onerosa, tóxica e tende a ser ineficiente. Este estudo teve como objetivo o estabelecimento de duas linhagem de *L. infantum* expressando uma cópia extra de otubaína (OtuLi), caracterização da atividade enzimática e funcional da OtuLi recombinante produzida em *E. coli* (rOtuLi). Com relação ao estabelecimento das linhagens, o gene *otuli* foi amplificado, clonado no vetor pLEXY-hyg2 e linearizado. Os promastigotas de *L. infantum* foram transfectados com os cassetes e selecionados. A integração dos cassetes ao locus gênico da 18S rRNA foi confirmada por PCR e a expressão da OtuLi fusionada ao peptídeo FLAG ou a cauda de 6 histidinas foi verificada por *western blot*. A citolocalização da FLAG-OtuLi indica que a enzima encontra-se em pequenas vesículas no citoplasma da célula com fortes marcações perto da região do cinetoplasto, corroborando o resultado visto utilizando anticorpos específicos para a OtuLi. A OtuLi não co-localiza com a mitocôndria marcada por duas sondas diferentes e com o retículo endoplasmático imunomarcado pela Proteína Dissulfato Isomerase em promastigotas. A rOtuLi apresentou atividade em pH ácido com substrato de tetra-ubiquitina ligado pela lisina 48 e o perfil de inibição indica que os inibidores NEM e Ub-aldeído são capazes de inibi-la. Através de mutações sítio-dirigidas realizadas na OtuLi, foi observado que tanto os resíduos próximos ao sítio catalítico quanto aqueles envolvidos na interação com a ubiquitina ocasionaram mudanças estruturais, conforme dinâmica molecular, resultando na redução ou perda da atividade da enzima. A rOtuLi foi capaz de estimular a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoniais e induzir a secreção de IL-6 e TNF- α , citocinas pró-inflamatórias. O estabelecimento das linhagens com a cópia extra de *otuli* representa o primeiro passo para futura identificação de proteínas capazes de interagir com a OtuLi e assim, elucidar seu mecanismo de ação no parasito.

Palavras-chaves: Deubiquitinação, manipulação genética, leishmaniose

ABSTRACT

Deubiquitylating enzymes (DUBs) play an important role in regulating protein degradation and other non-degradative processes, by deconjugation of ubiquitin (Ub) from marker proteins, such as immune response modulation, signalling of double strand breaks at DNA and endocytosis. Exploring the role of deubiquitination in *Leishmania infantum* demonstrates a promising alternative to search for new therapeutic targets for leishmaniasis, since its primary chemotherapy is expensive, toxic and tending to be inefficient. This study aimed to establish two *L. infantum* strains expressing an extra copy of otubain (OtuLi), characterization of enzymatic and functional activity of recombinant OtuLi (rOtuLi). Regarding the establishment of the strains, the *otuli* gene was amplified, cloned in pLEXSY-hyg2 and the vector was linearized. The promastigotes of *L. infantum* were transfected with the cassette and selected. The integration of the cassettes into the 18S rRNA gene locus was confirmed by PCR and the expression of OtuLi fused to the FLAG peptide or to a 6 histidine tail was accessed by western blot. The citolocalization of FLAG-OtuLi indicates that the enzyme is in small vesicles in the cytoplasm of the cell with strong markings near the kinetoplast region, confirming the results seen using antibodies specific for OtuLi. The OtuLi is not co-located with the mitochondria marked by two different probes and with the endoplasmic reticulum immunolabeled by protein disulfide-isomerase. The rOtuLi showed activity at acid pH with lysine 48-linked tetra-ubiquitin substrate and the inhibition profile indicates that NEM and Ub-aldehyde inhibitors are able to inhibit it. Through site-directed mutations in OtuLi, it was observed that the residues near the catalytic site or those involved in the interaction with the ubiquitin caused structural changes as shown by molecular dynamics, resulting in a reduction or loss of enzyme activity. The rOtuLi was able to stimulate the formation of lipid body in peritoneal macrophages and to induce the secretion of IL-6 and TNF- α , pro-inflammatory cytokines. The establishment of these strains with the extra copy of *otuli* is the first step for future identification of proteins that interact with OtuLi and thus elucidate its mechanism of action in the parasite.

Keywords: Deubiquitination, genetic manipulation, leishmaniasis

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* e transmitidas ao hospedeiro por insetos hematófagos do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). Estas parasitoses compõem a lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS) e possuem grande importância do ponto de vista médico-veterinário devido ao vasto número de espécies capazes de infectar mamíferos (WHO, 2016).

O gênero *Leishmania* abriga parasitos intracelulares obrigatórios que pertencem à família *Trypanosomatidae* e à ordem *Kinetoplastida*, caracterizada pela presença de um cinetoplasto rico em DNA mitocondrial. São protozoários heteroxenos, apresentando duas formas adaptativas em seu ciclo de vida: a promastigota, forma flagelada e extracelular que se replicam no hospedeiro invertebrado e a amastigota, forma com retração do flagelo capaz de parasitar células fagocíticas, principalmente macrófagos. Há aproximadamente 53 espécies de *Leishmania* descritas, sendo 31 espécies capazes de parasitar algum hospedeiro mamífero e, entre elas, 20 espécies são patogênicas aos seres humanos. As leishmanioses são transmitidas para humanos e outros hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo de fêmeas de 93 espécies diferentes de flebotomíneos quando estão infectadas pelos parasitos (AKHOUNDI et al., 2016).

O ciclo de vida destes protozoários inicia-se quando ocorre a infecção das fêmeas dos flebotomíneos no momento do repasto sanguíneo em um mamífero infectado, pela ingestão de macrófagos com formas amastigotas, conforme Figura 1. Ao atingir o trato digestivo anterior, essas células são rompidas e as formas amastigotas são liberadas; em seguida, elas se diferenciam em formas promastigotas procíclicas altamente replicativas e não infectivas, reproduzindo-se, então, por divisão binária. Estas formas migram para o esôfago e faringe do flebotomíneo e se aderem às suas células epiteliais, onde ocorre um importante processo chamado metaciclogênese, dando origem às formas promastigotas metacíclicas, que são infectivas e não replicativas. Estudos *in vitro* sugerem que o baixo pH e a insuficiência de nutrientes sejam pontos-chaves para o início da

metaciclogênese (BATES; TETLEY, 1993; SACKS; PERKINS, 1984). As formas promastigotas metacíclicas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo no momento em que os parasitos são regurgitados, penetrando a derme do hospedeiro. Neste momento, fagócitos são recrutados e os parasitos são aderidos a essas células mediante interação com receptores específicos. Os parasitos são fagocitados e então incorporados ao vacúolo parasitóforo que, em seguida, é fusionado ao lisossomo formando o fagolisossomo. Os promastigotas metacíclicos resistem ao estresse oxidativo do lisossomo e sofrem outra transformação morfológica dando origem às formas amastigotas, que se multiplicam diversas vezes, rompendo as células hospedeiras. As formas amastigotas livres estão aptas a infectar novos fagócitos, ocorrendo a disseminação para tecidos ricos em células fagocitárias como os linfonodos, fígado, baço e medula óssea. O ciclo se completa quando uma fêmea do flebotomíneo ingere fagócitos infectados com formas amastigotas durante o repasto sanguíneo (NO, 2016).

A classificação mais recente envolvendo o gênero *Leishmania* utilizando a análise dos espaçadores transcritos intergênicos do cluster gênico rRNA (*gene cluster of the intergenic transcribed spacers - ITSrRNA*) dividiu o gênero em duas “seções” chamadas de *Euleishmania* e *Paraleishmania* (CUPOLILLO et al., 2000). A seção *Euleishmania* incorpora os subgêneros *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e o complexo *L. enrietti*. Já a seção *Paraleishmania* envolve *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri*, *L. equatorensis* e *L. colombiensis*, onde apenas esta última espécie é patogênica ao ser humano (AKHOUNDI et al., 2016). As espécies do subgênero *Leishmania* se desenvolvem no intestino médio e intestino anterior do flebotomíneo e as espécies do subgênero *Viannia* possuem uma fase de desenvolvimento no intestino posterior do vetor (LAINSON; SHAW, 1987). Já o subgênero *Sauroleishmania* compreende espécies não patogênicas aos mamíferos, capazes de infectar lagartixas no Velho Mundo e o parasito se desenvolve no intestino posterior do vetor. Por fim, o complexo *L. enrietti* acomoda formalmente duas espécies; a *L. enrietti* isolada de um porco doméstico e a *L. martiniquensis* descrita recentemente como agente etiológico em humanos (KWAKYE-NUAKO et al., 2015).

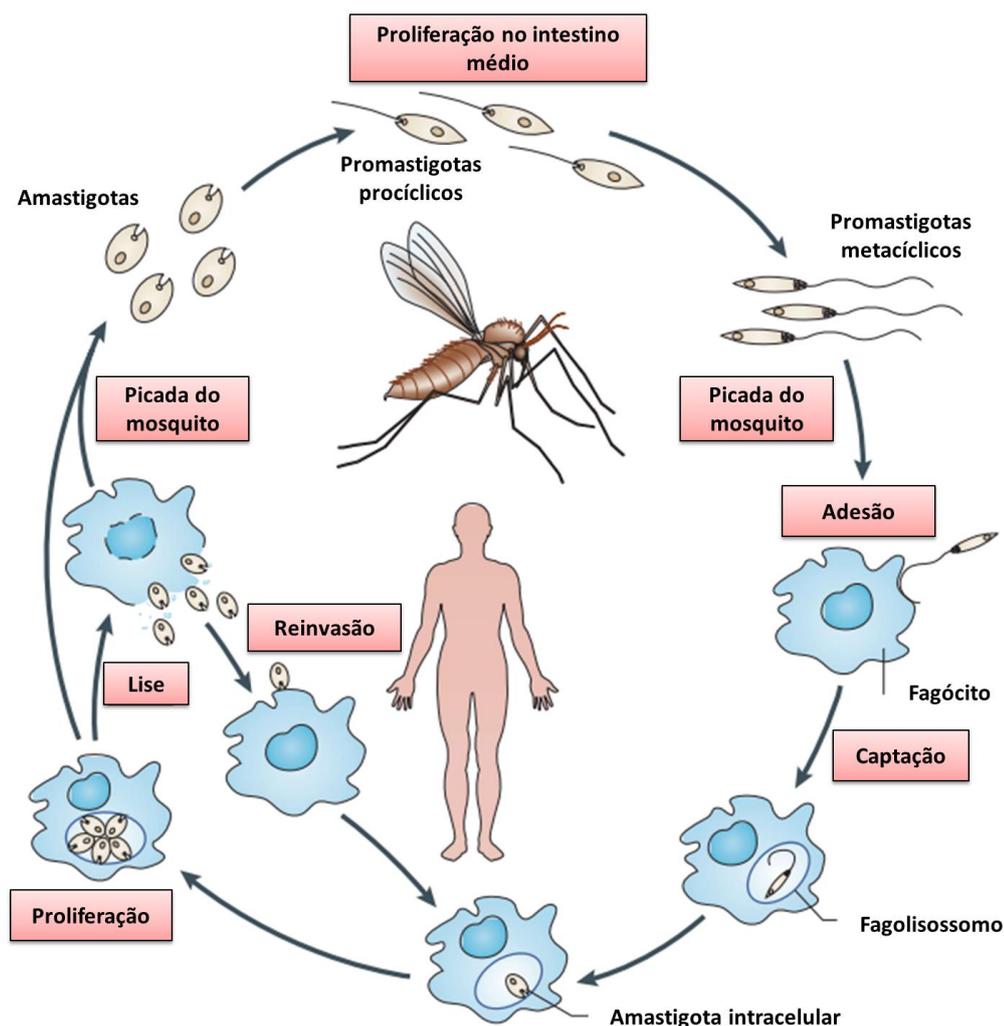


Figura 1. Ciclo de vida dos parasitos das espécies de *Leishmania*. Adaptado de (KAYE; SCOTT, 2011)

Outra classificação comumente observada é em relação às espécies de *Leishmania* no Novo Mundo (aquelas presentes nas Américas) e no Velho Mundo (aquelas encontradas na Europa e Ásia). Entretanto, esta classificação é apenas uma abordagem encontrada para representar as similaridades entre as espécies encontradas em diferentes áreas geográficas e não está relacionada à ancestralidade (AKHOUNDI et al., 2016).

A grande diversidade de espécies de *Leishmania*, o sítio de inoculação e fatores relacionados à imunocompetência do hospedeiro frente à infecção culminam no desenvolvimento de diferentes formas clínicas dessas doenças (RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

A leishmaniose cutânea tem como espécies representativas a *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* no Novo Mundo e *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo e, na maioria dos casos, é uma doença auto-limitante. O período de incubação é de 2 a 4 semanas, podendo, entretanto, ser amplo e variar de poucos dias a 3 anos (GOTO; LINDOSO, 2010). O quadro clínico se inicia com o surgimento de uma lesão assintomática, chamada pápula, no local de inoculação que pode ser controlada com uma eficiente resposta imunológica. Entretanto, este processo pode ser lento, e a pápula pode evoluir para uma lesão ulcerativa, podendo levar meses até a cura e, nestes casos, as lesões podem ser severas e deixam cicatrizes desfigurantes (HANDLER et al., 2015).

A leishmaniose cutânea difusa, que possui como principal agente etiológico a *L. amazonensis* no Novo Mundo e *L. aethiopica* no Velho Mundo, é caracterizada pelo aparecimento de nódulos indolores que progridem e afetam, normalmente, toda a superfície cutânea, principalmente face, orelhas, cotovelos e joelhos. As lesões não são auto-limitantes e possuem grande quantidade de parasitos na forma amastigota (HANDLER et al., 2015).

A leishmaniose mucocutânea pode ocorrer como uma reincidiva após a aparente cura da leishmaniose cutânea através da metástase dos parasitos, podendo ocorrer até 30 anos depois da primeira infecção. A espécie mais comum nestes casos é a *L. braziliensis*, mas também podem estar relacionada a *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. Lesões ulcerativas são predominantes no septo nasal, com consequente disseminação para a cavidade orofaríngea, podendo levar a necrose do tecido. Este tipo de leishmaniose é geralmente irresponsiva ao tratamento e pode levar à deformação da face do paciente, à dificuldade de deglutição e ao óbito devido a infecções secundárias, como pneumonia (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; PISCOPO; MALLIA, 2006).

O comprometimento de órgãos internos, como o baço, o fígado e a medula óssea caracteriza a leishmaniose visceral (LV, também conhecida como calazar). É resultante da disseminação de fagócitos infectados pelos parasitos através do sistema reticuloendotelial a partir do sítio de inoculação. No Velho Mundo, as espécies capazes de favorecer este tipo de doença são a *L. major* e a *L. infantum*. No Novo Mundo, a leishmaniose visceral também é causada por *L. infantum*

(conhecida como *L. chagasi* ou *L. infantum chagasi*), encontrada principalmente no Brasil. Devido ao tropismo destes parasitos por macrófagos do baço, fígado e medula óssea, eventos clínicos como hepatoesplenomegalia e supressão da medula são comuns e, quando não tratados, o paciente pode desenvolver pancitopenia e severa imunossupressão. Quando tratados, alguns pacientes após meses ou anos assintomáticos podem desenvolver uma forma da doença chamada leishmaniose dérmica pós-calazar decorrente de um expressivo aumento de parasitos e consequente surgimento de lesões maculares e hipopigmentadas. No Sudão, aproximadamente 50% dos pacientes recuperados de leishmaniose visceral desenvolvem este tipo dérmico (HANDLER et al., 2015; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Imunopatogenia

A *Leishmania* começa o processo de infecção através de sua interação com a célula hospedeira pelo flagelo que, então, consegue ser interiorizada por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. É sabido que a interiorização dos parasitos por neutrófilos funciona como um eficiente mecanismo de evasão do sistema complemento, para depois ser captado por sua principal célula hospedeira, o macrófago. Alguns macrófagos podem se encontrar ativados no momento da internalização com grande quantidade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e, assim, promovem a morte do parasito (RITTER; FRISCHKNECHT; VAN ZANDBERGEN, 2009).

Os mecanismos de defesa da resposta primária após a infecção consiste na supressão de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon- γ e IL-12, e indução de citocinas anti-inflamatórias como o TGF- β e IL-10, garantindo a inibição da ativação dos macrófagos (BHATTACHARYA; ALI, 2013). Alguns fatores de virulência são importantes para o estabelecimento do parasito na célula hospedeira nesta fase. Uma glicoproteína de superfície chamada GP63 e o lipofosfoglicano presentes na membrana do parasito inibem a IL-12 a fim de garantir que os macrófagos permaneçam inativos (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

As formas promastigotas também são capazes de infectar células dendríticas (CD) maduras e imaturas e CDs derivados de monócitos. O mecanismo de evasão em CD imaturas consiste no retardo do estágio do vacúolo parasitóforo em

endossomo tardio, levando à sobrevivência do parasito no interior da célula (KÖRNER et al., 2006). CDs infectadas produzem IL-12 que é capaz de induzir a liberação de interferon- γ por células T CD4+ (resposta Th1). Assim, o interferon- γ inicia o recrutamento de macrófagos ativados para fagocitose e morte do parasito. Uma resposta Th2 é iniciada pelo parasito através da indução de IL-10 e TGF- β , o que, novamente, mantém os macrófagos inativados para o sucesso do estabelecimento do parasito na célula (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Aspectos epidemiológicos

As leishmanioses eram conhecidas por seu caráter rural, onde as condições socioeconômicas, como a pobreza e a falta de saneamento básico, são fatores de risco. Entretanto, outros aspectos favoreceram o desenvolvimento das leishmanioses nas áreas urbanas e peri-urbanas. O intenso processo migratório das últimas décadas e o desmedido desflorestamento fizeram com que as pessoas se assentassem em locais tidos como habitat dos vetores onde o ciclo de transmissão já ocorre em animais, principalmente roedores. Outro fator de extrema importância é a acentuada mudança climática. Variações na temperatura e umidade podem afetar drasticamente a distribuição e sobrevivência dos vetores e dos reservatórios, além de poder contribuir para o desenvolvimento do ciclo do parasito nos vetores, permitindo que áreas não endêmicas passem a registrar casos de infecção (WHO, 2016).

As leishmanioses ocupam o 2º lugar na mortalidade entre as doenças parasitárias, atrás somente da malária. Elas também estão em 3º lugar das causas mais comum por morbidade no quesito de anos de vida ajustados por incapacidade (*disability-adjusted life years* – DALY), onde a malária e a esquistossomose ocupam o 1º e o 2º lugar, respectivamente. Além disso, viajantes que percorrem áreas endêmicas são importantes na disseminação da doença para áreas não endêmicas (FIELD et al., 2010).

Uma extensiva análise sobre a incidência de leishmaniose no mundo concluiu que cerca de 1,3 milhões de pessoas são acometidas por leishmanioses, principalmente as populações pobres e marginalizadas, levando a mais de 20 mil óbitos anualmente (WHO, 2016). Segundo Alvar e colaboradores (2012), 98 países distribuídos em 3 territórios e 5 continentes possuem transmissão endêmica de

leishmaniose (Figura 2). Ainda que os dados sejam alarmantes, acredita-se que eles são subestimados devido à negligência nas notificações dos casos. Os casos oficiais contabilizam aproximadamente 58 mil casos de leishmaniose visceral e 220 mil casos de leishmaniose cutânea anualmente. Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral acontecem em apenas seis países (Bangladesh, Brasil, Índia, Etiópia, Sudão e Sudão do Sul). Os casos de leishmaniose cutânea são geograficamente distribuídos, entretanto a maioria deles ocorre predominantemente em três regiões: Américas, bacia do Mediterrâneo e Ásia ocidental (ALVAR et al., 2012).

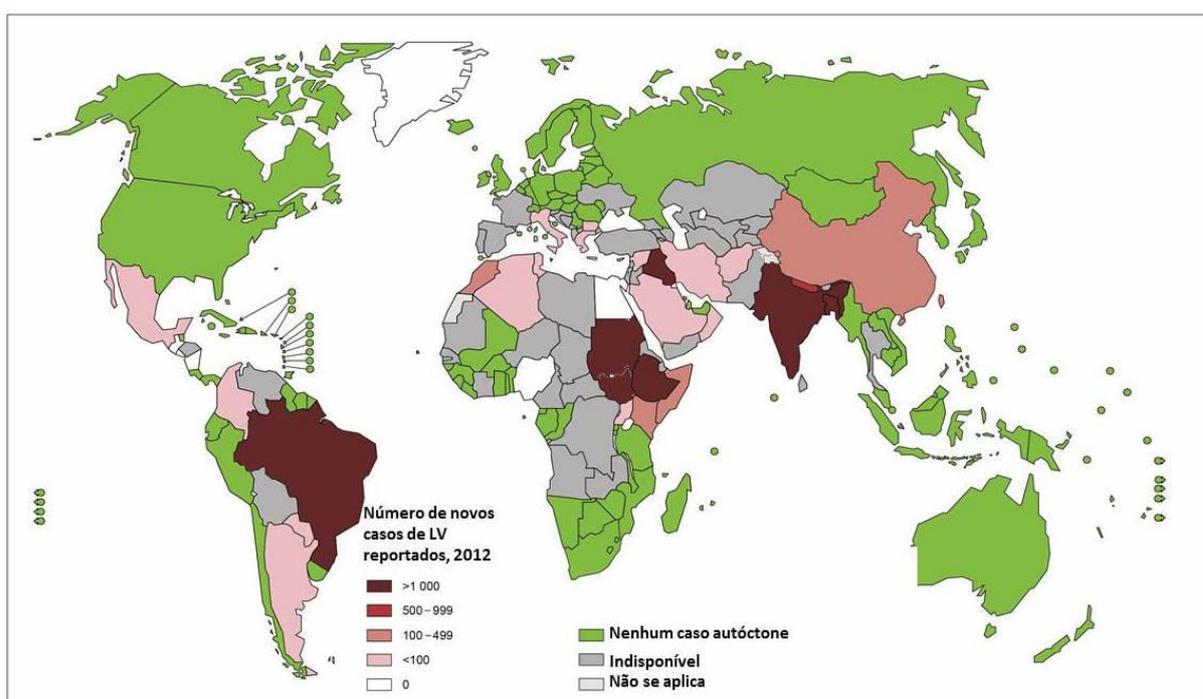


Figura 2. Endemia mundial da leishmaniose visceral, 2012. Adaptado de WHO (2014).

Um levantamento de dados do Ministério da Saúde contabilizou 48.455 casos entre os anos de 1984 e 2002 de leishmaniose visceral e mais da metade (66%) ocorreu em apenas 4 estados brasileiros (Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí). Do total, 54,4% dos atingidos pela LV são crianças menores de 10 anos e, em sua maioria, meninos. É sabido que a fragilidade imunológica e a desnutrição das crianças, comum nas áreas endêmicas, tornam-nas mais suscetíveis ao sucesso da infecção (BRASIL, 2014).

O Distrito Federal tem sofrido uma grande dispersão dos vetores nos últimos anos. Apesar das áreas de risco serem as regiões próximas à vegetação, o principal vetor no DF, o *L. whitmani*, vem se disseminando para regiões amplamente urbanizadas, como a região do Lago e Sobradinho (DISTRITO FEDERAL, 2013). Os dados de leishmaniose cutânea em 2015 totalizam 50 casos e 70% dessas pessoas residem no DF, entretanto, desde o ano de 2014, o DF não identificou nenhum caso autóctone. Ainda sobre o DF, dados da Secretaria de Vigilância à Saúde indicam a notificação de 142 casos de LV, com 39 casos confirmados em 2015. A grande maioria das pessoas infectadas (56,4%) possuem de 0 a 9 anos. Levantamento dos casos de LV de 2012 a 2015 mostram que, apesar do aumento dos casos notificados, o total de casos confirmados e autóctones no DF vem diminuindo. A grande maioria dos casos são provenientes de outras Unidades da Federação, em especial, o estado de Goiás (DISTRITO FEDERAL, 2016).

Tratamento

Os medicamentos a base de antimônio (Sb) foram os primeiros agentes quimioterápicos utilizados no tratamento das leishmanioses e até hoje são a primeira escolha na quimioterapia de todas as leishmanioses. O tártaro emético, fórmula contendo o antimônio na sua forma trivalente (Sb^{3+}), apesar da sua alta toxicidade, era utilizado no início do século XX nos casos de leishmaniose mucocutânea. À época, 90% dos casos não tratados acabavam em óbito (LAINSON; SHAW, 1978). O uso deste medicamento, no entanto, foi limitado devido aos severos efeitos adversos. Décadas depois, foi introduzida outra formulação no mercado, o estibogluconato de sódio, um derivado do ácido estibônico contendo o antimônio na forma pentavalente. Este medicamento obteve maior sucesso pelo fato de possuir menor toxicidade e, conseqüentemente, redução dos efeitos colaterais. Um segundo antimônio pentavalente foi incorporado ao tratamento: o antimoniato de meglumina. Este último é a formulação distribuída no Brasil sob o nome comercial de Glucantime[®] e acredita-se que sua estrutura se baseia em moléculas de *N*-metil-D-glucamina coordenadas em um átomo de Sb^{5+} (ROBERTS; BERMAN; RAINEY, 1995).

A utilização dos antimonais pentavalentes para a leishmaniose mucocutânea não é considerada eficaz e, geralmente, há casos de recorrência após o uso. Apesar de mais tolerada que as primeiras formulações com a sua fórmula trivalente, os

antimoniais pentavalente apresentam sérios efeitos adversos, como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade; deste modo, eles devem ser empregados com cautela e o paciente deve estar sob constante supervisão. A via de administração utilizada é a intramuscular e a duração do tratamento é de aproximadamente 30 dias (BRASIL, 2010). Ainda que efetivo contra a leishmaniose visceral, esses medicamentos não são mais utilizados na Índia devido ao aumento de cepas resistentes, tornando-os obsoletos (SUNDAR et al., 2000).

A segunda linha de tratamento utilizada para as leishmaniose é a anfotericina B. Demonstrada a atividade antileishmanial deste medicamento na década de 60, o uso da anfotericina B deoxicolato é limitado pelos inúmeros efeitos adversos, como pancitopenia, hipopotassemia, edema pulmonar, agravamento das funções cardíacas e hepáticas, entre diversos outros (BRASIL, 2010). Outras formulações menos tóxicas estão disponíveis, como a anfotericina B lipossomal, que pouco se acumula nos rins. Entretanto, ainda que haja esforço da OMS para diminuir o valor deste medicamento, o custo desta formulação mais moderna ainda é um fator limitante para pacientes nos países endêmicos que, em sua maioria, são países subdesenvolvidos (MEHEUS et al., 2010). Além disso, o uso de anfotericina B é restrito ao uso hospitalar, devido a sua administração intravenosa (BRASIL, 2010). A anfotericina B tem como alvo o ergosterol, principal constituinte da membrana plasmática da *Leishmania*. Ela se liga ao ergosterol por interação hidrofóbica e forma poros na membrana dos parasitos, causando um desequilíbrio osmótico celular (KAMINSKI, 2014).

A terceira e última linha de tratamento disponível no Brasil é a isetionato de pentamidina. É atualmente utilizado para o tratamento das leishmanioses na falha dos antimoniais pentavalentes, nos casos de recidiva e impossibilidade de uso da anfotericina B. São diamidinas aromáticas e agem interferindo na síntese de poliaminas através da inibição da ornitina descarboxilase e da espermidina sintetase. Há também atuação no DNA, capaz de ligar-se a ele em regiões ricas em adenina e timina (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). O esquema de tratamento é longo, chegando a durar 7 meses; sua administração é exclusivamente pelas vias intramuscular e intravenosa. Infelizmente, apresenta também diversos efeitos adversos, como nefrotoxicidade, disfunção hepática, sinais de diabetes mellitus e, menos frequente, cardiotoxicidade (BRASIL, 2010). Este medicamento

não é mais usado no Velho Mundo e, nas Américas, segundo recomendação da OMS, deve ser utilizado em casos extremos (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVA, 2012).

Organização genômica e manipulação genética

O genoma de *L. infantum* apresenta 8.154 genes e 41 pseudogenes distribuídos em 32,1 Mb em 36 cromossomos (PEACOCK et al., 2007). As espécies de *Leishmania* possuem cromossomos lineares e telômeros (BAÑULS, HIDE, & PRUGNOLLE, 2007). Diferente de outros protozoários, os clusters direcionais de genes *housekeeping* se estendem a 5 Kb para dentro do telômero; em outros parasitos, as regiões sub-teloméricas são importantes na geração de diversidade gênica. Inclusive, a análise genômica comparativa entre *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* identificou 26 genes específicos da espécie *L. infantum*, que curiosamente, estão espalhados pelo genoma ao invés de concentrados nas regiões sub-teloméricas. Outra particularidade das espécies de *Leishmania* é a ausência de elementos transponíveis, favorecendo a estabilidade cromossomal, e a presença de grandes arranjos gênicos *in tandem* com o objetivo de aumentar a expressão proteica na ausência de regulação gênica (PEACOCK et al., 2007). Os cromossomos de *Leishmania* são diplóides com alguns relatos de aneuploidia e os genes não possuem íntrons, o que é um ponto facilitador para identificação desses genes no genoma (BAÑULS et al., 2007).

A transcrição gênica em *Leishmania* ocorre de maneira policistrônica. Os genes são transcritos em precursores policistrônicos e clivados em RNA mensageiros monocistrônicos, seguida de processamento gênico para geração do *trans-splicing* na terminação 5', uma sequência de 39 nucleotídeos, e poliadenilação na terminação 3' do mRNA. Como consequência da transcrição policistrônica, todos os genes de um mesmo cluster tendem a possuir igual expressão gênica; conseqüentemente, a regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorre em nível pós-transcricional, no processamento do mRNA (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

A manipulação genética de parasitos no início da década de 1990 era baseada na recombinação homóloga e utilizada na geração de parasitos nocautes conferindo aos parasitos um gene de resistência à droga de seleção para estudo

funcional de genes (CRUZ; BEVERLEY, 1990). A técnica baseia-se na construção de um cassete que possui o gene de resistência à droga, flanqueado pelas regiões *upstream* e *downstream* do gene que deseja ser deletado. Foi visto que os parasitos conseguem receber material genético exógeno por eletroporação, entretanto, como o parasito *Leishmania* é um organismo diplóide, esse processo deve ser repetido duas vezes para que ambos alelos sejam deletados a fim de produzir um mutante nulo (ROBERTS, 2011). A técnica de RNA de interferência (RNAi), amplamente utilizada em eucariotos para degradação de mRNA específicos a partir da indução da quebra da dupla fita de RNA, está disponível apenas em *Trypanosoma brucei* e, com as informações provenientes do sequenciamento genômico, apenas parasitos do subgênero *Viannia* possuem o maquinário necessário para a utilização desta técnica (PEACOCK et al., 2007). As razões pelas quais esta maquinaria foi perdida após a separação dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* permanece obscura, entretanto plasticidade genômica e invasão viral parecem ter influenciado essa perda (LYE et al., 2010).

Para expressão de proteínas exógenas ou endógenas ao parasito, são utilizados vetores com genes de resistência à droga. Os genes de interesse são clonados nesses vetores e incorporados ao parasito por eletroporação. Apesar de ser uma técnica relativamente praticável, algumas limitações devem ser consideradas. Os vetores episomais podem se manter instáveis sem a pressão antibiótica, o que se torna preocupante já que nos estudos de infecção, as células são mantidas por longos períodos na ausência da droga. Além disso, a passagem vertical dos vetores para as células filhas após divisão dos parasitos não garante distribuição igual afetando sua expressão gênica (ROBERTS, 2011).

Foi produzido um novo sistema de expressão baseado na linearização de um vetor com capacidade para recombinação homóloga no parasito *Leishmania tarantolae*. Esta espécie foi isolada da lagartixa *Tarentola mauritanica* e, como sistema de expressão, demonstrou-se eficiente com alta produção de proteína heteróloga de maneira intracelular ou secretada. O cassete se aproveita da ação da RNA polimerase I de produzir transcritos constitutivos de genes integrados no locus gênicos da subunidade 18S do rRNA. Este sistema de expressão demonstrou-se reprodutível e apresenta algumas vantagens, como a possibilidade de expressar proteínas heterólogas com modificações pós-traducionais, fato ausente em sistemas

de procariotos, o parasito pode ser cultivado em um meio de cultura com maior custo-benefício e seu tempo de divisão celular é relativamente rápido, cerca de 6 – 8 h (BREITLING et al., 2002). Existe uma versão alternativa que garante a expressão indutível utilizando a T7 RNA polimerase e um repressor de tetraciclina (KUSHNIR et al., 2005).

Alvos moleculares para a quimioterapia das leishmanioses

Diante do cenário do tratamento das leishmanioses, em que os medicamentos disponíveis possuem diversos efeitos adversos e crescente resistência, torna-se urgente a busca por novos alvos moleculares que sejam importantes para o desenvolvimento do parasito. Assim, o estudo dessas moléculas pode influenciar no delineamento de fármacos mais promissores.

As proteases tornaram-se potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas contra parasitoses pela sua atuação em processos cruciais como replicação, metabolismo, sobrevivência e estabelecimento da doença no hospedeiro (DAS et al., 2013; MCKERROW et al., 2008; SELZER et al., 1999). Uma protease amplamente estudada em *Leishmania* é a GP63, uma metaloprotease localizada principalmente na superfície do promastigota (YAO, 2010). A GP63 é essencial para o estabelecimento do parasito na célula hospedeira, uma vez que ela medeia a evasão do sistema complemento e facilita a migração do parasito na célula hospedeira através da clivagem de proteínas da matrix extracelular (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012). Sendo esta metaloprotease um fator de virulência, houveram algumas tentativas sem sucesso de se obter um inibidor específico com o objetivo de impedir o progresso da doença (BANGS et al., 2001). Entretanto, há um grande esforço voltado para o estudo da GP63 focado no desenvolvimento de uma vacina eficiente contra leishmaniose (JAAFARI et al., 2007; OLOBO et al., 1995; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007).

As cisteíno-proteases representam uma família de proteases que também é extensamente estudada nestes parasitos. Morfologicamente, estas enzimas são encontradas em abundância nos lisossomos das formas amastigotas, entretanto também estão presente em outros compartimentos celulares tanto em amastigotas quanto em promastigotas (UEDA-NAKAMURA; ATTIAS; DE SOUZA, 2001). Essas enzimas já foram descritas como importantes fatores na modulação da resposta

imune do hospedeiro, na amastigogênese e na autofagia (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004). Além disso, quando há um desbalanço na atividade de cisteíno-proteases do parasito, a infectividade e virulência são comprometidas (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998; BRYSON et al., 2009; MAHMOUDZADEH-NIKNAM; MCKERROW, 2004; MOTTRAM et al., 1996; MUNDODI; KUCKNOOR; GEDAMU, 2005). A inibição de 80% das cisteíno-proteases por nocaute gênico culminou na prevenção da replicação de *Leishmania* (DAS et al., 2001). Levando em consideração a relevância dessas enzimas no parasito, a utilização de um inibidor específico de cisteíno-proteases parece útil. Entretanto, inibidores específicos das catepsinas B e L administrados em modelo murino apresentou grande citotoxicidade à célula hospedeira. Para o bloqueio da invasão e replicação da *Leishmania* nas células hospedeiras, é necessário que o inibidor específico de cisteíno-protease seja seletivo para as enzimas do parasito e tenha amplo-espectro, de maneira que ele consiga inibir pelo menos duas das três famílias de cisteíno-proteases (genes *cpa*, *cpb* e *cpc*) (SELZER et al., 1999).

A caracterização de outras cisteíno-proteases como as deubiquitinases, enzimas que serão discutidas ao longo deste trabalho importantes nos processos de ubiquitinação e deubiquitinação, pode contribuir para a validação das cisteíno-proteases como importantes alvos moleculares na quimioterapia das leishmanioses, além de elucidar a regulação desses processos na biologia do parasito.

Ubiquitinação e Deubiquitinação

A ubiquitinação foi funcionalmente descrita, no início dos anos 80, na marcação de substratos proteicos para degradação via proteassoma 26S através de uma ligação ATP-dependente. Sabe-se que esta modificação pós-traducional está relacionada a diversos eventos celulares independentes da degradação proteica (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998).

A ubiquitinação consiste na ligação covalente de uma proteína de 76 aminoácidos chamado ubiquitina, uma molécula que demonstra ser altamente conservada entre os organismos eucarióticos, a um substrato proteico. Esta ligação ocorre entre o resíduo de glicina presente no C-terminal da molécula de ubiquitina e o resíduo de lisina no substrato protéico. Como mostrado na Figura 3, é possível que o substrato seja marcado por uma cadeia polipeptídica de ubiquitinas

(poliubiquitinação), uma única ubiquitina (monoubiquitinação) ou várias ubiquitinas em diferentes sítios do substrato (multi-monoubiquitinação) (KAWABE; BROSE, 2011).

A cadeia de poliubiquitinas pode ser formada através de sete resíduos de lisinas (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63) disponíveis na molécula de ubiquitina ou através de seu grupo amino do N-terminal e o tipo de ligação formada possui papel chave na determinação do efeito da ubiquitinação. Cadeias de tetra-ubiquitina ligadas pela K48 são as mais abundantes e sinalizam a degradação proteolítica do substrato pelo proteassoma 26S. Já as cadeias formadas pela K63, segundo tipo mais comum, sinalizam a regulação de reparo do DNA, tráfego de proteínas e transdução de sinal, também sinalizado pela monoubiquitinação (WOELK et al., 2007) (Figura 3). A função das cadeia de poliubiquitinas formadas pela ligação dos outros resíduos de lisina não estão bem elucidadas, mas um estudo proteômico quantitativo indica que essas cadeias parecem estar também envolvidas na sinalização de degradação proteica (XU et al., 2009).

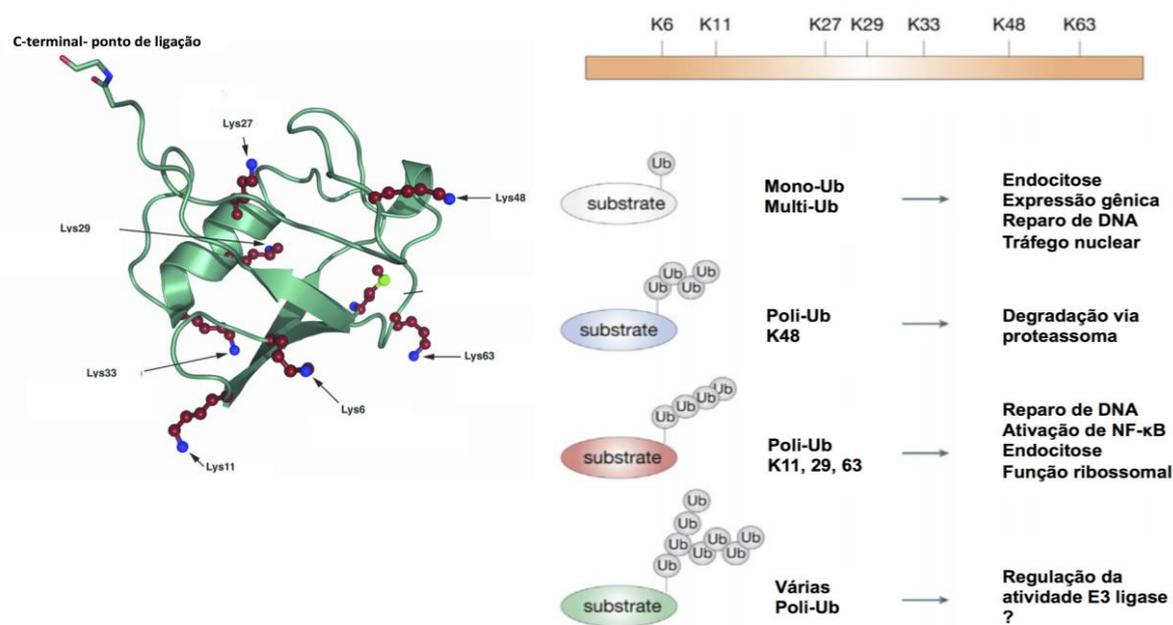


Figura 3. Estrutura representativa da ubiquitina, formação de cadeias ligadas via diferentes resíduos de lisina e efeito destas cadeias, ligadas ao substrato, em diferentes processos celulares. Adaptado de (WOELK et al., 2007).

O início da cascata enzimática, que é finalizado na ligação da ubiquitina ao substrato, dá-se pela ativação da molécula de ubiquitina pela enzima E1 (ativadora); a porção C-terminal da ubiquitina sofre adenilação e então forma, a custo de ATP, uma ligação tioéster entre o grupo tiol do resíduo de cisteína do sítio ativo da E1 e o grupo carbonil da porção C-terminal do resíduo de glicina da ubiquitina. Esta ubiquitina ativada é então transferida a uma enzima E2 (conjugadora) através uma reação de *trans*-tioesterificação, formando um tioéster intermediário. As E2 possuem papel importante na determinação de qual tipo de lisina será utilizado para formação da cadeia de poliubiquitinas. Além disso, são capazes de transferir a ubiquitina diretamente ao substrato, mas, normalmente, é necessária a especificidade no reconhecimento do substrato, ação que compete à última enzima da cascata, a E3 ligase (Figura 4). As E3 são divididas em dois grupos: ligase do tipo HECT (*homologous to E6AP carboxyl terminus*) e ligases do tipo RING-finger. No caso da E3 tipo HECT, a ubiquitina ativa liga-se de forma covalente ao resíduo de cisteína do domínio HECT, formando um intermediário E2-Ub, para então ser transferida para um resíduo de lisina no substrato protéico reconhecido pelo domínio específico. Já no caso das E3 do tipo RING-finger, a enzima atua transferindo a ubiquitina diretamente para o substrato protéico, sendo ausente a formação de um intermediário (revisado em Neutzner & Neutzner, 2012).

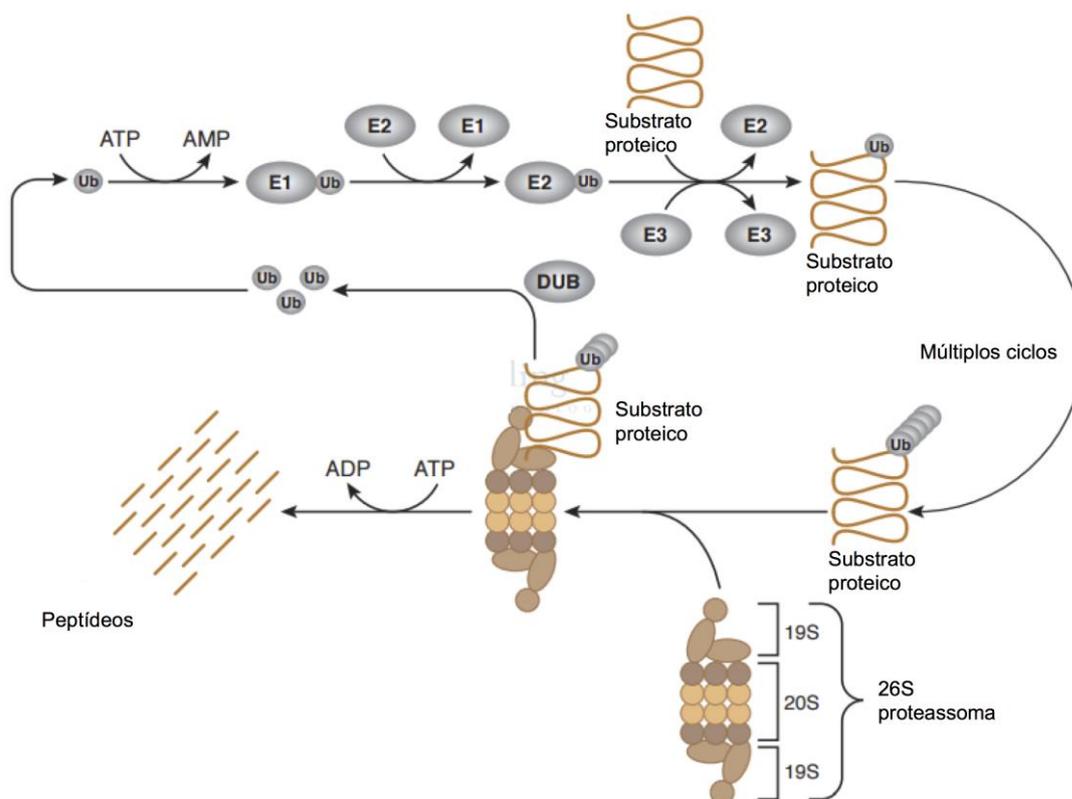


Figura 4. Representação esquemática do processo de ubiquitinação. A ubiquitinação é um processo que requer a atuação de três enzimas: enzima ativadora de ubiquitina (E1) responsável por ativar a cadeia de ubiquitina através de uma reação tioéster; enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e ligase (E3) que favorece e promove ligação da cadeia de ubiquitina ao resíduo de lisina no substrato, respectivamente. A adição da cadeia de ubiquitina no resíduo de lisina 48 do substrato sinaliza para a degradação do substrato através de proteassoma. Após a ligação do proteassoma com o substrato, as cadeias de ubiquitina são removidas pelas deubiquitinases (DUBs). Adaptado de Cell Signaling Technology (disponível em <http://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=pathways-ubiquitin>).

Após a adição da cadeia de ubiquitina realizada pela E3 ligase ao substrato, há o reconhecimento do complexo substrato-Ub pela subunidade Rpn10 da partícula regulatória do proteassoma. O próximo passo é a ligação do substrato às subunidades Rpn1 e Rpn2, ocasionando o seu desdobramento para entrada no centro catalítico do proteassoma. Em seguida, ocorre uma reação enzimática capaz de retirar as moléculas de ubiquitina resultantes da cascata acima descrita, esse processo é chamado de deubiquitinação. Após a liberação das ubiquitinas, a translocação da proteína no centro catalítico do proteassoma. Por fim, pequenas cadeias resultantes da degradação do substrato são liberadas (Figura 5).

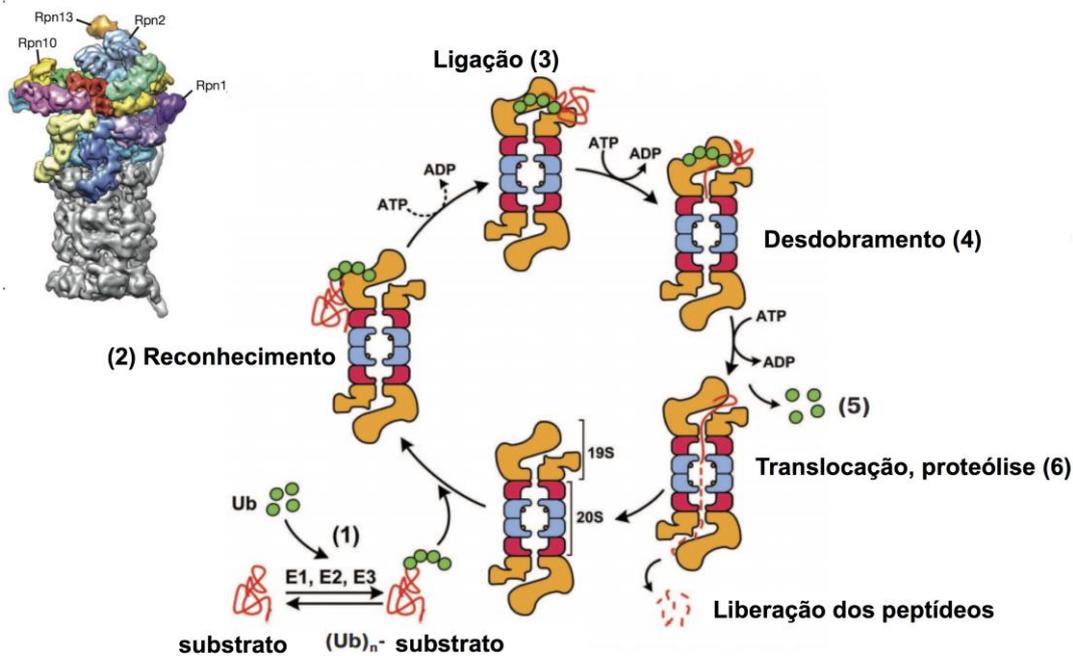


Figura 5. Estrutura tridimensional do proteassoma com destaque às subunidades reguladoras da “tampa” e representação esquemática da degradação proteica mediada por este complexo. Adaptado de (SOROKIN; KIM; OVCHINNIKOV, 2009).

As enzimas de deubiquitinação (*deubiquitylating enzymes* – DUBs) foram inicialmente descritas apenas como enzimas atuantes na reciclagem das cadeias de ubiquitinas no processo de proteólise do substrato pelo proteassoma. Entretanto, essas enzimas possuem papel decisivo na regulação dos processos que medeiam a participação da ubiquitinação, incluindo sinalizações independentes da degradação pelo proteassoma 26S.

As DUBs realizam um ataque nucleofílico ao grupo carbonil da ligação isopeptídica entre o C-terminal da ubiquitina e a porção amino-terminal do resíduo de lisina do substrato (KATZ; ISASA; CROSAS, 2010). As DUBs são reguladas para que não haja ação indiscriminada no controle da ubiquitinação, assim, geralmente, o sítio ativo dessas enzimas apenas está disponível após a ligação do substrato ao seu domínio específico. Ademais, elas possuem alta especificidade em relação ao seu substrato, discriminando inclusive o tipo de cadeia de poliubiquitina formada (RONAU; BECKMANN; HOCHSTRASSER, 2016).

As DUBs podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de ação: 1) as cisteíno-proteases, que são relacionadas à papaina e utilizam um resíduo de cisteína no sítio ativo para o ataque nucleofílico. Neste contexto, existem quatro

classes de DUBs: ubiquitina carboxi-terminal hidrolase (UCHs), ubiquitinas protease-específica (USPs), proteases relacionadas ao tumor ovariano (OTUs), proteases com domínio da proteína da doença Machado–Joseph (MJDs). Elas possuem uma tríade catalítica altamente conservada, onde a cisteína é deprotonada por uma histidina previamente polarizada por um ácido aspártico. A outra classe, 2) a metalo-protease, apresenta somente metalo-enzimas contendo domínio JAB1/PAB1/MPN (JAMMs), e o seu mecanismo de ação consiste na formação de um intermediário com a ubiquitina e o íon de zinco que é estabilizado por um aspartato e duas histidinas; esse intermediário é rompido após a transferência de próton de uma molécula de água (KATZ; ISASA; CROSAS, 2010).

Dentre as DUBs mencionadas acima, a otubaína, que pertence à família OTU, é a enzima objeto desta dissertação de mestrado e mais detalhes sobre as otubaínas já estudadas serão descritos a seguir.

Otubaína

O domínio OTU foi descrito no final da década de 80 como um gene relacionado ao tumor ovariano em *Drosophila*. Alelos mutantes do gene *otu* faziam parte do maior grupo de mutações capaz de causar esterilidade nas fêmeas. Neste caso, a formação de tumores ocorre quando os cystócitos germinativos passam por inúmeras divisões, não sendo aptos à diferenciação em oócitos ou células *nurse* - ovos não fertilizados responsáveis pelo provimento nutricional dos oócitos (KING, 1988). Análises mais abrangentes observaram que o domínio OTU era conservado em eucariotos, alguns vírus e na bactéria patogênica *Chlamydia pneumoniae*. Além disso, essa superfamília continha a tríade catalítica composta por uma cisteína, histidina e um aspartato. Supõe-se que essas proteases emergiram na evolução dos eucariotos e foram adquiridas pelos vírus e pela bactéria intracelular citada (MAKAROVA; ARAVIND; KOONIN, 2000), o que indica que a presença dessas proteases em patógenos, especialmente os intracelulares, pode estar relacionada à interação patógeno-hospedeiro.

A identificação da família de deubiquitinases otubaína (*OTU-domain Ub-aldehyde-binding protein*) em humanos se deu através do isolamento de duas enzimas (otubaína-1 e otubaína-2) utilizando um inibidor específico reversível de DUB, o Ub-aldeído. A análise das sequências dessas enzimas mostrou que não

havia homologia com nenhuma DUB conhecida à época e continha o domínio da superfamília do tumor ovariano (OTU) conservado. Além disso, observou-se a presença de domínios comumente encontrados em enzimas relacionadas à via de ubiquitinação, como o motivo de interação com ubiquitina e domínio associado à ubiquitina. A atividade *in vitro* dessas duas enzimas contra o substrato de tetra-ubiquitina corroborou a classificação dessas enzimas como deubiquitinases (BALAKIREV et al., 2003). Apesar da alta homologia entre a HsOtu1 e a HsOtu2, sabe-se hoje que essas duas enzimas são discordantes em certo nível no que diz respeito à suas atividades enzimática e funcional. Uma das distinções diz respeito à estrutura: a Otu1 possui um N-terminal maior e a Otu2, um C-terminal menor (BALAKIREV et al., 2003);

A HsOtu1 foi inicialmente descrita no processo de anergia de linfócitos T, capaz de se ligar ao fator anérgico GRAIL (uma E3 ligase), desestabilizando-o, mantendo-o auto-ubiquitinado para conseqüente degradação. Curiosamente, neste caso, a HsOtu1 não participa com sua atividade deubiquitinante. Foi descrita também uma isoforma da HsOtu1 gerada a partir da leitura de um *frame* alternativo. Esta enzima, em contrapartida, é capaz de formar um complexo com outra DUB, a USP8, e o GRAIL onde a USP8 é a DUB capaz de deubiquitinar o GRAIL e prevenir sua degradação (SOARES et al., 2004).

A atividade enzimática das otubaínas vem sendo bastante descrita e o que pode ser observado são alguns dados divergentes em relação à capacidade de clivar substratos *in vitro*. A HsOtu1 é conhecida por ter alta especificidade por substratos de poli-ubiquitinas ligadas pela lisina 48 (BALAKIREV et al., 2003; EDELMANN et al., 2009; WANG et al., 2009), entretanto, quanto à sua habilidade de clivar substratos de poli-ubiquitinas ligadas pela lisina 63 os resultados eram subestimados. De fato, a HsOtu1 é ativa contra substrato ligados pela K63, ainda que a atividade seja menor comparado com aqueles ligados pela K48 (EDELMANN et al., 2009; WANG et al., 2009). O que reforça a ideia das otubaínas serem enzimas com um singular potencial a ser explorado é o fato da HsOtu1 modular sinalizações mediadas pela ubiquitinação por K63, independentemente da sua atividade catalítica. Assim, a interação da HsOtu1 a outras proteínas já foi amplamente descrita. A HsOtu1 se liga a uma E2 conjugadora chamada UBC13 que interage com a E3 ligase RNF168. Esta ligação bloqueia o processo de ubiquitinação de

histonas mediado pela RNF168 de cadeias de poli-ub ligadas pela K63 em resposta à quebra da dupla fita do DNA – DSB (NAKADA et al., 2010). Em contrapartida, a HsOtu1 também é capaz de se ligar a Ubch5 (E2) prevenindo a ubiquitinação da p53 mediada pela MDM2 (E3), permitindo que a p53 migre para o núcleo e aja na DSB. Hipóteses indicam que este papel dual da HsOtu1 seja eficaz quando a DSB é letal para célula, assim a ativação da p53 levaria à apoptose celular (SUN; CHALLAGUNDLA, 2011).

Funcionalmente, a HsOtu2 foi descrita como regulador negativo, juntamente com a Otu1, da sinalização desencadeada por vírus através da deubiquitinação de duas E3 ligases, TRAF3 e TRAF6 (fatores associados ao receptor de TNF), responsáveis pela ativação das vias IRF3 e NF-κB (LI et al., 2010). Estudos posteriores mostraram que o nocaute da Otu2 interfere no aumento de NF-κB e na inibição da secreção de insulina. Assim, esse mecanismo pelo qual a Otu2 impede a ubiquitinação de fatores de sinalização, pode prevenir efeitos apoptóticos em células beta pancreáticas (BECK; VINIK; ISAAC, 2013).

No que diz respeito à importância da HsOtu1 no processo infeccioso, esta enzima já foi descrita como substrato *in vitro* de uma quinase da enterobactéria *Yersinia enterocolitica*, a YpkA (JURIS et al., 2006). A HsOtu1 fosforilada, a YpkA e a GTPase RhoA fazem parte de um mesmo complexo, onde a HsOtu1 estabiliza o RhoA antes da invasão e este processo parece estar envolvido no aumento da captação bacteriana pelas células. Uma vez dentro da célula, a quinase bacteriana YpkA é capaz de contrariar a ação da HsOtu1, possivelmente como um mecanismo de evasão na tentativa de limitar a interiorização e morte bacteriana. Entretanto, apesar da fosforilação da Otu1 ser importante para estabilização do complexo, no estudo citado, esse processo não foi atribuída à YpkA (EDELDMANN et al., 2010). Recentemente, a fosforilação da HsOtu1 foi caracterizada e atribuiu-se à caseína quinase 2, a habilidade de fosforilar a Otu1 na Ser16, ativando a translocação da Otu1 para o núcleo celular (HERHAUS et al., 2015).

As proteases do domínio OTU de patógenos também tem evidenciado certa importância no processo infeccioso. A OTU de *Chlamydia caviae* possui atividade deubiquitinante e demonstrou ser uma proteína efetora de secreção do tipo III. No momento da entrada da *Chlamydia caviae* na célula observa-se um acúmulo de

ubiquitinas neste sítio de entrada. A ChlaOTU demonstrou ter atividade deubiquitinante neste sítio, além da capacidade de se ligar a NDP52, uma proteína do hospedeiro importante para invasão e crescimento bacteriano na célula hospedeira (FURTADO et al., 2013). Algumas estruturas de DUBs virais contendo o domínio OTU já foram reportadas no vírus da febre hemorrágica Criméia-Congo e no nairovírus Dugbe. Ainda que pouco estudadas no âmbito funcional, a OTU de nairovírus demonstrou participar da inibição da imunidade inata através da deubiquitinação de fatores de sinalização (BAILEY-ELKIN et al., 2014).

No que concerne aos protozoários, as primeiras DUBs ativas foram identificadas em *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*. Análise genética demonstrou que o parasito *Plasmodium chabaudi* resistente ao artesunato e à cloroquina apresenta mutação em uma DUB (HUNT et al., 2007). A otubaína de *Cryptosporidium parvum* foi identificada e parcialmente caracterizada. A CpOTU possui atividade contra o substrato Z-LRGG-AMC em pH neutro e esta é mais expressa na fase de oocisto do parasito (JU et al., 2014).

Em verdade, a deubiquitinação foi primeiramente descrita em tripanosomatídeos, pelo nosso grupo, através dos estudos iniciais sobre a otubaína de *L. infantum*, onde foi realizada a modelagem e dinâmica molecular, que revelou a presença de 10 α -hélices e 1 folha- β com 4 fitas e os resíduos catalíticos conservados (GUIDO, 2011). Quanto à atividade enzimática, a otubaína de *L. infantum* recombinante demonstrou preferência pela tetra-ubiquitina ligada pela K48, uma ligação que sugere envolvimento na degradação de proteínas via proteassoma 26S, onde algumas mutações pontuais afetaram a atividade *in vitro* (AZEVEDO, 2014). Por fim, o nocaute simples do gene da otubaína de *T. cruzi* revelou que os parasitos nocauteados possuem uma taxa de infecção maior *in vitro* (FIGUEIRÊDO, 2013).



JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

Apesar de terem relatos que datam de mais de um milênio, ainda hoje as leishmanioses se apresentam como um grave problema de saúde pública, principalmente ligado à ineficiência dos tratamentos quimioterápicos existentes com preocupantes efeitos adversos e crescente resistência dos parasitos. Compõem a lista das doenças negligenciadas da OMS e são responsáveis por 70.000 mortes por ano, afetando principalmente as populações pobres e marginalizadas. Deste modo, o Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (*Special Programme for Research and Training in Tropical Disease – TDR*), incentivado pela OMS, estabeleceu a pesquisa de novos agentes terapêuticos como uma prioridade científica para doenças tropicais, dentre elas as leishmanioses (WHO, 2012).

Diante da importância da deubiquitinação em diversos papéis celulares, o estudo deste processo nas leishmanioses revela-se promissor para sondagem de novos alvos moleculares relevantes para estabelecimento do parasito na infecção. Deste modo, a realização deste trabalho de mestrado pretendeu contribuir com elucidação do processo de deubiquitinação mediado pela otubaína na *L. infantum*.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

Esta dissertação de mestrado teve como objetivo estabelecer uma linhagem de *L. infantum* expressando uma cópia extra de *otubaína* (OtuLi) e caracterização da atividade enzimática e funcional da forma recombinante desta deubiquitinase. Esta cópia extra será essencial para identificação futura de proteínas ligantes da OtuLi e assim, elucidar seu mecanismo de ação no parasito. Para tal, as seguintes etapas foram propostas:

- clonar a otubaína de *L. infantum* em pLEXY-hyg2 com FLAG ou cauda de histidina, transfectar os parasitos e selecionar os transgênicos;
- caracterizar as novas linhagens quanto à expressão da OtuLi extra e avaliar a taxa de crescimento celular;
- realizar a citolocalização por fluorescência dos parasitos expressando a FLAG-OtuLi e sondar a co-localização usando marcadores celulares;
- avaliar a atividade enzimática da OtuLi recombinante produzida em *Escherichia coli* quanto à dependência de pH e inibição utilizando o inibidores de cisteíno-proteases;
- analisar o efeito de mutações pontuais tanto na atividade quanto em nível estrutural da OtuLi por meio de dinâmica molecular, e
- avaliar a indução de corpúsculos lipídicos e o perfil de citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos peritoniais murinos após estimulação com a rOtuLi.



METODOLOGIA

METODOLOGIA

Análise de sequências

O alinhamento múltiplo da sequência protéica da otubaína de *L. infantum* com suas sequências homólogas nos organismos da família *Trypanosomatidae* e em *Homo sapiens* foi realizado com o software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.htm>). A análise filogenética foi realizada utilizando o software MEGA7 e a árvore foi construída a partir do método *neighbor-joining*.

Cultura celular

Formas promastigotas de *L. infantum* selvagem (10CL2609 – FIOCRUZ) foram cultivadas em meio de inseto Schneider (Sigma Aldrich) suplementado com 100 µg/mL de gentamicina e 20% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) inativado a 27 °C. Os parasitos transfectados com cassetes contendo o gene *hpt* (higromicina fosfotransferase) foram cultivados no meio acima descrito acrescido de 50 µg/mL de higromicina B (Sigma Aldrich). A passagem das culturas foi realizada a cada dois dias para manutenção.

Extração de DNA genômico dos parasitos

O DNA genômico foi extraído de formas promastigotas de *L. infantum* (WT ou transfectadas) em fase exponencial. Os parasitos (1×10^8) foram centrifugados a 1000 g por 10 min e lavados 3 vezes com tampão fosfato-salino (*Phosphate Saline Buffer* – PBS). Em seguida, foram ressuspensos em 200 µL de tampão de lise (10 mM Tris pH 8,0, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1 % p/v SDS) adicionado de 20 µg/mL RNase A e incubados a 60 °C por 30 min. Após este período, foram acrescidos 100 µg/mL Proteinase K a 56 °C por 1 h. Após, igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado à amostra, misturada por inversão até formação da emulsão e centrifugada a 12.000 g por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o processo de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) foi repetido uma segunda vez. A fase aquosa foi recuperada e o DNA foi precipitado com a adição de 2,5 volumes de etanol absoluto gelado a – 20°C por 20 min. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 20 min a 4 °C. O DNA genômico precipitado foi lavado 2 vezes com 500 µL de etanol 70 % e centrifugado a 12.000 g por 5 min. Ao fim da segunda centrifugação, o DNA foi seco e

ressuspendido em 50 µL de tampão contendo 10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM EDTA (TE).

Amplificação do gene *otubaína* de *L. infantum*

A partir do DNA genômico de *Leishmania infantum*, o gene *otuli* foi amplificado usando dois pares de iniciadores específicos para a sua fase aberta de leitura – *open reading frame* (ORF) – de 813 pb, e distintos quanto às bases suplementares. Os iniciadores foram desenhados a partir da sequência LinJ.17.1520 depositada no GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage>). Os iniciadores utilizados para a construção FLAG-OtuLi-pLEXY-hyg2 contém os sítios de restrição *Bgl*II e a sequência que codifica o peptídeo FLAG no iniciador senso e *Not*I no iniciador anti-senso para inserção desses sítios no gene nas regiões 5' e 3', respectivamente. Em contrapartida, os iniciadores para a construção OtuLi-pLEXY-hyg2, com cauda de His, possuem os sítios de restrição *Xho*I no iniciador senso e *Nhe*I no anti-senso (Tabela 1).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação do gene *otuli*

INICIADOR	SEQUÊNCIA
sFLAG-OtuLi	5'- ccttgccaccaGATCTATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGATGGA TGAGGGACTGCCAATCGA - 3' ^{a, b, c, d}
asFLAG-OtuLi	5'- aggaggaggGCGGCCGCTCACCCGGGTCCCCGCCCGA – 3' ^{a, e}
sOtuLi-His6	5'- ctgccatggcCTCGAGATGGATGAGGGACTGCCAATCGA – 3' ^{a, b, f}
asOtuLi-His6	5'- tacccttaagGCTAGCCCCGGGTCCCCGCCCGAGAA – 3' ^{a, g}

^a As sequências em letras minúsculas representam as bases complementares ao vetor de expressão pLEXY-hyg2 necessárias para clonagem utilizando o kit de clonagem In-Fusion® HD EcoDry™ (Clontech).

^b A sequência sublinhada indica o sítio de restrição de *Bgl*II.

^c As sequências em itálico correspondem ao códon de iniciação.

^d A sequência em negrito identifica a inclusão da *tag flag*.

^e A sequência sublinhada indica o sítio de restrição de *Not*I.

^f A sequência sublinhada representa o sítio de restrição de *Xho*I.

⁹ A sequência sublinhada equivalem ao sítio de restrição de *NheI*.

Para a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR), 500 ng de DNA genômico de *L. infantum*, 200 nM de cada iniciador, 200 μM dNTP, 1 unidade de Phusion DNA Polimerase (Thermo Fisher) e 1,5 mM MgCl₂ presente no tampão Phusion GC fornecido pelo fabricante foram utilizados em uma reação de 50 μL com o seguinte programa: 98 °C por 30 segundos para desnaturação inicial, 35 ciclos de 98 °C por 10 segundos e 72 °C por 30 segundos para anelamento dos iniciadores e extensão dos produtos de PCR e, por fim, 72 °C por 7 min para a extensão final. Os produtos de PCR (*flag-otuli* e *otuli* para fusão à cauda de histidina pelo plasmídeo pLEXSY-hyg2) foram purificados utilizando o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE HealthCare) e analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v).

Ligação dos produtos de PCR ao pLEXSY-hyg2

Inicialmente, o plasmídeo de expressão pLEXSY-hyg2 (Jena Bioscience, Figura 6) foi linearizado para o início do processo de clonagem molecular. A fim de obter a construção FLAG-OtuLi-pLEXSY-hyg2, o plasmídeo vazio foi previamente digerido com as enzimas de restrição *BglII* e *NotI* (Jena Bioscience). Para a construção OtuLi-pLEXSY-hyg2 onde o gene de interesse foi fusionado a uma sequência que resultará em uma cauda com seis histidinas, as enzimas de restrição *XhoI* e *NheI* (Jena Bioscience) foram utilizadas para a dupla digestão do plasmídeo vazio. Os plasmídeos digeridos foram excisados do gel de agarose 0,8 % (m/v) e purificados com o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE HealthCare) conforme recomendação do fabricante. Seguindo o protocolo do kit de clonagem In-Fusion® HD EcoDry™ (Clontech), foi utilizado 50 ng de vetor digerido e 100 ng de inserto purificado em uma reação final de 10 μL incubada a 37 °C por 15 min e a 50 °C por 15 min.

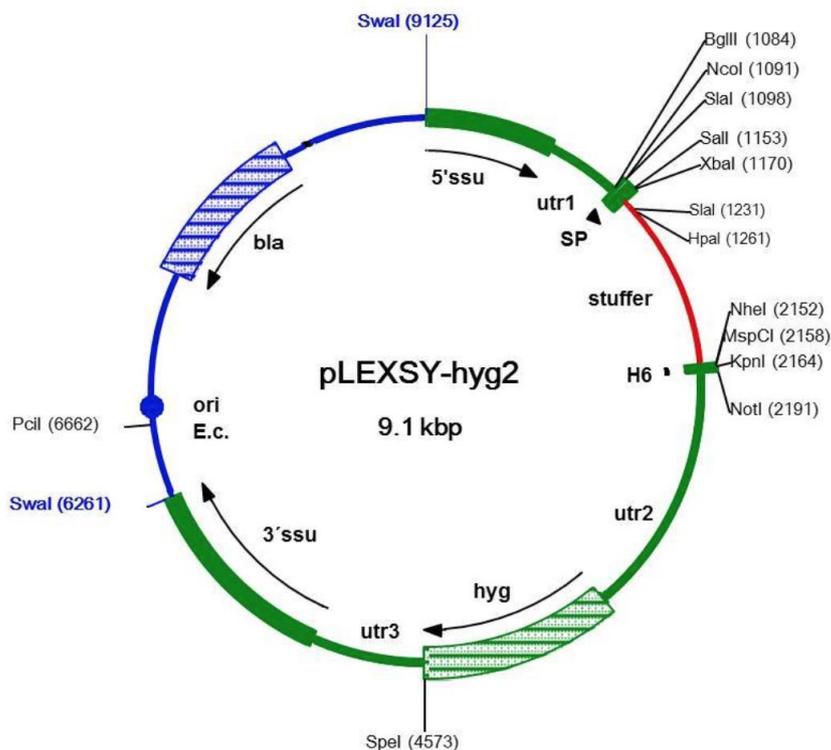


Figura 6. Mapa do vetor pLEXSY-hyg2 utilizado neste estudo. Retirado de JENA Bioscience (disponível em <http://www.jenabioscience.com/images/ae3a4f50f1/EGE-1300.pdf>).

Transformação bacteriana

Bactérias *E. coli* TOP10 quimicamente competentes foram transformadas por choque térmico a 42 °C por 1 minuto com 2,5 µL das ligações descritas anteriormente seguidas de incubação no gelo por 2 min. Em seguida, as bactérias cresceram em meio Luria-Bertani (LB) a 37°C por 1 h com agitação constante e foram plaqueadas em meio LB ágar com 100 µg/mL ampicilina. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 h. As colônias resultantes foram inoculadas em 5 mL de meio LB com 100 µg/mL ampicilina, crescidas a 37 °C por 16 h com agitação constante e foram submetidas à análise de restrição da minipreparação plasmidial.

Análise dos clones positivos da clonagem

A cultura de 2 mL de cada colônia foi ressuspensa após a centrifugação a 12.000 g por 30 segundos em tampão TE e 20 µg/mL Rnase A e, em seguida, lisada com 400 mM NaOH e 1% (v/v) SDS por 1 min. Em seguida, 1,5 volumes de 5 M acetato de potássio foram adicionados por 5 min e a amostra foi centrifugada a 12.000 g por 2 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o DNA plasmidial foi precipitado com 200 µL de isopropanol por 1 min. O DNA plasmidial foi

centrifugado a 12.000 g por 1 min, lavado com etanol 70%, seco e ressuscitado em 12 µL de TE. As minipreparações foram digeridas com *Bgl*III e *Not*I para confirmação da clonagem no vetor da construção FLAG-OtuLi-pLEXSY-hyg2 e com *Xho*I e *Nhe*I para a construção OtuLi-pLEXSY-hyg2. As colônias que continham as construções foram então submetidas à midipreparação plasmidial com o kit *PureLink HiPure Plasmid Midiprep* (Life Technologies). O sequenciamento das construções foi realizado pela empresa Genomic Engenharia Molecular.

Transfecção dos cassetes FLAG-OtuLi-hyg, OtuLi-hyg e LinpLEXSY-hyg

Os plasmídeos FLAG-OtuLi-pLEXSY-hyg2 e OtuLi-pLEXSY-hyg2 foram digeridos com a enzima de restrição *Swa*I (Jena Bioscience), gerando: 1) um fragmento menor de 2.864 pares de bases correspondente ao fagomídeo pBluescript II KS (-) contendo a origem de replicação para *E. coli* e 2) um fragmento maior de 5.996 pares de bases correspondente ao cassete FLAG-OtuLi-hyg ou 6.023 pares de bases correspondente ao cassete OtuLi-hyg. Como controle, o pLEXSY-hyg2 também passou pela digestão com *Swa*I, gerando um cassete de 6.269 pares de bases, chamado a partir de agora de LinpLEXSY-hyg. Após esta análise de restrição em gel de agarose 0,8% (m/v), os cassetes foram excisados e purificados com o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE HealthCare).

Imediatamente antes da transfecção, 2 µg (FLAG-OtuLi-hyg), ou 500 ng (OtuLi-hyg) ou 5 µg (LinpLEXSY-hyg) dos cassetes ou 10 µg do plasmídeo OtuLi-pLEXSY-hyg2 (forma circular) foram precipitados com 1/10 de volume de 3 M acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto a – 20 °C por 20 min. O DNA foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4 °C, lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado mais uma vez nas mesmas condições por 5 min. Em ambiente estéril, o etanol 70% foi descartado e o DNA foi seco e reconstituído em 50 µL de tampão de eletroporação (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂HPO₄, 6 mM glicose, pH 7,5) gelado.

Para transfecção, foram utilizados 4 x 10⁷ formas promastigotas de *L. infantum* em fase exponencial, por condição. Os parasitos foram centrifugados a 2.000 g por 5 min, lavados uma vez com metade do volume inicial com o tampão de eletroporação gelado. Em seguida, os parasitos foram ressuscitados em 350 µL de tampão de eletroporação e deixados no gelo por 10 min. Os 50 µL de cada cassete

(ou do tampão de eletroporação somente, servindo de controle negativo do método) foram misturados aos 350 µL de parasitos em uma cubeta de 4 mm de espessura e submetidos a um pulso através do sistema de eletroporação *Gene Pulser® II* (Bio-Rad) com as seguintes configurações: 500 µF, 450 V e resistência ao infinito. Após o pulso, as cubetas foram incubadas no gelo por exatos 10 min e então os parasitos foram transferidos para 10 mL de meio Schneider suplementado, incubados a 27 °C por 24 h. Em seguida, os parasitos foram selecionados com 50 µg/mL higromicina B (Sigma Aldrich). As culturas foram repicadas a cada três dias na presença do antibiótico de seleção. Após aproximadamente 30 dias, com a morte do controle negativo (transfectado apenas com tampão de eletroporação), os parasitos com os cassetes FLAG-OtuLi-hyg e OtuLi-hyg foram clonados por diluição exaustiva em placa de 96 poços por mais 20 dias. Os clones foram recuperados, mantidos com pressão antibiótica e submetidos às análises posteriores.

Confirmação da integração genômica por PCR

Para confirmar a integração dos cassetes no genoma por PCR, foram utilizados como template o DNA genômico das cepas transgênicas e da selvagem de *L. infantum* como controle negativo. Duas combinações de iniciadores foram utilizadas: 1) iniciador senso para a região 5' *ssu* (F3001, fornecido pela empresa Jena Bioscience) ausente no plasmídeo utilizado e iniciador antissenso para a região *utr1* presente no cassete (A1715, fornecido pela empresa Jena Bioscience) e 2) iniciador senso para a região 5' *ssu* ausente no plasmídeo utilizado e iniciador antissenso para a região 3' do gene *otubaína*. O par de iniciadores utilizados para a amplificação do gene *otubaína* previamente descrito também foi utilizado como controle positivo da reação. Em sequência, a tabela descritiva com a sequência dos iniciadores utilizados para formação dos dois pares utilizados na PCR diagnóstico.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação dos produtos de PCR 5' *ssu-utr1* e 5'*ssu-otuli*

INICIADOR	SEQUÊNCIA
F3001	5'- GATCTGGTTGATTCTGCCAGTAG - 3'
A1715	5'- -TATTCGTTGTCAGATGGCGCAC – 3'
asOtuLi-His6	5'- tacccttaag <u>GCTAGCCCCGGTCCCCGCCGAGAA</u> – 3'

Curva de crescimento das formas promastigotas de *L. infantum*

Parasitas WT e parasitos contendo os diferentes cassetes foram diluídos a 10^6 parasitos/mL em 5 mL de meio Schneider suplementado conforme descrito anteriormente em frascos de cultivo celular de 25 cm². A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer por 5 dias no mesmo horário e, diariamente, a cultura foi diluída a 10^6 parasitos/mL em 5 mL para que os parasitos se mantessem em fase logarítmica. Os resultados foram calculados utilizando a média da duplicata.

Expressão da rOtuLi em *E. coli* e purificação

Para o estudo enzimático da otubaína de *L. infantum*, a OtuLi selvagem e três outros mutantes foram estudadas. Conforme descrito por GUIDO (2011) e AZEVEDO (2014), mutações pontuais na sequência geraram o mutante $\Delta 1$ (T545C), o mutante $\Delta 2$ (T545C e T794C) e o mutante $\Delta 3$ (T245C, T545C e T794C). As sequências foram clonadas no vetor pET19-b e os vetores foram expressos em *E. coli* BL21 (DE3). Uma colônia positiva foi cultivada em meio LB suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina. Ao atingir a densidade óptica a 600 nm de 0,6, as culturas foram suplementadas com 0,1 mM de IPTG a 16 °C por 5 h (mutante $\Delta 3$) ou 16 h (demais construções) sob constante agitação. As bactérias foram centrifugadas a 3000 g por 20 min e ressuspensas em *binding buffer* contendo 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM imidazol, 0,2% m/v lisozima (mutante $\Delta 3$) ou em BugBuster (demais enzimas) para purificação com a resina Agarose-Ni (Novagen). 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 no caso do mutante $\Delta 3$. O extrato solúvel das bactérias lisadas foram passadas em coluna níquel-agarose His•Bind® Purification Kit (Novagen) previamente equilibrada. A coluna foi lavada com tampão contendo concentrações crescentes de imidazol (5 mM a 100 mM) e as enzimas foram eluídas com 400 mM (selvagem) ou 200 mM (mutantes) de imidazol. As proteínas purificadas foram analisadas em gel SDS/PAGE (12%) sob condições desnaturantes e redutoras.

Modelagem por homologia e dinâmica molecular da OtuLi WT, OtuLi Δ 1, OtuLi Δ 2 e OtuLi Δ 3

Os teste de modelagem por homologia e dinâmica molecular foram realizados em colaboração com o prof. Dr. Diego Oliveira Nolasco da Universidade Católica de Brasília.

A modelagem molecular por homologia e a dinâmica molecular foi realizada conforme Guido (2011). Brevemente, a busca pelo melhor template para a OtuLi foi realizada no *Protein Data Bank* (<http://www.pdb.org/pdb/>). O sistema foi simulado em ambiente neutralizado contendo água e 1,5 M de NaCl. Foi utilizada uma caixa dodecaédrica no interesse de diminuir o número de átomos simulados e, conseqüentemente, o tempo de simulação. O sistema OtuLi + H₂O + NaCl foi submetido a 200 ns de simulação fazendo uso do pacote computacional GROMACS 4.6 (HESS et al., 2008). As figuras foram geradas no programa PyMOL, que foi também utilizado para fazer as sobreposições e calcular os valores de RMSD (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC).

Produção de anticorpo policlonais anti-OtuLi

A enzima recombinante purificada OtuLi selvagem foi administrada via intraperitonal em 4 camundongos machos BALB/c em um ciclo de 4 imunizações intercaladas por 15 dias. A uma semana da primeira imunização, amostras de sangue foram coletadas e o soro pré-imune foi diluído em uma proporção 1:1 em glicerol e guardado no – 20 °C. Na primeira imunização, foram administrados 5 µg de rOtuLi emulsionada em adjuvante completo de Freund (1:1). Nas duas imunizações seguintes, foram administrados 5 µg de rOtuLi emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (1:1). Na última imunização, 5 µg da rOtuLi purificada foi diluída em PBS para administração. Após uma semana da última imunização, amostras de sangue foram coletadas, o soro imune foi separado, diluído em uma proporção 1:1 em glicerol e guardado no – 20 °C para futura utilização no *western blot* e na imunofluorescência.

Atividade enzimática e inibição da rOtuLi

A reação de deubiquitinação foi realizada com 250 ng da rOtuLi selvagem e 500 ng de tetraubiquitina ligada a K48 na presença de 25 mM Tris pH 7,5 por 5 h. Os inibidores 100 µM NEM, 100 µM E-64 e 10 µg Ub-aldeído foram incubados com a

enzima 30 min antes da realização da reação enzimática. As reações foram interrompidas com tampão de amostra (62,5 mM Tris – HCl pH 6,8, 2% m/v SDS, 5% v/v β -mercaptoetanol, 0,08% m/v azul de bromofenol e 30% v/v glicerol) e analisadas por SDS/PAGE.

Preparação dos extratos proteicos de *L. infantum*

A cultura de formas promastigotas de *L. infantum* em fase exponencial foi centrifugada a 2.000 g por 5 min e lavada três vezes com PBS. O sedimento celular foi ressuspenso em água ultrapura contendo coquetel de inibidor de proteases (*Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets* – Roche) em uma concentração de 2×10^6 parasitos/ μ L e a amostra foi congelada e descongelada repetidas vezes para desestabilização da membrana e consequente lise celular. Em seguida, o conteúdo celular foi centrifugado a 12.000 g por 15 min para separação dos extratos solúvel e insolúvel. O extrato solúvel foi coletado e o extrato insolúvel foi ressuspenso em igual volume de água ultrapura para análise SDS/ PAGE com 12% (v/v) acrilamida/bis-acrilamida.

Análise por *Western blot*

Os extratos proteicos das cepas selvagem e transgênicas foram misturados ao tampão de amostra de SDS-PAGE e fervidos por 5 min. As amostras foram separadas por SDS/PAGE com 12% (v/v) acrilamida/bis-acrilamida. Para análise em *western blot*, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Protran 0.45 NC, Amersham) utilizando o sistema de *wet blotting* da Bio-Rad submerso em tampão contendo 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% (m/v) SDS e 20% (v/v) metanol. Após transferência, a membrana foi bloqueada em solução *Tris-buffered saline* (TBS, 50 mM Tris e 150 mM NaCl) contendo 5% (m/v) leite desnatado por 30 min e, em seguida, incubada com o anticorpo primário em TBS com 0,1% (v/v) Tween 20 (TBST) e 1% (m/v) leite desnatado por 16 h, variando a diluição do anticorpo conforme necessário: 1:200 anticorpo policlonal anti-OtuLi, 1:2000 anticorpo monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma Aldrich) e 1:2000 anticorpo policlonal anti-His (Sigma Aldrich). Em seguida, a membrana foi lavada cinco vezes por 3 min com TBST e incubada com o anticorpo secundário *goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugated* (1:30.000) diluído em TBST e 1% (m/v) leite desnatado por 1,5 h. Por fim, a membrana foi extensivamente lavada com TBST e as bandas de proteínas imunorreativas foram visualizadas utilizando o substrato

quimioluminescente de peroxidase (*ECLTM Prime Western blotting detection reagent*, GE HealthCare) no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE HealthCare).

Detecção fluorescente da mitocôndria de *L. infantum*

Os teste de fluorescência foram realizados em colaboração com o prof. Dr. Philippe Grellier do *Laboratoire d'Adaptation des protozoaires à leur environnement* no *Muséum National d'Histoire Naturelle* e financiados pela *Communauté d'Universités et Établissements (COMUE) Sorbonne Universités*.

Para localizar a mitocôndria e prosseguir com a co-localização da OtuLi em formas promastigotas de parasitos selvagens, foi utilizada as sondas MitoTracker Red CMXRos ou MitoTracker Orange CMTMRos (Molecular Probes). Um total de 10 mL de uma cultura a 10⁶ parasitos/mL previamente lavada com PBS foi incubada em PBS contendo 80 nM como concentração final da sonda mitocondrial por 1 h protegida da luz. Os parasitos foram centrifugados a 1000 g por 10 minutos e lavados com 5 mL de PBS por 1 h. Em seguida, as células foram direcionadas para o ensaio de imunofluorescência.

Imunocitocalização

Parasitos selvagens marcados com a sonda para mitocôndria e anticorpo α - Proteína Dissulfato Isomerase (PDI)

Para determinar a co-localização da otubaína em promastigotas *L. infantum*, 10⁷ parasitos foram centrifugados a 1000 g por 10 minutos e, após, lavados 3 vezes com PBS e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de 3,7% formaldeído por 1 h. Após a fixação, os parasitos foram centrifugados por 5 minutos e foram lavados 3 vezes com PBS. Os parasitos foram ressuspenso em 100 μ L de PBS e eles foram espalhados em uma lâmina coberta com poli-L-lisina. Depois da sedimentação dos parasitos na lâmina, a permeabilização foi realizada através da adição de 0,1% Triton X-100 em PBS por 15 minutos. Em seguida, o bloqueio foi realizado com 5% PBS/leite por 30 minutos a temperatura ambiente. Para a marcação da otubaína, os parasitos foram incubados com o anticorpo policlonal anti-OtuLi diluído 1:100 em 1% PBS/leite por 16 h a 4 °C. Para a marcação da Proteína Dissulfato Isomerase (PDI), um anticorpo anti-PDI de *Gallus gallus* foi diluído 1:500 em 1% PBS/leite por 2 h a temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS, as células foram incubadas com um dos seguintes anticorpos secundários: *goat anti-mouse* IgG conjugado ao Alexa

Fluor 488 (1:500) para a marcação da otubaína ou *goat anti-rabbit IgG* conjugado ao Alexa Fluor 568 (1:300) para marcação da PDI, ambos com 2 h de incubação. Após 3 lavagens com PBS, os parasitos foram incubados com DAPI (5 µg/mL). Uma última lavagem foi realizada e as lâminas foram montadas com ProLong® Gold antifade.

Parasitos FLAG-OtuLi-hyg com anticorpo anti-FLAG

A citolocalização da enzima FLAG-OtuLi foi determinada a partir de uma cultura da formas promastigotas em fase exponencial de *L. infantum*. Os parasitos foram centrifugados a 1.000 g por 10 min, lavados duas vezes com PBS filtrado e o sedimento ressuscitado em 100 µL de 1% (v/v) paraformaldeído diluído em PBS por 30 min. Para a etapa de permeabilização, 0,1% (v/v) Triton X-100 foi adicionado aos parasitos por 10 min, seguido de 100 mM glicina por mais 10 minutos. Os parasitos foram coletados e ressuscitados em 400 µL de PBS. As lâminas foram previamente lavadas com água ultrapura e etanol 70% e, em seguida, carregadas com solução 0,1% (m/v) poli-L-lisina. Os parasitos fixados e permeabilizados foram depositados por 10 min nas lâminas observando a densidade em microscópio invertido de luz. A lâmina foi bloqueada durante 5 min com tampão TB (PBS, 1% v/v Triton X-100, 0,1% BSA). Então, as lâminas foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-FLAG por 1 h na diluição 1:100 em TB. Em seguida, três lavagens com PBS foram realizadas e as lâminas foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário (*goat anti-mouse IgG antibody*) conjugado com Alexa Fluor-488 (Invitrogen) diluído 1:200. Após a última lavagem com PBS, os parasitos foram incubados 5 min com 10 µg/mL DAPI e a lamínula foi montada sobre uma gota de DAKO mounting medium (DAKO).

Estimulação de macrófagos peritoniais pela rOtuLi *in vitro*

Os teste de biogênese de corpúsculos lipídicos e dosagem de citocinas foram realizados em colaboração com a profa. Dra. Kelly Grace Magalhães do Laboratório de Imunologia e Inflamação da Universidade de Brasília.

Macrófagos peritoniais murinos (10^6 células/mL) de camundongos C57BL/6 colhidos por lavagem peritoneal foram aderidos por 16 h em meio RPMI suplementado com 2% SFB. Após este período, os macrófagos não aderidos foram retirados por lavagem com PBS. As células foram estimuladas com 1 µg de rOtuLi

ou rOtuLi desnaturada por ebulição durante 24 e 48 h a 37 °C e atmosfera de 5% CO₂.

Coloração e quantificação da biogênese de corpúsculos lipídicos por Oil Red

As lamínulas contidas nas placas de 24 poços dos grupos controles e estimulados com rOtuLi e rOtuLi desnaturada por ebulição (24 e 48 h), foram fixadas em 3,7% (v/v) formaldeído diluído em PBS. Em seguida, as lamínulas foram lavadas três vezes com água ultrapura e incubadas com Propilenoglicol (PEG) por 15 min. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas com 0,5% Oil Red por 30 min. Após retirada do Oil Red, as lamínulas foram incubadas por 1 min com 60% PEG. Em seguida, as lamínulas foram lavadas três vezes com água ultrapura e incubadas com Solução de Hematoxilina por 5 segundos. Após três lavagens com água ultrapura, as lâminas foram montadas com o meio Aqua Poly/Mount (Vector). As análises para a quantificação dos corpúsculos foram feitas em 50 células consecutivas em microscópio de luz.

Dosagens de Citocinas

Os sobrenadantes do processo de estimulação de macrófagos peritoneais com a rOtuLi foram coletados em 24 e 48 h. As citocinas IL-6 e TNF- α foram dosadas pelo método ELISA, utilizando-se kit comercial (eBioscience). O ensaio foi realizado seguindo-se as instruções do fabricante e os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL).

Análise estatística

Os gráficos foram gerados a partir do programa Prism (GraphPad). Os resultados de quantificação de corpúsculo lipídicos e citocinas foram expressos como média + erro padrão da média e analisados estatisticamente com análise de variância (ANOVA) seguida pela *t-student*. O nível de significância de *p* encontra-se discriminado nos resultados.

Considerações éticas

Todos os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética da Universidade de Brasília, tendo respaldo no projeto 27764/2016.



RESULTADOS

RESULTADOS

Análise comparativa da sequência de OtuLi

Análise do genoma de *L. infantum* utilizando a interface *Database of Ubiquitinating and Deubiquitinating Enzymes* (<http://www.DUDE-db.org/>) (HUTCHINS et al., 2013), para identificar homólogos de enzimas deubiquitinantes baseadas na presença dos domínios proteicos, retornou 27 genes de proteínas preditas neste protozoário. Deste total, 16 genes são da família USP, 5 da família JAMM, 4 da família OTU e 2 da UCH. Não foram encontrados genes de proteínas preditas que pertencem à família MJD.

O gene *otuli* possui uma fase aberta de leitura de 813 pb e codifica uma proteína de 270 aminoácidos com massa predita de 30,3 kDa e um pI de 4,6, conforme banco de dados (<http://www.genedb.org/>). O domínio OTU da proteína localiza-se em seu C-terminal, entre os aminoácidos 69 – 268. Conforme descrito por GUIDO (2011), a tríade catalítica consiste na Cys81, His261 e Asn263, com o domínio OTU e o motivo de interação à ubiquitina conservados. A sequência não possui o domínio associado à ubiquitina, o sinal de localização nuclear e o motivo LxxL. Segundo análise filogenética, a otubaína demonstra-se conservada entre o subgênero *Leishmania*, mas relativamente distante do gênero *Trypanosoma*, possuindo apenas 37% de identidade com a otubaína de *Trypanosoma cruzi* (Figura 7).

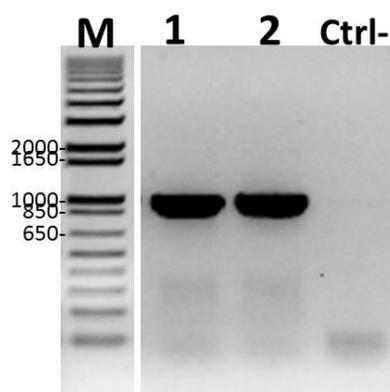


Figura 8. Amplificação do gene *otuli* e *otuli* contendo o peptídeo FLAG. Iniciadores específicos do gene *otuli* foram desenhados para amplificação do gene (1) e para adição na porção 5' do gene *otuli* da sequência que codifica o peptídeo FLAG a partir do DNA genômico de *L. infantum* com análise em gel de agarose 0,8%. M, marcador 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

O vetor pLEXSY-hyg2, escolhido para expressão constitutiva em *L. infantum*, foi digerido para posterior ligação aos fragmentos citados acima. Para a construção do FLAG-OtuLi-pLEXSY-hyg2, o plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *Bgl*II e *Not*I, liberando uma sequência de 1.107 pb (*stuffer 1*) e o vetor linearizado de 8.026 pb. Para a construção do OtuLi-pLEXSY-hyg2, foram utilizadas as enzimas de restrição *Xho*I e *Nhe*I, liberando uma sequência de 1.054 pb (*stuffer 2*) e o plasmídeo linearizado de 8.079 pb (Figura 9).

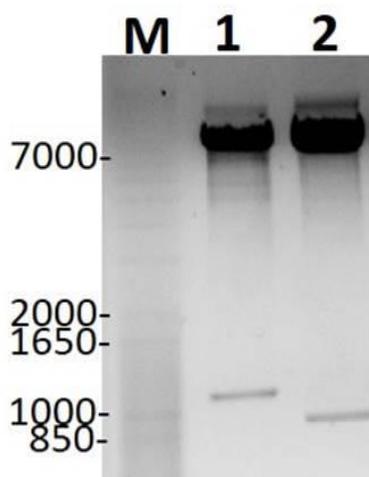


Figura 9. Digestão do vetor pLEXSY-hyg2 para clonagem. 5 µg de pLEXSY-hyg2 foram incubados com *Bgl*II e *Not*I ou *Xho*I e *Nhe*I. 1, digestão dupla com *Bgl*II e *Not*I, liberando o pLEXSY-hyg2 (8.026 pb) e um *stuffer* (1.107 pb). 2, digestão dupla com *Xho*I e *Nhe*I, liberando o pLEXSY-hyg2 (8.076 pb) e um *stuffer* (1.054 pb). O resultado das reações de digestão foram observados em gel de agarose 0,8% (p/v). M, marcador 1 Kb plus DNA ladder.

Após realização da ligação dos fragmentos amplificados aos seus respectivos plasmídeos linearizados, os vetores FLAG-OtuLi-pLEXSY-hyg2 e OtuLi-pLEXSY-hyg2 foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* na cepa TOP10 e selecionados com 100 µg/mL ampicilina. Para confirmação da clonagem, algumas colônias foram submetidas à PCR para amplificação do gene *otuli*. De todas as colônias testadas, obtivemos 10 colônias positivas para a clonagem do FLAG-OtuLi-pLEXSY-hyg2 e 9 colônias positivas para a construção OtuLi-pLEXSY-hyg2. Para uma segunda confirmação da clonagem, uma minipreparação plasmidial foi extraída de 2 colônias de cada construção e submetida à análise de restrição. As enzimas *Bgl*I e *Not*I foram usadas para a construção do FLAG-OtuLi-pLEXSY-hyg2 e *Xho*I e *Nhe*I para a construção do OtuLi-pLEXSY-hyg2. Como observado na Figura 10, após a análise, foram liberados os fragmentos correspondentes à otubaína de aproximadamente 850 pb e o vetor linearizado de aproximadamente 9 Kb. As colônias 1 de cada construção foi submetida a midipreparação plasmidial e sequenciadas. A análise do sequenciamento revelou que os produtos foram clonados no vetor com sucesso.

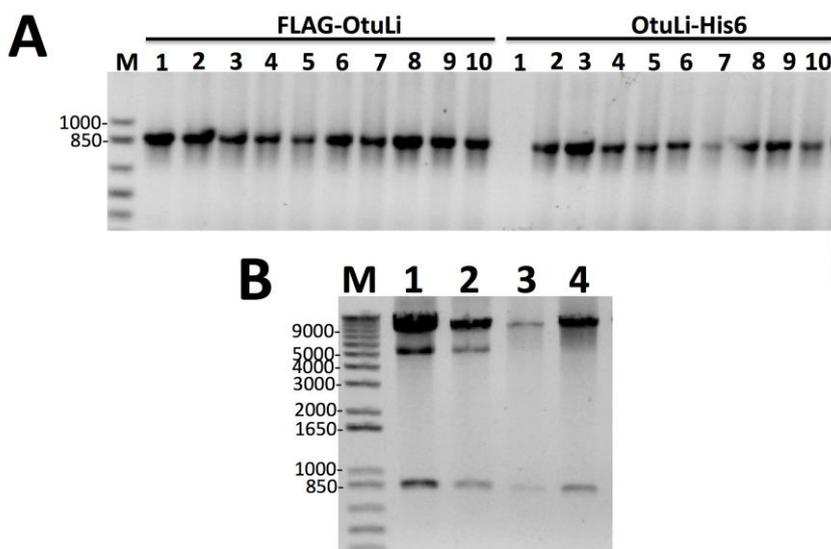


Fig 10. Confirmação da clonagem do gene *otuli* no vetor pLEXSY-hyg2. A, amplificação do gene *otuli* por meio de PCR de colônias da bactéria *E. coli* transfetada com a ligação vetor/inserto e selecionada com 100 µg/mL ampicilina. Uma porção de cada colônia foi ressuspensa em 10 µL de água ultrapura, fervida a 95 °C por 5 minutos e submetidas à PCR utilizando iniciadores específicos para o gene *otuli*. B, análise por eletroforese do plasmídeo pLEXSY-hyg2-flag-otuli (1, colônia 1; 2, colônia 2) digerido com *Bgl*I e *Not*I ou pLEXSY-hyg2-otuli (3, colônia 1; 4, colônia 2) digerido com *Xho*I e *Nhe*I. M, marcador 1 Kb plus DNA ladder.

Preparação dos cassetes FLAG-OtuLi-hyg, OtuLi-hyg e LinpLEXSY-hyg

A preparação dos cassetes para posterior transfecção foi iniciada com a digestão dos vetores FLAG-OtuLi-pLEXSY-hyg2, OtuLi-pLEXSY-hyg2 e pLEXSY-hyg2 (vetor vazio) com a enzima de restrição *Swa*I. O pLEXSY-hyg2 contém o fagomídeo pBluescript II KS (-) necessário para replicação em *E. coli* clonado nesse sítio de restrição. Na Figura 11, é possível observar um fragmento menor de 2.864 pb correspondente ao fagomídeo e um fragmento maior de 5.996 pb correspondente ao cassete FLAG-OtuLi-hyg ou 6.023 pb correspondente ao cassete OtuLi-hyg ou 6.269 pb indicando o pLEXSY-hyg2 vazio. Os fragmentos correspondentes aos cassetes foram excisados do gel de agarose (p/v) 0,8% e purificados.

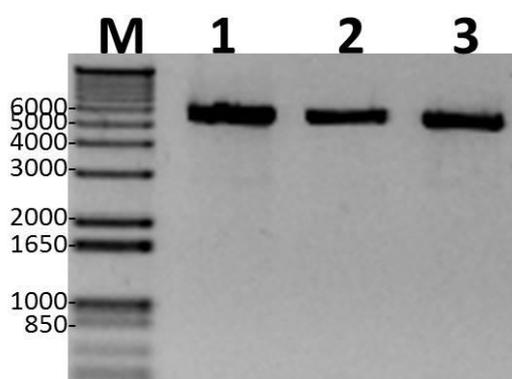


Figura 11. Cassetes purificados para transfecção em *L. infantum*. 1, FLAG-OtuLi-hyg. 2, OtuLi-hyg. 3, LinpLEXSY-hyg. M, marcador 1 Kb plus DNA ladder.

Inserção da cópia extra de otubaína nas formas promastigotas de *L. infantum*

Após a transfecção dos cassetes preparados, tanto a cultura transfectada com um dos cassetes quanto a cultura controle foram mantidas sob pressão antibiótica com higromicina B. A cultura controle não continha parasitos viáveis 2 semanas depois da transfecção. Em contrapartida, as culturas transfectadas com os cassetes, apesar da abundante presença de parasitos com formas arredondadas, era possível observar formas promastigotas móveis.

Quatro semanas depois da manipulação genética, o DNA dos transfectados foi extraído e submetido à análise por PCR. Conforme ilustrado no esquema da Figura 12, combinações de iniciadores foram utilizadas para a determinação da integração dos cassetes no locus gênico flanqueado por dois fragmentos da pequena subunidade (*small subunit* – *ssu*) rRNA (5' *ssu* e 3' *ssu*).

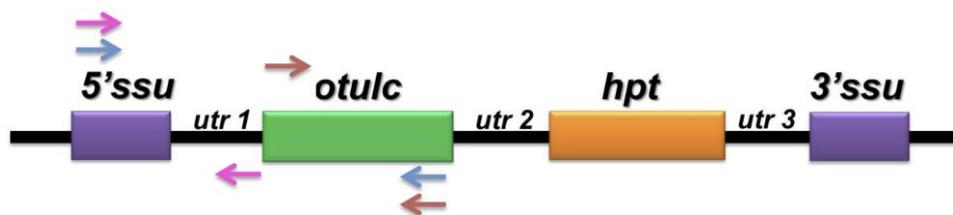


Figura 12. Estratégia para confirmação da integração da cópia extra de *otuli* no locus gênico *ssu*. As setas indicam os iniciadores e a direção da amplificação. Setas azuis, senso 5' *ssu* e antissenso *otuli*. Setas rosas, senso 5' *ssu* e antissenso *utr1*. Setas vermelhas, senso *otuli* e antissenso *otuli*.

Confirmação da inserção da cópia extra de *otuli* por PCR

A análise eletroforética da PCR revelou que todas os cassetes foram integrados ao locus gênico do *ssu* 18S rRNA. Os iniciadores padrões para amplificação do 5' *ssu* e da *utr1* geram um fragmento de 1,1 Kb. Já quando ocorre a combinação do iniciador senso 5' *ssu* e do iniciador antissenso específico para a *otuli*, há o acréscimo de aproximadamente 800 pb, gerando um novo fragmento de 1,9 Kb. Como controle negativo, o DNA de parasitos selvagens foi submetido às mesmas reações. Não houve amplificação com nenhuma das combinações utilizando os iniciadores específicos para a região do locus gênico utilizado para integração dos cassetes. Uma reação utilizando iniciadores senso e antissenso específicos para a *otuli* foi realizada como controle positivo para cada template, onde observamos a amplificação de um fragmento com aproximadamente 800 pb (Figura 13).

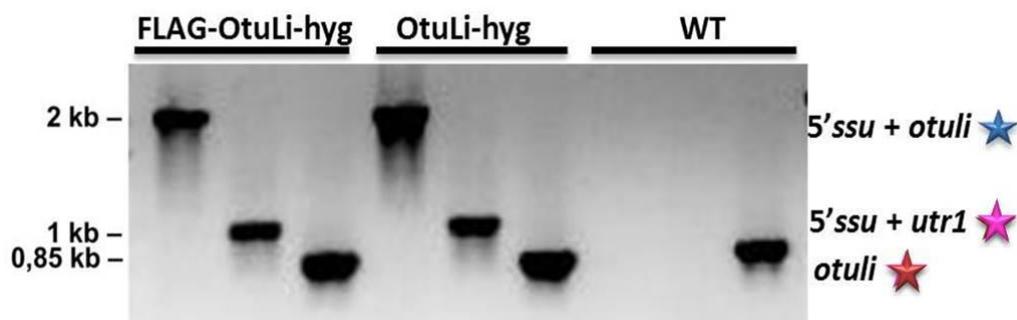


Figura 13. Integração dos cassetes ao DNA genômico de *L. infantum*. 5' *ssu* + *otuli*, geram um fragmento de 1,9 Kb. 5' *ssu* + *utr1*, geram um fragmento de 1,1 kb. *otuli* + *otuli*, geram um fragmento de 0,8 kb.

Confirmação da expressão da cópia extra de OtuLi por *western blot*

Como explicado anteriormente, o cassete FLAG-OtuLi-hyg possui o gene *otuli* fusionada a sequência codificante do peptídeo FLAG. Já o cassete OtuLi-hyg tem o

gene fusionado a uma sequência de códons para seis histidinas. Dessa forma, em nível proteico, análises por *western blot* foram realizadas para detectar a presença das proteínas OtuLi fusionadas aos peptídeos.

A cultura FLAG-OtuLi-hyg foi clonada por diluição exaustiva em placa de 96 poços e 7 clones foram recuperados e expandidos. O clone 1 (F1) não expandiu mesmo após a espera de 2 semanas e, por fim, foi descartado. De acordo com a Figura 14, é possível observar que a FLAG-OtuLi está presente no extrato proteico dos parasitos transfectados com o cassete. Não houve marcação do anticorpo α -FLAG nos extratos do LinpLEXSY-hyg (vetor vazio) e dos parasitos selvagens.

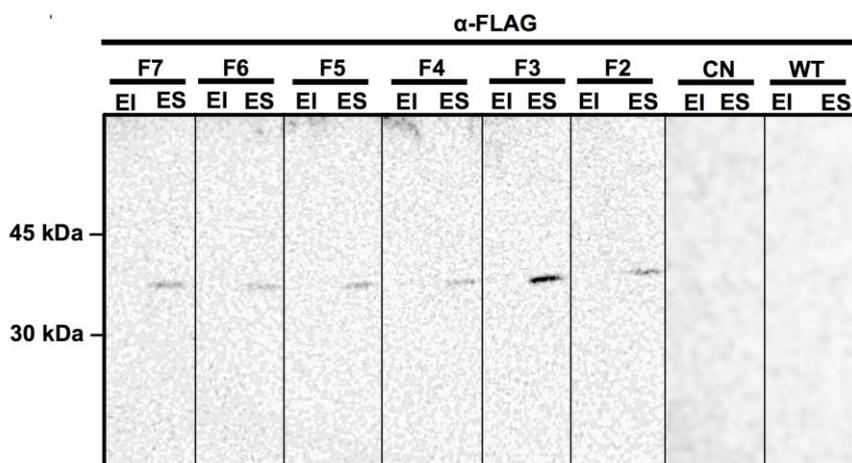


Figura 14 Detecção da enzima FLAG-OtuLi por *western blot*. Extratos de parasitos FLAG-OtuLi-hyg clonados (F7, F6, F5, F4, F3 e F2), parasitos LinpLEXSY-hyg (CN) e parasitos selvagens (WT) foram marcados com anticorpos α -FLAG (1:1000). Uma banda correspondente a FLAG-OtuLi no tamanho de 33 kDa encontra-se presente nos parasitos clonados.

Com relação aos parasitos OtuLi-hyg, 16 clones foram obtidos, congelados (10% glicerol) a -80°C , e 6 clones foram escolhidos randomicamente para expansão da cultura. Além disso, um clone que possui o plasmídeo OtuLi-pLEXSY-hyg2 na forma epissomal também foi avaliado. O *western blot* mostrou que todos os clones possuem uma banda de 35 kDa, que corresponde ao tamanho da OtuLi fusionada a cauda de histidinas, ausente no LinpLEXSY-hyg e nos parasitos selvagens. O LinpLEXSY-hyg apresentou uma marcação de 40 kDa. Todos os parasitos apresentaram uma banda (50 kDa) acima da OtuLi, provavelmente uma reação inespecífica do anticorpo (Figura 15).

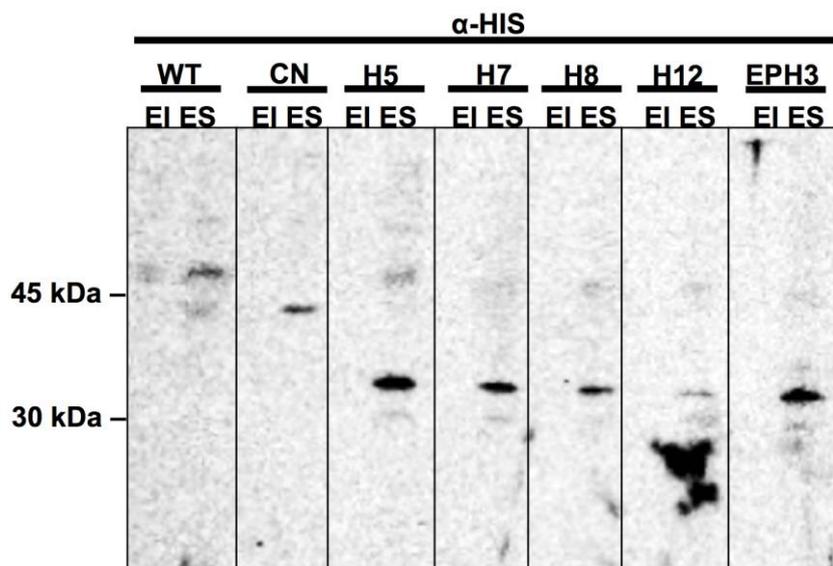


Figura 15. Detecção da enzima OtuLi-His6 por western blot. Extratos de parasitos OtuLi-hyg clonados (H5, H7, H8, H12 e EPH3), parasitos LinpLEXSY-hyg (CN) e parasitos selvagens (WT) foram marcados com anticorpos α -HIS (1:2000). Uma banda correspondente a OtuLi-His6 no tamanho de 35 kDa encontra-se presente nos parasitos clonados.

Citocalização da cópia extra de OtuLi em formas promastigotas de *L. infantum*

Sabendo que a cópia extra de *otuli* estava integrada ao genoma e que a FLAG-OtuLi é expressa pelo parasito, formas promastigotas de *L. infantum* contendo o cassete FLAG-OtuLi-hyg integrado e parasitos selvagens foram submetidos à imunofluorescência utilizando anticorpos α -FLAG. Na Figura 16, podemos observar a marcação citoplasmática da FLAG-OtuLi nos parasitos transfectados. Quando submetemos aos mesmos parâmetros de aquisição de imagem, os parasitos selvagens incubados com α -FLAG, não ocorre nenhum padrão de marcação. Desta forma, é possível dizer que o anticorpo α -FLAG marca especificamente a enzima FLAG-OtuLi.

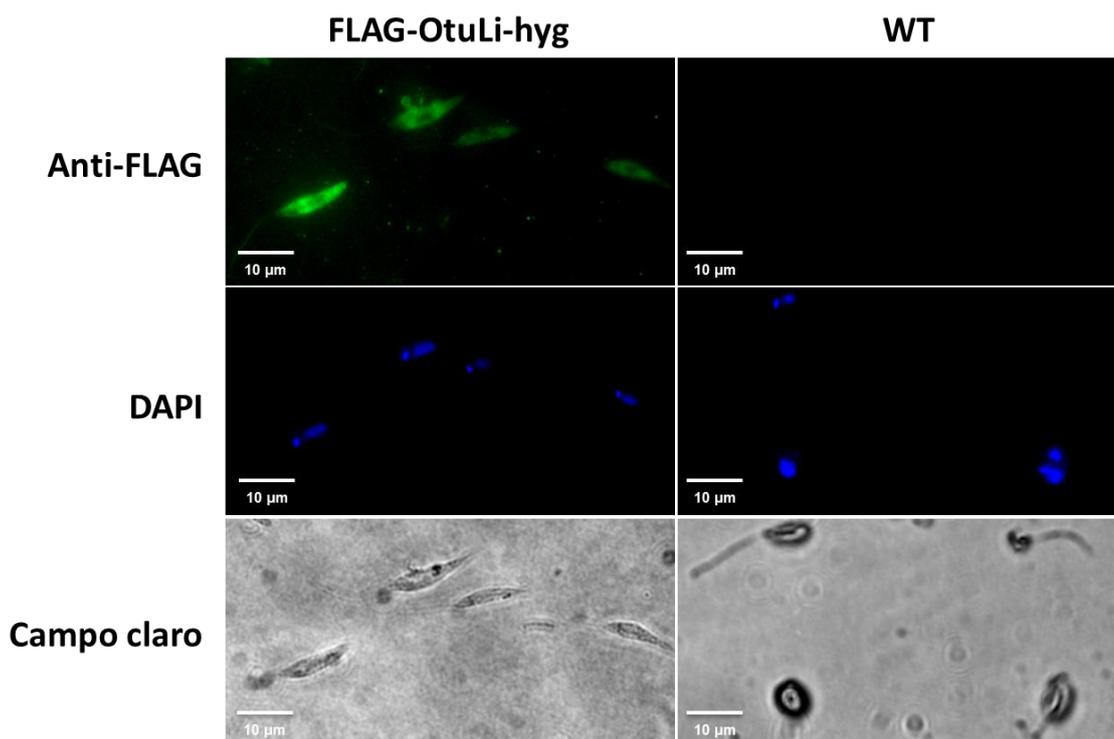


Figura 16. Imunofluorescência da enzima FLAG-OtuLi. A imunofluorescência foi realizada com anticorpos α -FLAG (1:100) e *goat anti-mouse IgG antibody* conjugado com *Alexa Fluor 488* (1:400). A identificação do DNA genômico e do cinetoplasto (azul) foram marcados pelo DAPI. Parasitos expressando cópia extra da *OtuLi*, FLAG-OtuLi; parasitos selvagens, WT.

Crescimento dos parasitos transfectados

Para avaliar se a cópia extra de *otuli* interfere no crescimento do parasito, calculou-se o crescimento cumulativo de 2 clones FLAG-OtuLi-hyg, 1 clone de OtuLi-hyg, 1 clone de OtuLi-pLEXSY-hyg2 na forma epissomal, o LinpLEXSY-hyg (pLEXSY vazio) e os parasitos selvagens. Conforme mostrado na Figura 17, comparando os parasitos selvagens e o LinpLEXSY-hyg, pode-se notar que não houve diferença significativa entre a taxa de crescimento de ambos, com apenas um acréscimo de 9,6% no tempo de divisão dos parasitos transfectados com o LinpLEXSY-hyg. Considerando isto, foi feita a comparação das outras linhagens com a linhagem LinpLEXSY-hyg como controle, uma vez que ela passou pelo processo de transfecção e foi selecionada com higromicina. Não houve uma diferença significativa de crescimento entre os parasitos que possuem a cópia extra em relação ao controle. O maior tempo de divisão foi do clone FLAG-OtuLi-hyg 6 (OtuLi-F6) com um aumento de 9,2% e o menor tempo de divisão foi o do OtuLi-F3 com uma diminuição de 5,6% (Figura 17).

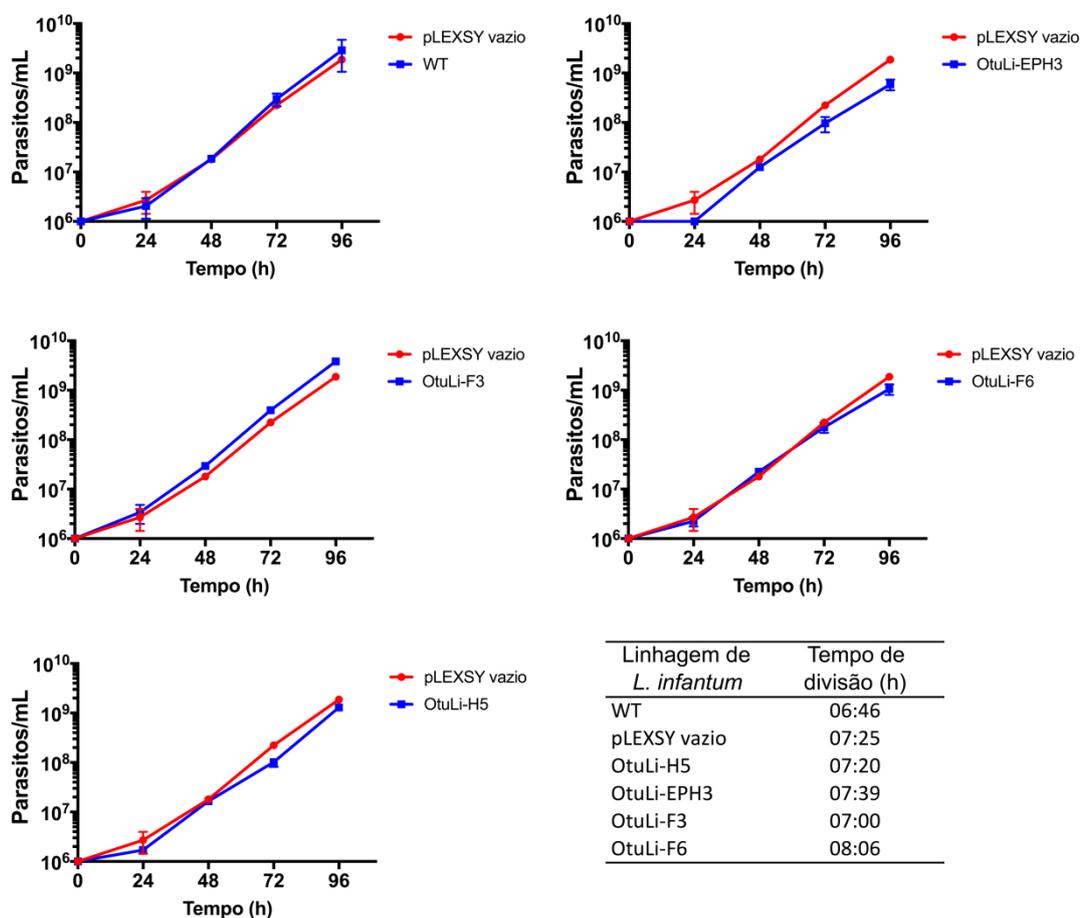


Figura 17. Crescimento cumulativo comparativo entre os parasitos *L. infantum* expressando uma cópia extra de OtuLi e o vetor vazio. O crescimento dos parasitos foi observado durante 5 dias, mantendo a cultura diluída diariamente a 10^6 parasitos/mL. A tabela indica o tempo de divisão calculado para cada linhagem.

Produção de soro imune contra a OtuLi recombinante

O soro contra a rOtuLi dos 4 camundongos imunizados foram utilizados para análise por *western blot* com o extrato de formas promastigotas de *L. infantum*, na diluição 1:200. Na Figura 18, observamos que todos os camundongos produziram anticorpos específicos contra a rOtuLi, já que a marcação aparece no tamanho de 30 kDa. A massa predita para a OtuLi é de 30,3 kDa. Não houve nenhuma reação inespecífica dos soros imunes, apenas uma fraca marcação inferior a da OtuLi no camundongo 4 (α -M4), que provavelmente é produto de degradação da própria OtuLi.

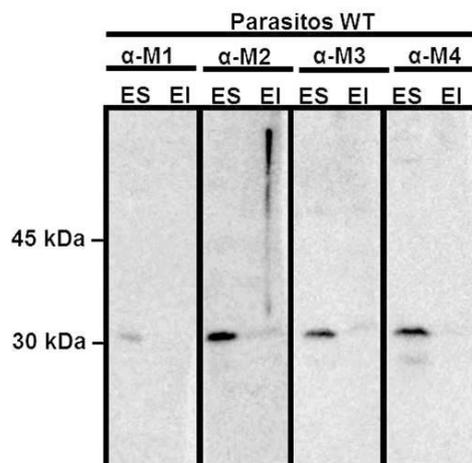


Figura 18. Imunorreatividade dos soros imunes contra a rOtuLi em extrato de formas promastigotas de *L. infantum*. O soro imune (M1 – M4) contra a rOtuLi (1:200) foi utilizado para marcação da OtuLi em extratos de formas promastigotas de parasitos selvagens de *L. infantum*.

Imunofluorescência da OtuLi de formas promastigotas selvagens com marcação da mitocôndria e da PDI

Com o objetivo de direcionar a investigação do papel funcional da OtuLi, marcações da mitocôndria e do retículo endoplasmático foram realizadas para comparar o perfil de fluorescência com a marcação da OtuLi em formas promastigotas de *L. infantum* selvagem. Para marcação da mitocôndria, duas sondas foram utilizadas: MitoTracker Red CMXRos ou MitoTracker Orange CMTMRos. Como referência também foi utilizado anticorpo contra a Proteína Dissulfato Isomerase (PDI) de *Gallus gallus*, uma proteína localizada no retículo endoplasmático.

A OtuLi apresenta-se em pequenas vesículas no citoplasma da célula, embora haja concentrada marcação perto do cinetoplasto, principalmente nos parasitos que apresentam forma mais oval e flagelo mais curto (formas paramastigotas). Não houve co-localização com a mitocôndria (Figura 19) e com a PDI (Figura 20).

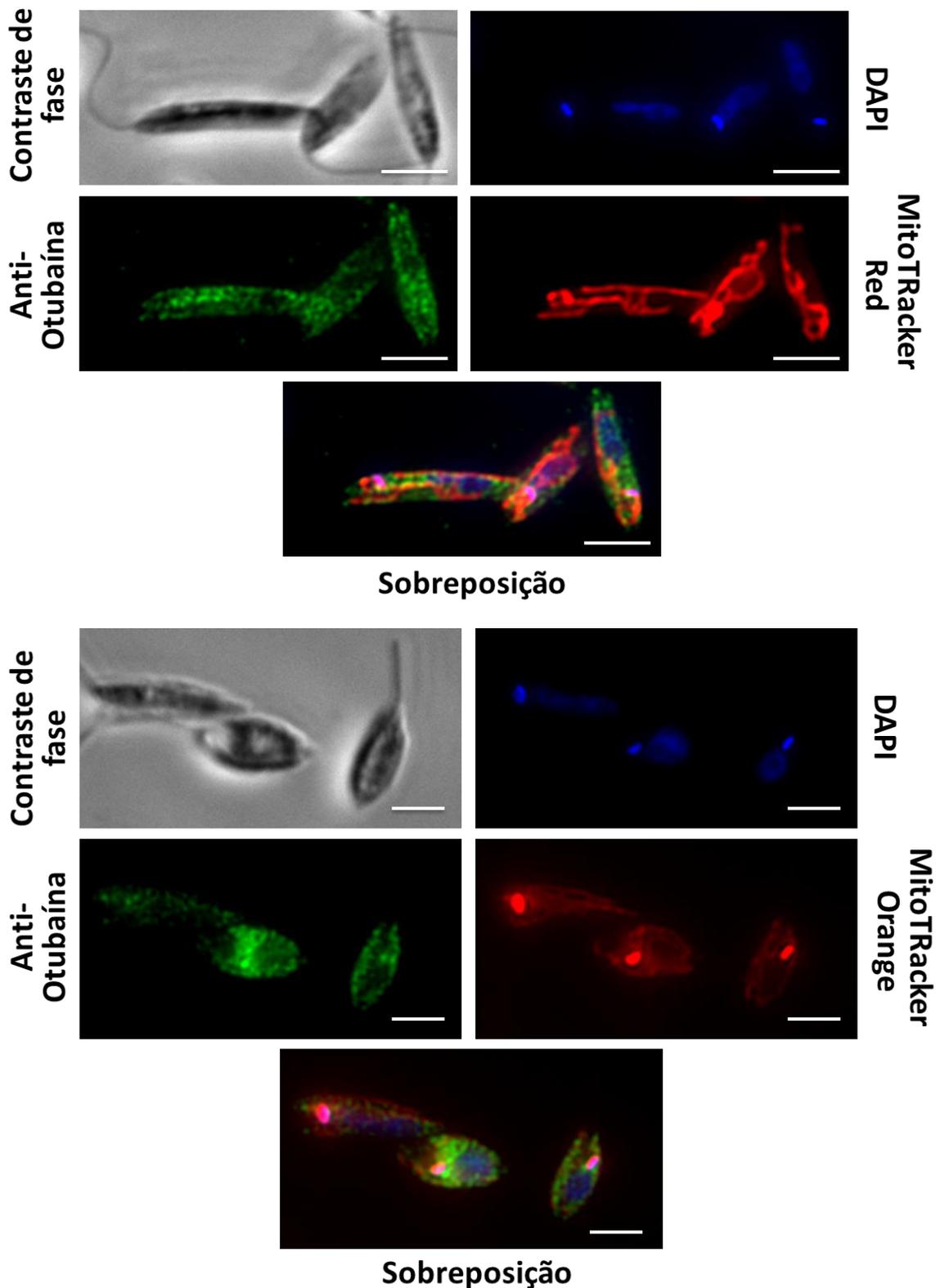


Figura 19. Marcação da mitocôndria e da OtuLi por fluorescência. A imunofluorescência foi realizada com soro imune contra a rOtuLi (1:100) e *goat anti-mouse IgG antibody* conjugado com *Alexa Fluor 488* (1:400). A identificação do DNA genômico e do cinetoplasto (azul) foram marcados pelo DAPI e mitocôndria marcada com Mitotracker Orange ou Red. Escala de 5 µm.

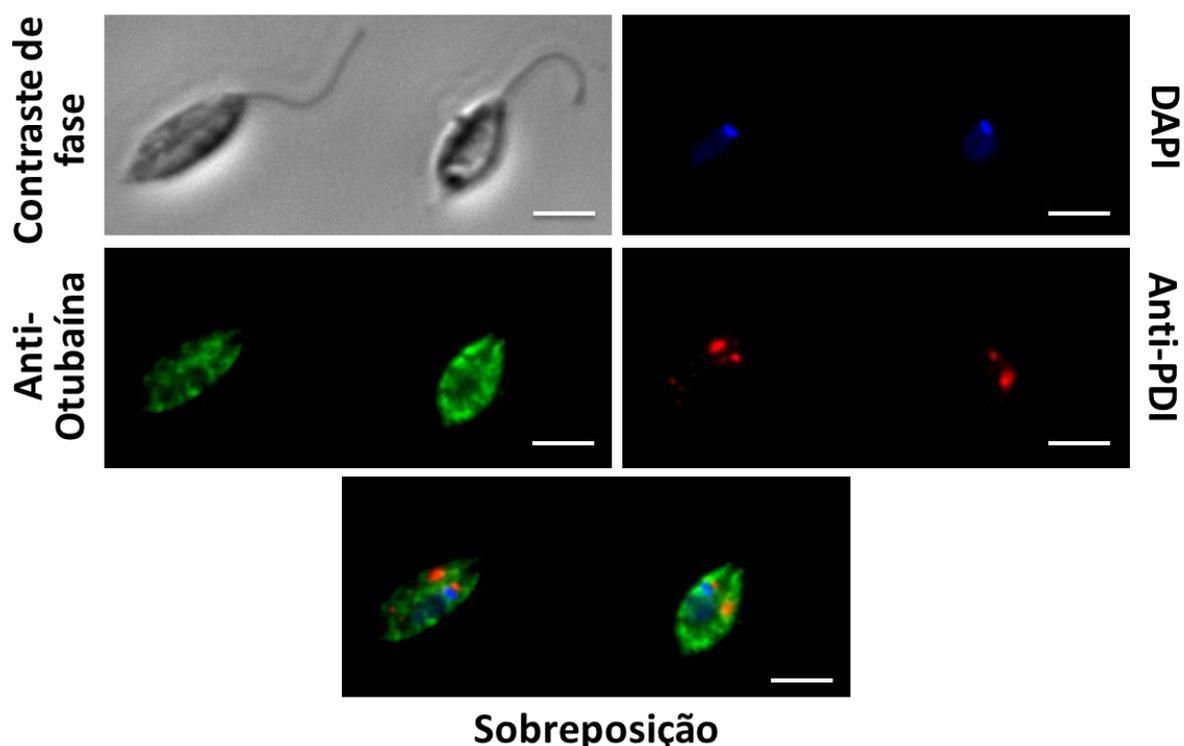


Figura 20. Marcação da PDI e da OtuLi por fluorescência. A imunofluorescência foi realizada com soro imune contra a rOtuLi (1:100) e *goat anti-mouse IgG antibody* conjugado com *Alexa Fluor 488* (1:400) para marcação da OtuLi (C). Para marcação da PDI (D), foi utilizado soro imune contra a PDI de *G. gallus* (1:500) e *goat anti-rabbit IgG antibody* conjugado com *Alexa Fluor 568* (1:300). Escala de 5 μ m.

Atividade e inibição enzimáticas da rOtuLi contra substrato proteico ligado pela lisina 48 (K48)

Na Figura 21, podemos constatar que a rOtuLi é ativa em pH 7,5 e em pH 6,5, o que é ligeiramente mais ácido. Conforme descrito por AZEVEDO (2014), a rOtuLi tem maior atividade contra o substrato de tetra-ubiquitina ligado pela K48 (4Ub-K48) em comparação com a 4Ub-K63. Sabendo que OtuLi é classificada como uma cisteíno-protease, a intenção de realizar um novo teste de atividade foi descobrir se a rOtuLi possui atividade em pH mais ácido contra seu substrato ideal (4Ub-K48), o que, de fato, foi comprovado.

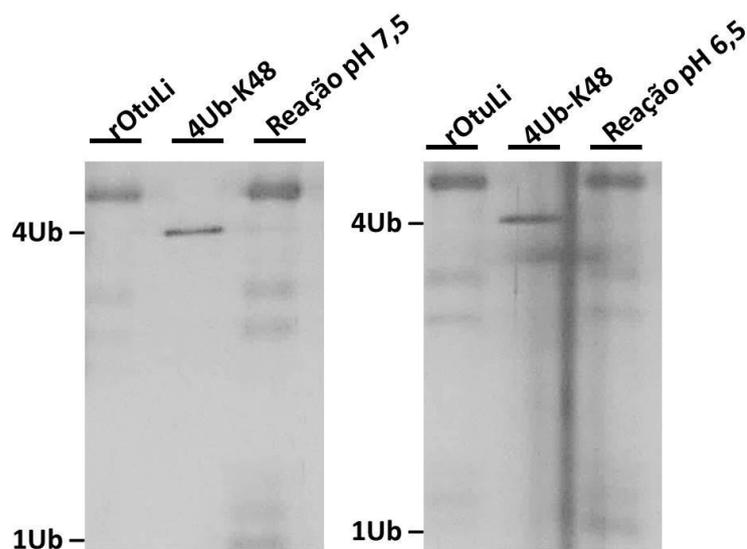


Figura 21. Atividade enzimática da deubiquitinase rOtuLi contra o substrato 4Ub-K48 em pH ácido. Em uma reação de 10 μ L, a rOtuLi (250 ng) foi incubada com o substrato 4Ub-K48 (500 ng) em 25 mM Tris 25mM pH 7,5 ou 25 mM MES pH 6,5 por 5 h a 25 °C.

A Figura 22 revela que, realmente, a rOtuLi não é inibida por E-64 e possui uma inibição parcial com o inibidor NEM, sendo possível identificar o substrato clivado a 3Ub-K48. Entretanto, a atividade é consideravelmente menor quando comparada com a atividade enzimática da Figura 21. Quanto ao inibidor Ub-aldeído, rOtuLi se manteve inativa, sendo a intensidade da banda de 4Ub-K48 da reação aparentemente igual ao controle. A banda correspondente a 1Ub na reação com Ub-aldeído, refere-se à própria monoubiquitina ligado ao aldeído.

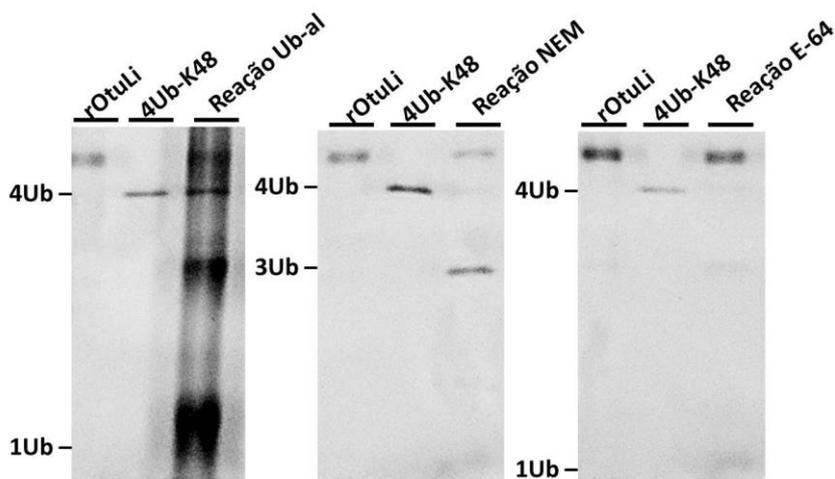


Figura 22. Inibição enzimática da deubiquitinase rOtuLi na presença de inibidores clássicos. Em uma reação de 10 μ L, a rOTULi (250 ng) foi incubada com o substrato 4Ub-K48 (500 ng) em 25 mM Tris 25mM pH 7,5. O teste de inibição da rOtuLi foi realizado com a incubação prévia da enzima com os inibidores Ub-aldeído (10 μ g), NEM (100 μ M) e E-64 (100 μ M) durante 30 min, seguida da incubação com o substrato 4Ub-K48 por 5 h nas condições supracitadas.

Modelagem molecular comparativa da OtuLi WT, OtuLi Δ 1, OtuLi Δ 2 e OtuLi Δ 3

A OtuLi selvagem e três outras moléculas de OtuLi com mutações sítio-dirigidas foram modeladas por homologia e refinadas por dinâmica molecular. Considerando a sequência de aminoácidos, as mutações pontuais na sequência geraram o mutante Δ 1 (Phe182Ser), o mutante Δ 2 (Phe182Ser e Leu265Pro) e o mutante Δ 3 (Phe82Ser, Phe182Ser e Leu265Pro).

Correlacionando esses resultados com os obtidos no teste de atividade contra o substrato de 4Ub-K48 mostrado na Figura 23C, podemos observar que a mudança no resíduo Leu265Pro e/ou Phe82Ser foram críticos para a perda da atividade da OtuLi. Além disso, houve mudanças significativas entre as estruturas OtuLi WT e as formas mutantes como mostrado pelos valores de RMSD (Figura 24). Este valor corresponde à distância entre as cadeias principais de duas enzimas sobrepostas. Comparando os RMSDs entre elas foi observado 1,512 Å entre WT e Δ 1, 1,690 Å entre WT e Δ 2 ao passo que a maior diferença com a WT foi a Δ 3 com 2,484 Å. Como consequência, houve uma correlação entre os valores de RMSD, atividade e solubilidade dessas enzimas recombinantes produzidas em bactérias, onde a mutante Δ 3 foi produzida majoritariamente em corpos de inclusão.

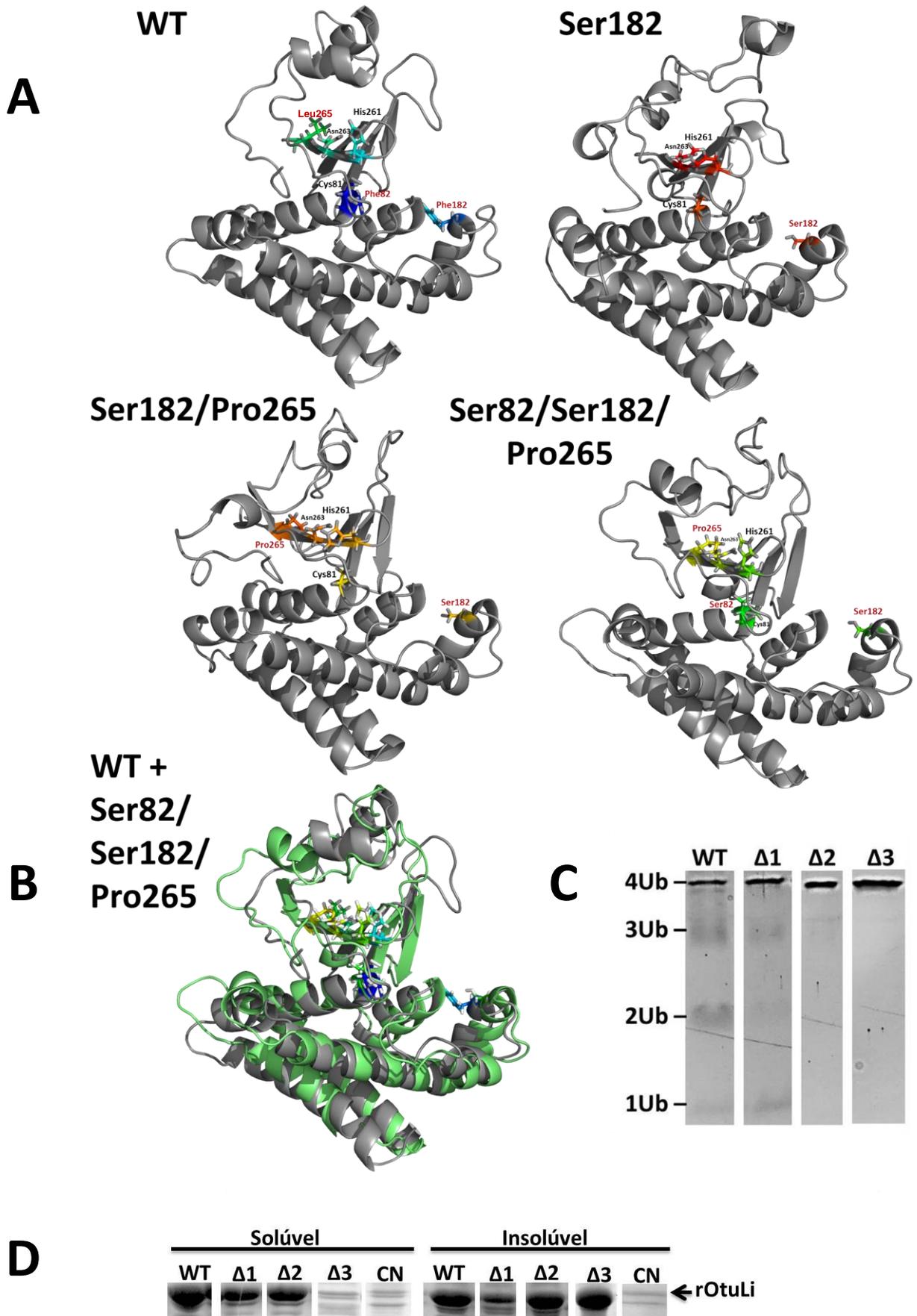


Figura 23. Avaliação da modelagem molecular entre a OtuLi WT e suas formas mutantes. **A**, modelos estruturais tridimensionais da OtuLi WT, OtuLi $\Delta 1$, OtuLi $\Delta 2$ e OtuLi $\Delta 3$. A fonte preta representa a tríade catalítica (Cys81, His261 e Asn263) e a fonte vermelha representa os aminoácidos escolhidos para mutação (Phe82, Phe182 e Leu265 - OtuLi WT) ou mutados (Ser82, Ser182 e Pro265 - demais formas). **B**, sobreposição das estruturas OtuLi WT e OtuLi $\Delta 3$. **C**, teste de atividade contra 4Ub-K48. **D**, Expressão das enzimas recombinantes em *E. coli* BL21 (DE3).

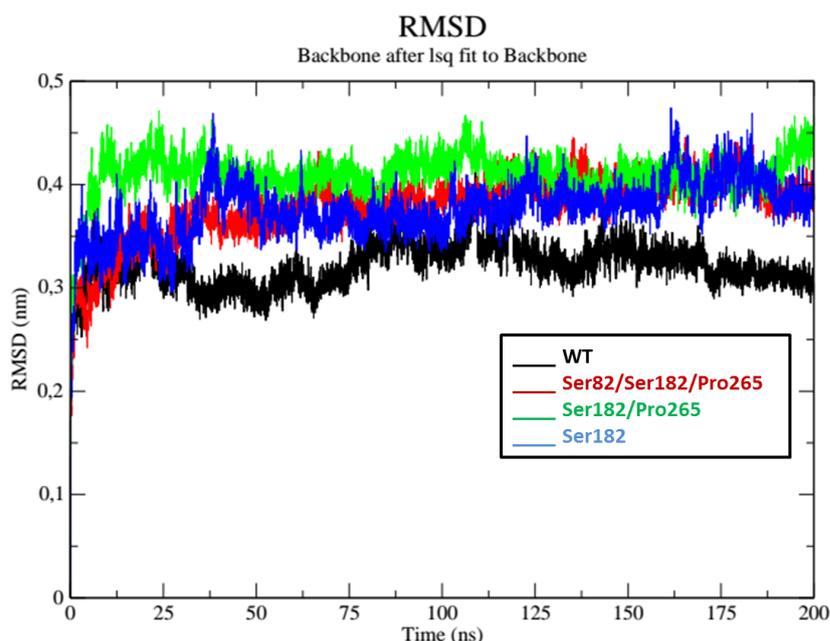


Figura 24. RMSD entre as estruturas OtuLi WT e suas mutantes. OtuLi WT (preto), OtuLi $\Delta 1$ (azul), OtuLi $\Delta 2$ (verde) e OtuLi $\Delta 3$ (vermelha).

Indução de resposta inflamatória pela rOtuLi

Para analisar se a rOtuLi possui efeito imunomodulador, macrófagos peritoneais murinos foram incubados com a enzima e a formação de corpúsculos lipídicos, marcador estrutural da inflamação, e o perfil de citocinas pro-inflamatórias foram avaliados.

Após 24 h de estímulo com a rOtuLi, já podia ser vista a formação de corpúsculos lipídicos em maior nível quando comparado com os macrófagos não estimulados. Quando incubados com a rOtuLi desnaturada, a quantidade dos corpúsculos lipídicos era de quase 3 vezes menor após 48 h. Além disso, a formação de corpúsculos lipídicos indica ser tempo-dependente (Figura 25).

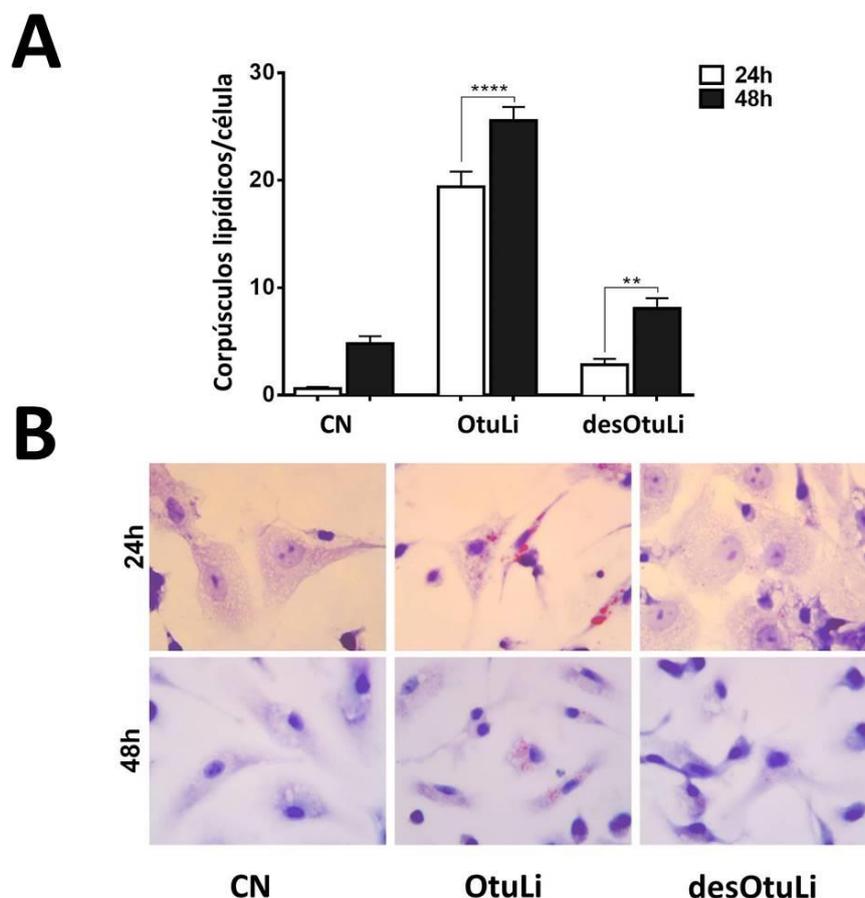


Figura 25. Produção de corpúsculos lipídicos em macrófagos induzidos pela rOtuLi. Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos C57BL/6 e incubados com 1 μ g de rOtuLi ou rOtuLi desnaturada (desOtuLi) por 24 e 48 h. A, a formação de corpúsculos lipídicos foi observada por microscopia de luz em 50 células separadamente. B, imagem representativa de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais observados por microscopia de luz. CN, controle negativo utilizando células não estimuladas. Ampliação original x 100. (**** $p < 0.0001$)

Quanto ao perfil de citocinas, os macrófagos, após incubação com rOtuLi, foram estimulados a produzir TNF- α e IL-6, com valores superiores ao controle positivo, o LPS (Figura 26). Tanto o TNF- α quanto IL-6 são, classicamente, citocinas que permanecem elevadas em processos inflamatórios. Neste contexto, a indução de corpúsculos lipídicos e a produção de citocinas pro-inflamatórias como resposta dos macrófagos ao estímulo com rOtuLi indicam que esta enzima pode induzir resposta pro-inflamatória no hospedeiro.

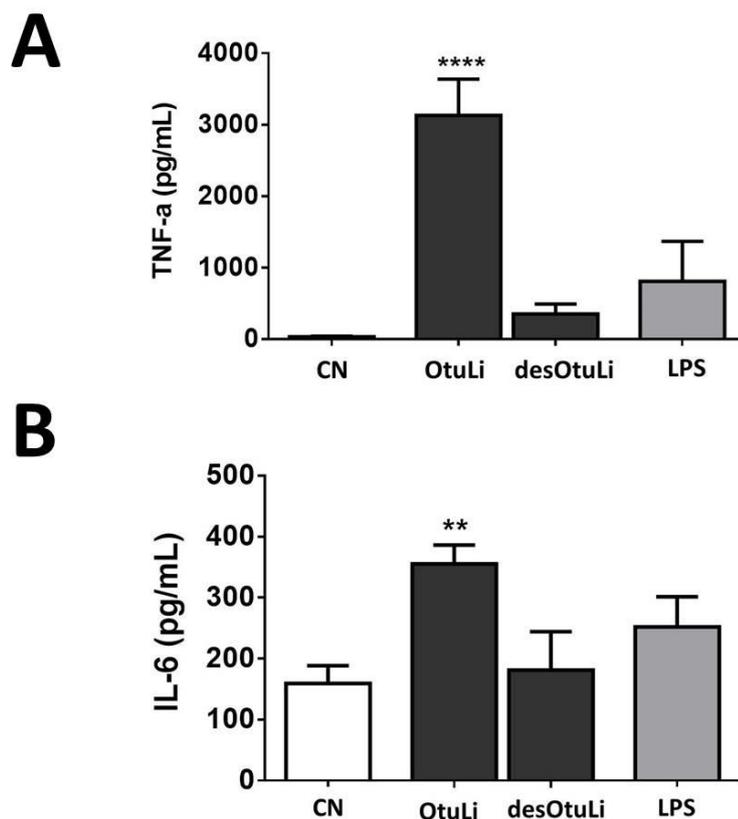


Figura 26. Produção de citocinas em macrófagos pela rOtuLi. Macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos C57BL/6 e incubados com 1 µg de rOtuLi ou rOtuLi desnaturada por 24 e 48 h. Os sobrenadantes foram coletados e os níveis de produção de TNF-α (A) e IL-6 (B) foram avaliados por ELISA. (**** p<0.0001).



DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

As enzimas deubiquitinantes vem sendo descritas como importantes reguladoras-chave de diversos processos biológicos. Apesar do seu papel clássico no controle da ubiquitinação e, conseqüentemente, na reciclagem de proteínas submetidas à proteólise pelo proteossoma 26S em eucariotos, é notório que a importância das DUBs vem crescendo à medida que os seus papéis estão sendo descritos na resposta imunológica, na estrutura da cromatina e na endocitose. O genoma humano descreve aproximadamente 95 DUBs distribuídas nas 5 classes previamente relatadas (NIJMAN et al., 2005). Neste contexto, o estudo da deubiquitinação torna-se interessante e está se expandindo para outros organismos, inclusive protozoários.

O presente trabalho dedicou-se à continuidade do estudo da enzima otubaína de *L. infantum*, que compreendeu o estabelecimento de duas linhagens de *L. infantum* expressando uma cópia extra do gene *otuli* marcada por um peptídeo FLAG ou uma cauda de seis histidinas, além do estudo da atividade enzimática e imunológica da OtuLi recombinante, baseando-se em trabalhos anteriores desenvolvidos no nosso laboratório (GUIDO, 2011; AZEVEDO, 2014).

Para início da construção do cassete contendo a *otuli*, o pLEXY-hyg que é um plasmídeo para expressão em *L. tarentolae*, foi escolhido para estabelecer uma linhagem de expressão estável da proteína *L. infantum*. No subgênero *Leishmania*, já havia relatos do uso de vetores constitutivos e integrativos do tipo pLEXY-2 para estabelecer linhagens fluorescentes em *L. major* (BOLHASSANI ET AL., 2011; CALVO-ÁLVAREZ et al., 2012; VACCHINA & MORALES, 2014), *L. donovani* (VACCHINA; MORALES, 2014) e *L. infantum* (BOLHASSANI et al., 2011; CALVO-ÁLVAREZ et al., 2014, 2015). O uso destes vetores para introduzir cópias extras de genes presentes no genoma do parasito para estudo funcional já havia sido descrito em *L. donovani* no estudo de uma fosfatase ácida em que o plasmídeo foi incorporado ao parasito em sua forma episomal (PAPADAKI et al., 2015).

Como a regulação gênica em *Leishmania* ocorre em nível transcricional, as UTRs são importantes para o controle da expressão gênica e a sua escolha garante a formação de um cassete eficiente para a expressão dos transcritos (BREITLING et al., 2002). No caso do vetor escolhido, o gene *otuli* está precedido pela região 5'

UTR do gene *adenina fosforibosil transferase (aprt)* de *Leishmania* com o acceptor de *splicing* para realização do *trans-splicing* no gene *otuli*. Consequente a esta sequência, existe a região intergênica da calmodulina (*camA*) de *Leishmania* com o sítio para poliadenilação da *otuli* e o acceptor de *splicing* para o *trans-splicing* do gene de resistência à higromicina (*higromicina fosfotransferase - hpt*), que se encontra logo em seguida. Por fim, encontra-se a 5' UTR do gene da diidrofolato redutase-timidilato sintase (*dhfr-ts*) com o sítio de poliadenilação para o gene *hpt*. Toda essa construção está flanqueada por dois fragmentos (5' e 3') do locus da *ssu rRNA* para que seja possível a recombinação homóloga dupla. Dessa forma, a recombinação homóloga e a pressão antibiótica no meio garante a seleção dos parasitos que receberam o cassete (BASILE; PETICCA, 2009).

Os parasitos dismorfos presentes na cultura após seleção com o antibiótico persistiam até a realização de subseqüentes passagens e podem estar relacionadas ao estresse sofrido pelos parasitos durante a eletroporação. Estas formas já foram observadas em um contexto similar em *L. donovani* e *L. major* e são chamadas de células *fat-like*. O tratamento desses parasitos com orizalina, um inibidor de α -tubulina (ROBINSON; BEVERLEY, 2003), e a perda de α -tubulina em *T. brucei* demonstraram o mesmo fenótipo celular (NGÔ et al., 1998). De fato, a aplicação de pulsos elétricos em células HMEC-1 promove alterações na β -actina, causando um rearranjo do citoesqueleto, onde a célula fica com um aspecto mais denso e oval (MEULENBERG; TODOROVIC; CEMAZAR, 2012).

Os parasitos contendo os cassetes foram, então, avaliados quanto a sua expressão proteica por *western blot* e por imunofluorescência e quanto ao seu crescimento. O *western blot* dos extratos de parasitos clonados claramente mostram que a FLAG-OtuLi está sendo expressa e que o anticorpo α -FLAG é específico e não ocorre reatividade cruzada com nenhuma proteína do extrato de *L. infantum*, uma vez que a banda de aproximadamente 33 kDa está ausente tanto nos parasitos selvagens quanto no controle negativo, onde o parasito carrega apenas o cassete sem a *otuli*. Em contrapartida, apesar dos extratos dos parasitos clonados com o cassete OtuLi-hyg revelarem a expressão da OtuLi-His6, o *western blot* também acusou bandas no extrato proteico dos parasitos selvagens e do controle negativo. A explicação plausível para a marcação no WT seria a reatividade cruzada entre o anticorpo e alguma proteína de 50 kDa, já que, mesmo nos parasitos clonados, é

possível observar uma marcação fraca nesta altura. A marcação de 40 kDa no controle negativo, onde o cassete está vazio, seria a tradução de um *frame* alternativo do cassete que gera uma proteína de 365 aminoácidos, conforme análise dessa sequência no portal de bioinformática ExPASy. O controle negativo foi apenas digerido com a enzima de restrição *Swal* o que significa que o *stuffer* de 1.054 pb permaneceu intacto no cassete (Figura 9) disponível para a tradução.

Considerando que o anticorpo α -FLAG foi altamente específico para o extrato dos parasitos FLAG-OtuLi-hyg, os clones com esta construção também foram submetidos à imunofluorescência. O padrão de marcação dos parasitos transgênicos utilizando o anticorpo α -FLAG é o mesmo observado nos imunomarcados com o anticorpo α -OtuLi. A FLAG-OtuLi encontra-se por toda a extensão dos parasitos, indicando uma marcação citoplasmática, ainda que haja alguns pontos mais fortes. Esse dado indica que a localização citoplasmática é consenso com as otubáinas de outros organismos. A HsOtu1 regula o supressor tumoral p53 através de sua ligação ao complexo Ubch5/MDM2, impedindo que esta ligase ubiquitine a p53, deixando-a livre para o deslocamento para o núcleo e posterior atuação durante a quebra de dupla fita do DNA. Esse processo de inibição não-canônico da ubiquitinação ocorre no citoplasma da célula, conforme observado por imunofluorescência e fracionamento celular (SUN; CHALLAGUNDLA, 2011).

Em todas as imunofluorescências realizadas neste trabalho, observa-se uma região de forte intensidade na região próxima ao cinetoplasto dos parasitos, principalmente nas formas que indicam ser paramastigotas, que possuem o flagelo menor e o corpo celular maior e constituem uma forma intermediária entre a amastigota e promastigota. Este dado levanta o interesse de investigar o papel desta enzima nas formas amastigotas, que são aquelas presentes no hospedeiro vertebrado no interior de fagócitos. De fato, foi revelado que o gene *otubáina* em *L. infantum* está diferencialmente regulado após a geração de formas amastigotas axênicas tratadas em pH 4,5, encontrando-se 1,8 vezes mais expresso nessas formas (ALCOLEA et al., 2010).

No presente trabalho, avaliamos se há co-localização da OtuLi com a mitocôndria ou com o retículo endoplasmático. O uso de duas sondas diferentes para marcação da mitocôndria demonstrou que a OtuLi não está localizada em

compartimentos mitocondriais. A PDI pertence à superfamília das tiol-redoxinas e é uma das proteínas mais abundantes no retículo endoplasmático (RE), atuando no mecanismo de degradação de proteínas no RE (GILLECE et al., 1999). Sabendo disso, utilizamos um anticorpo α -PDI para marcação do RE nas formas promastigotas do parasito e observamos que também não houve co-localização da OtuLi com a PDI no RE. Apesar disso, não podemos descartar a possibilidade de a OtuLi ser re-endereçada para esses compartimentos após a amastigogênese e essas marcações precisam ser repetidas nas formas amastigotas. Cisteíno-proteases da superfamília das papaínas são encontradas em abundância no compartimento lisossomal de tripanossomatídeos (BROOKS et al., 2000). Devido a esta característica, aliada à atividade da OtuLi em pH ácido observado aqui neste trabalho (discutido abaixo), o próximo passo será verificar se a OtuLi estaria localizada no lisossomo.

Para finalizar a análise descritiva dos parasitos contendo os cassetes FLAG-OtuLi-hyg e OtuLi-hyg, avaliamos a taxa de crescimento dos parasitos que haviam recebido os cassetes contendo a cópia extra de *otuli*, os que haviam recebido apenas o cassete vazio e os parasitos selvagens. Escolhemos como parâmetro de comparação os parasitos transfectados com o cassete vazio, já que eles também estariam sob a mesma pressão seletiva com o antibiótico. Todos os clones avaliados mantiveram crescimento logarítmico a partir de 24 h e não houve diferença significativa na taxa de crescimento e no tempo de divisão entre o controle e os clones.

Estudos anteriores no nosso laboratório deram início à caracterização enzimática da OtuLi recombinante. A rOtuLi revelou-se uma enzima capaz de clivar substratos de 4Ub ligados tanto pela K48 quanto pela K63, demonstrando maior efetividade na clivagem da 4Ub-K48. Substratos como Ub-AMC não são clivados, já que a rOtuLi é uma isopeptidase capaz de clivar apenas ligações isopeptídicas. Além disso, já havia sido relatado que esta enzima, apesar de ser uma cisteíno-protease, não é capaz de ser inibida pelo E-64 (AZEVEDO, 2014). Baseando-se nesses fatos, esta dissertação deu continuidade à avaliação enzimática da rOtuLi. Considerando que a maioria das cisteíno-proteases possui atividade ótima em pH mais ácido (TURK et al., 1995), investigamos se a rOtuLi era ativa em pH 5,5 e 6,5, já que os testes anteriores haviam sido realizados em pH neutro. De fato, a rOtuLi

possui atividade em pH mais ácido de maneira similar à atividade em pH neutro. Diferentemente da rOtuLi, a otubaína recombinante de *Cryptosporidium parvum* apresentou instabilidade em pH ácido e sua atividade enzimática ótima se concentra em pH 7,5 (JU et al., 2014). Estudos que demonstram a atividade enzimática das otubaínas de outros eucariotos geralmente utilizam um intervalo de pH 7 – 8 como padrão (ALTUN et al., 2015; BALAKIREV et al., 2003; EDELMANN et al., 2009; ERNST et al., 2009; GONCHAROV et al., 2013; HERHAUS et al., 2015; JUANG et al., 2012; NAKADA et al., 2010; SUN; CHALLAGUNDLA, 2011; WANG et al., 2009; WIENER et al., 2013).

As estruturas da HsOtu1 e da HsOtu2 revelam que, assim como as outras enzimas papaina-*like*, o sítio ativo é formado por um lóbulo de α -hélice e um lóbulo de folha- β centrados no resíduo de Cys91 catalítica. Entretanto, a conformação do resíduo de His265 da tríade catalítica na estrutura e sua distância até os resíduos de Cys91 e Asp267 é incompatível. Além disso, o resíduo de Cys91 está bloqueado por ligações de hidrogênio com o resíduo de Arg86 e pela interação de uma molécula de água com o resíduo de Glu214, que se encontra na bolsa P1. Acredita-se que essa estrutura é uma peculiaridade diante das cisteíno-proteases, já que o sítio catalítico encontra-se quase inviabilizado para realização da catálise (EDELMANN et al., 2009).

Na OtuLi WT, conforme modelo estrutural proposto por GUIDO (2011), a tríade catalítica é formada pelos resíduos de Cys81, His261 e Asn263 e possivelmente o bloqueio do sítio catalítico, ainda que seja parcial, também parece ocorrer na estrutura da OtuLi. Este fato explicaria, por exemplo, a incapacidade da rOtuLi de clivar Ub-AMC. O grupamento AMC do Ub-AMC não consegue se acomodar no P1 e, talvez, isto ocasione a inatividade desta enzima com este substrato. O mesmo pode acontecer com os inibidores E-64 e NEM. Como a molécula de E-64 é relativamente maior que a de NEM, o E-64 não consegue se acomodar apropriadamente, impossibilitando a ligação covalente com o sítio catalítico.

A incompatibilidade estérica do sítio catalítico descrita acima parece ser revertida com o rearranjo estrutural da molécula quando a ubiquitina se liga ao motivo de interação à ubiquitina presente na OtuLi, já que é possível observar

clivagem de 4Ub. Além disso, a OtuLi não possui uma extensão do N-terminal presente na HsOtu1 e ausente na HsOtu2. O N-terminal mais curto na HsOtu2 permite que a interação com a ubiquitina seja mais permissiva, o que poderia explicar o fato de a HsOtu2 clivar tanto cadeias de ubiquitinas ligada à K48 quanto à K63 (ALTUN et al., 2015), assim como a rOtuLi (AZEVEDO, 2014).

É sabido que as otubaínas são um grupo de enzimas que dependem da interação com outras proteínas para regular sua atividade. Um estudo que avaliou a HsOtu1 covalentemente ligada a uma variedade de diferentes E2 ligases demonstrou que o complexo Otubaína-E2 é capaz de estimular a clivagem de Ub4, Ub2 e, surpreendentemente, do Ub-AMC, o que não ocorre quando a enzima HsOtu1 esta em sua forma apo (WIENER et al., 2013).

Neste trabalho, foi realizada a dinâmica molecular de três diferentes OtuLi mutantes. Mutações de base única foram introduzidas nas sequências de nucleotídeos a fim de causar uma mutação *missense*, ou seja, o novo códon deu origem a um aminoácido diferente do presente na enzima WT. O julgamento da escolha dos aminoácidos a serem trocados foi baseado na análise da sequência de aminoácidos da HsOtu2, a primeira a otubaína a ser cristalizada e ter sua estrutura resolvida (NANAO et al., 2004). Nossos critérios foram: 1) aminoácido próximo à cisteína do sítio catalítico; 2) aminoácido presente no domínio relacionado à ubiquitina e 3) aminoácido próximo ao domínio relacionado à ubiquitina (Figura 27).

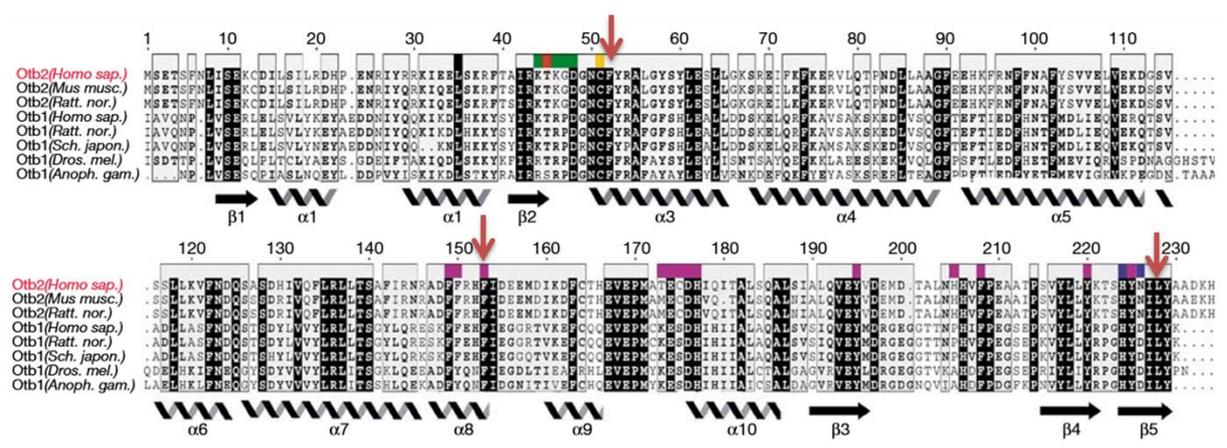


Figura 27. Alinhamento de sequências de otubaínas. Os resíduos conservados estão marcados em preto. Cores acima do alinhamento de sequências são indicadas da seguinte forma: Cys51 (laranja), His224/Asn226 (azul) e proposta região de ligação ubiquitina (rosa). As setas vermelhas indicam os aminoácidos

correspondentes na HsOtu2 mutados na OtuLi. As extensões N-terminais de uma otubaina foram removidas para maior clareza. Adaptado de (NANA O et al., 2004)

A escolha da Phe182 da OtuLi foi baseada no fato deste aminoácido conservado em HsOtu2 fazer parte da superfície hidrofóbica que fica exposta para formar uma bolsa para interação com os resíduos da ubiquitina (NANA O et al., 2004). Desta forma, a intenção era avaliar se a introdução de um aminoácido hidrofílico (Ser182) ocasionaria mudanças relevantes na atividade. Apenas esta mudança (Phe182Ser) não foi suficiente para ocasionar a perda da atividade da OtuLi.

Quando houve a introdução de uma segunda mutação (Leu265Pro), introduzindo um aminoácido volumoso (Pro265) próximo a um resíduo conservado e relacionado à interação com a ubiquitina (Asn263 na OtuLi e Asp227), a enzima perdeu totalmente sua atividade.

Não é possível afirmar com certeza que a inserção da mutação ao lado da cisteína catalítica (Phe82Ser) é responsável pela inatividade da OtuLi $\Delta 3$, já que a OtuLi $\Delta 2$ já é intrinsecamente inativa. Entretanto, a inserção da terceira mutação causou a grande formação de corpos de inclusão da OtuLi $\Delta 3$ em bactérias. A formação de corpos de inclusão pode ser consequência da inibição da formação de pontes dissulfeto pelo ambiente redutor da bactéria (SINGH; PANDA, 2005). Uma hipótese seria que talvez não só esta mutação, mas a ação coordenada das três mutações foram responsáveis por este fato.

No que se refere ao estudo funcional, a rOtuLi induziu a formação de corpúsculos lipídicos (CL) em macrófagos peritoniais murinos. Sabendo que o estabelecimento da infecção pela *Leishmania* é dependente do comportamento das células fagocíticas, estudos anteriores observaram o acúmulo de organelas intracelulares constituídas de lípidos neutros chamados corpúsculos lipídicos (CL) em células infectadas ou estimuladas com *Leishmania* (RABHI et al., 2016). A síntese de tais CL pela célula hospedeira poderia ajudar a desencadear a expressão de citocinas (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007) e também ser uma resposta à necessidade de fonte de energia a partir do parasito (MELO; DVORAK, 2012).

As citocinas desempenham um papel importante na regulação da resposta imune inicial, a fim de manipular o ambiente para o sucesso da infecção. Os

macrófagos começam a produzir óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta ao interferon gama (IFN- γ) liberado pelos linfócitos T auxiliares ativados a fim de modular uma resposta protetora ao hospedeiro. A indução de TNF- α por *Leishmania* em macrófagos aumenta a produção de IFN- γ , que é um estímulo para a ativação de mais macrófagos (CUMMINGS; TULADHAR; SATOSKAR, 2010). O perfil de duas citocinas também foi avaliado mediante estímulo com a rOtuLi. Nossos resultados mostram que a rOtuLi induz a secreção de IL-6 e TNF- α em macrófagos murinos.

Considerando este cenário, a rOtuLi pode estar envolvida no processo de formação de CL e indução da produção de IL-6 e TNF- α na célula hospedeira pela *Leishmania*. Entretanto, esta é apenas uma suposição, visto que ainda há a necessidade de investigar se a OtuLi é capaz de ser secretada quando o parasito é internalizado no fagolisossomo, por exemplo. A sequência da OtuLi não possui peptídeo-sinal (GUIDO, 2011), porém, esta enzima pode ser secretada por vias não clássicas, como exocitose do compartimento lisossomal por exemplo (MCCONVILLE et al., 2002).

Todos os dados produzidos nesta dissertação despertam ainda mais o interesse de persistir na elucidação deste processo pouco estudado em tripanossomatídeos tal qual é a ubiquitinação. Assim, a produção das duas linhagens aqui descritas serão ferramentas para o início da caracterização deste processo na relação patógeno-hospedeiro.



CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho nos permitem concluir que:

- os parasitos integraram corretamente ao seu genoma as cópias extras de FLAG-OtuLi ou OtuLi-His6;
- os parasitos transgênicos expressam as proteínas FLAG-OtuLi e OtuLi-His6 e não alteraram significativamente sua taxa de crescimento celular;
- a FLAG-OtuLi está localizada no citoplasma do parasito e mantém o padrão celular visto pela imunofluorescência utilizando anticorpos específicos para a OtuLi e a OtuLi não co-localiza com a mitocôndria e o retículo endoplasmático;
- a rOtuLi possui atividade em pH ácido e é inibida por NEM e Ub-aldeído;
- a rOtuLi é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos e a secreção de IL-6 e TNF- α .
- mutações pontuais de aminoácidos resultam em mudança estrutural significativa da OtuLi o que pode explicar a sua redução/perda de atividade.



PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

O estabelecimento de uma linhagem de *L. infantum* com a expressão constitutiva da OtuLi fusionada a um peptídeo representa uma grande ferramenta para o estudo desta enzima no parasito. Para isso, as seguintes etapas estão previstas:

- avaliar a infectividade das novas linhagens em macrófagos;

- comparar a expressão de OtuLi entre promastigotas e amastigotas por Western blot e imunofluorescência;

- identificar possíveis proteínas-substratos de OtuLi por meio de imunoprecipitação do extrato dos parasitos ou de macrófagos infectados com anticorpo anti-FLAG e análise por espectrometria de massas de alta performance. E, posteriormente, validar a interação com estes ligantes.

- avaliar o papel funcional da OtuLi para o parasito por meio de nocaute do seu gene usando o sistema CRISPR/Cas9, já estabelecido para *Leishmania* e já utilizado em nosso grupo de pesquisa.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- ALCOLEA, P. J. et al. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 31, 2010.
- ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 12, p. 6794–6801, 1998.
- ALTUN, M. et al. The human otubain2-ubiquitin structure provides insights into the cleavage specificity of poly-ubiquitin-linkages. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, 2015.
- ALVAR, J. et al. **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence** **PLoS ONE**, 2012.
- AZEVEDO, C. S. **Caracterização molecular da otubaina, uma deubiquitinase de *Leishmania chagasi***. 47p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia). Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, 2014.
- BANULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. **Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans** **Advances in Parasitology**, 2007.
- BAILEY-ELKIN, B. A. et al. Viral OTU Deubiquitinases: A Structural and Functional Comparison. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 1–6, 2014.
- BALAKIREV, M. Y. et al. Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. **EMBO reports**, v. 4, n. 5, p. 517–22, maio 2003.
- BANGS, J. D. et al. In vitro cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 1, p. 111–117, 2001.
- BASILE, G.; PETICCA, Æ. M. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. p. 273–278, 2009.
- BATES, P. A.; TETLEY, L. **Leishmania mexicana: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH**. **Experimental parasitology**, 1993.
- BECK, A.; VINIK, Y.; ISAAC, R. Otubain 2 is a novel promoter of beta cell survival as revealed by siRNA high-throughput screens of human pancreatic islets. p. 1317–1326, 2013.
- BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, 2013.

BOLHASSANI, A. et al. Fluorescent Leishmania species: Development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 637–645, 2011.

BOZZA, P. T.; MELO, R. C. N.; BANDEIRA-MELO, C. **Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense** *Pharmacology and Therapeutics*, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário terapêutico nacional 2010: Rename 2010/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos**. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. – 1 ed., 5. Reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

BREITLING, R. et al. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. **Protein Expression and Purification**, v. 25, n. 2, p. 209–218, 2002.

BROOKS, D. R. et al. Processing and trafficking of cysteine proteases in *Leishmania mexicana*. **Journal of cell science**, v. 113 (Pt 2, p. 4035–4041, 2000.

BRYSON, K. et al. Overexpression of the natural inhibitor of cysteine peptidases in *Leishmania mexicana* leads to reduced virulence and a Th1 response. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 2971–2978, 2009.

CALVO-ÁLVAREZ, E. et al. Appraisal of a *Leishmania* major Strain Stably Expressing mCherry Fluorescent Protein for Both In Vitro and In Vivo Studies of Potential Drugs and Vaccine against Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, 2012.

CALVO-ÁLVAREZ, E. et al. First Evidence of Intraclonal Genetic Exchange in Trypanosomatids Using Two *Leishmania infantum* Fluorescent Transgenic Clones. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, 2014.

CALVO-ÁLVAREZ, E. et al. Infrared Fluorescent Imaging as a Potent Tool for In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Models of Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, 2015.

CRUZ, A.; BEVERLEY, S. M. Gene replacement in parasitic protozoa. **Nature**, v. 348, n. 6297, p. 171–173, 1990.

CUMMINGS, H. E.; TULADHAR, R.; SATOSKAR, A. R. **Cytokines and their STATs in cutaneous and visceral leishmaniasis** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.

CUPOLILLO, E. et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, v. 16, p. 142–144, 2000.

DAS, L. et al. Successful Therapy of Lethal Murine Visceral Leishmaniasis with Cystatin Involves Up-Regulation of Nitric Oxide and a Favorable T Cell Response. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 4020–4028, 2001.

DAS, P. et al. Protease inhibitors in potential drug development for Leishmaniasis. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 50, n. 5, p. 363–76, 2013.

DISTRITO FEDERAL. Secretaria de Estado de Saúde do DF. Subsecretaria de Vigilância à Saúde. **Informativo Ambiental das Leishmanioses no Distrito Federal**. Boletim anual - 2013. Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde. Disponível em <http://www.saude.df.gov.br/images/Informativos/DIVAL/Informativo_Ambiental__2013_Leishmanioses_EM_PDF.pdf>

_____. Governo do Distrito Federal. **Informativo Epidemiológico das Leishmanioses no Distrito Federal. Diretoria de Vigilância Epidemiológica** Ano 8, nº 1 - Janeiro de 2016. Disponível em <http://www.saude.df.gov.br/images/Informativos/2016/Informativo_Epidemiologico_das_Leishmanioses_no_DF__1_2016.pdf>.

EDELMANN, M. J. et al. Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination. **The Biochemical journal**, v. 418, n. 2, p. 379–90, mar. 2009.

EDELMANN, M. J. et al. Post-translational modification of the deubiquitinating enzyme otubain 1 modulates active RhoA levels and susceptibility to Yersinia invasion. **The FEBS journal**, v. 277, n. 11, p. 2515–30, jun. 2010.

ERNST, R. et al. The otubain YOD1 is a deubiquitinating enzyme that associates with p97 to facilitate protein dislocation from the ER. **Molecular cell**, v. 36, n. 1, p. 28–38, 2009.

FIELD, V. et al. Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008. **BMC infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 330, 2010.

FIGUEIRÊDO, Débora Torres Alves. **Análise funcional preliminar da dipeptidil peptidase 8 e da otubaina de Trypanosoma cruzi por meio de nocaute gênico**. 2013. 113 f., il. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular)—Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

FURTADO, A. R. et al. The chlamydial OTU domain-containing protein ChlaOTU is an early type III secretion effector targeting ubiquitin and NDP52. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 2064–2079, 2013.

GILLECE, P. et al. Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. **Journal of Cell Biology**, v. 147, n. 7, p. 1443–1456, 1999.

GONCHAROV, T. et al. OTUB1 modulates c-IAP1 stability to regulate signalling pathways. **The EMBO Journal**, v. 32, n. 8, p. 1103–1114, 2013.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GUIDO, B.C. **Expressão heretóloga, citolocalização e modelagem molecular da otubaina, uma deubiquitinase predita de *Leishmania chagasi***. 77p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular). Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, 2007.

HANDLER, M. Z. et al. **Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives** *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2015.

HERHAUS, L. et al. Casein kinase 2 (CK2) phosphorylates the deubiquitylase OTUB1 at Ser16 to trigger its nuclear localization. **Science Signaling**, v. 8, n. 372, p. ra35-ra35, 2015.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annual review of biochemistry**, v. 67, p. 425–79, 1998.

HESS, B. et al. GRGMACS 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.

HUNT, P. et al. Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate- and chloroquine-resistant rodent malaria parasites. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 27–40, 2007.

HUTCHINS, A. P. et al. The Repertoires of Ubiquitinating and Deubiquitinating Enzymes in Eukaryotic Genomes. v. 30, n. 5, p. 1172–1187, 2013.

ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 72, 2012.

JAAFARI, M. R. et al. The role of CpG ODN in enhancement of immune response and protection in BALB/c mice immunized with recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) encapsulated in cationic liposome. **Vaccine**, v. 25, n. 32, p. 6107–6117, 2007.

JU, H. L. et al. Characterization of a novel otubain-like cysteine protease of *Cryptosporidium parvum*. **Parasitology International**, v. 63, n. 4, p. 580–583, 2014.

JUANG, Y. C. et al. OTUB1 Co-opts Lys48-Linked Ubiquitin Recognition to Suppress E2 Enzyme Function. **Molecular Cell**, v. 45, n. 3, p. 384–397, 2012.

JURIS, S. J. et al. Identification of otubain 1 as a novel substrate for the *Yersinia* protein kinase using chemical genetics and mass spectrometry. v. 580, p. 179–183, 2006.

KAMISKI, D. M. **Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments** *European Biophysics Journal*, 2014.

KATZ, E. J.; ISASA, M.; CROSAS, B. A new map to understand deubiquitination.

Biochemical Society transactions, v. 38, n. Pt 1, p. 21–28, 2010.

KAWABE, H.; BROSE, N. The role of ubiquitylation in nerve cell development. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 12, n. 5, p. 251–268, 2011.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KING, R. C., STORTO, P. D. The role of out gene in *Drosophila* oogenesis. **Bioessays**, v. 8, p. 18-24, 1988.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 1443–1474, 2012.

KÖRNER, U. et al. Biogenesis of *Leishmania* major-harboring vacuoles in murine dendritic cells. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1305–1312, 2006.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. msw054, 2016.

KUSHNIR, S. et al. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. **Protein Expression and Purification**, v. 42, n. 1, p. 37–46, 2005.

KWAKYE-NUAKO, G. et al. First isolation of a new species of *Leishmania* responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex. **International Journal for Parasitology**, v. 45, n. 11, p. 679–684, 2015.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, n. 5664, p. 595–600, 1978.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The leishmaniasis in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology**. [s.l: s.n.]. p. 120.

LI, S. 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.

LYE, L. F. et al. Retention and Loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, 2010.

MAHMOUDZADEH-NIKNAM, H.; MCKERROW, J. H. *Leishmania tropica*: Cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. **Experimental Parasitology**, v. 106, n. 3–4, p. 158–163, 2004.

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.

MCCONVILLE, M. J. et al. Secretory pathway of trypanosomatid parasites.

Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, v. 66, n. 1, p. 122–154, 2002.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. **Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment** *Qjm*, 2014.

MCKERROW, J. H. et al. Development of protease inhibitors for protozoan infections. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 6, p. 668–72, 2008.

MEHEUS, F. et al. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.

MELO, R. C. N.; DVORAK, A. M. **Lipid body-phagosome interaction in macrophages during infectious diseases: Host defense or pathogen survival strategy?** *PLoS Pathogens*, 2012.

MEULENBERG, C. J. W.; TODOROVIC, V.; CEMAZAR, M. Differential Cellular Effects of Electroporation and Electrochemotherapy in Monolayers of Human Microvascular Endothelial Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

MOTTRAM, J. C. et al. Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 6008–13, 1996.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. **Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*** *Current Opinion in Microbiology*, 2004.

MUNDODI, V.; KUCKNOOR, A. S.; GEDAMU, L. Role of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. **BMC molecular biology**, v. 6, n. 1, p. 3, 2005.

NAKADA, 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. et al. Crystal structure of human otubain 2. **EMBO reports**, v. 5, n. 8, p. 783–788, 2004.

NEUTZNER, M.; NEUTZNER, A. Enzymes of ubiquitination and deubiquitination. **Essays in biochemistry**, v. 52, p. 37–50, 2012.

NGÔ, H. et al. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14687–14692, 1998.

NIJMAN, S. M. B. et al. **A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes** *Cell*, 2005.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113–123, 2016.

OLOBO, J. O. et al. Vaccination of vervet monkeys against cutaneous leishmaniasis

using recombinant *Leishmania* “major surface glycoprotein” (gp63). **Veterinary Parasitology**, v. 60, n. 3–4, p. 199–212, 1995.

PAPADAKI, A. et al. The *Leishmania donovani* histidine acid ecto-phosphatase LdMAcP: insight into its structure and function. **Biochem. J.**, n. February, 2015.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature genetics**, v. 39, n. 7, p. 839–47, 2007.

PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgraduate medical journal**, v. 82, n. 972, p. 649–57, 2006.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–29, 2015.

RABHI, S. et al. Lipid Droplet Formation, Their Localization and Dynamics during *Leishmania* major Macrophage Infection. **Plos One**, v. 11, n. 2, p. e0148640, 2016.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505–510, 2009.

ROBERTS, S. C. The genetic toolbox for *Leishmania* parasites. **Bioengineered bugs**, v. 2, n. 6, p. 320–326, 2011.

ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D.; RAINEY, P. M. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1234–1239, 1995.

ROBINSON, K. A.; BEVERLEY, S. M. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 128, n. 2, p. 217–228, 2003.

RODRIGUES, J. C. F.; GODINHO, J. L. P.; DE SOUZA, W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. **Sub-cellular biochemistry**, v. 74, p. 1–42, 2014.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. **Vaccine**, v. 25, n. 46, p. 7962–7971, 2007.

RONAU, J. A.; BECKMANN, J. F.; HOCHSTRASSER, M. Substrate specificity of the ubiquitin and Ubl proteases. **Cell Research**, v. 26, n. 4, p. 441–456, 2016.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 223, n. 4643, p. 1417–1419, 1984.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–25, 1987.

SELZER, P. M. et al. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 20, p. 11015–11022, 1999.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body

- proteins. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303–10, 2005.
- SOARES, L. et al. Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL. **Nature Immunology**, v. 5, n. 1, p. 45–54, 2004.
- SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139–149, 2004.
- SOROKIN, A V; KIM, E. R.; OVCHINNIKOV, L. P. Proteasome system of protein degradation and processing. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 74, n. 13, p. 1411–42, 2009.
- SUN, X.; CHALLAGUNDLA, K. B. Positive regulation of p53 stability and activity by the deubiquitinating enzyme Otubain 1. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 3, p. 576–592, 2011.
- SUNDAR, S. et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31, n. 4, p. 1104–1107, 2000.
- TURK, B. et al. Regulation of the Activity of Lysosomal Cysteine Proteinases by pH-Induced Inactivation and/or Endogenous Protein Inhibitors, Cystatins. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 376, n. 4, p. 225–230, 1995.
- UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: A morphometric and cytochemical study. **Parasitology Research**, v. 87, n. 2, p. 89–97, 2001.
- VACCHINA, P.; MORALES, M. A. In vitro screening test using *Leishmania* promastigotes stably expressing mCherry protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1825–1828, 2014.
- WANG, T. et al. EVIDENCE FOR BIDENTATE SUBSTRATE BINDING AS THE BASIS FOR THE K48 LINKAGE SPECIFICITY OF OTUBAIN 1. v. 386, n. 4, p. 1011–1023, 2009.
- WIENER, R. et al. E2 ubiquitin-conjugating enzymes regulate the deubiquitinating activity of OTUB1. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 9, p. 1033–9, 2013.
- WOELK, T. et al. The ubiquitination code: a signalling problem. **Cell division**, v. 2, p. 11, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis – Facts and sheets**. . Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. March 2016
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Health Observatory Data Repository**. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHVNUM?lang=en>. 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION & SPECIAL PROGRAMME FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASE. Research priorities for Chagas disease,

human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **Technical Report Series** n. 975. 2012.

XU, P. et al. Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. **Cell**, v. 137, n. 1, p. 133–145, 2009.

YAO, C. Major surface protease of trypanosomatids: One size fits all? **Infection and Immunity**, 2010.