



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB

FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE

FARMÁCIA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA OTUBAÍNA, UMA DEUBIQUITINASE
DE *Leishmania chagasi***

CLÊNIA DOS SANTOS AZEVEDO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. FLÁVIA NADER MOTTA

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. IZABELA MARQUES DOURADO BASTOS
CHARNEAU

BRASÍLIA

2014

CLÊNIA DOS SANTOS AZEVEDO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA OTUBAÍNA, UMA DEUBIQUITINASE
DE *Leishmania chagasi***

Monografia de Graduação submetida à Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. FLÁVIA NADER MOTTA

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. IZABELA MARQUES DOURADO BASTOS
CHARNEAU

BRASÍLIA

2014

Nome: AZEVEDO, Clênia dos Santos

Título: Caracterização molecular da otubaína, uma deubiquitinase de *Leishmania chagasi*

Monografia de Graduação submetida à Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovada em: 24/06/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

Instituição: Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília

Profa. Dra. Flávia Nader Motta

Instituição: Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília

Prof. Dr Hugo de Almeida Silva

Instituição: Instituto de Biologia, Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Às Profas. Dras. Izabela Marques Dourado Bastos e Flávia Nader Motta pela orientação neste trabalho e nesses anos todos de graduação. Obrigada por terem aberto as portas do LIPH quando ainda estava no primeiro semestre e acreditado no meu potencial. Obrigada por todas as exigências e pelo exemplo de excelência acadêmica!

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

Ao Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau e à Prof. Dra. Carla Nunes por sempre se mostrarem tão prestativos. Obrigada por contribuírem indescritivelmente para minha formação. Grande parte do que sei hoje sobre Parasitologia devo a vocês!

À “velha guarda” do LIPH, André Corrêa, Brina Portugal, Hugo Almeida, Isabel Sousa, Keyla Almeida, Paula Beatriz, Tiago Gastardelo e Viviane Fragoso pela receptividade quando entrei no laboratório, sempre dedicados em me ensinar da melhor forma possível. Obrigada por toda paciência! Agradeço também às grandes amigadas que conquistei no laboratório, Cinthia Bonatto e Janaína Almeida, pela companhia e pelo apoio, ainda que mais distantes agora.

À Bruna Guido, por toda amizade e disposição em me ajudar sempre que precisei. Obrigada por compartilhar comigo todos os ensinamentos do seu mestrado. Sem isso, não teria conseguido dar continuidade ao trabalho da OTULc. Sou muito grata!

À Raquel Negreiros pelos conselhos durante todos esses anos, pelo companheirismo e pelo exemplo de dedicação. Aprendi muito em sua companhia!

Aos meus companheiros de bancada, Camila Lasse, Graziella Figueiredo, Marta Rosa, Tatiana Giraldo e Iracyara Sampaio, pelos momentos de descontração e pela ajuda diária!

À Cissé Sow pela disposição em compartilhar tudo que sabe e por toda contribuição nesse último ano!

À Rauciane Gomes e ao Jhonata Pereira, meus queridos companheiros do laboratório e da FCE. Obrigada por compartilharem dos momentos de angústia,

indecisões e felicidade durante nossa graduação. Além disso, muito obrigada, Jhonata, por me ajudar no desenvolvimento do projeto da OTULc.

Aos colegas do LQBP pela disponibilidade quando precisei e pelo alto astral contagiante.

Aos meus professores de graduação que também me serviram de inspiração e que me despertaram o querer de ser uma farmacêutica decente e competente, mesmo sabendo que isto seja um processo árduo e constante. Obrigada, em especial, à Profa. Dra. Larissa Matos e ao Prof. Dr. José Eduardo Pandóssio.

Ao meu pai, Cláudio Azevedo, e à minha mãe, Maria da Paz Azevedo, pelo exemplo constante de luta e de dignidade. Obrigada por se dedicarem incondicionalmente à nossa família. Todo o esforço e amor de vocês é o que me move adiante, sempre!

Aos meus irmãos incríveis, Dinho e Aninha, por todo o amor, por todo carinho e por toda dedicação. Obrigada por sempre cuidar de mim sem medir esforços. Vocês são o presente mais sublime que posso ter na vida.

Ao meu sobrinho, Johnny Azevedo, por todo o companheirismo nesses 18 anos, pelo amor e pelo empenho em me deixar feliz nos dias cansativos. Enzo Azevedo, Sophia Amorim e Olívia Amorim, obrigada pelo estímulo de me fazer querer ser um ser humano melhor diariamente. Tia Cleninha ama vocês!

Ao Brenno Henrique por estar comigo nessa caminhada longa, por vezes difícil. Sua companhia, amizade e amor fizeram minha vida incrível nesses 6 anos. Obrigada por ser a melhor coisa que levarei dessa graduação para a minha vida, meu farmacêutico!

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

But we must not forget that when radium was discovered no one knew that it would prove useful in hospitals. The work was one of pure science. And this is a proof that scientific work must not be considered from the point of view of the direct usefulness of it. It must be done for itself, for the beauty of science, and then there is always the chance that a scientific discovery may become like the radium a benefit for humanity.

Marie Curie

RESUMO

O gênero *Leishmania* representa um grupo de protozoários intracelulares que são agentes etiológicos de doenças infecciosas chamadas leishmanioses. Esse espectro de doenças possui tratamento ineficiente com sérios efeitos adversos. Nosso grupo de estudo busca a identificação de potenciais alvos de drogas para a quimioterapia de doenças negligenciadas, entre elas a leishmaniose, focando principalmente nas proteases. A sinalização de proteínas para degradação via proteassoma 26S ocorre quando cadeias de ubiquitina (Ub) são conjugadas por Ub-ligases. Ub-hidrolases (enzimas de deubiquitinação - DUBs) atuam na remoção da Ub. Estas enzimas possuem importante participação na modulação da resposta imune, como a otubaína, a primeira DUB relacionada à regulação da anergia de linfócitos T. Este trabalho apresenta a caracterização enzimática da enzima recombinante otubaína de *Leishmania chagasi* (rOTULc) e sua localização no parasito. A recombinante WT e os mutantes F82S/F182S/L265P, F82S/L265P e L265P foram testados com tetra ubiquitina ligada por K48 ou K63. A rOTULc demonstrou clivar tetra ubiquitina ligada por K48 e parcialmente ligada por K63. O mutante L265P demonstrou atividade reduzida na tetra ubiquitina ligada por K48. Os mutantes F82S/F182S/L265P e F82S/L265P não clivaram ambos substratos. A imunofluorescência da OTULc demonstrou um padrão vesicular, ao longo do parasito. Ademais, otubaína não colocalizou com a catepsina-B, uma protease lisossomal, na forma promastigota. Os achados mostram que a rOTULc cliva preferencialmente tetra ubiquitina ligada por K48, uma ligação associada a degradação proteica pelo proteassoma 26S, sugerindo um envolvimento na preservação de proteínas evitando sua degradação.

PALAVRAS-CHAVES: deubiquitinação, *Leishmania chagasi*, otubaína, atividade enzimática

ABSTRACT

The genus *Leishmania* represents a group of intracellular protozoan that are the etiological agents of the infectious diseases called leishmaniasis. This spectrum of diseases has ineffective treatment with serious adverse effects. Our research group aims to identify potential drug targets for chemotherapy of neglected diseases, as leishmaniasis, focusing especially on proteases. The signaling of proteins for degradation by the 26S proteasome occurs when ubiquitin (Ub) chains are conjugated by Ub-ligases. Ub-hydrolases (deubiquitylating enzymes - DUBs) perform the removal of Ub. These enzymes have important mechanisms in the modulation of immune response, like otubain, the first DUB related to the regulation of the anergy in T cells. This work presents the enzymatic characterization of the recombinant otubain from *Leishmania chagasi* (rOTULc) and its localization within the parasite. The recombinant WT and the F82S/F182S/L265P, F82S/L265P and L265P mutants were assayed on K48- or K63-linked tetra ubiquitin. The rOTULc is shown to cleave K48-linked Ub and partially K63-linked. The L265P mutant showed only reduced activity on K48-linked Ub. The F82S/F182S/L265P and F82S/L265P mutants did not cleave either substrates. The immunofluorescence of OTULc showed a vesicular pattern, along the parasite. Besides, otubain did not colocalized with cathepsin-B, a lysosomal protease, in promastigote form. The findings show that rOTULc cleaves preferentially tetra K48-linked Ub, a linkage associated to protein degradation by 26S proteasome suggesting an involvement in proteins rescuing by avoiding their degradation

KEYWORDS: deubiquitination, *Leishmania chagasi*, otubain, enzymatic activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida das espécies patogênicas de <i>Leishmania</i>	15
Figura 2 - Processo de ubiquitinação.....	23
Figura 3 - Regulação de processos celulares pela ubiquitinação.....	24
Figura 4 - Alinhamento das sequências de otubáina de diferentes organismos.....	33
Figura 5 - Variantes da OTULc com mutações pontuais perto do sítio ativo.....	34
Figura 6 - Ensaio eletroforético da indução das enzimas recombinantes....	35
Figura 7 - <i>Western blot</i> da rOTULc e da OTULc nativa.....	36
Figura 8 - Efeito das mutações na atividade deubiquitinante da OTULc.....	37
Figura 9 - Atividade deubiquinante da OTULc durante 5 horas e inibição por E-64.....	38
Figura 7 - Citolocalização da OTULc em forma promastigota de <i>L. chagasi</i> ..	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	7-amino-4-metil-cumarina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
DAPI	4'6-diamidino-2-phenilyndole
DUB	Enzima de deubiquitinação
E-64	L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano
kDa	Kilodalton
K48-Ub4	Tetra ubiquitina ligada pela lisina 48
K63-Ub4	Tetra ubiquitina ligada pela lisina 63
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
NaCl	Cloreto de sódio
NBT	Nitro-azul-tetrazólico
NTD	Doença Tropical Negligenciada
PBS	Phosphate Buffered Saline
rOTULc	Otubaína recombinante de <i>Leishmania chagasi</i>
SDS/PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
WHO/OMS	World Health Organization/Organização Mundial de Saúde

LISTA DE AMINOÁCIDOS

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

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
LEISHMANIOSES	13
LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA	16
LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA.....	16
LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA.....	16
LEISHMANIOSE VISCERAL	17
LEISHMANIOSE NO BRASIL E NO DISTRITO FEDERAL.....	17
PATOGENIA	19
TRATAMENTO.....	20
DEUBIQUITINAÇÃO	22
OTUBAÍNA.....	25
JUSTIFICATIVA	27
OBJETIVOS	28
METODOLOGIA	29
ALINHAMENTO MÚLTIPLO DA OTULC	29
ANÁLISE DOS AMINOÁCIDOS SUBSTITUÍDOS NO MODELO TRIDIMENSIONAL DA OTULC	29
CULTURA DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. CHAGASI</i>	29
CULTURA AXÊNICA DAS FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>L. CHAGASI</i>	29
EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS ENZIMAS RECOMBINANTES	29
PREPARO DO EXTRATO SOLÚVEL E INSOLÚVEL DE PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE <i>L. CHAGASI</i>	30
ENSAIO ELETROFORÉTICO	30
WESTERN BLOT	31
IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	31
ENSAIO ENZIMÁTICO DE DEUBIQUITINAÇÃO	32
RESULTADOS	33
IDENTIDADE DAS SEQUÊNCIAS DE OTUBAÍNA ENTRE DIFERENTES ORGANISMOS COM <i>L. CHAGASI</i>	33
EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS OTULC	34
ATIVIDADE DEUBIQUITINANTE DA OTULC E SUAS VARIANTES	36
LOCALIZAÇÃO DA OTUBAÍNA DE <i>L. CHAGASI</i> EM FORMAS PROMASTIGOTAS	38
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

INTRODUÇÃO

Leishmanioses

As leishmanioses compõe um grupo de doenças causadas por parasitos intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania* que atingem humanos e outros animais. Pertecem à família *Trypanosomatidae* e à ordem Kinetoplastida, caracterizada pela presença de um cinetoplasto rico em DNA mitocondrial. É sabido que pelo menos 21 espécies representam os agentes etiológicos dessas doenças, transmitidas pela fêmea de aproximadamente 30 espécies de hematófagos do gênero *Phlebotomus*, na África e Europa, e *Lutzomyia*, nas Américas (WHO, 2013).

Os primeiros relatos dessas doenças datam do final do século XIX, por meio da observação de David D. Cunningham em feridas de pacientes indianos, atribuindo-as a fungos. Em 1903, William Leishman descreveu corpos intracelulares em tecido de órgãos viscerais de paciente indianos e sugeriu que eram relacionados aos tripanossomatídeos (LEISHMAN, 1903). Sabe-se, porém, que as leishmanioses acometem seres humanos há muito tempo, uma vez que já foi relatado a presença de DNA de *Leishmania donovani* em múmias egípcias de 4 mil anos atrás (ZINK et al, 2006).

Embora haja o acometimento de indivíduos pelos parasitos causadores de leishmanioses há alguns milênios, ainda hoje estas doenças são consideradas graves problemas de saúde pública e, por isso, estão na lista das 17 doenças negligenciadas da Organização Mundial da Saúde, ao lado de outras 2 doenças causadas por tripanossomatídeos, como doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e doença do sono (*Trypanosoma brucei*) (WHO, 2012). Assim, as leishmanioses afetam em grande parte a população pobre e marginalizada, sendo endêmica em 98 países, estimando-se aproximadamente 2 milhões de novos casos, 20.000 óbitos todos os anos e 350 milhões de pessoas com o risco de contraírem um dos tipos dessas doenças atualmente no mundo (WHO, 2010).

As leishmanias são organismos digenéticos e estão presentes no hospedeiro invertebrado (flebotomíneos) em formas promastigotas, que possuem flagelo, e nos

hospedeiros vertebrados (humanos e outros mamíferos) em formas amastigotas, que possuem o flagelo internalizado (HERWALDT, 1999).

Este gênero é dividido em 3 subgêneros: *Leishmania (Leishmania)*, *Leishmania (Viannia)* e *Leishmania (Sauroleishmania)*, sendo a classificação baseada no tropismo do parasito por diferentes partes do intestino do vetor. Na *Leishmania (Leishmania)*, as formas promastigotas metacíclicas migram para o intestino médio e probóscide. Entretanto, no subgênero *Leishmania (Viannia)* estes parasitos se direcionam para a região pilórica do intestino posterior. Já a *Leishmania (Sauroleishmania)* é uma espécie não patogênica ao homem e seu desenvolvimento ocorre no intestino posterior (BATES, 2007; BESTEIRO et al., 2007).

De modo geral, os flebotomíneos obtêm os parasitos durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado. No momento que os flebotomíneos introduzem seu aparelho bucal na pele do hospedeiro infectado, as formas amastigotas ali presentes são adquiridas e o aumento do pH e a diminuição de temperatura no intestino do vetor ativa a diferenciação do parasito da forma amastigota para a forma promastigota procíclica que é fracamente móvel, altamente multiplicativa e não infectiva. Com o tempo, a taxa de replicação é diminuída e ocorre a metaciclogênese, que corresponde à diferenciação da promastigota procíclica em promastigota metacíclica. Esta última forma, mais alongada e altamente móvel, é infectiva para os hospedeiros mamíferos e pouco replicativa. Além disso, possui a capacidade de migrar para o intestino médio e probóscide do vetor, pronto para ser transmitidos através do repasto sanguíneo. Assim, quando acontece a transmissão dessas formas na pele do hospedeiro pelo vetor, ocorre a quimiotaxia para recrutamento de células fagocíticas, como o macrófago, que internaliza o parasito, formando o vacúolo parasitoforo. Este ambiente possui características lisossomais (pH baixo e elevada concentração de CO₂) favorecendo a diferenciação de promastigota em amastigota. No interior da célula fagocítica, as formas amastigotas se replicam, até que a membrana da célula é rompida e ocorre o extravasamento do parasito, recrutando novas células para a fagocitose e, assim, levando a diante a infecção. Quando o hospedeiro invertebrado ingere formas amastigotas do hospedeiro vertebrado infectado, um novo ciclo se inicia (Fig. 1).

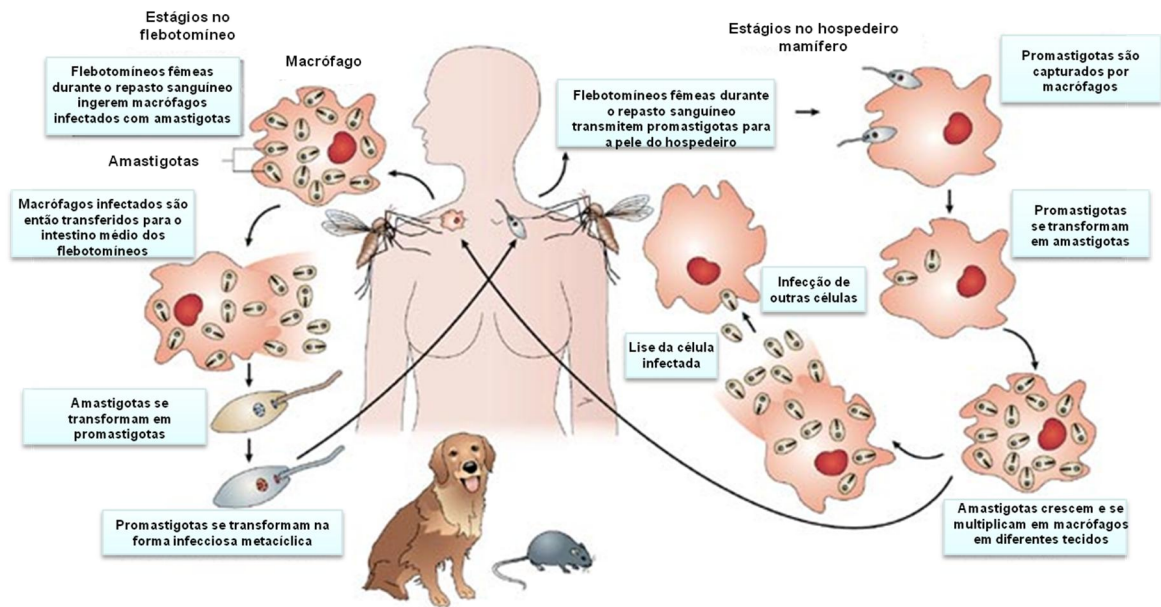


Figura 1 Ciclo de vida das espécies patogênicas de *Leishmania*. As formas amastigotas se desenvolvem nos hospedeiros mamíferos e são fagocitadas por células do sistema imune, principalmente macrófagos, onde se multiplicam. Quando a fêmea do flebotomíneo alimenta-se do sangue de um hospedeiro mamífero, ela se infecta com a forma amastigota que sofre diferenciação tornando-se promastigota. Então, as formas promastigotas, após metaciclogênese, reproduzem-se no trato digestivo do inseto que, posteriormente, serão transmitidas pela picada da fêmea do flebotomíneo em um novo hospedeiro, diferenciando-se em amastigotas, completando o ciclo evolutivo do parasito. Adaptado de LIPOLDOVA & DEMANT (2006).

As manifestações clínicas são diversas e dependentes do tipo de leishmaniose que o indivíduo desenvolve, sendo o quadro clínico diferenciado em leishmaniose cutânea (localizada ou difusa), mucocutânea ou visceral. Respectivamente, estas patologias possuem como principais características clínicas as lesões ulcerativas na pele, inflamação destrutiva nas mucosas e infecção visceral disseminada, (HERWALDT, 1999). O quadro que será desenvolvido pelo indivíduo infectado é dependente da espécie pela qual ele foi acometido. Entretanto, demonstrou-se que outros fatores podem ser igualmente determinantes, como o estado nutricional e perfil genotípico do infectado. Inclusive, os sintomas, entre indivíduos infectados pela mesma espécie, também não seguem padronização. Apesar de não haver esclarecimentos sobre esse comportamento atípico, é sabido que alterações gênicas do hospedeiro podem estar envolvidas nesse processo (LIPOLDOVA; DEMANT, 2006).

Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)

A espécie mais importante clinicamente nesta forma da doença é a *L. (V.) braziliensis*, apesar de que qualquer espécie do subgênero *Viannia* e *Leishmania* está apta a provocar o desenvolvimento de LCL. O primeiro sinal após a picada do flebotomíneo é o aparecimento de uma pápula no local de inoculação que pode evoluir para uma ulceração e, na maioria dos casos, perdura entre 3 a 18 meses até seu desaparecimento, deixando uma ferida com alteração de pigmento. É possível o surgimento de nódulos subcutâneos indolores nas proximidades da úlcera formada devido à propagação pelos linfonodos locais (CHOI & LERNER, 2001). Infecções desenvolvidas em LCL podem evoluir para leishmaniose mucocutânea (LMC) ou para leishmaniose cutânea difusa (LCD), caso o sistema imunológico do hospedeiro não consiga controlar a LCL (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Leishmaniose Mucocutânea (LMC)

O desenvolvimento de LMC é comumente associado a uma LCL não tratada em que as ulcerações apresentadas desapareceram por si só, apesar de ser possível o aparecimento de lesões cutâneas e nas mucosas sem histórico prévio de LCL (SILVEIRA et al., 2004). Desta forma, *L. (V.) braziliensis* se mostra como o principal agente etiológico desta forma da doença, sendo também atribuída, na América Central, a espécie *Leishmania panamensis* (CHOI & LERNER, 2001). A sintomatologia se apresenta, inicialmente, com a inflamação e consequente necrose do septo nasal, evoluindo para a cavidade oral e faringe. Desnutrição devido à dificuldade de deglutição e infecções secundárias, como pneumonia, são causas associadas aos óbitos por LMC (CHOI & LERNER, 2001; PISCOPO; MALLIA, 2006).

Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)

A LCD é decorrente de uma resposta celular hipossensível (anérgica) à LCL. É uma forma rara do Novo Mundo causada por *L. amazonensis*, sendo também já descrita no Leste da África por *L. aethiopica* (CHOI & LERNER, 2001). Ocorrem lesões cutâneas que se disseminam pela face e outras áreas da pele. Neste caso, as lesões não são ulcerativas e possuem alta quantidade de parasitos na forma amastigota

(SILVEIRA et al., 2004). Geralmente não se propaga para os órgãos viscerais, porém a LCD responde pouco aos antimoniais pentavalente, primeira linha de tratamento das leishmanioses (PISCOPO; MALLIA, 2006).

Leishmaniose Visceral (LV)

A LV, também chamada de calazar, é uma forma sistêmica que atinge órgãos viscerais causada por *L. infantum* e *L. donovani*. O período de incubação é de 3 a 8 meses e os sinais e sintomas são geralmente febre, pancitopenia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e pode se manifestar inicialmente como uma pápula eritematosa, que raramente é percebida. A VL pode ser fatal se não tratada e, devido à depressão da imunidade celular, aumenta a predisposição a infecções secundárias (CHOI & LERNER, 2001). É possível que a LV seja assintomática ou até mesmo auto-curável, entretanto, na maioria dos casos, a doença evolui para um quadro crônico sintomático. No leste da África e na Índia, regiões endêmicas por *L. donovani*, aproximadamente 50% dos acometidos por LV, após recuperação, desenvolvem uma forma da doença chamada leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), caracterizada por máculas hipopigmentadas ou eritematosas que se desenvolvem no rosto espalhando-se pelo corpo (WHO, 2010). Esta complicação requer períodos longos de tratamento sistêmico medicamentoso e, geralmente, as áreas hipopigmentadas não retraem (CHOI & LERNER, 2001).

Leishmanioses no Brasil e no Distrito Federal

As leishmanioses, antes tratadas como doenças rurais, encontram-se em um grande processo de disseminação ao longo das décadas para áreas urbanas e periurbanas. Este fato não é uma verdade apenas no Brasil, mas também em outros países, levando a surtos em países não endêmicos da Europa e crescente propagação em países endêmicos. Podem-se relatar dois grandes processos iniciados na década de 80 que contribuíram para esta mudança de cenário epidemiológico: (1) a alta adaptação do vetor que transmite essas doenças (*Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi*) a regiões mais urbanizadas e (2) o grande processo migratório das populações rurais

devido à fome e à seca levando indivíduos e cachorros infectados para essas novas regiões (HARHAY et al., 2011).

As formas de leishmaniose tegumentar americana (LTA) representam grande importância dermatológica no Brasil, provocando profundas deformidades nos indivíduos acometidos pelas doenças, refletindo nas áreas sociais e psicológicas. A média anual de casos autóctones no Brasil de LTA é de 28.568 e em 2005 foi confirmada a presença de casos de LTA em todas as Unidades Federativas do Brasil (BRASIL, 2010a).

A grande maioria dos casos de leishmaniose visceral (LV) estão concentradas em um grupo de 6 países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil, sendo que 90% dos casos conhecidos nas Américas ocorrem no Brasil. Desde os anos 80 até meados de 2005, aproximadamente 60 mil casos de LV foram registrados e grande parte desses casos era na região Nordeste (HARHAY et al., 2011). Entretanto, com a propagação supracitada em todos os estados brasileiros, este quadro vem sofrendo alterações, sendo contabilizada no período de 2000 a 2002 uma redução de aproximadamente 14% casos na região Nordeste (BRASIL, 2006).

Considerando dados dos últimos 10 anos a respeito da LV, 3.156 casos representam a média anual do Brasil, levando a incidência a 2 casos a cada 100.000 habitantes. Grande parte dos afetados são crianças e 41% dos casos registrados são em crianças menores de 5 anos. As crianças estão mais suscetíveis devido à maior exposição ao vetor e à imaturidade do sistema imune celular agravado pela desnutrição, fator constante nas áreas endêmicas (BRASIL, 2006).

Devido à instalação da ação de vigilância entomológica em 2004, foi possível o mapeamento das espécies de flebotomíneos e consequente determinação das áreas de risco de leishmanioses no Distrito Federal. Neste mesmo ano, foi identificado, em São Sebastião, o flebotomíneo capaz de transmitir leishmaniose visceral, *L. longipalpis*. No ano seguinte, em 2005, foi registrado o primeiro caso de leishmaniose visceral autóctone do DF. Até 2013, foram identificadas outras 4 espécies de flebotomíneos, *L. whitmani*, *L. intermedia*, *L. neivai* e *L. flaviscutelata*, aptas a transmitir o protozoário causador da leishmaniose tegumentar americana (DISTRITO FEDERAL, 2013a).

As áreas de risco para LTA e LV são as regiões rurais e aquelas que estão passando por processos de urbanização. Geralmente, são áreas com vegetação preservada ou remanescente, porém, o principal vetor do DF, *L. whitmani*, também já foi identificado em áreas urbanizadas como Lago Norte, Lago Sul e Sobradinho. Em 2012, foram confirmados 38 casos de LV e 51 casos de LTA no DF, sendo desses 7 e 5 casos autóctones, respectivamente (DISTRITO FEDERAL, 2013a; DISTRITO FEDERAL, 2013b).

Patogenia

No momento da picada do inseto hematófago, além da laceração dos vasos sanguíneos causada pela introdução do aparelho bucal na pele, as moléculas presentes na saliva também auxiliam na entrada dos promastigotas naquele novo ambiente. Agentes vasodilatadores presentes na saliva possibilitam que a probóscide atinja a epiderme. Assim, o sistema imune do hospedeiro, como resposta, realiza a ativação de células fagocíticas, sistema complemento, anticorpos, plaquetas e trombina contra as moléculas farmacológicas presentes na saliva do inseto, como prostaglandinas, apirase, fator de ligação à interleucina 2, adenosina, entre outras (DE ALMEIDA et al., 2003). Alguns fatores de virulência são de fundamental importância para a entrada bem sucedida das formas promastigotas nas células fagocíticas, como o lipofosfoglicano, capaz de interferir na atividade de macrófagos e células dendríticas e a GP63, uma metaloprotease presente na superfície da membrana da forma promastigota, que é capaz de protegê-lo da ação do sistema complemento, prevenindo a lise do parasito, que então é capaz de adentrar os macrófagos (MURRAY et al., 2005).

Após a internalização das formas promastigotas pelas células fagocíticas (principalmente macrófagos e células dendríticas) e metaciclogênese no fagolisossomo, a resposta imune pelo hospedeiro é mediada por células. Os macrófagos começam a produzir radicais livres em resposta ao interferon gama (IFN- γ) liberado pelos linfócitos T auxiliar ativados, a fim de promover a morte do agente. A indução de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pela *Leishmania* nos macrófagos potencializa esta produção de IFN- γ , o que é um estímulo para a ativação de mais macrófagos. Em contrapartida,

também há a produção de fator de crescimento beta (TGF- β) que inibe o IFN- γ e, com isso, impede a ativação dos macrófagos. Há também a inibição de IL-12, impedindo a ativação da resposta protetora por T_H1 (CUMMINGS et al., 2010). Além disso, os parasitos, uma vez presentes no interior dos macrófagos, interferem na apresentação dos antígenos o que pode modular o caminho da doença. É sabido que o controle da doença é determinado pela sobreposição de uma resposta T_H1 à resposta T_H2 (BRASIL, 2010a).

Tratamento

A primeira tentativa bem sucedida no tratamento das leishmanioses ocorreu em 1912, quando Gaspar Vianna utilizou uma formulação com antimônio trivalente, Sb(III), na quimioterapia de LTA. Em 1922, Bramachari sugeriu o uso de ureia estibamina, o primeiro antimônio pentavalente, uma forma menos tóxica em comparação aos trivalentes. Desde então, os antimônios pentavalentes, Sb(V), são a primeira linha de escolha no tratamento das leishmanioses (WHO, 2010). Os antimônios pentavalentes são pró-fármacos, ou seja, eles são convertidos a uma forma biológica ativa, o antimônio trivalente, no organismo através do sistema glutatona. O efeito leishmanicida dos antimônios sugere estar envolvido na glicólise, no balanço tripanotona e na atividade da DNA topoisomerase tipo I (KOBETS et al., 2012).

Atualmente, duas formulações de antimônio pentavalente são utilizadas: o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio. Ambos são quimicamente similares, sendo o antimoniato de N-metilglucamina menos tóxico por possuir menor porcentagem de Sb(V) na formulação (WHO, 2010). O estibogluconato de sódio não é comercializado no Brasil. Apesar de ser o tratamento de primeira escolha para todas as formas de leishmanioses, os antimônios pentavalentes devem ser utilizados com cautela nas formas mucosas, apresentando resposta lenta ao medicamento e recidivas (BRASIL, 2010a). Esses medicamentos são administrados pelas vias intramuscular ou intravenosa por infusão, ou ainda intralesional, no caso da LC, sendo a duração média do tratamento de 30 dias (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). A formulação oral é ineficiente, provavelmente devido à baixa lipossolubilidade do

fármaco, dificultando sua absorção (KEDZIERSKI et al., 2009). No entanto, já é observado um aumento na resistência dos parasitos aos antimoniais. Na Índia, o uso destes medicamentos foi abandonado dado à resistência adquirida por *L. donovani* e uma queda na taxa de cura de 50%. Outro fator desfavorável ao uso dos antimoniais são seus efeitos adversos dose-limitante, que incluem efeitos cardiotóxicos como arritmias, prolongamento Q-T, morte súbita, além de efeitos nefrotóxicos, hepatite, artralgia, mialgia, náuseas e vômito (KOBETS et al., 2012).

O medicamento de segunda escolha é a (desoxicolato) anfotericina B, utilizada no caso de falha aos antimoniais pentavalentes, no tratamento de pacientes gestantes e, principalmente, nos casos de leishmanioses visceral e mucocutânea. A anfotericina B é um antibiótico da classe dos macrolídeos, isolada do *Streptomyces nodosus* nos anos 60. Seu mecanismo de ação provém da formação de poros na membrana do parasito através de sua afinidade pelo ergosterol, componente da membrana plasmática do parasito, aumentando sua permeabilidade e ocasionando a morte da *Leishmania*. Graves efeitos colaterais, como nefrotoxicidade, hipocalcemia e anafilaxia estão associados ao uso da anfotericina B. O desenvolvimento de uma formulação lipossomal teve como objetivo obter a mesma eficácia, porém com um nível de toxicidade menor, graças à captação preferencial por células reticuloendoteliais (KOBETS et al., 2012). O maior fator limitante da anfotericina B lipossomal é seu alto custo. A administração desses medicamentos é injetável e, geralmente, é restrita ao uso hospitalar (BRASIL, 2010a).

A terceira linha de tratamento utilizada no Brasil e recomendada pela Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) é a pentamidina, utilizada no insucesso das outras duas linhas de tratamento e no caso de LC por *L. guyanensis* (BRASIL, 2010b). A pentamidina promove a morte do parasito por meio de sua ligação às sequências AT do DNA do cinetoplasto. A formulação disponível no Brasil é o isetonato de pentamidina e sua administração é intramuscular ou, preferencialmente, intravenosa. Entre os efeitos colaterais da pentamidina estão nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, indução de estado de diabetes mellitus e hipoglicemia. Por isso, na Índia, o uso deste medicamento foi totalmente abandonado, porém, ele ainda é utilizado

nas Américas e, por recomendação da OMS apenas quando nenhum outro medicamento estiver disponível (KOBETS et al., 2012).

Considerando o cenário da quimioterapia para leishmanioses, torna-se evidente a necessidade de novos alvos terapêuticos, culminando em novas formulações farmacêuticas que sejam eficazes e que ofereçam menos efeitos adversos aos pacientes. Assim, o melhor entendimento da biologia celular e molecular do parasito, como a caracterização de moléculas envolvidas em processos pouco elucidados, se faz necessário para o início desta busca por novos alvos.

Deubiquitinação

A ubiquitinação consiste em uma ligação covalente de moléculas de ubiquitina (Ub) a um substrato protéico no intuito de regular as vias de sinalização, seja levando essas proteínas-alvo para degradação por meio do proteassoma ou modificando sua atividade ou localização. Esta modificação pós-traducional é um processo reversível, sendo possível a desconjugação da molécula ou da cadeia de ubiquitina através de enzimas especializadas denominadas enzimas de deubiquitinação (DUB). Ainda que pouco estudadas, as DUBs possuem papel importante na regulação de vários processos, desde a progressão tumoral até a neurodegeneração (NIJMAN et al., 2005).

A ligação covalente, catalisada por uma cascata de enzimas, pode ser feita a uma única molécula de ubiquitina ou a uma cadeia de moléculas de ubiquitinas ligadas por seus resíduos de lisina na porção carboxi-terminal. A ubiquitina é ativada pela enzima E1 (ativadora), por meio do consumo de ATP, para formação de uma ligação tioéster entre o resíduo de cisteína, presente no sítio ativo, com a porção carbóxi-terminal da ubiquitina. Assim, esta ubiquitina é transferida à enzima E2 (conjugadora), novamente através de uma ligação com o resíduo de cisteína do sítio ativo da E2. Então, a catálise da ubiquitinação da proteína-alvo acontece de duas formas, dependendo do tipo da enzima E3 (ligase) (Fig. 2): caso a enzima seja uma ligase do tipo HECT (*homologous to E6AP carboxyl terminus*), a ubiquitina ativa é recebida pela E3, ligando-se covalentemente ao resíduo de cisteína do domínio HECT e, então, transferida para um resíduo de lisina no substrato protéico, que foi previamente

reconhecido pelo domínio específico para as proteínas. Já as ligases do tipo RING finger transferem a ubiquitina diretamente da E2 para a proteína-alvo, sem a necessidade de ligação covalente (KAWABE; BROSE, 2011).

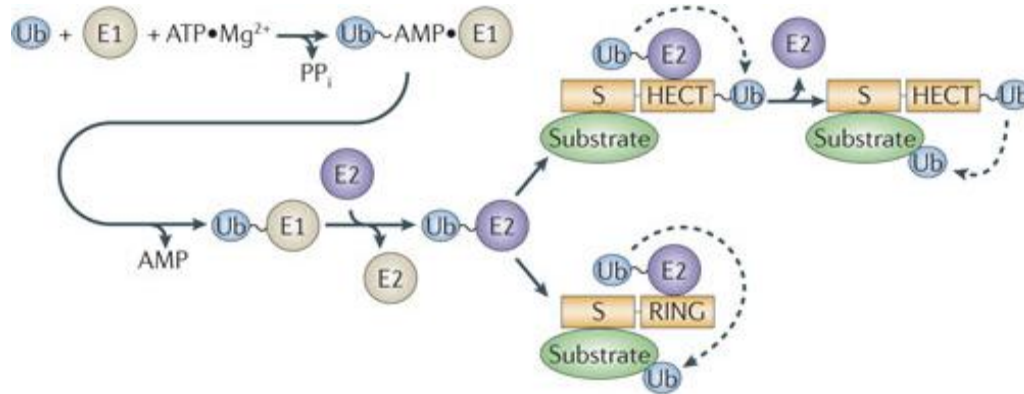


Figura 2. Processo de ubiquitinação. A ubiquitina é ativada pela enzima E1 e transferida à E2. Então, a catálise da ubiquitinação da proteína-alvo acontece de duas formas: a ubiquitina pode ligar-se a ubiquitina-ligase E3 monomérica (HECT) ou o complexo E2-Ub pode se associar à E3 (RING), onde ambos os caminhos levam à ligação da ubiquitina ao substrato protéico. Adaptado de KAWABE; BROSE (2011).

A conjugação de ubiquitina ao substrato pode ser realizada de diferentes formas. A monoubiquitinação consiste na ligação de uma molécula de ubiquitina; a monomultiubiquitinação, na ligação de diferentes moléculas de ubiquitina, cada uma ligada a diferentes sítios do substrato. A poliubiquitinação consiste na ligação de cadeias de ubiquitinas à proteína-alvo. O processo de ligação da ubiquitina ao substrato pode ser feito através de qualquer uma das 7 lisinas presentes na ubiquitina (K6, K11, K27, K29, K33, K48 e K63). Os substratos protéicos poliubiquitinados na lisina 48 representam a grande maioria nas células eucarióticas e, juntamente com a poliubiquitinação na K11, são direcionados para o proteassoma 26S para degradação. As cadeias poliubiquitinadas na lisina 63 medeiam diversas funções não degradativas, como o tráfego de proteínas, interação proteína-proteína e a ativação funcional de fatores de sinalização. A monoubiquitilação também está envolvida em diversos processos celulares não degradativos, como reparo e replicação de DNA e transcrição gênica e regulação da endocitose (Fig. 3). Já a poliubiquitinação a partir de outras lisinas não tem seu papel bem elucidado (HERSHKO; CIECHANOVER, 1998; KAWABE; BROSE, 2011; PONTS et al., 2008).

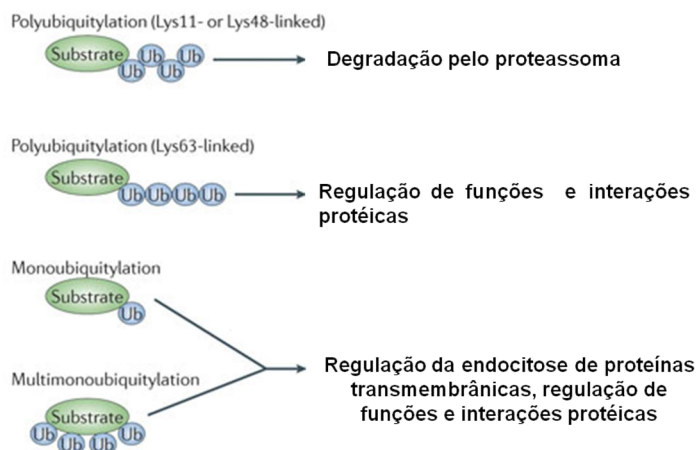


Figura 3. Regulação de processos celulares pela ubiquitinação. A poliubiquitinação pela lisina 48 é uma das ligações mais estudadas no processo de ubiquitinação e geralmente essa modificação está associada à degradação pelo proteassoma. Com o mesmo objetivo, a cadeia ligada pela lisina 11 também marca proteínas para degradação. Já a ligação pela lisina 63 está envolvida com marcação de proteínas que modulam processos não degradativos. A monoubiquitinação e a multimonoubiquitinação também está associada a eventos não degradativos, como a regulação da endocitose de proteínas transmembrânicas. Adaptado de KAWABE; BROSE (2011).

As enzimas de deubiquitinação (DUBs) são proteases que clivam as cadeias de ubiquitinas, antagonizando o processo de ubiquitinação. A maior parte das DUB são cisteíno-proteases, ou seja, sua atividade depende da deprotonação de uma cisteína, adjacente à uma histidina, que é polarizada por um aspartato, formando a tríade catalítica. A catálise ocorre com o ataque nucleofílico da cisteína com do grupo carbonil formado pelo substrato proteico e a ubiquitina, formando, assim, um oxianion. O substrato proteico é liberado e a ubiquitina forma uma ligação covalente com a DUB que, após reação com uma molécula de água, liberará a ubiquitina e a enzima livre. Já nas metalo-proteases, outra classe de DUBs, é utilizado um átomo de zinco, gerando um intermediário com o substrato estabilizado por um aspartato e duas histidinas que é quebrado após a transferência de próton de uma molécula de água, liberando a ubiquitina (NIJMAN et al., 2005).

As DUBs, então, são divididas em 5 famílias: 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) e metalo-enzimas contendo domínio JAB1/PAB1/MPN (JAMMs). A especificidade pelo substrato é determinada por alguns fatores, como os domínios de interação protéica, as cadeias de ubiquitinas ligadas pelas diferentes lisinas, expressão e de localização subcelular (SUN, 2008). Já é sabida a importância da ubiquitinação para a regulação da resposta imune, como a relação das ubiquitinas ligases E3 com o desenvolvimento e a ativação de linfócitos, estabelecimento da tolerância imunológica e funções na imunidade inata.

De modo geral, ubiquitinação na lisina 63 é um mecanismo sinalizador envolvido na ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (LIU; PENNINGER; KARIN, 2005; WERTZ et al., 2004). Ainda que menos estudado, o papel imunorregulatório da deubiquitinação vem sendo evidenciado. Como exemplo, podemos citar a enzima A20, um regulador negativo da inflamação, uma vez que ela degrada as ubiquitinas ligadas a TRAF6 e IKK γ , fatores que quando ubiquitinados ativam uma cascata de fosforilação que resulta na liberação do fator de transcrição NF- κ B responsável pela transcrição de vários genes de citocinas inflamatórias (MAURO et al., 2006; BOONE, 2004). Outro exemplo é a otubaína, uma DUB que tem como substrato a proteína E3 GRAIL, uma proteína relacionada com a anergia de linfócitos (SOARES et al., 2004).

Otubaína

A otubaína (*ovarian tumor domain-containing ubiquitin aldehyde binding protein*) é membro da família de proteases relacionadas ao tumor ovariano (OTUs), a segunda maior família de DUBs nos mamíferos. O primeiro gene desta família foi identificado em *Drosophila melanogaster* na qual regula o desenvolvimento dos ovários. A capacidade da otubaína-1 de ser uma enzima deubiquitinante foi demonstrada por sua habilidade de clivar tetraubiquitina *in vitro*. Já a otubaína-2 de humanos não possui atividade catalítica *in vitro* para isopeptídeos. Apesar da alta homologia entre essas duas sequências, na otubaína-2 há uma extensão da porção carboxi-terminal que sugere estar associada à inibição da atividade catalítica dessa enzima, uma vez que a remoção desses resíduos culminou na atividade da Otu-2 de humano (OtuHs-2) contra

isopeptídeos de ubiquitina. Tanto otubaína-1 quanto a otubaína-2 demonstraram estar presente em diferentes tecidos humanos (BALAKIREV et al., 2003).

Soares *et al.* (2004) conseguiram isolar a otubaína-1 como uma proteína associada à E3 ligase GRAIL. Esta DUB foi a primeira a ser relacionada à regulação da anergia de células T. A anergia é um importante tipo de tolerância periférica que pode ser induzida pela ligação do TCR na ausência de sinais co-estimulatórios. A ligase E3 GRAIL promove a degradação a partir da poliubiquitinação na lisina 48 do GRAIL, proteína expressa por células T reguladoras responsável pela produção de populações de células T reguladoras induzíveis na periferia. A otubaína-1, quando superexpressa, promove a ativação de células T em camundongos (SOARES et al., 2004).

Além disso, a otubaína 1 já foi demonstrada fazer parte de um complexo com o fator de virulência com atividade quinase (YpkA) e com *small GTPase ras homologue gene family member A* (RhoA), onde a otubaína 1 indica função moduladora da RhoA, promovendo sua estabilização e afetando diretamente a susceptibilidade ao processo de invasão da bactéria *Yersinia enterocolitica*. Para que isto ocorra, a otubaína 1 de humanos sofre uma modificação pós-traducional – a fosforilação –, modificação esta que modula sua habilidade em estabilizar RhoA (EDELMAAN et al., 2010).

A otubaína também é capaz de modular processos celulares independente da sua atividade enzimática. Demonstrou-se que a otubaína é capaz de se ligar à E2 ligase UBC13, impedindo a ubiquitinação via lisina 63, independentemente da sua atividade de isopeptidase. A ubiquitinação de cadeias de ubiquitinas ligadas pela lisina 63 é um processo importante para o recrutamento de reparo de DNA em resposta a quebra de dupla fita (*double strand break – DSB*) (SATO et al., 2012).

A deubiquitinação foi primeiramente descrita em tripanosomatídeos através dos estudos iniciais sobre a otubaína de *L. chagasi* (GUIDO, 2011). Neste trabalho, foi padronizado o protocolo para purificação da rOTULc inativa, a produção de anticorpos contra esta enzima recombinante em camundongos BALB/c, além da 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).

JUSTIFICATIVA

As leishmanioses compõem a lista das doenças negligenciadas e são responsáveis por 20.000 mortes por ano no mundo. Um dos grandes problemas para contenção dessas doenças é a disponibilidade de tratamentos farmacológicos inconvenientes. Os antimoniais pentavalentes, por exemplo, foram introduzidos na quimioterapia das leishmanioses em 1940 e perduram até hoje como tratamento de primeira escolha. Entretanto, apresentam efeitos colaterais indesejados e graves, como náuseas, mialgia, artralgia e hepatotoxicidade. A pentamidina e a anfotericina B, quimioterápicos de segunda escolha, também possuem alta toxicidade. Ambas as linhas de tratamento são difíceis de serem administradas, uma vez que suas formulações são parenterais. Isto culmina no abandono do tratamento pelo paciente, já que a população amplamente acometida pertence às regiões rurais com limitada assistência médica (BERMAN, 1997; FREZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). Diante deste cenário, o Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (*Special Programme for Research and Training in Tropical Disease – TDR*), incentivado pela Organização Mundial da Saúde, estabeleceu a pesquisa de novos agentes terapêuticos como uma prioridade científica para doenças tropicais, dentre elas as leishmanioses (WHO, 2012). Assim, investigar mecanismos moleculares que podem interferir no desenvolvimento do parasito, como o estudo de enzimas deubiquitinantes, sugere avanços que possivelmente poderão contribuir para a investigação de novos alvos moleculares.

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi a caracterização molecular parcial da otubaína recombinante de *L. chagasi* (OTULc), para isso foram realizadas as seguintes etapas:

- Análise comparativa da estrutura primária de OtuLc e seus ortólogos;
- Estabelecimento do protocolo para expressão e purificação da OTULc e seus mutantes;
- Avaliação da atividade enzimática da otubaína de *L. chagasi* com substratos de tetra-ubiquitina e
- Avaliação da localização da enzima em formas promastigotas.

METODOLOGIA

Alinhamento Múltiplo da OtuLc

O alinhamento da sequência da proteína otubaína de *L. chagasi* com as sequências da proteína otubaína de *L. braziliensis*, *T. cruzi*, *H. sapiens* e *D. melanogaster* foi realizado com o software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.htm>).

Análise dos aminoácidos substituídos no modelo tridimensional da OTULc

A modelagem molecular foi realizada segundo Guido (2011). O ensaio foi feito no servidor Swiss Model, utilizou como molde a otubaína-1 de *H. sapiens* (2ZFY) cristalizada por Edelmann e colaboradores (2009). As imagens foram geradas e modificadas no programa VDM.

Cultura das formas promastigotas de *L. chagasi*

As formas promastigotas de *L. chagasi* foram cultivadas em meio Schneider (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (SFB) e sulfato de gentamicina (100 µg/ml) a 28°C.

Cultura axênica das formas amastigotas de *L. chagasi*

Formas promastigotas de *L. chagasi* em fase estacionária foram centrifugadas por 10 min a 1000 x *g* e lavadas com PBS estéril. Após remoção do sobrenadante, as células foram reconstituídas em 10 mL de meio M199 (Sigma Aldrich) suplementado com 10% de SFB e incubadas por 3 dias a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

Expressão e purificação das enzimas recombinantes

A rOTULc selvagem e as três formas mutantes (T794C, T794C/T245C e T794C/T245C/T545C) sintetizadas pela empresa *GenScript* foram clonadas no vetor pET19b e transformados em *E. coli* BL21 (DE3). Uma colônia contendo o vetor foi crescida em meio LB suplementado com 50 µg/mL de ampicilina. A expressão das enzimas foi induzida a *Abs*₆₀₀ de 0,6 com 0,1 mM de isopropil-1-β-D-galactopiranosídeo (IPTG) a 16 °C por 5 h ou 16 h sob constante agitação. A cultura de bactérias foi

centrifugada a 3000 x g por 15 minutos e após o sobrenadante descartado, as bactérias foram ressuspensas com binding buffer (0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM imidazol, 0,2% lisozima) ou BugBuster™ (Novagen) para purificação com a resina Agarose-Ni da marca Novagen. Ao tampão, foi adicionado concentração efetiva dos seguintes inibidores de proteases, para evitar a degradação das enzimas recombinantes: 1 µM de pepstatina (inibidor de aspártico protease) e 0,5 mM AEBSF (inibidor de serino protease). A lise das bactérias foi realizada por sonicação (3 ciclos com amplitude entre 40 e 50, pulsos de 7 segundos com intervalos de 1 segundo entre si, por um período de 3 minutos) no gelo e o homogenato foi centrifugado a 16000 x g por 10 minutos. Coluna níquel-agarose *His•Bind® Purification Kit* (Novagen) foi previamente equilibrada e carregada com o sobrenadante (fração solúvel) resultante desse processo, que contém uma das enzimas OTULc recombinantes. A coluna foi lavada com tampão contendo concentrações crescentes de imidazol e as enzimas foram eluídas com 400 mM (OTULc T794C/T245C/T545C) ou 200 mM (para as demais enzimas) de imidazol. As proteínas solúveis purificadas foram analisadas em gel SDS/PAGE (12%) sob condições desnaturantes e redutoras, seguida da coloração do gel com Azul de Coomassie.

Preparo do extrato solúvel e insolúvel de promastigotas e amastigotas de *L. chagasi*

A cultura da forma promastigota e da amastigota de *L. chagasi*, após centrifugação a 5.000 x g por 15 min, foi lavada três vezes com PBS filtrado. O sedimento foi ressuspendido com inibidor de proteases e PBS e congelado e descongelado repetidas vezes a fim de lisar as células. Em seguida, as células lisadas foram centrifugadas a 15.000 x g por 10 min para separar as porções solúvel e insolúvel. O sobrenadante contendo o extrato solúvel foi retirado e o sedimento (extrato insolúvel) foi ressuspendido com PBS em quantidade igual ao resultante do extrato solúvel.

Ensaio eletroforético

O SDS/PAGE foi realizado usando 12% ou 10% de poliacrilamida. Às amostras foi acrescentado tampão de amostra de proteína (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; SDS 2%; β-

mercaptoetanol 5%; Azul de bromofenol 0,08% e Glicerol 30%), e as mesmas foram fervidas por 5 min. Para a eletroforese, utilizou-se tampão de corrida (25 mM Tris; 191 mM Glicina e SDS 0,1%) sob voltagem inicial de 90 V e final de 160 V. Após a eletroforese, o gel foi corado com Azul de Coomassie. Como padrão utilizou-se o marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen).

Western blot

As proteínas solúveis purificadas ou o extrato solúvel e insolúvel de promastigotas de *L. chagasi* foram submetidos a SDS/PAGE. As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Hybond-C Extra*, Amersham) utilizando tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol e 0,1% SDS). Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h PBS/leite desnatado (5%) para o bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens de 5 min com PBS. A membrana foi então incubada com anticorpo primário, sendo este o soro pré-imune ou imune contra otubaína de *L. chagasi* na concentração de 1:200 em PBS/leite 1% durante a noite a 4°C. A seguir, a membrana foi lavada novamente 3x com PBS por 5 min e incubada com o anticorpo secundário anti-IgG α -IgG de camundongo, conjugado à fosfatase alcalina (*Goat Anti-mouse IgG alkaline Phosphatase Conjugate*, Novagen) na concentração de 1:1000. A membrana foi então incubada no tampão da fosfatase alcalina por 10 min e os imunocomplexos formados foram revelados com o substrato da fosfatase-alcalina, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-1-fosfato/Nitro Blue Tetrazolina (NBT/BCIP, Promega).

Imunofluorescência

Para determinar a citolocalização da proteína OtuLc, a cultura da forma promastigota ou amastigota de *L. chagasi* foi centrifugada a 2.000 x g por 10 min e, então, lavadas três vezes com PBS filtrado e o sedimento ressuspendido em 1mL de paraformaldeído 3,7% diluído em PBS por 30 min. Posteriormente, os parasitos foram depositados em lâmina, previamente lavada com EtOH 70% e H₂O milli-Q e carregada com solução 0,1% poli-Lisina. Em seguida, a lâmina com os parasitos foi permeabilizada com solução de Triton 0,1% em PBS por 10 min e lavada três vezes

com PBS. Para o aumento do sinal de fluorescência, 100 µL de *Enhancer* (Invitrogen) foi adicionado à lâmina por 30 min. Após, a lâmina foi lavada com PBS e bloqueada durante 30 min com PBS/leite 5%. Então, incubou-se a lâmina com o anticorpo policlonal anti-OTULc por 2 h na diluição 1:100 diluído em PBS/leite 1%. Após 3 lavagens com PBS, houve a incubação, por 2 h, com anticorpo secundário (*goat anti-mouse IgG antibody*) conjugado com *Alexa Fluor 488* (Invitrogen) diluído 1:1000. Após a lavagem com PBS 1 e posteriormente com H₂O milli-Q, adicionou-se uma gota de *ProLong® Gold antifade* com DAPI (Invitrogen).

Ensaio enzimático de deubiquitinação

A reação de deubiquitinação foi realizada com 200 ng/µL da rOTULc selvagem ou das três formas mutantes, 0,25 µg/µL de tetraubiquitina ligada a K48 ou K63 na presença de 25 mM Tris pH 7,5. Os pontos analisados foram 5, 15, 30 min, 1 e 5 h após a incubação de uma das DUBs com a tetra ubiquitina. E-64 foi utilizado como inibidor e incubado com as enzimas 30 min antes da realização da reação enzimática. As reações foram interrompidas após adição do tampão de amostra com SDS, analisadas por SDS/PAGE e o gel foi submetido à coloração com nitrato de prata.

RESULTADOS

Identidade das sequências de otubaína de diferentes organismos

O alinhamento da sequência da proteína otubaína de *L. chagasi* foi realizado com as sequências da proteína otubaína de *L. braziliensis*, *T. cruzi*, *H. sapiens* e *D. melanogaster* (Fig. 5). De acordo com o alinhamento, a OtuLc possui maior identidade com a otubaína de *L. braziliensis* (83%) e *T. cruzi* (37%), parasitos da família Trypanosomatidae. No alinhamento da sequência da proteína otubaína-1 de humanos, a OtuLc apresentou apenas 25% de identidade. Entre as sequências analisadas, a menor identidade se deu com a otubaína de *D. melanogaster* (21%), organismo onde o primeiro gene da superfamília das proteases do tumor ovariano foi identificado.

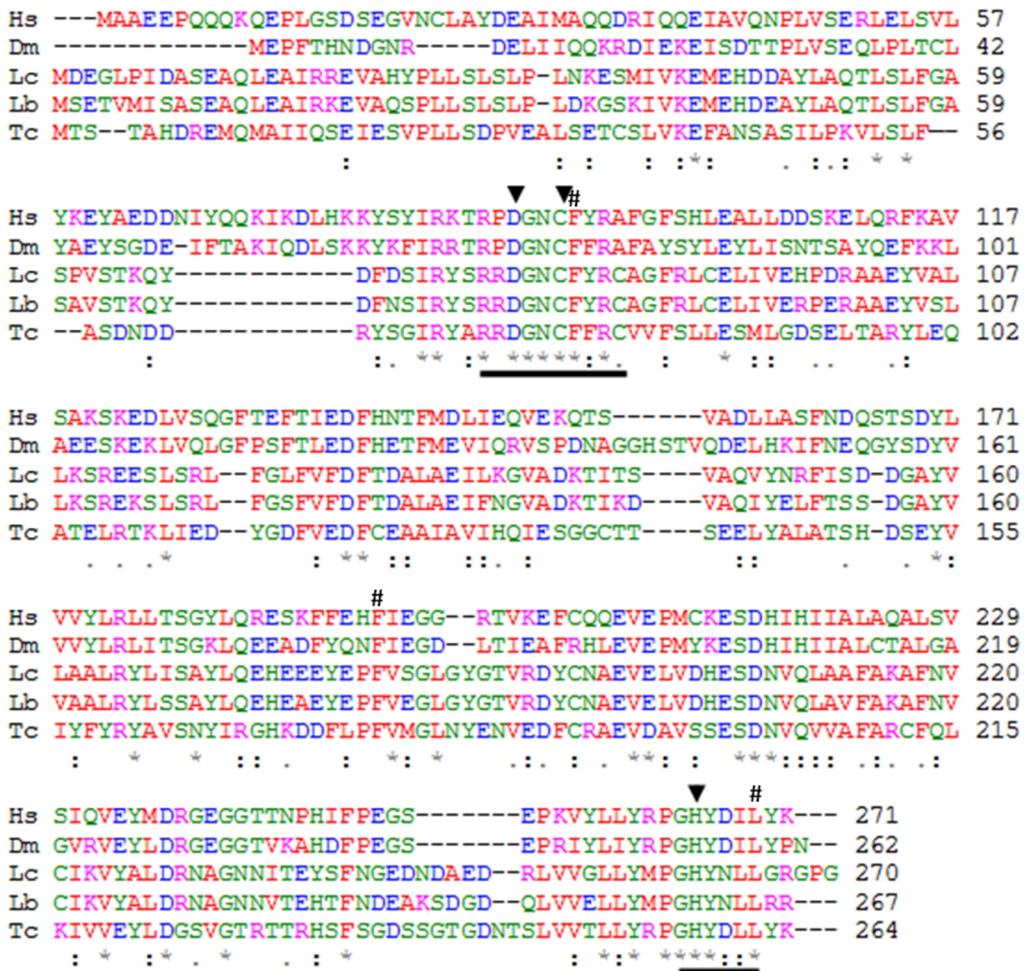


Fig. 4 Alinhamento das sequências de otubaína de diferentes organismos. As sequências de aminoácidos disponíveis no NCBI de *L. chagasi* (CAM59837.1), *L. braziliensis* (CAM37967.1), *T. cruzi* (XP_816450.1), *H. sapiens* (AAO27702.1) e *D. melanogaster* (AAF52905.1) foram alinhadas usando o programa ClustalW. Os

asteriscos indicam os aminoácidos conservados. Os dois-pontos indicam as substituições conservadas de aminoácidos. A linha preta embaixo da seqüência marca o domínio OTU (ovarian tumor) de humanos. As setas indicam a tríade catalítica putativa presente em cisteíno-proteases. As rachuras indicam os aminoácidos mutados (F82S, F182S e L265P) na seqüência da OTULc para obtenção das enzimas variantes.

Expressão e purificação das OTULc

Neste trabalho, além da otubaína selvagem, foram estudados outras 3 variantes: o primeiro variante possui uma mutação pontual na timina 245; a segunda possui duas mutações pontuais, uma na timina 245 e outra na timina 545; o terceiro possui as duas mutações anteriores e uma nova mutação na timina 794. Todas as mutações resultaram, após tradução, na troca de aminoácidos. Na Fig. 5 é possível visualizar a localização dos aminoácidos que foram substituídos em relação ao sítio catalítico. As mutações nos nucleotídeos T245C e T545C substituíram o resíduo de fenilalanina por um resíduo de serina (F82S e F182S) e a mutação no T794C substituiu um resíduo de leucina por um resíduo de prolina (L265P). Para a expressão da enzima rOtuLc, a bactéria *E. coli* BL21 (DE3) com o plasmídeo pET19-b contendo o gene *otulc* (selvagem ou mutado). A otimização do processo de produção de proteína se deu com 0,1 mM de IPTG a 16 °C por 16 h para o variante com 3 mutações ou 5 h para os outros dois variantes e a forma selvagem.

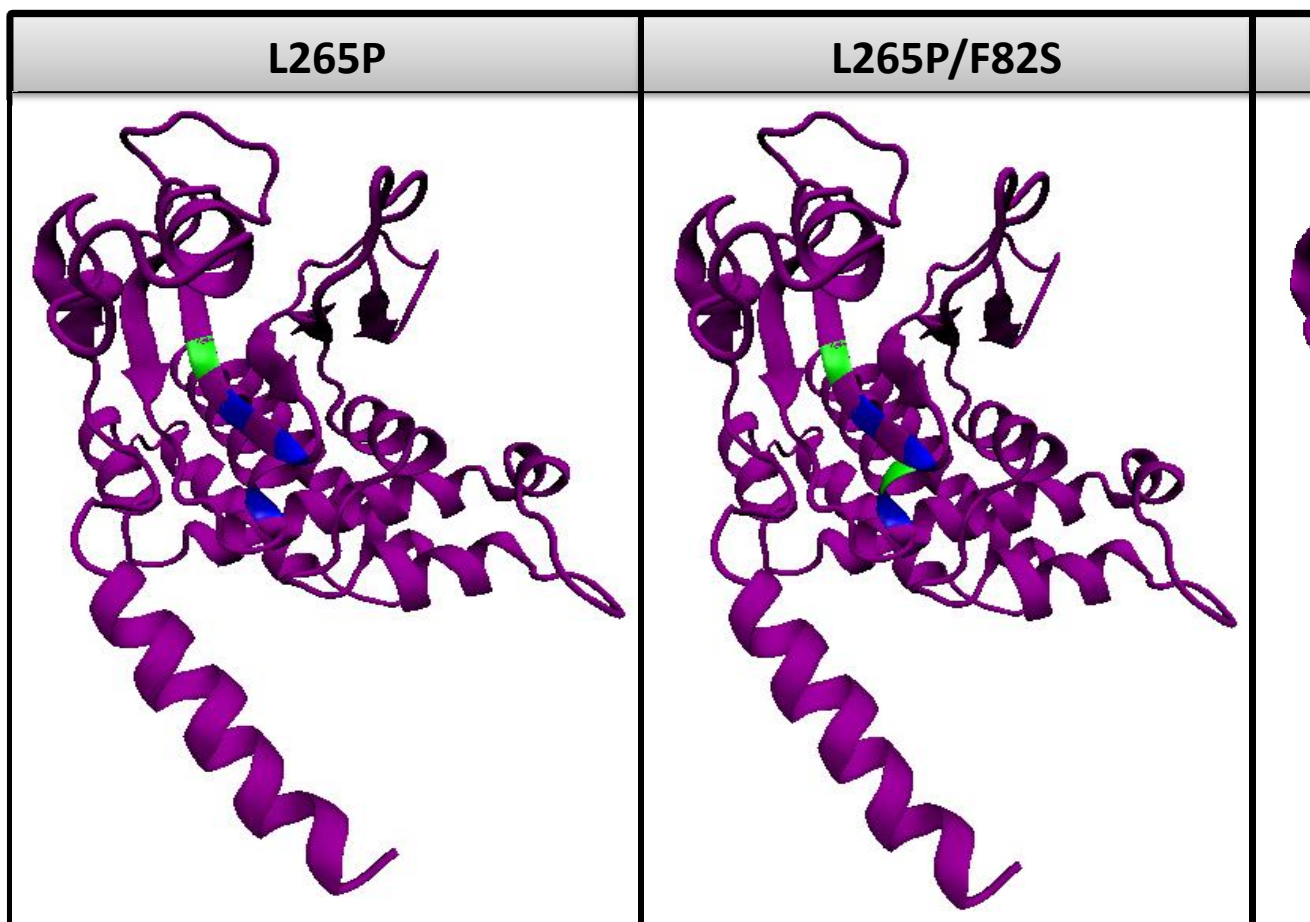


Fig. 5 Variantes da OTULc com mutações pontuais perto do sítio ativo. As mutações F82S/F182S/L265P, F82S/L265P e L265P estão representadas em verde e a tríade catalítica em azul.

De acordo com a Fig. 6, é possível perceber que a variante com 3 mutações é expressa em menor quantidade na porção solúvel, enquanto as outras variantes e a enzima selvagem são expressas em maior quantidade na porção solúvel. Também houve expressão das enzimas na porção insolúvel, indicando uma grande formação de corpos de inclusão. Apesar da massa molecular predita da OTULc ser de 30,3 kDa, a banda observada nos ensaios de eletroforese é de aproximadamente 37 kDa. Este aumento deve-se à fusão da cauda adicionada pelo plasmídeo de expressão para que as enzimas recombinantes sejam posteriormente purificadas. Na forma promastigota de *L. chagasi*, a otubaína se encontra na porção solúvel, como pode ser identificado no western blot (Fig. 7). Neste caso, a marcação da enzima se dá aproximadamente na massa predita de 30 kDa.

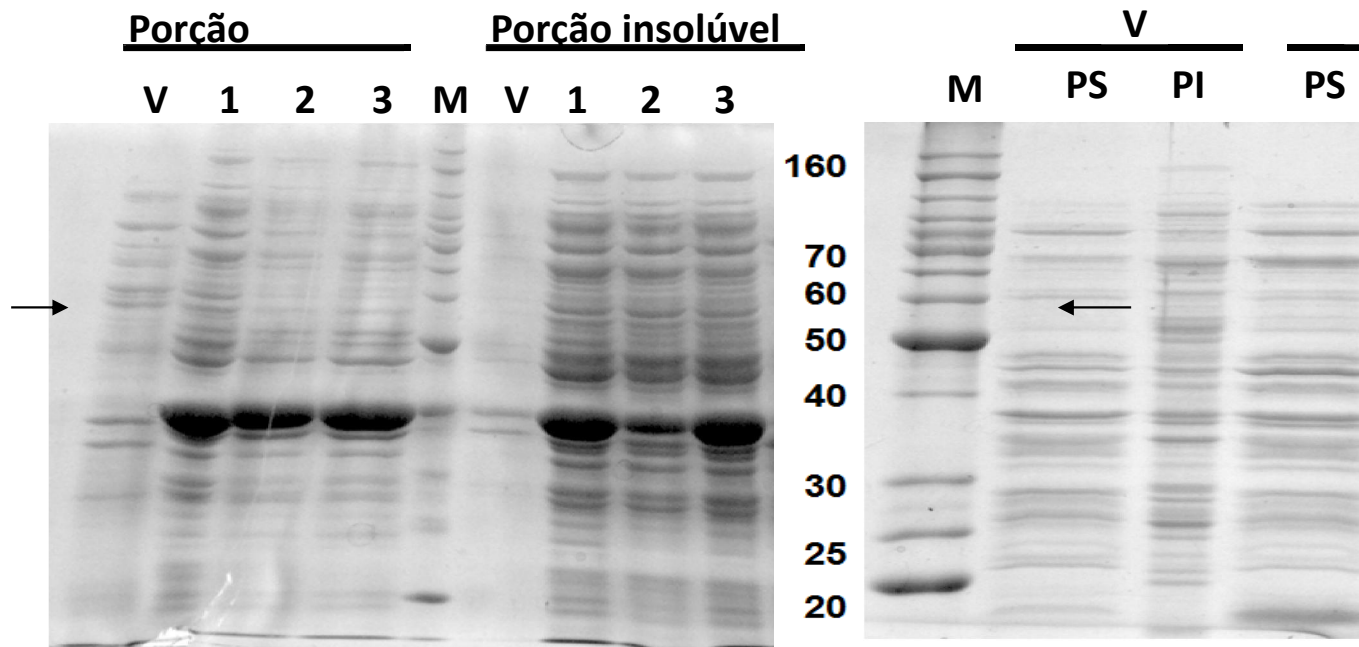


Fig. 6 Ensaio eletroforético da indução das enzimas recombinantes. Extratos solúvel e insolúvel de colônias positivas de *E. coli* - BL21 (DE3) para o pET19-b/*otulc* (selvagem e mutado) induzidos conforme descrito na Metodologia. A seta indicada representa a banda de 37 kDa correspondente a OTULc e suas mutantes. V, vetor pET-19b; PS, porção solúvel; PI, porção insolúvel; 1, OTULc selvagem; 2, OTULc L265P; 3, OTULc F82S/L265P; 4, OTULc F82S/F182S/L265P; M, marcador *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen).

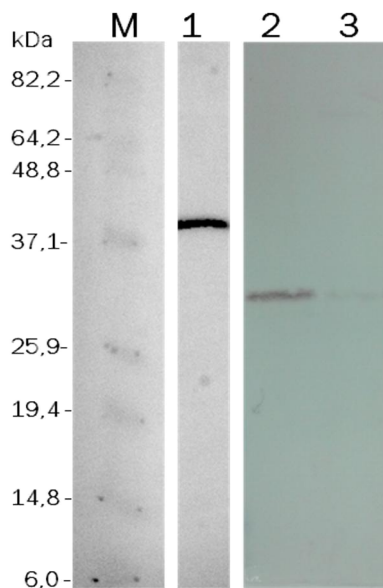


Fig. 7 Western blot da rOTULc e da OTULc nativa. Western blot com o soro imunizado contra a OTULc (1:200) do extrato solúvel de *E. coli* - BL21 (DE3) contendo o

pET19-b/*otulc* selvagem (1) e do extrato solúvel (2) ou extrato insolúvel (3) de promastigotas de *L. chagasi*.

Atividade deubiquinante da OTULc e suas variantes

A atividade das enzimas recombinantes foi testada com dois substratos diferentes: a K48 ou K63-linked tetra-ubiquitina. Na Fig. 8, pode-se observar que a OTULc hidrolisou totalmente a tetra-ubiquitina a monoubiquitina quando o substrato utilizado possui a cadeia ligada pela K48. Já para o substrato com a cadeia ligada pela K63, percebe-se que ocorre hidrólise, entretanto, de uma maneira parcial, já que ainda é possível observar as bandas de tri- e di-ubiquitinas.

Em relação aos mutantes contendo as mutações pontuais, na variante L265P, a hidrólise do substrato ligado pela K48 torna-se parcial e, além disso, esta enzima não possui atividade sobre o substrato que possui a cadeia de ubiquitina ligada pela K63. Quando há a adição da mutação F82S ao mutante L265P (F82S/L265P), a OTULc perde totalmente a atividade sobre ambos os substratos (Fig. 8).

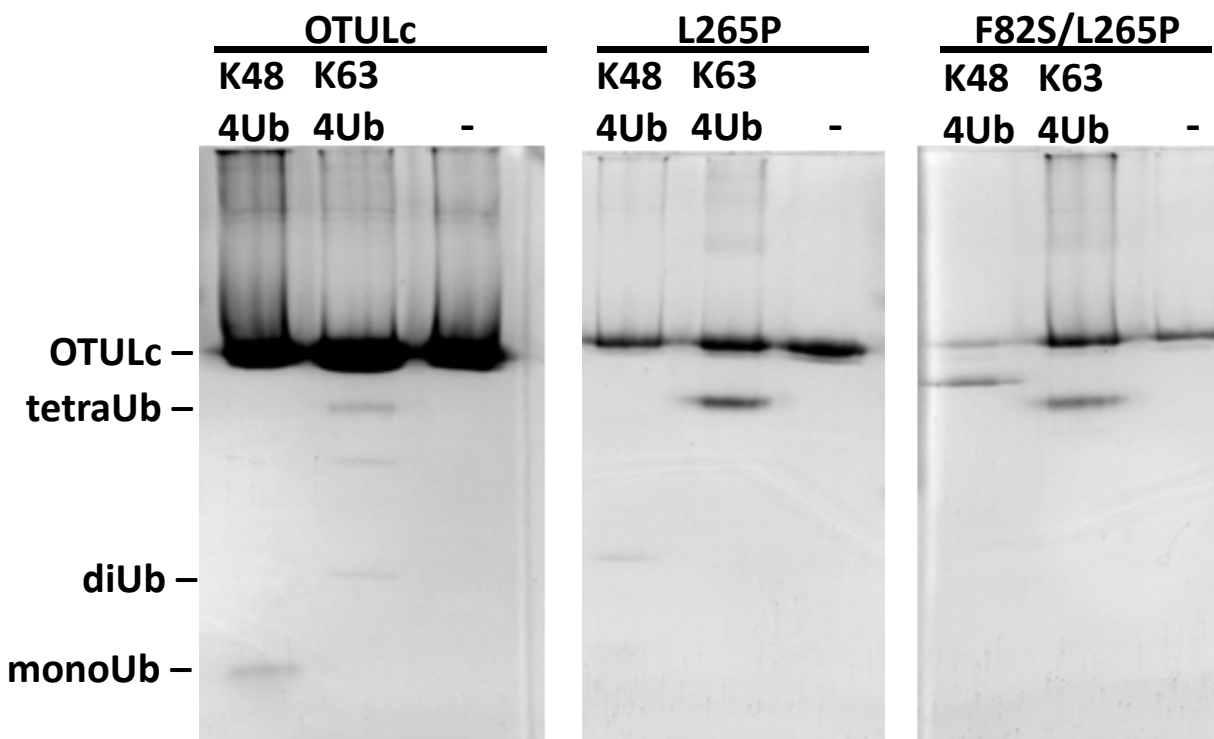


Fig. 8 Efeito dos aminoácidos na atividade deubiquinante da OTULc. Em uma reação de 10 μ L, a rOTULc ou seus mutantes (L265P ou L265P/F82S) foram incubados com os substratos K48 ou K63-linked tetra-ubiquitina em tampão Tris 25mM pH 7,5 por 3h a 25 °C. Os traços (-) indicam o padrão de migração da enzima.

Na Fig. 9, o ensaio enzimático foi realizado por um tempo maior (5 h) com o intuito de confirmar a preferência de substrato pela OTULc. Assim, após 5 h, a OTULc foi capaz de hidrolisar completamente o substrato tetra-ubiquitina ligado pela K48, mesmo resultado vista da Fig. 8. A avaliação da inibição da atividade enzimática da OTULc na presença de E64, um inibidor clássico de cisteíno-protease, também foi realizada e, curiosamente, a OTULc não foi inibida por esse composto, podendo ainda ser observada a banda referente à mono-ubiquitina (Fig. 9). No que diz respeito ao substrato ligado pela K63, após 5 h de reação, ainda é possível observar a presença de tetra-ubiquitina, confirmando a hidrólise parcial vista anteriormente na Fig. 8.

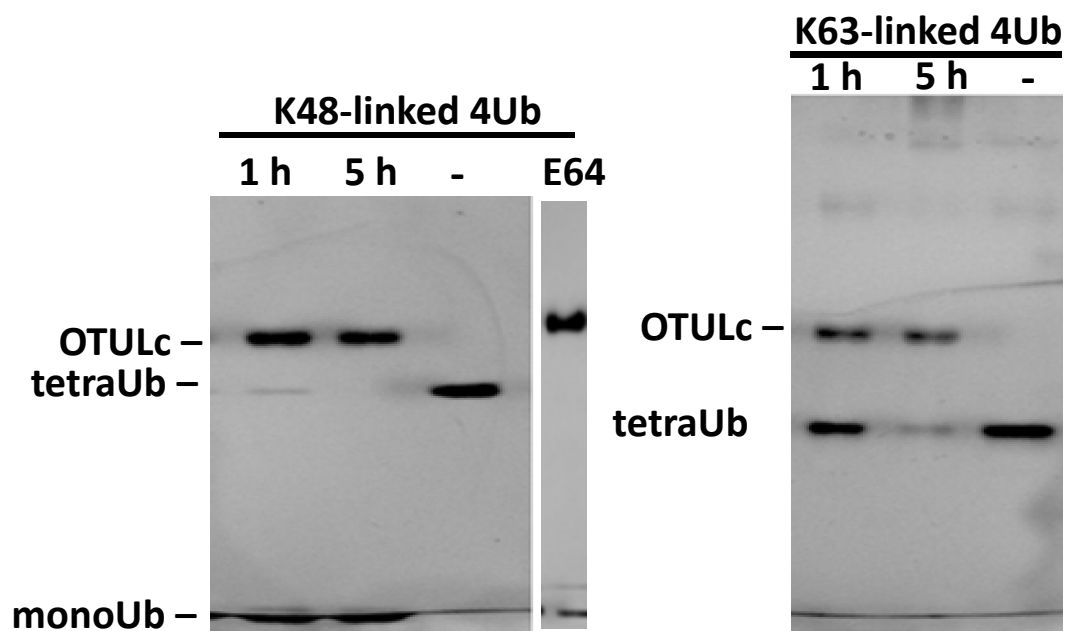


Fig. 9 Atividade deubiquinante da OTULc durante 5 horas e inibição por E64. Em uma reação de 10 μ L, a rOTULc (200 ng) foi incubada com os substratos tetra-ubiquitina K48 ou K63-linked em tampão Tris 25mM pH 7,5 por 1 ou 5 h a 25 $^{\circ}$ C. O teste de inibição da OTULc foi realizado com a incubação prévia da enzima com o inibidor E64 (100 μ M) durante 1 h, seguida da incubação com o substrato tetra-ubiquitina K48-linked por 5 h nas condições supracitadas. Os traços (-) indicam o padrão de migração da tetra ubiquitina.

Localização da otubaína de *L. chagasi* em formas promastigotas

Os soros dos camundongos imunizados com a rOtuLc (GUIDO, 2011) foram utilizados na técnica de imunofluorescência para realizar a citolocalização da otubaína

nas promastigotas de *L. chagasi*. Quando se utilizou o soro pré-imune dos camundongos, observou-se somente a marcação pelo DAPI no DNA da célula (Fig. 10D), uma vez que neste soro não há a presença dos anticorpos policlonais anti-OtuLc. Entretanto, na utilização do soro imune, com os anticorpos anti-OtuLc, pode-se observar que OtuLc é vista ao longo do parasito com marcações pontuais (Fig. 10G).

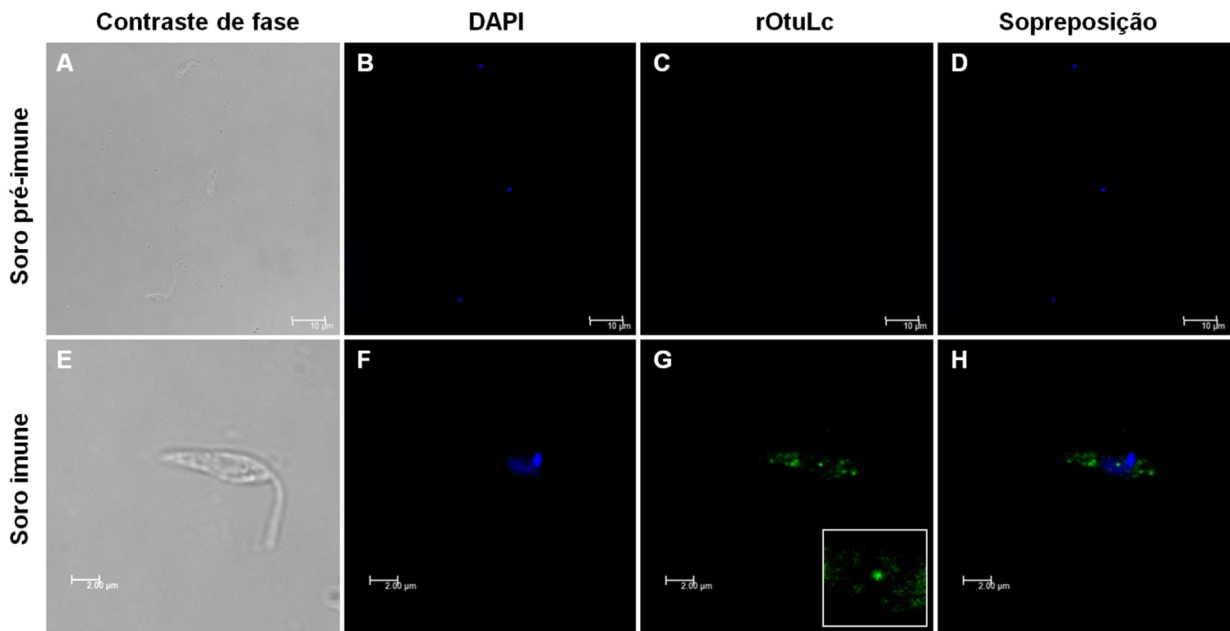


Fig. 10 Citolocalização da OTULc em forma promastigota de *L. chagasi*. As figuras A e E mostram os parasitos em contraste de fase. A identificação do DNA genômico e do cinetoplasto (azul) foram marcados pelo DAPI (B e F). A OtuLc (verde) foi marcada quando incubada com o soro imune (G), e não houve marcação no soro pré-imune (C). A sobreposição do soro pré-imune aponta somente a marcação do DNA genômico e cinetoplasto (D). A sobreposição (H) das figuras F e G revelaram que a OtuLc possui marcações pontuais ao longo do parasito.

DISCUSSÃO

A deubiquitinase otubaína foi primeiramente descrita em células HeLa em 2003, a partir do isolamento por purificação com Ub-aldeído, um inibidor típico de deubiquitinases. Nesta análise, foram isoladas duas isopeptidases que não compartilhavam homologia entre as deubiquitinases conhecidas, mas que possuíam homologia entre si e continham o domínio da superfamília OTU (*ovarian tumor*). Estas enzimas foram chamadas de otubaína-1 (36 kDa) e otubaína-2 (28 kDa). A principal diferença destas duas enzimas é a extensão maior da porção amino-terminal da otubaína-1 e a menor extensão da porção carboxi-terminal da otubaína-2. Ambas foram classificadas como cisteíno-proteases, sendo inibidas por NEM (N-etilmaleimida) e, além disso, mutações em seus resíduos catalíticos ocasionaram a perda da atividade da otubaína (BALAKIREV et al., 2003).

O presente trabalho deu continuidade ao estudo da OTULc iniciado com a expressão heteróloga e padronização de purificação do mutante F82S/F182S/L265P (GUIDO, 2011). Assim, os protocolos foram ajustados para a obtenção das demais variantes e da enzima selvagem, possibilitando então estes estudos preliminares da caracterização enzimática da otubaína de *L. chagasi*. Desta forma, a avaliação da atividade de OTULc foi realizada a partir da produção da enzima recombinante e de outros três variantes com mutações pontuais, com o objetivo de avaliar se estas mutações influenciariam na atividade deubiquitinante.

O alinhamento da sequência da proteína otubaína de *L. chagasi* foi realizado com as sequências da proteína otubaína de *L. braziliensis*, *T. cruzi*, *H. sapiens* e *D. melanogaster* (Fig. 1). De acordo com o alinhamento, a OTULc possui maior identidade com a otubaína de *T. cruzi* (37%) e com a otubaína de *L. braziliensis* (83%), outros parasitos da família *Trypanosomatidae*. Com a sequência da proteína otubaína-1 de humanos, a OTULc apresentou 25% de identidade. Entre as sequências analisadas, a menor identidade se deu com a otubaína de *D. melanogaster* (21%), organismo onde o primeiro gene da superfamília das proteases do tumor ovariano foi identificado. A baixa identidade com a otubaína de *H. sapiens* é interessante, uma vez que um alvo quimioterápico que afete a funcionalidade da otubaína do parasito para impedir a progressão da doença deve lesar o mínimo possível o hospedeiro.

Os substratos utilizados foram a tetra-ubiquitina ligada pela K48, que usualmente está relacionada à marcação de proteínas para degradação via proteassoma 26S e a tetra-ubiquitina ligada pela K63, ligação envolvida em processos não degradativos, como participação no reparo do DNA (KAWABE; BROSE, 2011). Os testes enzimáticos demonstraram que a OTULc realiza a hidrólise completa da tetra-Ub ligada a K48 e hidrólise parcial do substrato ligado a K63. A mutação L265P foi responsável pela perda da atividade da enzima pela K63-Ub4 e pela hidrólise parcial da K48-Ub4. A perda da atividade por ambos os substratos ocorre com a adição da mutação F82S. O variante com as três mutações também não apresentou atividade com estes substratos (dados não mostrados). Desta forma, é possível observar que os resíduos L265 e F82 são cruciais para atividade da OTULc com a K63-Ub4 e a K48-Ub4, respectivamente.

Na análise do sequenciamento das otubaína de diferentes organismos (Fig. 4), pode-se perceber que as mutações realizadas na enzima são em resíduos altamente conservados. Ademais, o resíduo F82 encontra-se ao lado do resíduo cisteína presente no sítio catalítico, e tanto este resíduo quanto o F82 fazem parte do domínio OTU.

Sabendo que a OTULc possui atividade total com a K48-Ub4 e parcial com a K63-Ub4, a enzima foi incubada durante 5 horas com estes substratos para avaliar qual seria sua preferência. Assim, com 5 horas, a OTULc realiza a hidrólise efetiva da K48-Ub4, o que não ocorre com a K63-Ub4. Portanto, este dado sugere que a OTULc possui preferência pelo substrato K48-Ub4. Cadeias de ubiquitinas ligadas pela lisina-48 são importantes sinalizadores de degradação via proteassoma (KAWABE; BROSE, 2011). A preferência *in vitro* da OTULc por este substrato sugere que esta enzima pode estar envolvida na regulação da degradação proteica no parasito. Entretanto, ainda que a hidrólise de cadeias ligadas pela lisina-63 *in vitro* não tenha sido efetiva, não se pode descartar um possível envolvimento da OTULc em processos não degradativos mediados pela deubiquitinação, uma vez que estudos demonstram a participação da otubaína no reparo do DNA, por exemplo, independente de sua atividade enzimática (SATO et al., 2012).

A adição do E-64, um inibidor de cisteíno-protease, demonstra que OTULc não é inibida, e é possível observar claramente a formação de mono-ubiquitina neste caso. Estudos anteriores já haviam verificado que a otubaína não é inibida por E-64 (JU et al.,

2014), entretanto, esta enzima é inibida por N-etilmaleimida, outro inibidor de cisteíno-protease (BALAKIREV et al., 2003).

A atividade com Ub-AMC, um substrato fluorescente, também foi realizada. Contudo, a OTULc não demonstrou atividade com este substrato fluorescente (dados não mostrados). Este dado corrobora o que foi observado na otubaína-1 de humanos, que também possui alta especificidade com o substrato K48-Ub4 e inatividade com Ub-AMC (WANG, 2009). É sabido que as otubaínas são isopeptidases, ou seja, realizam clivagem de ligações entre peptídeos, o que não é o caso do substrato Ub-AMC.

A localização da otubaína em *L. chagasi* foi observada pelo método de imunofluorescência indireta e demonstrou-se um padrão de marcações pontuais no citoplasma do parasito, indicando uma possível associação a vesículas. Inúmeros ensaios de imunofluorescência foram feitos e, apesar de o padrão de marcação pontual se repetir, não há concordância entre os diferentes resultados, já que ora a marcação pontual é única, ora é disseminada ao longo do parasito. Supõe-se que isto pode ser uma resposta a diferentes funções que a enzima possa ter no parasito. Deste modo, a localização exata ainda deve ser confirmada.

Com a padronização dos processos de purificação e atividade enzimática da OTULc, torna-se interessante a continuidade do estudo desta enzima para melhor compreensão do seu papel no parasito. Sabendo que a otubaína já foi descrita como uma enzima associada a complexos (EDELMANN et al., 2010; SATO et al., 2012), o desenvolvimento do interatoma desta enzima revela-se como um importante passo futuro a ser realizado, principalmente para confirmar seu papel no processo degradativo. Além disso, o papel imunorregulatório das enzimas deubiquitinantes, inclusive da otubaína no envolvimento da anergia de linfócitos T (SOARES et al., 2004), também é uma vertente a ser explorada para correlacionar o papel desta enzima dentro do processo imunopatológico das leishmanioses.

CONCLUSÃO

Em relação à otubaina de *L. chagasi*, é possível concluir deste estudo que:

- A OTULc hidrolisa preferencialmente substrato ligado pela K48, ainda que tenha menor atividade com substrato ligado pela K63, sugerindo que a enzima regule processos biológicos evitando a degradação de seus substratos pelo proteassoma.

- Os resíduos F82 e L265 são críticos para a atividade da OTULc com substratos ligado pela K48 e pela K63, respectivamente

- A OTULc se apresenta com marcações pontuais, sugerindo associação à vesículas.

REFERÊNCIAS

BALAKIREV, M. Y. et al. Otubains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway. **EMBO Rep**, v. 4, n. 5, p. 517-22, May 2003.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1097-106, Aug 2007.

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

BESTEIRO, S. et al. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1063-75, Aug 2007.

BOONE, D. L.; TURER, E. E.; LEE, E. G.; AHMAD, R. C.; WHEELER, M. T.; TSUI, C.; HURLEY, P.; CHIEN, M.; CHAI, S.; HITOTSUMATSU, O.; MCNALLY, E.; PICKART, C.; MA, A. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. **Nat Immunol**. v. 5, n. 10, p. 1052-60, 2004.

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. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010a.

_____. 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, 2010b.

CHOI, C. M. & LERNER, E. A. Leishmaniasis as an Emerging Infection. **JID Symposium Proceedings** . Vol. 6 nº3. Dec, 2001.

CUMMINGS, H. E.; Tuladhar, R.; Satoskar, A. R. Cytokines and their STATs in cutaneous and visceral leishmaniasis. **J Biomed Biotechnol**. 1-6, 2010.

DE ALMEIDA, M. C. et al. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 861-70, Oct 2003.

Distrito Federal. Governo do Distrito Federal. **Informativo Epidemiológico das Leishmanioses no DF. Diretoria de Vigilância Epidemiológica**. Ano 5, nº 2 - Abril de 2013a. Disponível em <<http://www.saude.df.gov.br/images/Leishmaniose/Informativo%20Epidemiologico%20das%20Leishmanioses%20no%20DF%20N%202%202013.pdf>>.

Secretaria de Estado de Saúde do DF. Subsecretaria de Vigilância à Saúde. **INFORMATIVO AMBIENTAL DAS LEISHMANIOSES NO DF**. Boletim anual - 2013b. Diretoria de Vigilância Ambiental em Saúde. Disponível em <http://www.saude.df.gov.br/images/Informativos/DIVAL/Informativo_Ambiental__2013_Leishmanioses_EM_PDF.pdf>

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

FREZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-36, 2009.

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

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 9, p. 403-9, Sep 2011.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A. The ubiquitin system. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 425-79, 1998.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-9, Oct 2 1999.

JU, H. L. et al. Characterization of a novel otubain-like cysteine protease of *Cryptosporidium parvum*. **Parasitol Int**, v. 63, n. 4, p. 580-3, Aug 2014.

KAWABE, H.; BROSE, N. The role of ubiquitylation in nerve cell development. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 5, p. 251-68, May 2011.

KEDZIERSKI, L. et al. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. **Curr Med Chem**, v. 16, n. 5, p. 599-614, 2009.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 10, p. 1443-74, 2012.

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

LIPOLDOVA, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nat Rev Genet**, v. 7, n. 4, p. 294-305, Apr 2006.

LIU, Y. C.; PENNINGER, J.; KARIN, M. Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 12, p. 941-52, Dec 2005.

MAURO, C. et al. ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB. **J Biol Chem**, v. 281, n. 27, p. 18482-8, Jul 7 2006.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7-14, Jan 2014.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-77, Oct 29-Nov 4 2005.

NIJMAN, S. M. et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. **Cell**, v. 123, n. 5, p. 773-86, Dec 2 2005.

PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgrad Med J**, v. 82, n. 972, p. 649-57, Oct 2006.

PONTS, N. et al. Deciphering the ubiquitin-mediated pathway in apicomplexan parasites: a potential strategy to interfere with parasite virulence. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2386, 2008.

SATO, Y. et al. Molecular basis of Lys-63-linked polyubiquitination inhibition by the interaction between human deubiquitinating enzyme OTUB1 and ubiquitin-conjugating enzyme UBC13. **J Biol Chem**, v. 287, n. 31, p. 25860-8, Jul 27 2012.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-51, May 2004.

SOARES, L. et al. Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL. **Nat Immunol**, v. 5, n. 1, p. 45-54, Jan 2004.

SUN, S. C. Deubiquitylation and regulation of the immune response. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 7, p. 501-11, Jul 2008.

WERTZ, I. E. et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. **Nature**, v. 430, n. 7000, p. 694-9, Aug 5 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Health Observatory Data Repository**. Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHVNUM?lang=en>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis - Situation and trends.** 2013. Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/index.html

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases.** Geneva, 2010.

YE, R.; RAPE, M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10, n. 11, p 755–764, 2009.

ZINK, AR; SPIGELMAN M; SCHRAUT, B; GREENBLATT, GL; NERLICH, A. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper Nubia. **Emerg Inf Dis**, n. 12, p. 1616–1617, 2006.