UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

TAÍZ DOS REIS SANTOS

AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS CHAVE PARA O FUNCIONAMENTO DA METACASPASE DE *Candida albicans* (CaMCA)

Mogi das Cruzes, SP

2024

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

TAÍZ DOS REIS SANTOS

AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS CHAVE PARA O FUNCIONAMENTO DA METACASPASE DE *Candida albicans* (CaMCA)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como exigência parcial para banca de defesa do grau de Doutorado em Biotecnologia.

Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Ferreira Marcondes Machado

Mogi das Cruzes, SP

2024

Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Santos, Taíz dos Reis
S237a Avaliação de resíduos chave para o funcionamento da metacaspase de candida albicans (CaMCA) / Taízz dos Reis Santos. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2024.
220 f. : il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Mauricio Ferreira Machado.

1. Candida albicans 2. Caspases 3. Morte celular 4. Mutação sítio-dirigida I. Machado, Mauricio Ferreira II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 660.6

Elaborada por Maria Cristina Alves Silva Xavier – CRB-8/10077

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES.

Às dez horas e trinta minutos do dia trinta de agosto de dois mil e vinte e quatro, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa da tese intitulada "AVALIAÇÃO DE RESÍDUOS CHAVE PARA O FUNCIONAMENTO DA METACASPASE-1 DE CANDIDA ALBICANS (CaMCA-1a)" para obtenção do grau de doutor(a) pelo(a) candidato(a) **Taíz dos Reis Santos**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 75 (setenta e cinco), a saber: 39 unidades de crédito em disciplinas e atividades na pós-graduação e 36 unidades de crédito no preparo da tese o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de doutor(a). A comissão examinadora foi constituída pelos senhores professores doutores: Maurício Ferreira Marcondes Machado, Wagner Alves de Souza Júdice, e Denise Costa Arruda, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Fernanda Calheta Vieira Portaro, do Instituto Butantan, e Nilana Meza Tenorio de Barros Jaggi, da Universidade Federal de São Paulo, sob a presidência do primeiro, como orientador do(a) aluno(a). A sessão pública da defesa da tese foi aberta pelo senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral de seu trabalho, ao final da qual seguiram-se as arguições pelos membros da comissão examinadora. A seguir, a comissão, em sessão secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

APROVADA (aprovado(a)/reprovado(a)) por UNANIMIDADE (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 30 de agosto de 2024.

Comissão Examinadora — Julgamento

Documento assinado digitalmente
gov.br FERNANDA CALHETA VIEIRA PORTARO
Data: 04/09/2024 13:39:24-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª Drª Fernanda Calheta Vieira Portaro — APROVADA (aprovado(a)/reprovado(a))

Documento assinado digitalmente
gov.br NILANA MEZA TENORIO DE BARROS
Data: 04/09/2024 13:10:20-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª Drª Nilana Meza Tenorio de Barros Jaggi — APROVADA (aprovado(a)/reprovado(a))

Prof. Dr. Wagner Alves de Souza Júdice — APROVADA (aprovado(a)/reprovado(a))

Profª Drª Denise Costa Arruda — APROVADA (aprovado(a)/reprovado(a))

Prof. Dr. Maurício Ferreira Marcondes Machado — APROVADO (aprovado(a)/reprovado(a))

"A descoberta consiste em ver o que todos viram e em pensar no que ninguém pensou." - Albert Szent-Györgyi

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

A Deus, meu consolador e salvador. Digno de toda honra e toda glória.

Aos meus pais, insigne senhora Arleide Almeida dos Reis e exímio senhor Adenilson Neri dos Santos, por terem me educado, transferido amor, cuidado, princípios e valores. Pilares da minha formação como ser humano.

Aos meus filhos de quatro patas Flash e Zico, motivos de alegria e de sincero amor. Vocês são os meus maiores presentes.

Ao meu esposo, amigo, companheiro, confidente e alentador, Márcio Luiz, cuja presença foi fundamental para manter nosso lar operacional durante minha ausência e capaz de suportar todos os meus momentos de estresse durante a elaboração deste trabalho. Agradeço o encorajamento e amparo nas circunstâncias difíceis.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha mais profunda gratidão a todos que tornaram possível a realização desta jornada, que transcendeu não apenas os limites acadêmicos, mas também os horizontes da minha própria história.

Agradeço primeiramente a Deus, meu abrigo seguro, meu socorro, meu amigo fiel, aquele que me sustentou até aqui e não permitiu que eu desistisse. Sempre presente em todos os momentos com intervenções acolhedoras. Maior dirigente e conhecedor da minha vida.

A minha amada Bahia, onde as raízes da minha determinação e resiliência foram firmemente plantadas, agradeço por me proporcionar um solo fértil para cultivar meus sonhos, mesmo quando os recursos eram escassos. Aos meus pais, cujo amor incondicional e exemplo de trabalho árduo me ensinaram a nunca desistir, mesmo diante das adversidades mais desafiadoras, devo toda a minha gratidão.

A minha irmã, Tamire Reis, que soube de todos os meus altos e baixos durante essa jornada. Seu apoio incondicional e sua presença constante foram tudo para mim. Suas palavras de encorajamento e seu ouvido sempre disponível me deram forças para seguir em frente. Você é minha inspiração e poder contar com você me deixa mais forte.

Ao meu orientador, Professor Dr. Mauricio Machado, que não só me guiou pelo intricado labirinto da pesquisa científica, mas também foi um mentor incansável, minha sincera apreciação. A generosidade e dedicação do Professor Dr. Marcelo Marcondes, que ofereceu sua expertise, expresso minha mais profunda gratidão.

Ao Professor Dr. Wagner Judice, cujo vasto conhecimento e sabedoria foram uma fonte constante de inspiração e aprendizado.

A família que formamos no laboratório, onde cada experimento se transformou em uma jornada compartilhada de descoberta e crescimento, expresso minha mais profunda gratidão. A cada um de vocês (Ane Caroline, João Pedro, Laura Maffeis, Mariana Trujulho, Bianca Pereira, Luan Viana, Vitoria Caroline), cuja paixão pela ciência se entrelaçou com a amizade e o apoio mútuo, agradeço por cada momento de colaboração. Juntos, enfrentamos desafios, celebramos conquistas e criamos memórias que serão tesouros para sempre em meu coração. Obrigada por serem não

apenas colegas, mas verdadeiros companheiros de jornada nesta incrível aventura científica.

Não posso deixar de mencionar meus três companheiros essenciais nesta jornada: meus fies companheiros de quatro patas, Flash e Zico, cuja presença reconfortante e leal sempre trouxe alegria aos meus dias, e meu amado esposo, Marcio Luiz, cujo apoio inabalável e compreensão ao longo dos altos e baixos desta jornada foram verdadeiramente inestimáveis. Vocês viram não apenas as páginas da minha tese, mas também as lágrimas, os sorrisos e os momentos de dúvida que moldaram cada linha escrita.

A vida, a ciência e a mim. Em meio as dificuldades, consegui não apenas sobreviver, mas também enfrentar perdas significativas e abraçar a renovação pessoal necessária para completar esta jornada. Cada obstáculo superado fortaleceu minha determinação e me ensinou lições inestimáveis sobre resiliência e perseverança. Este trabalho não teria sido possível sem meu próprio compromisso e autodisciplina, que foram fundamentais para alcançar este marco em minha vida acadêmica e pessoal. Que esta tese não seja apenas o fim de uma jornada, mas sim o início de novas descobertas e realizações, inspiradas pela gratidão e pelo desejo de fazer a diferença neste mundo.

RESUMO

As infecções fúngicas não só impactam a qualidade de vida dos pacientes, mas também representam um ônus substancial para os sistemas de saúde. Estratégias eficazes de prevenção e tratamento são essenciais para mitigar o impacto dessas infecções e proteger a saúde pública. O aumento nos casos de infecções por fungos do gênero *Candida*, especialmente *Candida albicans*, representa um desafio significativo para a saúde pública. Essas infecções, que podem variar de leves e superficiais a sistêmicas e potencialmente fatais, afetam uma ampla gama de pacientes, incluindo aqueles com sistemas imunológicos comprometidos. A transição da forma comensal de *C. albican*s para um patógeno é influenciada por uma série de fatores, incluindo condições ambientais e alterações na resposta imune do hospedeiro. As metacaspases, proteases estruturalmente relacionadas as caspases de mamíferos, têm ganhado destaque na pesquisa sobre a regulação da morte celular programada e na fisiologia celular. As caspases e metacaspases diferem em estrutura, ativação e função. Enquanto as caspases formam dímeros ativos e são altamente específicas para resíduos de aspartato, as metacaspases clivam seus substratos após um resíduo de arginina ou lisina na posição P_1 e especialmente o tipo I, possuem um pró-domínio N-terminal que regula sua atividade catalítica. Embora compartilhem semelhanças estruturais, como a organização em folhas β e α-hélices, as metacaspases têm uma arquitetura distinta e dependem do íon cálcio para exercer a sua função catalítica. Presentes em organismos não metazoários, como plantas, fungos e protozoários, as como a CaMCA e YCA1, desempenham papéis multifuncionais na regulação de processos celulares, como apoptose, diferenciação celular e resposta ao estresse. Sua classificação em 3 tipos reflete sua diversidade funcional em diversos organismos, com estudos revelando funções desde a regulação do ciclo celular até a resposta a estímulos ambientais e patogênicos. A CaMCA e a YCA1 compartilham características estruturais semelhantes, incluindo resíduos críticos de cálcio e um N-terminal propenso a agregação. Para entender melhor o papel desses resíduos na função da CaMCA, construímos mutantes do sítio de cálcio e truncamos o N-terminal da CaMCA, semelhante ao que foi feito na YCA1, para investigar seu efeito na agregação e na função da proteína. A construção da CaMCA-Δ86 foi realizada utilizando a metodologia TEDA, enquanto os mutantes foram desenvolvidos através do TEDA em combinação com sobreposição de fragmentos e forma expressos em *E. coli* BL21(DE3)pLysS utilizando IPTG como indutor. Os produtos foram purificados utilizando resina de Niquel-sepharose e eluidos com imidazol. Para os dados de fluorescência intrínseca, foram utilizados o software Grafit 5 para análise e tratamento. A CaMCA selvagem passa por autoprocessamento, gerando fragmentos de ~55 e ~45 KDa, influenciado pelo cálcio, que também forma um fragmento adicional de ~30 KDa após 72 horas com 5 mM de $CaCl_2$. A proteína tem alta afinidade (7 µM) e baixa afinidade (9,3 mM) pelo cálcio. A deleção no N-terminal (CaMCA-ΔN86) também apresenta autoprocessamento, gerando fragmentos de 43 e 33 KDa, com o cálcio desempenhando papel importante na ativação da enzima. A ausência do N-terminal altera a resposta ao cálcio, sugerindo que essa região regula o processo de clivagem. Mutantes como D252A ativam-se após 96 horas com cálcio, enquanto D268A, D299A e D268/269A não mostraram resposta. O mutante D268/299A revelou processamento com cálcio após 48 horas. Íons bivalentes, como bário e magnésio, ativaram a CaMCA de forma menos eficiente que o cálcio.

Palavras-chave: *Candida albicans*; Metacaspase; CaMCA; Morte celular programada; Mutação sítio-dirigida

ABSTRACT

Fungal infections not only impact patients' quality of life but also represent a substantial burden on healthcare systems. Effective prevention and treatment strategies are essential to mitigate the impact of these infections and protect public health. The increase in infections caused by fungi of the *Candida* genus, especially *Candida albicans*, poses a significant challenge to public health. These infections, which can range from mild and superficial to systemic and potentially fatal, affect a wide range of patients, including those with compromised immune systems. The transition of *C. albicans* from a commensal organism to a pathogen is influenced by various factors, including environmental conditions and changes in the host's immune response. Metacaspases, proteases structurally related to mammalian caspases, have gained prominence in research on the regulation of programmed cell death and cellular physiology. Caspases and metacaspases differ in structure, activation, and function. While caspases form active dimers and are highly specific for aspartate residues, metacaspases cleave their substrates after an arginine or lysine residue in the P1 position and, especially type I, possess an N-terminal pro-domain that regulates their catalytic activity. Although they share structural similarities, such as the arrangement of β-sheets and α-helices, metacaspases have a distinct architecture and depend on calcium ions to perform their catalytic function. Present in non-metazoan organisms such as plants, fungi, and protozoa, metacaspases like CaMCA and YCA1 play multifunctional roles in regulating cellular processes such as apoptosis, cell differentiation, and stress response. Their classification into three types reflects their functional diversity in various organisms, with studies revealing roles ranging from cell cycle regulation to responses to environmental and pathogenic stimuli. CaMCA and YCA1 share similar structural characteristics, including critical calcium residues and an N-terminal prone to aggregation. To better understand the role of these residues in CaMCA function, we constructed calcium-binding site mutants and truncated the N-terminal of CaMCA, similar to what was done with YCA1, to investigate its effect on protein aggregation and function. The construction of CaMCA-Δ86 was carried out using the TEDA methodology, while the mutants were developed through TEDA in combination with fragment overlap and expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS using IPTG as an inducer. The products were purified using Nickel-sepharose resin and eluted with imidazole. For the intrinsic fluorescence data, Grafit 5 software was used for analysis and processing. Wild-type CaMCA undergoes autoprocessing, generating fragments of ~55 and ~45 kDa, influenced by calcium, which also forms an additional fragment of ~30 kDa after 72 hours with 5 mM CaCl2. The protein has high affinity (7 μM) and low affinity (9.3 mM) for calcium. The deletion of the N-terminal (CaMCA-ΔN86) also shows autoprocessing, generating fragments of 43 and 33 kDa, with calcium playing an important role in enzyme activation. The absence of the N-terminal alters the response to calcium, suggesting that this region regulates the cleavage process. Mutants such as D252A are activated after 96 hours with calcium, while D268A, D299A, and D268/269A showed no response. The D268/299A mutant showed processing with calcium after 48 hours. Bivalent ions such as barium and magnesium activated CaMCA less efficiently than calcium.

Keywords: *Candida albicans*; Metacaspase; CaMCA; Programmed cell death; Site-directed mutagenesis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Organização estrutural da parede celular do patógeno oportunista *C.albicans.* 26

Figura 02: Estrutura química da quitina. 28

Figura 03: Estrutura química dos β-glucanos. 29

Figura 04: Mecanismos de patogenicidade de *Candida albicans* 31

Figura 05: Formação do biofilme de *C. albicans.* 34

Figura 06: Mecanismo geral de ação dos fármacos da classe polienos. 38

Figura 07: Mecanismo geral de ação dos fármacos da classe azóis. 39

Figura 08: Mecanismo geral de ação dos fármacos da classe equinocandinas. 41

Figura 09: Principais vias de morte celular. 46

Figura 10: Representação da interação dos sub-sítios de uma protease com seu substrato. 50

Figura 11: Representação estrutural papaína, uma cisteína protease, mostrando os resíduos do sítio ativo; Cys^{25}, His^{159} e Asn^{175}. 51

Figura 12: Mecanismo esquemático de reação da cisteína protease mediada pela clivagem de uma ligação peptídica. 52

Figura 13: Classificação das cisteíno protease em famílias e clãs. 53

Figura 14: Mecanismo de ativação proposto para as caspases. 55

Figura 15: Mecanismo de ativação proposto para as metacaspases. 56

Figura 16: Comparação das caspases e metacaspases – composição dos domínios e características bioquímicas 57

Figura 17: Estrutura e sequência do *T. brucei* $MCA2^{C213G}$. 62

Figura 18: O íon de Sm^{3+} se liga firmemente a $TbMCA2^{C213A.}$ 63

Figura 19: Estrutura da YCA1. 64

Figura 20: Caracterização do sítio ativo da YCA1. 65

Figura 21: Comparação estrutural entre Yca1 e TbMCA2. 65

Figura 22: Sequência completa do gene codificador da metacaspase de *C. albicans* (CaMCA). 70

Figura 23: Mutação sítio dirigida por sobreposição de *primers.* 74

Figura 24: Eletroforese da expressão e purificação a CaMCA íntegra. 84

Figura 25: Impacto do Ca^{2+} na ativação e processamento da CaMCA íntegra. 86
Figura 26: Resultado do ensaio de Western blotting, evidenciando a detecção seletiva da fração processada da enzima CaMCA 87
Figura 27: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA. 88
Figura 28: Alinhamento da sequência primária da YCA1 selvagem com a sequência primária da CaMCA íntegra. 89
Figura 29: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação da região codificadora da CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN115. 90
Figura 30: Expressão da CaMCA-ΔN115 e CaMCA íntegra. 91
Figura 31: Cromatograma da purificação da CaMCA-ΔN115 e *desalting* das frações purificadas da CaMCA-ΔN115 92
Figura 32: Esquema do método TEDA. A meia-lua (azul) representa a T5 exonuclease; o retângulo em dupla fita com lacuna representa o plasmídeo pET28(a)+ linearizado. 93
Figura 33: Eletroforese em gel de agarose 1% indicando a eficiência da amplificação do pET28(a)+ por PCR, utilizando os *primers* do procedimento TEDA. 94
Figura 34: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação da região codificadora da CaMCA íntegra, CaMCA-ΔN115 e CaMCA-ΔN86 95
Figura 35: PCR da *miniprep* da CaMCA-ΔN86 para análise da transformação em *E. coli* DH5α utilizando *primers* T7. 96
Figura 36: PCR de colônia da CaMCA-ΔN86 para análise da transformação em *E. coli* BL21(DE3)pLysS utilizando *primers* T7. 97
Figura 37: Expressão da metacaspase CaMCA-ΔN86. A análise foi realizada em SDS-PAGE a 15%. 98
Figura 38: Cromatograma da purificação da CaMCA-ΔN86. 99
Figura 39: Cromatograma da dessalinização da CaMCA-ΔN86 e gel SDS-Page 15% das frações eluidas da CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86. 100
Figura 40: Maturação da CaMCA-ΔN86 na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0 – 15 mM). 102
Figura 41: Maturação da CaMCA-ΔN86 na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio (2 mM). 104

Figura 42: Resultado da análise por Western blotting da CaMCA-ΔN86 após 72 horas de incubação com 5 mM de $CaCl_2$. 104
Figura 43: Resultado da análise por Western blotting da CaMCA-ΔN86 após 48 horas de incubação com 5 mM de $CaCl_2$, com intervalo de 24 horas entre cada análise. 105
Figura 44: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA-ΔN86. 106
Figura 45: Primeira PCR para a reação de sobreposição de fragmento: PCR-1 FW e PCR-I RV. 107
Figura 46: PCR II da reação de sobreposição de *primers*. 108
Figura 47: PCR da *miniprep* CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86 para análise da transformação em E. coli DH5α utilizando *primers* T7. 109
Figura 48: PCR de colônia da CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86 para análise da transformação em E. coli BL21(DE3)plysS utilizando *primers* T7. 110
Figura 49: Análise do extrato proteico total induzidos com 0.25 mM de IPTG para os mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A, D299A. 111
Figura 50: Resultado da eletroforese em SDS-PAGE a 15% das amostras eluidas na cromatografia por gel filtração com coluna HiTrap™ 5mL (GE Healthcare) para os mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A, D299A). 112
Figura 51: *Western Blotting* da (A) CaMCA íntegra e (B) CaMCA-ΔN86 e seus respectivos mutantes (D268A, D269A, D252A, D299A E D268/269) através de reconhecimento por anticorpo primário anti-6XHis-tag. 113
Figura 52: Teste de maturação dos mutantes da CaMCA íntegra do sítio de cálcio na presença de cálcio. 115
Figura 53: Teste de maturação dos mutantes da CaMCA-ΔN86 do sítio de cálcio na presença de cálcio. 117
Figura 54: Maturação das mutantes do sítio de Ca^{2+} da CaMCA-ΔN86 na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio (2 mM). 119
Figura 55: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA íntegra D268A. 122

Figura 56: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA íntegra D269A. 124
Figura 57: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA íntegra D299A. 123
Figura 58: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA íntegra D268/269A. 124
Figura 59: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA-ΔN86 D252A. 125
Figura 60: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA-ΔN86 D268A. 125
Figura 61: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA-ΔN86 D299A. 126
Figura 62: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA-ΔN86 D268/269A. 127
Figura 63: Western blotting do mutante D268/299A da CaMCA-ΔN86 através de reconhecimento por anticorpo primário anti-6XHis-tag. 127
Figura 64: Teste de maturação do mutante D268/299A da CaMCA-ΔN86. 128
Figura 65: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca do mutante D268/299A da CaMCA-ΔN86. 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Íons inorgânicos que servem como cofatores para enzimas 56

Tabela 2: Iniciadores *forward* e *reverse* usados para as mutações pontuais no gene codificante da CaMCA-WT. 71

Tabela 03: *Primers* usados para a construção do plasmídeo recombinante usando o TEDA. 72

Tabela 04: Características da HiTrap *Desalting* 81

Tabela 05: Tamanho dos fragmentos obtidos na reação de PCR-I FW e RV para os mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A, D299A, D170A e D290A. 107

Tabela 06: Valores de K_D para os mutantes da CaMCA íntegra e CaMCA-Δ86 121

Tabela 07: Propriedades dos íons divalentes utilizados na ativação da CaMCA-ΔN86. O raio atômico do íon em picômetros (pm). A eletronegatividade é dada em Pauling 141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
ANVISA	Agência Nacional De Vigilância Sanitária
AtMCA	Metacaspase de *Arabidopsis thaliana*
Ba^{2+}	Bário
Ca^{2+}	Cálcio
$CaCl_2$	Cloreto de cálcio
CaMCA	Metacaspase de *Candida albicans*
CaMCA-ΔN115	Metacaspase truncada (115 aminoácidos) de *Candida albicans*
CaMCA-ΔN86	Metacaspase truncada (86 aminoácidos) de *Candida albicans*
CDC	Centros De Controle E Prevenção De Doenças
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cu^{2+}	Cobre
CVV	Candidíase Vulvovaginal
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO_{600}	Densidade óptica
Fe^{2+}	Ferro ferroso
Fe^{3+}	Ferro férrico
K^{+}	Potássio
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LmjMCA	Metacaspase de *Leishmania major*
MCR	morte celular regulada
Mg^{2+}	Magnésio
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
MIPC	Manose-Inositol-Fosfo-Ceramida
Mn^{2+}	Manganês
$MnCl_2$	Cloreto de manganês
MoMca	Metacaspase de *Magnaporthe oryzae*

Na_2HPO_4	Fosfato de sódio
NaCl	Cloreto se sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Ni^{2+}	Níquel
OMS	Organização Mundial Da Saúde
PARP	poli (ADP-ribose) polimerase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Sm^{3+}	Samário
SmAc	Acetato de semário
Sods	Superóxido Dismutases
TAE	Tampão TRIS-Acetato-EGTA
TbMCA	Metacaspase de *Trypanossoma brucei*
TEDA	*T5 exonuclease DNA assembly*
TNF	fator de necrose tumoral
UTI	Unidades De Terapia Ontensiva
YCA1	Metacaspase de *Saccharomyces cerevisiae*
Zn^{2+}	Zinco

ABREVIAÇÕES DOS AMINOÁCIDOS

NOME DOS AMINOÁCIDOS	3 LETRAS	1 LETRA
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

1.1 INFECÇÕES FÚNGICAS 20

1.2 *Candida albicans* 23

1.2.1 Estrutura da parede celular da *Candida albicans* 24

1.2.1.1 Biossíntese da parede celular 26

1.2.1.2 Lipídios presentes na parede celular 27

1.2.1.3 Quitina 27

1.2.1.4 Glucanos 28

1.2.1.5 Proteínas da parede celular 30

1.2.2 Fatores de virulência da *Candida albicans* 31

1.2.2.2 Polimorfismo celular 32

1.2.2.3 Adesão, invasão e dano à célula hospedeira 33

1.2.2.4 Formação de biofilme 34

1.2.2.5 Adaptação metabólica 36

1.2.2.6 Resistência ao estresse 36

1.2.2.7 Evasão do sistema imunológico 37

1.3 MEDICAMENTOS USADOS NO TRATAMENTO DE INFEÇÕES POR *C. albicans* . 37

1.3.1 Polienos 38

1.3.2 Azóis 38

1.3.3 Equinocandinas 40

1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DA *C. albicans* AOS ANTIFÚNGICOS 41

1.4.1 Alteração nos receptores alvo 42

1.4.2 Super-expressão de bombas de efluxo 42

1.4.3 Modulação das respostas ao estresse 43

1.5 MORTE CELULAR 45

1.5.1 Apoptose 47

1.5.1.1 Via intrínseca 48

1.5.1.2 Via extrínseca 49

1.5 PROTEASES 49

1.5.1 Cisteíno protease 51

1.6 METACASPASES 54

1.6.1 Análise estrutural e funcional das metacaspases: implicações na atividade proteolítica e regulação por íons metálicos 61

1.6.2 Metacaspase de *C. albicans* – CaMCA 66

2.1. OBJETIVO GERAL ... 69
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS ... 69
3.1 PROJEÇÃO DOS *PRIMERS* ... 70
3.2 DNA MOLDE ... 71
3.3 PREPARAÇÃO DO VETOR E INSERTO PARA APLICAÇÃO DO PROTOCOLO TEDA ... 71
3.3.1 Amplificação do pET28(a) através da reação de PCR ... 72
3.3.2 Mutação *in vitro* do DNA codificante da CaMCA usando a reação de extensão de sobreposição de *primer* ... 73
3.3.3 Procedimento TEDA ... 75
3.4 PREPARAÇÃO DAS BACTÉRIAS *E. coli* Dh5α E BL21 (DE3) plysS COMPETENTES PARA TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO ... 76
3.5 TRIAGEM DAS COLÔNIAS POSITIVAS ... 77
3.6 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO PLASMÍDEO OBTIDO POR PCR USANDO *PRIMERS* T7 ... 78
3.7 SEQUENCIAMENTO ... 78
3.8 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS DE *Escherichia coli* BL21 (DE3) plysS COM O PRODUTO DA LISE ALCALINA ... 78
3.9 ENSAIOS PARA EXPRESSÃO DA CaMCA CONTENDO AS RESPECTIVAS MUTAÇÕES ... 79
3.10 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DA CaMCA CONTENDO AS RESPECTIVAS MUTAÇÕES ATRAVÉS DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-Page) ... 80
3.11 PURIFICAÇÃO ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE ... 80
3.12 WESTERN BLOTTING ... 81
3.13 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO Ca^{2+} SOBRE A ESTRUTURA DA CaMCA ... 82
3.14 TESTE DE PROCESSAMENTO USANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO ... 82
4 RESULTADOS ... 83
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA CaMCA ÍNTEGRA ... 83
4.2 DELEÇÃO DO N-TERMINAL – CaMCA TRUNCADA (CaMCA-ΔN115) ... 88
4.3 DELEÇÃO DO N-TERMINAL – CaMCA TRUNCADA (CaMCA-ΔN86) ... 91
4.1 MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS ... 106
5 DISCUSSÃO ... 130
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CaMCA ÍNTEGRA ... 130
5.2 DELEÇÃO DO N-TERMINAL – CaMCA-ΔN115 ... 134
5.3 DELEÇÃO DO N-TERMINAL – CaMCA-ΔN86 ... 136
5.4 MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS ... 145

6. CONCLUSÃO 156
REFERÊNCIAS 158
ANEXO 1 - CYSTEINE PROTEASES AS POTENTIAL TARGETS FOR ANTI TRYPANOSOMATID DRUG DISCOVERY 185
ANEXO 2 - METACASPASE OF *Saccharomyces cerevisiae* (ScMCA-Ia) PRESENTS DIFFERENT CATALYTIC CYSTEINE IN A PROCESSED AND NON-PROCESSED FORM ..... **Erro! Indicador não definido.**
ANEXO 3 - MUTAÇÕES SÍTIO-DIRIGIDAS NA METACASPASE DE *S. cerevisiae*: UMA ABORDAGEM, METODOLÓGICA AVANÇADA PARA ESTUDOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS ..... **Erro! Indicador não definido.**

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFECÇÕES FÚNGICAS

Os fungos, como um dos maiores reinos eucarióticos, possuem uma diversidade de padrões de ciclo de vida, adaptando-se as mudanças ambientais (CHOI & KIM, 2017). Embora existam entre 1,5 e 5 milhões de espécies, apenas algumas centenas têm potencial patogênico em humanos (HAWKSWORTH, 2001). O filo *Ascomycota* abriga patógenos humanos relevantes, como *Histoplasma, Blastomyces, Coccidioides e Paracoccidioides*, que podem infectar até mesmo indivíduos saudáveis. Por outro lado, fungos oportunistas, como *Aspergillus, Fusarium, Scedosporium e Candida*, tendem a afetar principalmente pessoas com imunossupressão (LOPES & LIONAKIS, 2022).

De acordo com Fisher *et al.,* (2012), há uma correlação positiva entre patógenos fúngicos e a vida animal e vegetal, destacando o impacto significativo dos fungos na extinção de espécies, na segurança alimentar e nas disfunções do ecossistema. Por outro lado, as infecções fúngicas representam uma séria preocupação para a saúde humana, especialmente em pacientes com condições médicas subjacentes (REDDY, PADMAVATHI & NANCHARAIAH, 2022). Em humanos, essas infecções podem variar de comuns, leves e superficiais, sendo que as infecções invasivas representam uma ameaça a vida, especialmente em indivíduos com sistema imunológico comprometido como pacientes com AIDS, aqueles que estão fazendo quimioterapia ou medicamentos imunossupressores (KÖHLER, CASADEVALL & PERFECT, 2014; BONGOMIN *et al.,* 2017).

Responsáveis por pelo menos 1,5 milhão de mortes anuais em todo o mundo, essas infecções são difíceis de diagnosticar e ainda mais difíceis de tratar. Em pacientes que apresentam comprometimento do sistema imunológico, as infecções fúngicas tendem a progredir rapidamente, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade (KÖHLER, CASADEVALL & PERFECT, 2014; BONGOMIN *et al.,* 2017).

A maioria dessas infecções contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade, implicando em desafios significativos no tratamento e na gestão clínica. O desfecho da infecção é influenciado pela capacidade patogênica do fungo, pela resposta imunológica do hospedeiro e pela localização da infecção. De modo geral,

as infecções fúngicas são categorizadas como superficiais, cutâneas/mucosas, subcutâneas e invasivas (ZHAN & LIU, 2016).

As infecções superficiais afetam principalmente a pele, unhas e cabelo, sem causar mudanças patológicas significativas ou uma resposta imunológica celular pronunciada. Um exemplo comum é a micose cutânea causada por dermatófitos, que infectam tecidos ricos em queratina como a pele. Por outro lado, as infecções subcutâneas envolvem camadas mais profundas da pele e do tecido subcutâneo, podendo incluir condições como a cromoblastomicose (ZHAN & LIU, 2016). As infecções fúngicas invasivas são caracterizadas como infecções sistêmicas resultantes da invasão de tecidos profundos, e diferente das infecções fúngicas superficiais, representam condições graves com altas taxas de morbidade e mortalidade. As espécies mais comuns associadas a essas infecções incluem *Candida, Aspergillus, Cryptococcus* e *Pneumocystis*. Além disso, cepas endêmicas como *Blastomyces, Histoplasma, Paracoccidioides* e *Coccidioides* também podem causar infecções sistêmicas graves em pacientes com comprometimento imunológico. Devido ao número limitado de antifúngicos que podem ser usados sistemicamente, o tratamento das infecções fúngicas invasivas são um grande desafio clínico (MALCOLM & CHIN-HONG, 2013; ZHAN & LIU, 2016; FANG *et al.,* 2023).

Apesar de ser uma preocupação alarmante, há uma notável falta de conscientização clínica em relação as infecções fúngicas, indicando que essas questões continuam sendo negligenciadas na esfera da saúde pública (RODRIGUES & NOSANCHUK, 2020). No Brasil, foi apenas em 2021 que o Ministério da Saúde, em colaboração com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), elaborou uma nota técnica abordando a vigilância, identificação, prevenção e controle de infecções fúngicas invasivas, em meio ao contexto da pandemia da COVID-19.

Em 2021, a preocupação com infecções fúngicas relacionadas a pandemia da COVID-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2 aumentou consideravelmente. De acordo com Sharma *et al.,* (2021), a infecção pelo SARS-CoV-2 resulta em uma diminuição das células T, incluindo as células CD4 e CD8, o que enfraquece o sistema imunológico e torna os pacientes mais suscetíveis a infecções fúngicas.

Uma das espécies fúngicas frequentemente associadas as infecções pós-COVID-19 é a *Mucorales*, com o *Rhizopus arrhizus* sendo responsável pela maioria dos casos de mucormicose em todo o mundo (GOKULSHANKAR, 2021; ARORA, 2021; MENDONÇA *et al.,* 2022). Além disso, a pandemia de COVID-19 aumentou a

transmissão de outras infecções fúngicas nosocomiais, como as causadas por *Candida auris*, sendo considerada uma séria ameaça a saúde. Desde sua identificação em 2009, surtos de *C. auris* têm sido relatados apresentando preocupações crescentes devido a sua alta resistência a antifúngicos e rápida transmissão em ambientes hospitalares (ALFOUZAN 2020; THEODOROPOULOS, 2020; MENDONÇA *et al.,* 2022).

Em países subdesenvolvidos, os patógenos fúngicos mais prevalentes são o *Cryptococcus spp* e o *Pneumocystis spp*, associados principalmente a AIDS. Em contraste, em países desenvolvidos as infecções invasivas mais comuns são causadas por *Candida spp* e por *Aspergillus spp.* Além disso, fungos endêmicos como *Blastomyces, Histoplasma, Paracoccidioides e Coccidioides* podem causar infecções localizadas, mas podem se tornar sistêmicas e graves em pacientes imunocomprometidos (MENDONÇA *et al.,* 2022). As espécies de *Candida* são reconhecidas como uma das principais causas de infecções fúngicas oportunistas em seres humanos, com destaque para *Candida albicans, Candida glabrata* (resistente a medicamentos), *Candida auris* (uma nova ameaça global a saúde pública), além de outras espécies emergentes como *Candida tropicalis, Candida parapsilosis e Candida Krusei* (ALFOUZAN 2020; THEODOROPOULOS, 2020; MENDONÇA *et al.,* 2022).

O cenário atual das infecções fúngicas demonstra uma necessidade clara e urgente de diagnósticos mais precisos, de medicamentos antifúngicos mais seguros e eficazes e de terapias direcionadas ao hospedeiro (KÖHLER, CASADEVALL & PERFECT, 2014). Pesquisas voltadas para a elucidação de possíveis alvos terapêuticos podem contribuir para com a diminuição na taxa de morbidade e mortalidade causada por patógenos fúngicos (CASADEVALL & PERFECT, 2014).

Os tratamentos convencionais para infecções fúngicas graves representam um grande desafio, especialmente em ambientes com recursos limitados, devido a lentidão dos testes de diagnósticos convencionais e a disponibilidade desigual e, muitas vezes, ao alto custo e toxicidade dos tratamentos antifúngicos (BONGOMIN *et al.,* 2017). A dificuldade em encontrar novos alvos terapêuticos para o tratamento de infecções fúngicas é amplamente atribuída ao fato de que os fungos, como eucariotos, compartilham mecanismos fundamentais de crescimento e divisão celular com os humanos (KÖHLER, CASADEVALL & PERFECT, 2014).

1.2 *Candida albicans*

Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento significativo nos casos de infecções causadas por fungos do gênero *Candida.* Dentre as espécies de *Candida*, a *C. albicans* é a que apresenta uma maior incidência de infecções em todos os grupos de pacientes, seguida por *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida Krusei* (NISHIMOTO, SHARMA & ROGERS, 2020).

Diversos fatores contribuem para esse aumento, incluindo o uso excessivo de antibióticos de amplo espectro, tratamentos de quimioterapia, transplantes de órgãos, uso de cateteres e deficiências nos exames microbiológicos de rotina (NISHIMOTO, SHARMA & ROGERS, 2020). Estima-se que as infecções por *Candida* representem mais de 700 mil casos anualmente em todo o mundo (BONGOMIN *et al.,* 2017), e essas infecções estão associadas a taxas de mortalidade elevadas, que variam de 40 a 60%. Embora algumas infecções possam ser leves e superficiais, como as manifestações na mucosa e derme, além de candidíase oral e vaginal (HOFFMANN *et al.,* 2013; FINDLEY *et al.,* 2013; MERENSTEIN *et al.,* 2013; ARENDRUP & PATTERSON, 2017; KOEHLER *et al.,* 2019), outras podem se disseminar e atingir a corrente sanguínea, aumentando significativamente o risco de morte, especialmente em pacientes imunocomprometidos, como aqueles com AIDS, pacientes transplantados ou sob terapias imunossupressoras (MUSKETT *et al.,* 2011; DEIKEMA *et al.,* 2012).

O fungo oportunista *C. albicans* é um organismo comensal que coloniza diversos locais do corpo humano como o trato gastrointestinal, reprodutivo, cavidade oral e pele, fazendo parte da microbiota em indivíduos saudáveis (JABRA-RIZK *et al.,* 2016). Normalmente sua proliferação nesses locais é controlada pelo sistema imunológico do hospedeiro e outros componentes da microbiota.

O comprometimento a integridade da barreira e/ou as respostas imunes do hospedeiro, como mudanças nos níveis de pH e oxigênio, uso de antibióticos, estresse, infecções por outros patógenos ou terapia imunossupressora (PFALLER & DIEKEMA, 2007; NOBILE & JOHNSON, 2015), essas alterações podem influenciar significativamente o crescimento e a fisiologia da *C. albicans,* resultando em mudanças na expressão de genes, proteínas, metabolismo e morfologia que por sua vez podem causar danos ao hospedeiro (JABRA-RIZK *et al.,* 2016) e favorecer a penetração do fungo através do epitélio e alcançar regiões anatômicas mais

profundas. Essas mudanças podem ser exacerbadas em indivíduos imunocomprometidos, aumentando o risco de infecções fúngicas invasivas e complicações associadas (NOBILE & JOHNSON, 2015).

A transição do comensalismo para a patogenicidade está intrinsecamente ligada aos fatores e condições que promovem o comensalismo ou oportunismo em *C. albicans.* Durante a candidíase vulvovaginal (CVV), a *C. albicans* é um colonizador imunorreativo, enquanto nas infecções sistêmicas são principalmente nosocomiais e geralmente associadas a condições predisponentes. Isso só é possível pois o fungo é capaz de ajustar a expressão de seu arsenal de fatores de virulência e atributos favoráveis para a colonização local (d'ENFERT *et al.,* 2021).

As infecções fúngicas têm um impacto significativo na qualidade de vida do hospedeiro. Um estudo recente realizado por Rosati *et al.,* (2020) revelou que cerca de 75% das mulheres em idade reprodutiva experimentarão pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal , enquanto até 9% dessas mulheres podem sofrer de CVV recorrente. A candidíase orofaríngea, por sua vez, é comumente diagnosticada em pacientes portadores do HIV, e muitos casos de infecção aguda estão associados ao uso de antibióticos de amplo espectro (VILA *et al.,* 2020).

Quanto as infecções sistêmicas elas frequentemente resultam da disseminação do fungo para a corrente sanguínea, geralmente originada do trato gastrointestinal do paciente. Diversos fatores predispõem ao desenvolvimento de candidíase sistêmica, incluindo o uso de cateteres, tratamentos de diálise, nutrição parenteral, longos períodos de administração de antibióticos de amplo espectro, permanência prolongada em unidades de terapia intensiva (UTI), cirurgias de grande porte e comprometimento do sistema imunológico induzido por medicamentos, como corticoides ou neutropenia associada a quimioterapia (ZHAI *et al.,* 2020). Uma vez que atinge a corrente sanguínea, o fungo pode se disseminar para órgãos vitais, como rins, fígado e baço. Apesar da disponibilidade de medicamentos antifúngicos, a taxa de mortalidade associada a essas infecções varia de 10 a 47%, dependendo da região geográfica (BROWN *et al.,* 2012).

1.2.1 Estrutura da parede celular da *Candida albicans*

Os fungos são organismos eucarióticos cuja estrutura celular pode ser distinguida por características específicas. Apresentam uma camada externa

protetora chamada parede celular, que não só fornece proteção, mas também desempenha um papel crucial na determinação da forma e na comunicação entre as células (BOWMAN & FREE, 2006). No desenvolvimento do processo patogênico, a parede celular da *C. albicans* (assim como em outros fungos patogênicos) desempenha uma função crucial. Esta estrutura externa protege o fungo dos mecanismos de defesa do hospedeiro e estabelece o contato direto com as células hospedeiras, aderindo à sua superfície. Além disso, a parede celular contém antígenos importantes e outros compostos que influenciam o equilíbrio homeostático do hospedeiro em favor do parasita (HERRERA *et al.,* 2006).

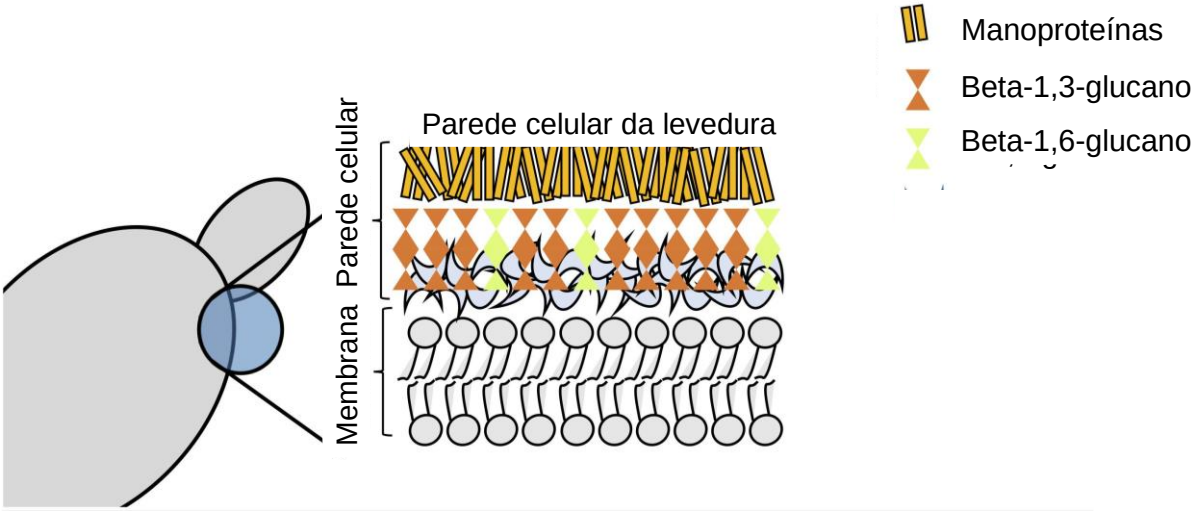
A parede celular da *C. albicans* é composta por três componentes principais: (i) um esqueleto de quitina, (ii) uma rede de β-(1,3)- e β-(1,6)-glucano, e (iii) proteínas altamente glicosiladas, as vezes referidas como manoproteínas. A composição da parede influencia diretamente suas funções e interações com o ambiente, incluindo o reconhecimento imunológico por plantas e animais. As paredes celulares dos fungos são estratificadas, com uma camada interna composta por um núcleo de β-glucano ramificado ligado covalentemente com uma pequena proporção de quitina. O β-glucano e a quitina formam ligações de hidrogênio e podem se agrupar em microfibrilas fibrosas (FLEET, 1991; LATGÉ, 2007; GOW, LATGE & MUNRO, 2017). Além de promover a adesão da célula fúngica a célula do hospedeiro com proteínas de adesão como Als1-7, Als9 e Hwp1, cabe a parede celular proteger a célula de condições estressantes, como condições osmóticas, desidratação e mudanças de temperatura, bem como proteger contra o sistema imunológico do hospedeiro (d'ENFERT *et al.,* 2021).

A membrana celular é composta por uma bicamada fosfolipídica, contendo proteínas que atuam como receptores, transporte, transdução de sinal. Ainda é responsável pela comunicação celular com o meio externo. O ergosterol é o principal esterol da membrana celular fúngica. Sintetizado no retículo endoplasmático e nos corpos lipídicos, é o principal responsável pela estabilidade, rigidez e resistência a estressores físicos (TALAPKO *et al.,* 2021).

Leveduras como as do gênero *Candida* e *Saccharomyces* e o patógeno humano *Pneumocystis jiroveci* possuem uma parede celular externa composta por glicoproteínas altamente manosiladas que cobrem a parede interna. Em *C. albicans* e *S. cerevisiae*, o β-(1,6) glucano desempenha o papel de uma molécula ligante, conectando as proteínas da parede celular (CWPs) ao esqueleto de β-(1,3) glucano-

quitina por meio de um resíduo de glicosilfosfatidil inositol (GPI) (Figura 1) (KLIS *et al.,* 2001; IORIO *et al.,* 2008).

Figura 01: Organização estrutural da parede celular do patógeno oportunista *C.albicans.*



Fonte: Herrera *et al.,* (2006).

As manoproteínas são abundantemente presentes na superfície externa da parede da *C. albicans*. Em diversos fungos, incluindo *C. albicans*, as proteínas da parede estão ligadas a camada interna de β-glucano e/ou quitina através das cadeias laterais de β-1,6-glucano ou, em menor medida, ao β-1,3-glucano. Os polissacarídeos estruturais se acumulam na camada mais interna da parede celular (HORISBERGER & CLERC, 1988; HERRERA *et al.,* 2006).

1.2.1.1 Biossíntese da parede celular

Polissacarídeos como quitina e glucano são sintetizados na membrana plasmática por complexos enzimáticos transmembrana. Inicialmente, esses complexos são direcionados para a membrana plasmática de forma inativa através de vesículas secretoras. Posteriormente, eles são ativados após a inserção na membrana plasmática. Esse processo contrasta com a síntese de mananos e outros glicoconjugados, que ocorre no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Nessas estruturas os glicoconjugados podem ser conjugados a proteínas da parede celular e em seguida serem transportados para a parede celular pela rota secretora, mediada por vesículas secretoras. Todas as sintetases utilizam açúcares difosfato

nucleotídicos como substratos, o que implica que as enzimas das vias metabólicas responsáveis pela síntese de açúcares nucleotídicos são essenciais para a construção da parede celular e representam um fator limitante da taxa de síntese (GOW *et al.,* 2017).

1.2.1.2 Lipídios presentes na parede celular

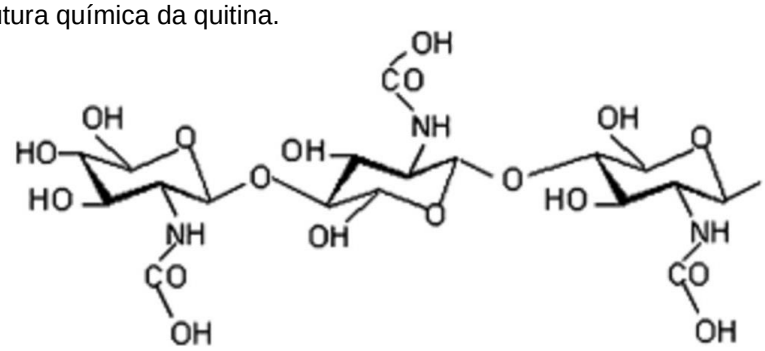
Os lipídios constituem uma fração minoritária, porém importante, da parede celular da *C. albicans* e de fungos em geral. Um lipídio notável presente na parede celular da levedura é o fosfolipomanano. A síntese do fosfolipomanano ocorre por meio de um mecanismo único que se diferencia da via convencional no estágio do manose-inositol-fosfo-ceramida (MIPC) (GOW *et al.,* 2017).

A mutação do gene MIT1, responsável pela codificação da manose transferase do produto de degradação da glicose (GDP)-MIPC, resultou na redução da virulência em um modelo animal de camundongos, bem como na resistência a análise por macrófagos (MILLE *et al.,* 2004).

1.2.1.3 Quitina

A quitina consiste em uma cadeia linear de mais de 2000 unidades de N-acetilglicosamina (GlcNAc), unidas por ligações β-1,4 (Figura 2). Essas cadeias de quitina se organizam de forma antiparalela por meio de ligações de hidrogênio, formando microfibrilas compostas por cerca de 20 a 400 cadeias. Devido a essa organização, a quitina é reconhecida como um dos materiais naturais mais insolúveis, o que justifica suas ligações com o β-1,3-glucano na formação do arcabouço básico da parede celular, onde as manoproteínas são covalentemente ligadas (ELIEH-ALI-KOMI & HAMBLIN, 2016).

Figura 02: Estrutura química da quitina.



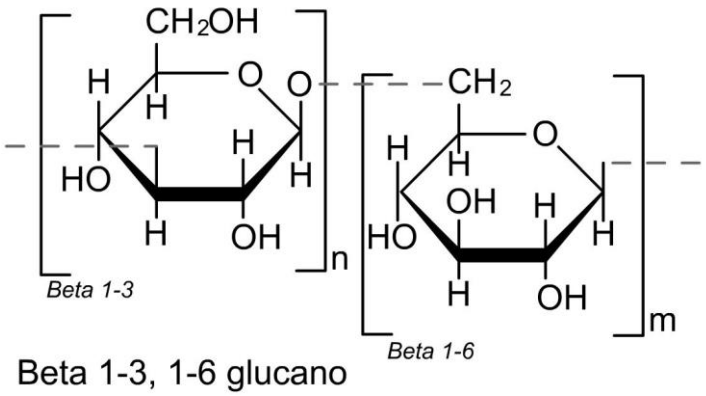
Fonte: Herrera *et al.,* (2006).

A síntese de quitina implica em uma reação de transglicosilação dos resíduos de GlcNAc a partir do substrato UDP-N-acetilglicosamina. Essa reação, catalisada por enzimas denominadas quitina sintases (Chsps), requer a presença de um metal divalente, o Mg^{2+}, porém não requer a participação de lipídios ou de intermediários. A quitina sintase é acumulada no citosol das células fúngicas, incluindo *C. albicans*, em microvesículas denominadas de quitossomas. Estas são responsáveis pela transferência da enzima do seu local de síntese para o seu local de ação (RUIZ-HERRERA & RUIZ-MEDRANO, 2004).

1.2.1.4 Glucanos

A *C. albicans* não apresenta α-glucanos, sendo os β-glucanos os polissacarídeos predominantes em sua parede celular, assim como em outros fungos. Estes consistem em polímeros de unidades de glicose ligadas por ligações glicosídicas β-1,3 e/ou β-1,6 (Figura 3). As cadeias de β-1,3-glucano possuem uma estrutura helicoidal ou espiral, ocorrendo como uma única cadeia polimérica ou como um complexo de três cadeias poliméricas, estabilizado por extensas ligações de hidrogênio no resíduo hidroxila C-2. A forma de tripla hélice é a conformação molécula mais comum encontrada na natureza (HERRERA *et al.,* 2006).

Figura 03: Estrutura química dos β-glucanos.



Fonte: Herrera *et al.,* (2006).

O sistema imunológico inato identifica agentes infecciosos por meio de receptores de reconhecimento de padrões, que reconhecem macromoléculas específicas de patógenos, conhecidas como "padrões moleculares associados a patógenos". Os glucanos presentes na parede celular dos fungos estimulam de maneira não específica diversos aspectos da imunidade inata por meio da interação com receptores de membrana em células imunes competentes (BREUEL *et al.,* 2004).

O β-(1,3) glucano, é sintetizado por meio de um complexo de glucano sintase associado a membrana plasmática (Figura 02). Esse complexo utiliza UDP-glicose como substrato e transporta cadeias lineares de β-(1,3) glucano através da membrana para a parede celular. Posteriormente, o β-(1,3) glucano pode ser utilizado como substrato por várias enzimas transglicosidases presentes na parede celular (DOUGLAS, 2001).

As leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans* possuem uma camada externa de proteínas altamente glicosiladas com resíduos de oligomanosil α e β ligados por manosiltransferases que utilizam GDP-manose como substrato (CUTLER, 2001). As N-glicanas são a principal forma de modificação das manoproteínas e consistem em uma estrutura central, semelhante em todos os eucariotos, que é posteriormente elaborada no complexo de Golgi para formar uma cadeia externa composta por uma espinha dorsal de manana α-(1,6) linear altamente ramificada com cadeias laterais contendo α-(1,2) e α-(1,3) (THOMPSON *et al.,* 1999; CUTLER, 2001).

1.2.1.5 Proteínas da parede celular

Avanços na identificação de proteínas da parede celular da *C. albicans* foram impulsionados pelo sequenciamento de genomas, análise computacional e espectrometria de massa. A definição de proteínas de parede celular tornou-se complexa devido a descoberta de proteínas consideradas citoplasmáticas que estão ligadas as paredes celulares. Como resultado, as proteínas de parede celular foram divididas em duas classes: aquelas extraídas por detergentes iônicos (classe 1) e as resistentes a esse tratamento (classe 2), que incluem glicoproteínas covalentemente ligadas à parede celular (subclasse 2a) e as proteínas não típicas retidas por mecanismos desconhecidos (subclasse 2b). Três tipos de glicoproteínas foram identificados na subclasse 2a: GPI-CWP, ASL-CWP e RAE-CWP (HERRERA *et al.,* 2006).

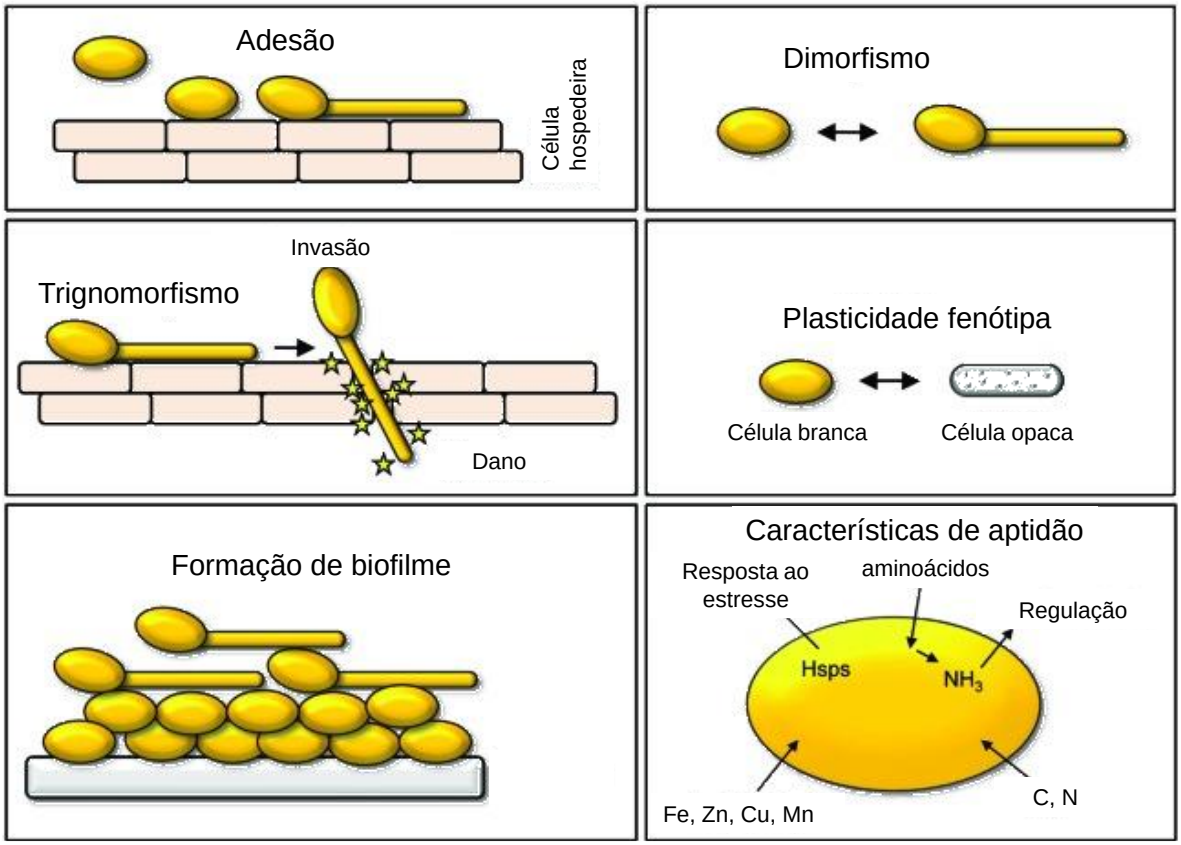
Algumas proteínas presentes na parede celular desempenham um papel significativo na colonização do patógeno no hospedeiro e na resposta imunológica do hospedeiro à invasão. É amplamente reconhecido que em fungos patogênicos essas proteínas podem funcionar como fatores de virulência. Por exemplo, estudos indicam que proteínas da parede celular quando extraídas por meio de β-mercaptoetanol, podem intensificar a artrite induzida por colágeno em modelos animais. Além disso, mutações que afetam proteínas envolvidas na construção da parede celular têm sido associadas a uma redução na virulência. Essas descobertas fornecem evidências do papel das proteínas da parede como fatores de patogenicidade ou virulência, tanto de forma direta quanto indireta (FRADIN *et al.,* 2005).

As características hidrofóbicas das células de *C. albicans*, fundamentais para sua virulência, podem ser influenciadas pelos polissacarídeos presentes na região externa da parede celular, especialmente o β-1,2-manano ligado por fosfodiéster (HOBSON *et al.,* 2004). A capacidade de formação de biofilmes, estruturas organizadas com alta resistência aos medicamentos, também está vinculada as propriedades hidrofóbicas da superfície celular. Essa característica é crucial para permitir que a *C. albicans* colonize tecidos hospedeiros, implantes e materiais cirúrgicos (CAO *et al.,* 2005).

1.2.2 Fatores de virulência da *Candida albicans*

A capacidade da *C. albicans* de infectar uma variedade de hospedeiros é suportada por fatores de virulência e capacidade de adaptação ao meio. Dentre esses atributos, incluem-se a transição morfológica entre as formas de levedura e hifas, a expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, o fenômeno do tigmotropismo, a formação de biofilmes, a alternância fenotípica e a secreção de enzimas hidrolíticas (Figura 4), todos considerados fatores de virulência (NICHOLLS *et al.,* 2011). Além disso, os atributos adaptativos englobam a rápida adaptação às flutuações no pH do ambiente, a flexibilidade metabólica, sistemas robustos de aquisição de nutrientes e maquinários de resposta ao estresse altamente eficazes (NICHOLLS *et al.,* 2011; MAYER *et al.*, 2013).

Figura 04: Mecanismos de patogenicidade de *Candida albicans*



Fonte: Adaptado de MAYER *et al.*, 2013

1.2.2.2 Polimorfismo celular

Dependendo das condições ambientais, as células fúngicas têm a capacidade de alternar entre diferentes formas de crescimento e morfologia, incluindo levedura, pseudohifas e hifas. As hifas e pseudohifas apresentam distinções em sua morfologia, função e requisitos para o crescimento celular. Essa natureza polimórfica está intimamente ligada a patogênese e comensalismo do fungo. Em condições de ausência de nutrientes, microaerofilia e temperaturas mais baixas (24 a 28°C), as células de *C. albicans* podem formar clamidósporos, caracterizados por uma parede celular espessa (d'ENFERT *et al.,* 2021). Além disso, as células de *C. albicans* podem sofrer alterações fenotípicas, manifestando-se em diferentes cores como branco, cinza ou opaco, acompanhadas por variações morfológicas e no perfil de expressão gênica. Esse fenômeno conhecido como mudança fenotípica é altamente regulado e está associado ao comensalismo, adaptação ao hospedeiro, invasão e virulência do fungo (TAO *et al.,* 2014).

Em condições *in vitro* as formas celulares predominantes são arredondadas ou ovais e possuem uma morfologia unicelular. Elas podem estar envolvidas na formação de biofilmes, serem tóxicas ou manterem uma relação simbiótica no sangue, conservando essa relação no ambiente oral, na pele e na vagina (ANDES *et al.,* 2012).

As células em forma de pseudohifas da *C. albicans* exibem formas alongadas e elípticas, são induzidas em condições específicas como pH 6.0, temperatura de 35°C, meio sólido com baixa disponibilidade de nitrogênio e participam ativamente na formação de biofilmes (SOLL *et al.,* 1978). Nessas células, ocorre uma constrição no colo do broto e da célula-mãe, mantendo-se presente mesmo em junções septais subsequentes. Com variações significativas em largura e comprimento, podendo apresentar características tanto de hifas quanto de brotos alongados de células de levedura, com segmentos mais largos no centro do que nas extremidades. A conexão entre a célula-mãe e a célula-filha é frágil sendo facilmente interrompida por agitação mecânica (SUDBERY, 2001).

As hifas são caracterizadas pela ausência de estreitamento nos locais de septação e pela ramificação das células tubulares, enquanto as pseudohifas são células mais alongadas. A formação de filamentos é mais proeminente em temperaturas superiores a 37°C, pH alcalino e altas concentrações de CO_2. A transição das células de levedura para hifas é mediada por uma série de fatores de

transcrição e uma complexa rede reguladora, contribuindo para a virulência do fungo (JACOBSEN *et al.,* 2012; TALAPKO *et al.,* 2021). A largura das hifas é cerca de 2,0 µm, enquanto as células em pseudohifas são mais largas, com no mínimo 2,8 µm (CHEN *et al.,* 2019).

A transição entre as formas de crescimento da levedura e da hifa é denominada dimorfismo, e tem sido sugerido que ambas as formas de crescimento são importantes para a patogenicidade. A forma de hifa demonstrou ser mais invasiva do que a forma de levedura. Por outro lado, a forma de levedura é considerada a principal forma envolvida na disseminação (SAVILLE *et al.,* 2003).

Quando em sua forma comensal, a *C. albicans* está presente na microbiota humana na forma de levedura. Já a forma de hifa é invasiva, permitindo que as células penetrem nos tecidos do hospedeiro por meio de penetração ativa e endocitose induzida (MAYER, WILSON & HUBE, 2013). Várias vias de sinalização estão envolvidas nessa transição, sendo a proteína quinase A (PKA) dependente de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) a mais importante. Esse processo é acompanhado de uma mudança no perfil de expressão gênica, alterações na parede celular e expressão de diversos fatores de virulência (JACOBSEN *et al.,* 2012).

1.2.2.3 Adesão, invasão e dano à célula hospedeira

C. albicans possui um conjunto de proteínas (adesinas) que mediam a adesão entre suas células, a outros microrganismos, a superfícies abióticas e a células hospedeiras (GARCIA *et al.,* 2011). A relevância dos fatores de adesão e invasão para o sucesso patogênico da *C. albicans* é evidenciada pela sua habilidade de colonizar uma variedade de superfícies, desde os tecidos de mucosas do hospedeiro até dispositivos médicos e instrumentos cirúrgicos. Nos tecidos, as células da levedura aderem ao epitélio e/ou endotélio desencadeando a formação de hifas e a subsequente penetração ativa das células hospedeiras. Essa etapa é mediada por proteínas de adesão e invasão pertencentes as famílias Als e Hwp1 (NABILE *et al.,* 2006; LIU & FILLER, 2011).

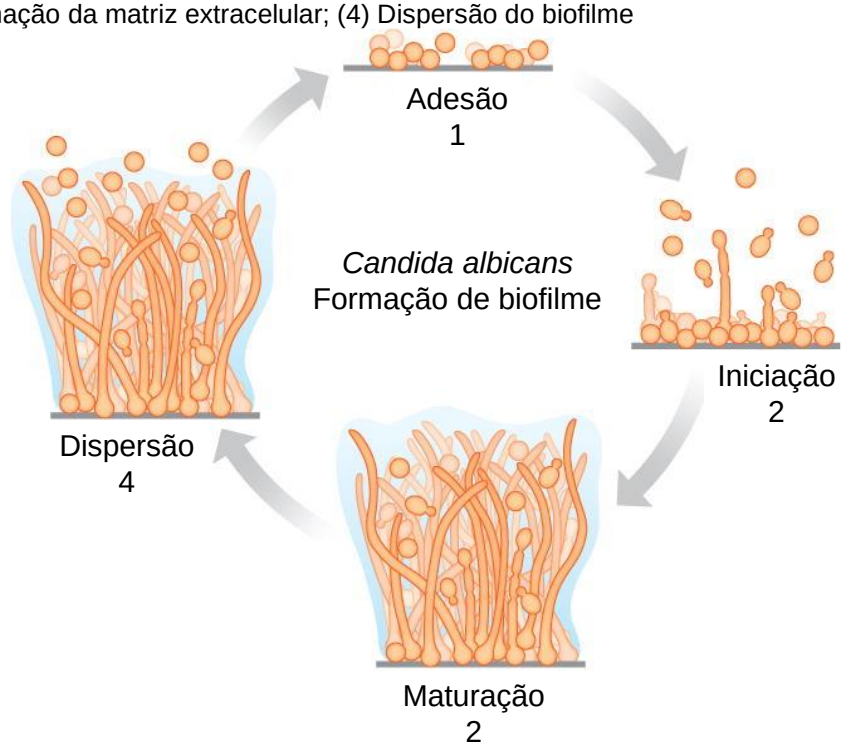
A *C. albicans* pode utilizar dois mecanismos diferentes para invadir as células do hospedeiro: endocitose induzida e penetração ativa. Durante a infecção na mucosa, a interação entre a *C. albicans* e as células epiteliais do hospedeiro acarreta processos como a endocitose, ocasionando a penetração do fungo no tecido (FILLER

et al., 1995). Em infecções sistêmicas, a penetração permite que o fungo alcance a corrente sanguínea, facilitando a disseminação para outros tecidos. Esse processo é mediado por adesinas e invasinas, como Als3 e Ssa1, que se ligam a proteínas de adesão específicas, como a N-caderina em células endoteliais e a E-caderina em células epiteliais orais (PHAN *et al.,* 2007). Durante o processo de penetração ocorre a expressão de proteínas associadas à formação de hifas, que podem penetrar ativamente na membrana plasmática das células hospedeiras. Além disso as células de *C. albicans* secretam hidrolases como proteinases aspárticas (Saps), fosfolipases e lipases, que desempenham papéis importantes na patogenicidade do fungo, incluindo a indução de danos celulares, recrutamento de células imunológicas e inflamação (ALBRECHT *et al.,* 2006).

1.2.2.4 Formação de biofilme

A formação de biofilme é uma das propriedades infectantes da *C. albicans.* Seu início se dá por meio da adesão celular a uma superfície, seguido do início da formação do biofilme, maturação e dispersão (Figura 5) (TALAPKO *et al.,* 2021).

Figura 05: Formação do biofilme de *C. albicans.* É um processo multifatorial, e consiste em quatro etapas principais: (1) Adesão inicial das células; (2) Proliferação e filamentação; (3) Maturação do biofilme e formação da matriz extracelular; (4) Dispersão do biofilme



Fonte: Adaptado de NOBILE & JOHNSON, 2015

A adesão é fortalecida pela expressão de proteínas associadas a parede celular do fungo, conhecidas como adesinas, que pertencem a três famílias: ALS, HWP e IFF/HYR. As adesinas ALS (Als1p-Als7p e Als9p) desempenham um papel fundamental no processo de adesão e no desenvolvimento do biofilme (GROOT *et al.,* 2013; HOYER, 2016). Além disso, outras adesinas também contribuem para a formação do biofilme das células de *C. albicans*, como a Eap1p, que possui relevância clínica devido a sua capacidade de mediar a formação de biofilme em plásticos presentes em dispositivos médicos (McCALL *et al.,* 2019).

Uma vez aderidas a superfície, as células iniciam o processo de formação de hifas e pseudohifas, formas morfológicas cruciais para o desenvolvimento do biofilme. As adesinas Als1p e Als3p desempenham papéis importantes na adesão das hifas durante a formação do biofilme (NOBILE *et al.,* 2008).

Após a formação inicial do biofilme, o aglomerado de células entra no processo de maturação e passam por mudanças em sua morfologia, número de células, expressão gênica e produção de matriz extracelular, formando microcolônias. A integridade estrutural do biofilme é atribuída as hifas, que também fornecem suporte para a fixação das pseudohifas (NOBILE & JOHNSON, 2015).

O estágio final do ciclo de vida do biofilme é a dispersão, onde as células são liberadas de um biofilme maduro, tornando-se livres para disseminar e estabelecer novos locais de infecção. A dispersão é regulada por diversos reguladores de dispersão (Nrg1p, Pes1p e Ume6p) (NOBILE & JOHNSON, 2015). As células dispersas possuem algumas características que as tornam importantes no contexto clínico, como a expressão de genes envolvidos na aquisição de micronutrientes e resistência a fármacos (UPPULURI *et al.,* 2018).

Um dos fatores que contribuem com o sucesso no processo de infecção pela *C. albicans* é sua diversidade morfológica e fisiológica, uma vez que se trata de um fungo polimórfico. As alterações morfológicas desenvolvidas pelas células de *C. albicans* estão associadas à sua capacidade de formação de biofilme, fator importante na capacidade de virulência do fungo (MIRANDA *et al.,* 2007). A formação de biofilme está diretamente relacionada com mecanismos de resistência a drogas (RAMAGE *et al.,* 2012).

Os biofilmes maduros apresentam resistência farmacológica e aos fatores imunológicos do hospedeiro, em comparação com as células não associadas ao biofilme. Esse aumento na resistência é atribuído a arquitetura complexa dos

biofilmes, a presença da matriz do biofilme, ao aumento da expressão de bombas de efluxo de fármacos e a plasticidade metabólica (FANNING & MITCHELL, 2012).

1.2.2.5 Adaptação metabólica

Durante infecções por *C. albicans*, a limitação de nutrientes nos tecidos é superada por meio de estratégias adaptativas desenvolvidas pelo fungo. Em condições de escassez de zinco, a levedura produz a proteína ligante de zinco PRA1, que facilita a aquisição desse micronutriente e interfere na resposta imune do hospedeiro (CITIULO *et al.,* 2012). Além disso, durante infecções sistêmicas a regulação dinâmica da assimilação de cobre com a superexpressão de Crp1 e Ctr1 é essencial para a virulência do fungo (MACKIE *et al.,* 2016). Outra perturbação comum é a homeostase do ferro, onde a expressão de FTR1 é crucial para a captação desse elemento promovendo a virulência durante a candidíase sistêmica (RAMANAN WANG, 2000).

Na maioria dos ambientes a glicose é a principal fonte de carbono para o crescimento da *C. albicans*. No entanto, em muitos locais onde ocorre colonização as condições apresentam escassez de glicose. Diante desse cenário, a *C. albicans* se adapta regulando vias alternativas do metabolismo de carbono, incluindo a utilização de ácidos carboxílicos como lactato, aminoácidos e N-acetilglucosamina (GlcNAc) (WILLIAMS & LORENZ, 2020). Cepas mutantes de *C. albicans* que apresentam deficiência dessas vias metabólicas demonstraram ter uma virulência reduzida (VESELY *et al.,* 2017; ALVES *et al.,* 2017).

1.2.2.6 Resistência ao estresse

Durante o processo de infecção e invasão, as células da *C. albicans* enfrentam diferentes estressores impostos pelo sistema imune do hospedeiro e pelas condições do microambiente, o que requer respostas adaptativas. Para resistir a morte por estresse oxidativo induzida pelas células do sistema imune do hospedeiro, o fungo desenvolveu seis superóxido dismutases (Sod), que desempenham um papel crucial na resistência a espécies reativas de oxigênio (FRIHNER *et al.,* 2009). Além disso, proteínas antioxidantes adicionais e genes de reparo de danos ao DNA são acionadas para lidar com o estresse oxidativo. Essas adaptações são fundamentais para a

sobrevivência e a capacidade patogênica da *C. albicans* em ambientes hostis durante a infecção (HWANG *et al.,* 2002).

A resposta ao estresse é influenciada por proteínas de choque térmico (Hsps), especialmente a Hsp90. Essa chaperona é dependente de ATP, sendo amplamente conservada e desempenha um papel crucial na estabilização de vários transdutores de sinal. Em *C. albicans*, a Hsp90 é fundamental para a virulência e resistência a medicamentos, pois regula a atividade da quinase ativada por mitógeno McK1, da quinase ativada por estresse Hog1/Sty1 e/ou da fosfatase calcineurina (LEACH *et al.,* 2012).

1.2.2.7 Evasão do sistema imunológico

O primeiro estágio na resposta imune contra a *C. albicans* envolve o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos pelos receptores de reconhecimento do hospedeiro (GOW & HUBE, 2012). A parede celular do fungo, composta por quitina, β-glucano e manoproteínas, é reconhecida pelos receptores desencadeando respostas imunes. Para evitar a ativação dessas respostas, a *C. albicans* pode minimizar a exposição aos padrões moleculares, mascarando componentes da parede celular em resposta a sinais metabólicos do hospedeiro (WHEELER *et al.,* 2008). Além disso, o fungo ativa modos de sobrevivência dentro de fagossomos adaptando-se ao ambiente pobre em nutrientes e ácido, o que inclui a indução de vias metabólicas de inanição e a produção de amônia para neutralizar o pH ácido e induzir a filamentação (TRIPATHI *et al.,* 2020).

1.3 MEDICAMENTOS USADOS NO TRATAMENTO DE INFEÇÕES POR *C. albicans*

Existem várias classes de medicamentos utilizados no tratamento de infecções por *Candida*. Os polienos, azóis e equinocandinas são empregados com eficácia variável, dependendo do tipo e do local da infecção, assim como da sensibilidade das espécies de *Candida* (PAPPAS *et al.,* 2016).

1.3.1 Polienos

Os polienos foram introduzidos na prática médica na década de 1950 e representam a classe mais antiga de medicamentos usados no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. A anfotericina B é o polieno mais utilizado devido ao seu amplo espectro de ação contra diversas espécies de fungos clinicamente relevantes, incluindo *Aspergillus, Cryptococcus* e várias espécies de *Candida* (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.,* 2010; ROBBINS, WRIGHT & COWEN, 2016).

Inicialmente, se acreditava que o mecanismo de ação dos polienos estava relacionado com sua ligação direta ao ergosterol, resultando na formação de complexos polieno-lipídicos o que causava o vazamento dos componentes celulares (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.,* 2010). Estudos mais recentes revelaram que na verdade a anfotericina B forma agregados extra membranosos, que extraem o ergosterol da membrana celular fúngica atuando como uma "esponja de esterol" (Figura 6) (ANDERSON *et al.,* 2014).

Figura 06: Mecanismo geral de ação dos fármacos da classe polienos. Polienos, como a anfotericina B, atuam como uma “esponja de esterol”, formando agregados extra membranosos que extraem o ergosterol das bicamadas lipídicas, causando instabilidade na membrana celular.



Fonte: Adaptado de LEE *et al.,* 2022

Uma das maiores limitações no uso da anfotericina B é a sua baixa biodisponibilidade oral e efeitos tóxicos (OSTROSKY-ZEICHNER *et al.,* 2010). Ainda na década de 90 foi desenvolvida a formulação lipídica da anfotericina B, o que levou a diminuição considerável da neurotoxicidade deste fármaco (PAPPAS *et al.,* 2016; ROBBINS, WRIGHT & COWEN, 2016).

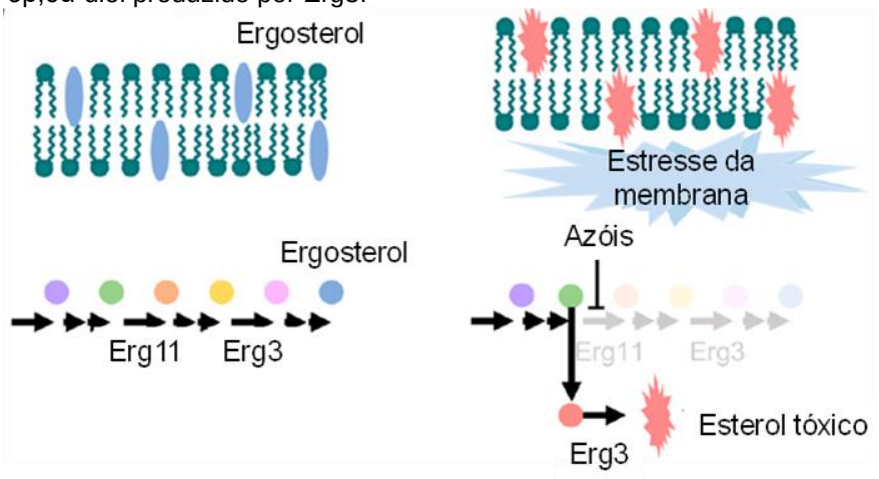
1.3.2 Azóis

Os azóis são a classe mais utilizada no tratamento de infecções causadas por *Candida* devido a sua disponibilidade, baixa toxicidade e biodisponibilidade oral

excepcional (ALLEN *et al.,* 2015; WHALEY *et al.,* 2016). É importante destacar que os azóis têm uma alta propensão para interações com outros fármacos, uma vez que inibem enzimas do citocromo P450, que são importantes no metabolismo de diversos medicamentos (ROEMER & KRYSAN, 2014).

Os azóis são compostos sintéticos heterocíclicos que foram introduzidos na prática médica por volta de 1980 (LEE *et al.,* 2022), e seu mecanismo de ação envolve a alteração da membrana celular fúngica (Figura 7). Seu efeito fungistático é devido a inibição seletiva da 14-alfa demetilase, codificada por ERG11. Essa enzima do citocromo P450 é essencial para a síntese de ergosterol, um componente crucial da membrana celular fúngica.

Figura 07: Mecanismo geral de ação dos fármacos da classe azóis. Os azóis exercem atividade fungistática inibindo a lanosterol 14- α -desmetilase (codificada por ERG11), o que leva a um bloqueio na síntese de ergosterol e ao acúmulo de intermediários de esteróis tóxicos, incluindo 14α-metilergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol produzido por Erg3.



Fonte: Adaptado de LEE et al., 2022

A síntese do ergosterol em *Candida albicans* é um processo complexo e crucial para a sobrevivência do fungo. O processo começa com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA. Em seguida, uma terceira molécula de acetil-CoA é adicionada para formar o HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA). A enzima HMG-CoA redutase então converte o HMG-CoA em ácido mevalônico, um passo chave na via dos esteróis (OXMAN et al., 2010; LORTHOLARY et al., 2011; FOTHERGILL et al., 2014). A partir do ácido mevalônico, uma série de reações gera o farnesil pirofosfato, que é convertido em esqualeno. O esqualeno, por ação da enzima esqualeno epoxidase, é transformado em 2,3-oxidoesqualeno, que se converte em lanosterol por meio da lanosterol sintase. O lanosterol, então, sofre

uma série de modificações, incluindo a demetilação pela enzima 14-alfa-demetilase (codificada pelo gene *ERG11*), além de outras reações de isomerização e redução, até finalmente se tornar ergosterol. O ergosterol é fundamental para a integridade e função da membrana fúngica, regulando sua fluidez, permeabilidade e estrutura. (ODDS *et al,* 2003; OXMAN *et al.,* 2010; LORTHOLARY *et al.,* 2011; FOTHERGILL *et al.,* 2014).

A inibição da 14-alfa demetilase leva a uma diminuição na produção de ergosterol e ao acúmulo de 14 alfa-metil esteróis, resultando em uma maior permeabilidade da membrana celular fúngica (OXMAN *et al.,* 2010; LORTHOLARY *et al.,* 2011; FOTHERGILL *et al.,* 2014). Para a *C. albicans*, a inibição da desmetilação do lanosterol pela Erg11 desvia a biossíntese de esterol para outras vias, levando ao acúmulo de 14α-metilergosta-8,24(28)-dien-3β,6α-diol. Esse acúmulo é tóxico para a célula e resulta no efeito fungistático (WATSON *et al.,* 1989).

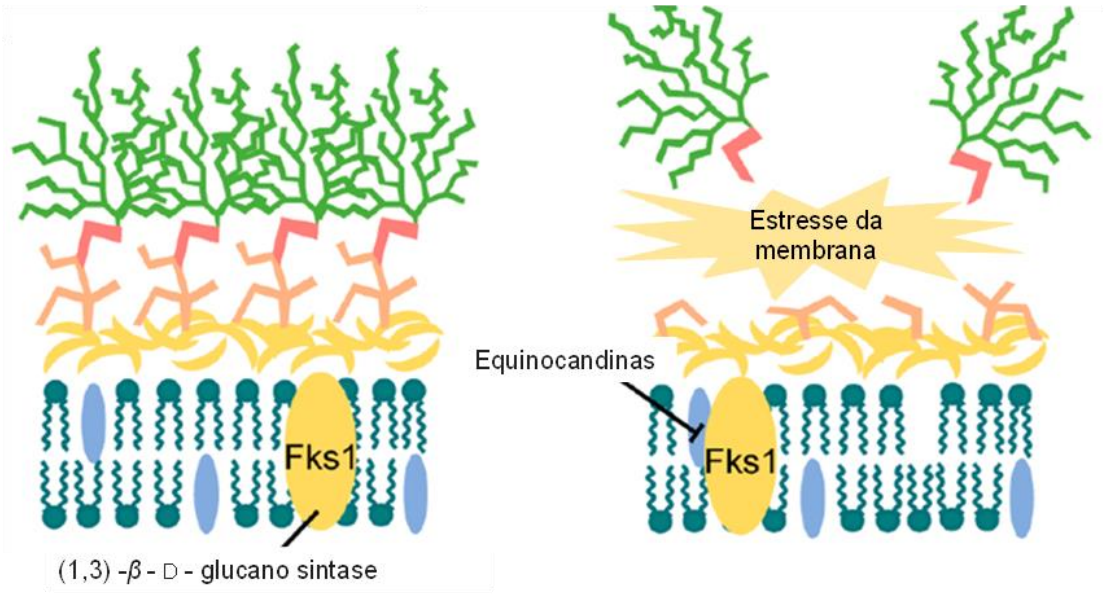
O fluconazol é comumente utilizado como a droga de escolha ou uma alternativa viável para o tratamento de muitas infecções invasivas causadas por *Candida* (PAPPAS *et al.,* 2016). Em relação a *C. albicans*, as taxas de resistência ao fluconazol são relativamente baixas em comparação com outras espécies de *Candida* (DEIKEMA *et al.,* 2012). No entanto, é importante notar que o uso profilático prolongado de fluconazol ou tratamento a longo prazo pode levar ao desenvolvimento de resistência secundária em cepas anteriormente suscetíveis ao medicamento. Nos Estados Unidos, por exemplo, observou-se um aumento significativo, entre 12 e 22%, na resistência ao fluconazol em pacientes com HIV durante o tratamento da candidíase orofaríngea (MASIA *et al.,* 2000; SANGLARD & ODDS, 2002).

1.3.3 Equinocandinas

Quando pensamos em novos tratamentos para combater infecções fúngicas, houve poucas inovações nas últimas décadas. As equinocandinas fazem parte da única nova classe de drogas antifúngicas a entrar na prática clínica. Seu mecanismo de ação está bem descrito e baseia-se na perda da integridade da parede celular fúngica e no desequilíbrio na pressão osmótica (CORNELY *et al.,* 2012; PAPPAS *et al.,* 2016), garantindo-lhes um excelente perfil de segurança, uma maior seletividade fúngica e baixa potência de interações com outros medicamentos (PATIL &

MAJUMDAR, 2017). As equinocandinas são capazes de se ligar de forma não competitiva à subunidade catalítica da (1,3)-ß-D-glucano sintase, que é codificada pela FKS1 em *C. albicans* (Figura 8) (CORNELY *et al.,* 2012; PAPPAS *et al.,* 2016).

Figura 08: Mecanismo geral de ação dos fármacos da classe equinocandinas. A parede celular dos fungos é composta por (1,3)-*ß*-D-glucano ligados por ligações covalentes a (1,6)-*ß* -D- glucano, quitina e manana. As quinocandinas inibem a síntese do (1,3)-*ß* -D- glucano (codificada pela FKS1 em *Candida albicans*), resultando na perda da integridade da parede celular.



Fonte: Adaptado de LEE *et al.,* 2022

Atualmente, as equinocandinas são recomendadas como tratamento de primeira linha para candidíase invasiva devido a sua potente atividade contra espécies de *Candida* (CORNELY *et al.,* 2012; PAPPAS *et al.,* 2016). Ao contrário dos azóis, como os polienos, as equinocandinas apresenta baixa absorção oral, limitando seu uso clínico a administração intravenosa (DENNING, 2003).

1.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DA *C. albicans* AOS ANTIFÚNGICOS

A resistência medicamentosa caracterizada pela elevação da concentração inibitória mínima (CIM) de um microrganismo acima dos limites clínicos aceitáveis, representa um desafio significativo no tratamento de infecções fúngicas. Esse fenômeno ocorre quando uma cepa previamente sensível a uma determinada droga passa a crescer em concentrações dessa substância superiores a CIM estabelecida. A resistência desenvolvida pelas espécies de *Candida* em resposta ao uso

indiscriminado de agentes antifúngicos é uma preocupação crescente na prática clínica (BERMAN & KRYSAN, 2020).

Diante de condições ambientais adversas, células de *C. albicans* empregam uma variedade de estratégias adaptativas para sua sobrevivência. Essas incluem a ocorrência de mutações genéticas, a amplificação da expressão de bombas de efluxo de múltiplas drogas (MRR1) e a modulação das vias de sinalização, tais como a PKA e a via cálcio-calmodulina-calcineurina (COWEN & STEINBACH, 2008).

1.4.1 Alteração nos receptores alvo

A resistência da *C.albicans* a classe dos azóis é primariamente atribuída a substituição de aminoácidos no gene ERG11, responsável pela codificação da lanosterol demetilase. Essas substituições reduzem a afinidade das ligações azóis-enzima, resultando na diminuição da eficácia do fármaco (REVIE *et al.,* 2018). Adicionalmente, cepas resistentes de *C. albicans* tendem a super-expressar o Erg11, contribuindo ainda mais para a redução da susceptibilidade aos azóis (ROBBINS, CAPLAN & COWEN, 2017).

A resistência aos polienos é menos prevalente em comparação com os azóis e geralmente está associada a alterações nas enzimas envolvidas na síntese do ergosterol, incluindo Erg2, Erg3, Erg5 e Erg11. Essas alterações resultam na redução da afinidade de ligação do fármaco aos seus alvos (JENSEN *et al.,* 2015).

No caso das equinocandinas, mutações nos genes FKS são os principais determinantes de resistência na maioria das espécies de *Candida*. Em *C. albicans*, as mutações que conferem resistência às equinocandinas ocorrem no gene FKS1, que codifica a (1,3)-ß-D-glucano sintase, alvo dessas drogas (CHOWDHARY *et al.,* 2018).

1.4.2 Super-expressão de bombas de efluxo

A resistência a azóis por muitos patógenos fúngicos é primariamente governada pela regulação positiva das bombas de efluxo. As principais classes de bombas de efluxo associadas a resistência aos azóis são as ATP-transportadoras de *cassette* de ligação (ABC *transporters*) e a subfamília dos facilitadores principais (MF) (COLEMAN & MYLONAKIS, 2009), as quais têm sido correlacionadas com a

formação de biofilme (MUKHERJEE *et al.,* 2003). Em *C. albicans*, dois transportadores de *cassette* de ligação de ATP (CDR1 e CDR2) foram associados a resistência a azóis, especialmente em pacientes que utilizam o fármaco por períodos prolongados (REVIE *et al.,* 2018). Embora a *C. albicans* codifique mais de 90 genes MF, apenas o gene MDR1 foi associado a resistência ao fluconazol (WIRSCHING, MICHEL & MORSCHHAUSER, 2000).

O fator de resistência a múltiplas drogas (MRR1) atua como regulador da bomba MF, sendo que a deleção de MRR1 reduz a expressão de MDR1 e aumenta a susceptibilidade aos azóis, enquanto mutações pontuais ativadoras em MRR1 aumentam a resistência aos azóis, sugerindo que MRR1 pode regular a resistência aos azóis (DUNKEL *et al.,* 2008).

Em leveduras de brotamento a regulação transcricional envolve diversos reguladores distintos. Uma família de fatores de transcrição conhecida como mediadores da resistência a drogas pleiotrópicas (RDP) consiste em proteínas contendo agrupamentos de zinco. As Pdr1p e Pdr3p regulam positivamente a expressão de vários genes transportadores de múltiplas drogas (MacPHERSON *et al.,* 2005).

Ao contrário dos azóis, os polienos e equinocandinas são menos influenciados pelas bombas de efluxo, uma vez que os polienos são moléculas hexapeptídicas cíclicas e hidrofóbicas, enquanto as equinocandinas atuam no folheto externo da membrana (ROBBINS, CAPLAN & COWEN, 2017).

1.4.3 Modulação das respostas ao estresse

O crescimento e proliferação da *C. albicans* estão sujeitos a uma série de fatores, incluindo as condições nutricionais do meio de crescimento, pH e temperatura. Alterações em um ou mais desses fatores podem perturbar a homeostase celular, induzindo uma condição de estresse celular. Os fármacos antifúngicos utilizados no controle das infecções também representam um estresse celular e as células fúngicas respondem adaptando-se para sobreviver, desenvolvendo uma variedade de mecanismos para driblar a ação dos fármacos (ROBBINS, CAPLAN & COWEN, 2017).

No contexto dos azóis e polienos a principal adaptação celular observada em *C. albicans* envolve a biossíntese do ergosterol, resultante de mutações em ERG3, com dependência da proteína de choque térmico (Hsp90) (SPETTEL *et al.,* 2019). Estudos anteriores identificaram mutações pontuais em aminoácidos associadas à redução da susceptibilidade ao fluconazol (WHALEY *et al.,* 2016).

A calcineurina desempenha um papel fundamental na mediação dos efeitos da Hsp na resistência e tolerância aos azóis e equinocandinas por *C. albicans* (LAFAYETTE *et al.,* 2010). Esta enzima, uma fosfatase envolvida na sinalização dependente de cálcio e na regulação de diversos processos celulares (JUVVADI *et al.,* 2017), é essencial para a sobrevivência celular na presença de fluconazol (SANGLARD *et al.,* 2003).

A Hsp90 estabiliza a calcineurina permitindo que as células de *C. albicans* respondam ao estresse dependente de calcineurina, o que é crucial para a sobrevivência celular durante o tratamento com fluconazol e equinocandinas. Além disso, a ação da proteína quinase C (PKC), calcineurina e Hsp90 são fundamentais para a diminuição da susceptibilidade as equinocandinas (SINGH *et al.,* 2009).

Além das alterações na biossíntese do ergosterol, modificações pós-traducionais (metilação, acetilação e fosforilação) também regulam respostas ao estresse, virulência e tolerância antifúngica em várias espécies de *Candida*. Estudos realizados com a levedura *S. cerevisiae* mostraram que a deleção da lisina deacetilase Hda1 e Rpd3 aumenta a sensibilidade ao azol, genes que em *C. albicans* também contribuem para a resistência aos azóis (ROBBINS, LEACH & COWEN, 2012).

O aumento da expressão de Erg11 devido a mutações ativadoras no gene que codifica o regulador transcricional de grupamento de zinco Upc2p é outro mecanismo de resistência ao fluconazol em *C. albicans* (JENSEN-PERGAKES *et al.,* 1998). Pouco se sabe sobre os reguladores Upc em leveduras de brotamento; no entanto, um estudo publicado por MacPherson *et al.* (2005) identificou um gene homólogo a Upc2 em *C. albicans*, e sua deleção foi associada ao aumento da susceptibilidade do fungo ao cetoconazol e fluconazol.

Outro fator relacionado a modulação do estresse celular envolvido na resistência aos azóis envolve a via de sinalização do AMP cíclico (AMPc)-PKA. Esta via em *C. albicans* desempenha um papel importante na recuperação e crescimento celular em resposta ao estresse, como a exposição ao fluconazol. O gene CDC35,

que codifica a adenil ciclase, e a CAP (proteína associada ao AMPc), estão envolvidos no desenvolvimento da resistência aos azóis (MAIDAN *et al.,* 2005).

1.5 MORTE CELULAR

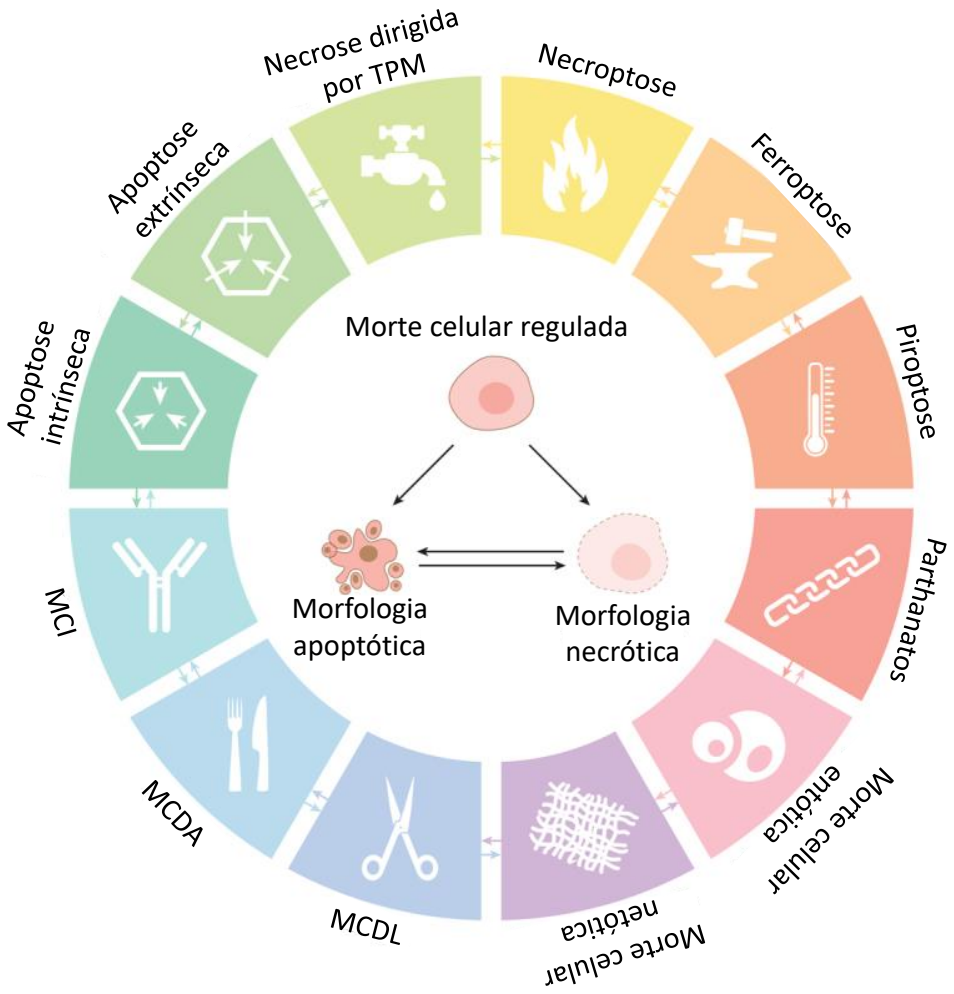
Quando consideramos os processos fundamentais da vida e da morte celular, a sobrevivência, proliferação e diferenciação representam pilares essenciais para alcançar a homeostase. A morte celular regulada (MCR) é um processo fisiológico crucial para a sobrevivência e manutenção da homeostase celular em organismos multicelulares. Embora a morte celular possa resultar de danos, a maioria das mortes celulares em animais ocorre de maneira ativa, como consequência de eventos específicos de sinalização (GREEN & LLAMBI, 2015). Este processo é altamente regulado e depende de uma maquinaria celular especializada (GALLUZZI *et al.,* 2018). Madeo, Fröhlich & Fröhlich (1997) identificaram que organismos unicelulares também experimentam o que conhecemos como MCR, e esse processo é mediado por uma protease com semelhança funcional e estrutural as caspases de mamíferos.

Inicialmente, a morte celular foi classificada em três tipos: (I) morte celular tipo I (apoptose), morte celular tipo II (autofagia) e morte celular tipo III (necrose). No entanto, nos últimos anos, a pesquisa científica nesse campo se intensificou levando a identificação de outros tipos de morte celular, tendo em consideração estímulos correspondentes, mecanismos moleculares e características morfológicas (Figura 9) (YAN, ELBADAWI & EFFERTH, 2020).

Severin e Hyman (2002) demonstraram que a MCR pode ocorrer em cenários fisiológicos, como observado em acasalamentos malsucedidos. Dados publicados por Büttner *et al.* (2006) descrevem que a morte celular, seja por envelhecimento ou dano que afeta sua capacidade metabólica, favorece a sobrevivência da população clonal.

Em ambos os cenários, a apoptose funciona como um mecanismo para eliminar células que podem estar velhas, com danos irreversíveis ou que apresentam disfunções prejudiciais a população de células fúngicas (VÁCHOVÁ E PALKOVÁ, 2005). Essa descoberta representou um grande avanço no meio científico, tornando-se uma área com grande potencial para revelar alvos a serem empregados na terapêutica antifúngica.

Figura 09: Principais vias de morte celular. Uma vez expostas a condições estressantes do microambiente intracelular ou extracelular, as células de mamíferos podem ativar uma das muitas vias de transdução de sinal, levando a morte celular. Cada tipo de morte celular regulada (MCR) pode se manifestar com um espectro de características morfológicas diversas. MCI: morte celular imunogênica; MCDA: morte celular dependente de autofagia; MCDL: morte celular dependente de lisossomo.



Fonte: Adaptado de GALUZZI *et al.,* 2018

É crucial compreender o papel da MCR em organismos multicelulares, onde a eliminação controlada de células anormais ou envelhecidas, minimizando o dano às células vizinhas é essencial para a saúde do tecido ou do organismo como um todo. Embora seja menos óbvio, os organismos unicelulares também passam por MCR (BARCINSKI *et al.,* 1992; MOREIRA *et al.,* 1996). Após os estudos pioneiros do Dr. Marcello BarcinsKi diversas evidências da ocorrência de MCR em organismos unicelulares foram acumuladas e confirmaram seus achados (WELBURN et al., 1997). Embora a descoberta da MCR em eucariotos simples não seja recente, pouco se sabia até o início dos anos 2000 sobre os mecanismos envolvidos. Foi nesse período que

Uren *et al.* (2000) identificaram uma protease com similaridade funcional e estrutural as caspases de mamíferos, conhecida como metacaspase.

1.5.1 Apoptose

Apesar do conceito de apoptose ter sido descrito explicitamente muitos anos antes, foi somente em 1972 que os pesquisadores Kerr, Wyllie e Currie usaram pela primeira vez o termo para descrever uma forma distinta de morte celular (ELMORE, 2007). A apoptose é uma forma de MCR que ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento (NORBURY & HICKSON, 2001), e desempenha um papel crucial na homeostasia de organismos metazoários, permitindo a remoção de células danificadas e/ou indesejadas. Esse mecanismo é controlado por uma rede bioquímica altamente regulada (STELLER, 1995), e uma variedade de estímulos e condições, tanto fisiológicas quanto patológicas, podem desencadear a apoptose. No entanto, nem todas as células necessariamente morrerão em resposta ao mesmo estímulo (ELMORE, 2007; DONEHOWER & BRADLEY, 1993).

A apoptose é um processo altamente complexo, envolvendo uma cascata de eventos moleculares. Durante este processo, ocorrem modificações bioquímicas cruciais, incluindo a clivagem de proteínas como lamins, PARP (poli (ADP-ribose) polimerase) e ICAD (inibidor da CAD), entre outras. Além disso, há formação de ligações cruzadas entre diversas proteínas, como membros da família de proteínas Bcl-2 (HENGARTNER, 2000). É observado também a quebra do DNA por endonucleases dependentes de Ca^{2+} e Mg^{2+} (BORTNER *et al.,* 1995). Além disso, há a expressão de marcadores de superfície celular que facilitam o reconhecimento precoce e a rápida fagocitose de células apoptóticas por células adjacentes, como a externalização de fosfatidilserina e a exposição de outras proteínas, como Anexina I e calreticulina (BORTNER *et al.,* 1997).

As caspases são expressas na forma de pró-enzima inativa, e uma vez ativadas são capazes de ativar outras pró-caspases, dando início a cascata de ativação das caspases. Essa cascata proteolítica amplifica a via de sinalização apoptótica, e assim leva a MCR (ELMORE, 2007). Elas têm atividade proteolítica com especificidade em resíduos de ácido aspártico na posição P_1. Até o momento, foram identificadas dez caspases principais, categorizadas em iniciadoras (caspase-2, -8, -9, -10), efetoras (caspase-3, -6, -7) e inflamatórias (caspase-1, -4, -5) (RAI *et al.,* 2005). Outras

caspases incluem a caspase-11, relacionada ao choque séptico, a caspase-12, envolvida na apoptose endoplasmática, e a caspase-13 e caspase-14, com funções específicas em tecidos embrionários e adultos, respectivamente (KANG *et al.,* 2002).

Até o momento, duas vias principais de apoptose foram identificadas: a via extrínseca e a via intrínseca. No entanto, há evidências de que essas vias estão interligadas e que moléculas de uma via podem influenciar a outra (IGNEY & KRAMMER, 2002). Além disso, existe uma via adicional que envolve a citotoxicidade mediada por células T e a morte celular dependente de perfurina-granulina. Essa via pode induzir a apoptose por meio de granzima B ou granzima A. Todas essas vias convergem em uma via terminal comum, iniciada pela clivagem da caspase-3 e resultando em fragmentação do DNA, degradação de proteínas nucleares e citoesqueléticas, formação de corpos apoptóticos e eventualmente fagocitose pelas células fagocíticas (MARTINVVALET *et al.,* 2005).

1.5.1.1 Via intrínseca

A via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, é desencadeada por estímulos internos celulares, como danos no DNA ou estresse no retículo endoplasmático. Isso induz a ativação de proteínas *BH3-only* (homologia 3 de BCL-2), incluindo BID, BIM, BAD, BIK, BMF, Noxa, PUMA e HRK. Essas proteínas BH3 interagem e ativam proteínas pró-sobrevivência ou pró-apoptóticas BH3, interrompendo ou continuando o processo apoptótico, respectivamente (LOMONOSOVA & CHINNADURAI, 2008).

No primeiro estágio, as proteínas pró-sobrevivência (BCL-2, BCL-X, BCL-w, MCL-1 ou BFL-1/A1) são predominantes. No segundo estágio, a ativação das proteínas pró-apoptóticas BAX (proteína X associada ao BCL-2) ou BAK (antagonista de BCL-2) resulta na permeabilização da membrana externa da mitocôndria, ocasionando a liberação de proteínas envolvidas na ativação de caspases (TAIT *et al.,* 2010; GALUZZI *et al.,* 2012).

Durante a permeabilização da membrana externa mitocondrial, ocorre a liberação de proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo-c, Smac/DIABLO e Omi/HtrA2. Essas proteínas ativam pró-caspases, como Pró-caspase-3 (ProC3) e Pró-caspase-7, inibindo as proteínas inibidoras da apoptose. Em seguida, o citocromo-c promove a formação do apoptossomo, uma estrutura que inclui citocromo-

c, Apaf-1 e Pró-caspase-9, levando à ativação das caspases e, consequentemente, à apoptose celular (YUAN & AKEY, 2013; GORTAT *et al.,* 2015; CHENG *et al.,* 2016).

1.5.1.2 Via extrínseca

A via extrínseca da apoptose é desencadeada por estímulos externos à célula, como a oligomerização de proteínas transmembrana da superfamília de receptores de morte ou a elevação das concentrações extracelulares de fatores específicos. Isso resulta na transdução de sinais letais ou na ativação de receptores de dependência (GALLUZZI *et al.,* 2012). A via extrínseca da apoptose é então ativada por interações entre receptores transmembrana da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) (LOCKSLEY *et al.,* 2001). Estes receptores compartilham características semelhantes em seus domínios extracelulares e possuem um "domínio da morte" citoplasmático crucial na transmissão do sinal apoptótico. Os principais ligantes e receptores conhecidos incluem FasL/FasR, TNF-α/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5 (RUBIO-MOSCARDO *et al.,* 2005; ELMORE, 2007).

O TNFR1 pode indiretamente induzir apoptose dependente de FADD e a caspase 8. O receptor recruta proteínas associadas ao domínio da morte do TNFR1, que recruta moléculas sinalizadoras como FADD, TRAF2 e RIP. Isso pode resultar na ativação da caspase 8 para induzir apoptose, além de ativar vias anti-apoptóticas como NF-κB e JNK/AP-1 (ASHKENAZI, 1998).

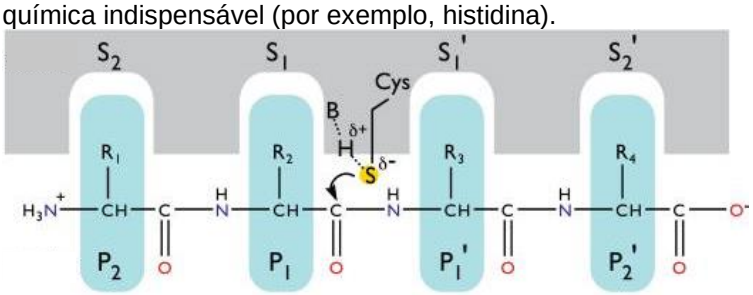
Na fase extrínseca da apoptose, exemplificada pelos modelos FasL/FasR e TNF-α/TNFR1, os receptores se ligam aos ligantes homólogos, formando o Complexo de Sinalização Indutor de Morte (DISC). Após a formação do DISC, a caspase-8 é ativada desencadeando a ativação subsequente de outras caspases, como a caspase 3. No entanto, a ligação de caspase 8 ao FADD e a formação adicional do DISC podem ser evitadas se uma isoforma de um dos reguladores DR, conhecida como proteína inibitória celular *FLICE-liKe* (cFLIPs), se ligar ao FADD. Isso ocorre porque uma dessas isoformas de cFLIP tem uma estrutura muito semelhante à caspase 8, com exceção do domínio catalítico ativo (HITOSHI *et al.,* 1998; WAJANT, 2002; ELMORE, 2007).

1.5 PROTEASES

As proteases, também denominadas peptidases, proteinases ou hidrolases peptídicas, são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de proteínas e/ou peptídeos, através da quebra de suas ligações peptídicas (ATIKINSON, BABBITT & SAJID, 2009). A interação entre a protease e seu substrato ocorre em uma região específica da estrutura proteica, chamada de sítio ativo. Este sítio ativo pode ser subdividido em diferentes sub-sítios, cada um exibindo uma alta especificidade para um resíduo de aminoácido particular presente no substrato (MÓTYÁN e TŐZSÉR, 2013).

Em 1967, Schechter e Berger propuseram uma nomenclatura para categorizar os sub-sítios de uma protease. Segundo essa nomenclatura, os resíduos de aminoácidos do substrato na direção da porção N-terminal a partir do sítio de clivagem, são denominados como P_1, P_2, P_3, e assim por diante, enquanto os sub-sítios correspondentes na protease são denominados de S_1, S_2, S_3 etc. Por outro lado, os resíduos localizados após o sítio de clivagem, na direção da porção C-terminal, são denominados como P_1', P_2', P_3', e os sub-sítios correspondentes na protease são nomeados como S_1', S_2', S_3', e assim por diante. A Figura 10 ilustra o sítio ativo de uma protease interagindo com seu substrato, conforme proposto por Schechter e Berger (1967).

Figura 10: Representação da interação dos sub-sítios de uma protease com seu substrato. A ligação de um substrato ao sub-sítio da peptidase (sítio ativo) posiciona o enxofre da cisteína próximo ao carbonil da ligação peptídica a ser clivada. O enxofre da cisteína catalítica é nucleofílico devido a presença de uma base química indispensável (por exemplo, histidina).



Fonte: Adaptado de ATIKINSON, BABBITT & SAJID, 2009

Conforme o banco de dados MEROPS, as proteases são classificadas com base no grupo nucleofílico responsável pela primeira etapa do processo de proteólise. Portanto, existem pelo menos seis classes de proteases: serino-, cisteíno-, metalo-, aspartil-, glutamato- e treonino-protease (RAWLINGS *et al.,* 2018).

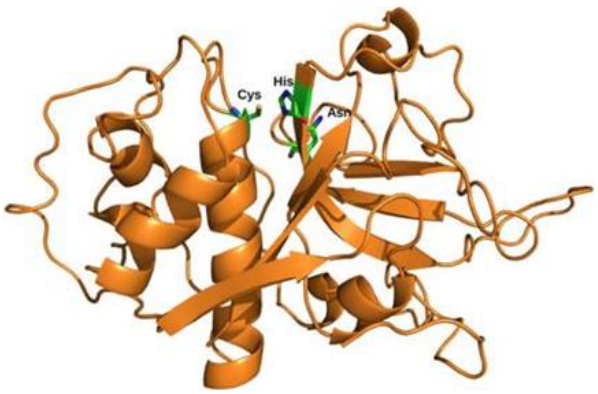
Como a metacaspase de *Candida albicans* (CaMCA), que é foco deste estudo é classificada como cisteíno-protease iremos detalhar essa classe de enzimas a seguir.

1.5.1 Cisteíno protease

As cisteíno proteases, juntamente com as serino proteases, representam a classe mais abundante de proteases. Essa classe de proteases foi identificada em organismos eucarióticos e procarióticos, e atualmente mais de 20 famílias dessas proteases são conhecidas (RANI, RACHITA E DATT, 2012; VERMA, DICXIT E PANDEY, 2016). Isso torna seu campo de aplicação particularmente interessante para o desenvolvimento de potenciais moduladores de sua atividade, aumentando assim seu potencial terapêutico (RANI, RACHITA E DATT, 2012).

A primeira enzima desta classe a ser isolada e caracterizada foi a papaína, que em 1937 foi extraída da *Carica papaya.* Em 1968, Jansoniuns *et al.,* elucidaram a sua estrutura tridimensional. Graças a este feito foi possível observar a presença da sua tríade catalítica formada pelos resíduos de Cys^{25}, His^{159} e Asn^{175} (VERMA, DICXIT E PANDEY, 2016). A presença do resíduo de asparagina (Asn^{175}) conservado na proximidade da histidina catalítica (His^{159}), cria uma tríade de Cys-His-Asn considerada similar ao arranjo de Ser-His-Asp encontrado nas serino protease (Figura 11).

Figura 11: Representação estrutural papaína, uma cisteína protease, mostrando os resíduos do sítio ativo; Cys^{25}, His^{159} e Asn^{175}.



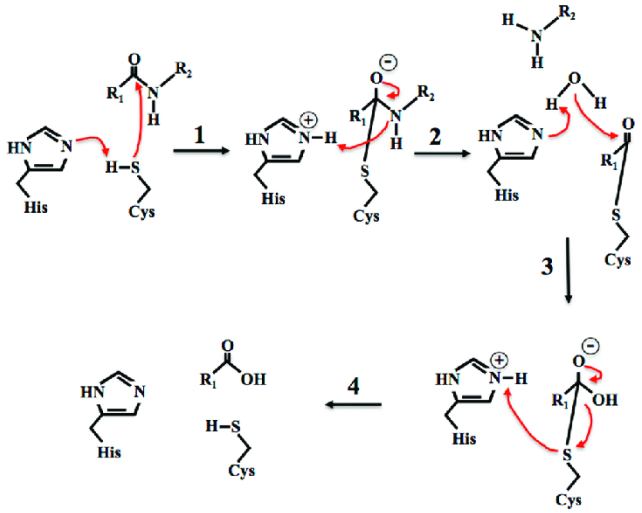
Fonte: VERMA, DICXIT E PANDEY, 2016

Um fator de suma importância para as cisteíno proteases é a presença da díade catalítica no sítio ativo, composta por um resíduo de histidina (His) e um resíduo de

cisteína (Cys). Em certas famílias, um terceiro resíduo é utilizado para garantir a orientação adequada do anel imidazólico da histidina, formando assim uma tríade catalítica (Figura 10) (RANI, RACHITA E DATT, 2012; VERMA, DICXIT E PANDEY, 2016). Desde então, a papaína foi extensivamente estudada e se tornou um modelo de cisteíno protease para investigações bioquímicas e moleculares desta família (RANI, RACHITA E DATT, 2012; VERMA, DICXIT E PANDEY, 2016).

O resíduo de histidina no sítio ativo atua como doador de prótons, facilitando assim o ataque nucleofílico do resíduo de cisteína ao substrato (RANI, RACHITA E DATT, 2012; VERMA, DICXIT E PANDEY, 2016). O primeiro intermediário tetraédrico é formado pelo ataque nucleofílico do resíduo de cisteína ao carbono da ligação peptídica reativa, resultando na liberação do fragmento N-terminal do substrato (RANI, RACHITA E DATT, 2012; VERMA, DICXIT E PANDEY, 2016). A estabilização do primeiro intermediário tetraédrico ocorre por meio de ligações de hidrogênio entre o substrato e um resíduo de glutamina. Posteriormente, a hidrólise da ligação tioéster leva à produção de um ácido carboxílico (Figura 12) (RANI, RACHITA E DATT, 2012; VERMA, DICXIT E PANDEY, 2016).

Figura 12: Mecanismo esquemático de reação da cisteína protease mediada pela clivagem de uma ligação peptídica. No processo de clivagem catalisado por uma cisteíno protease, após a desprotonação de um tiol no sítio ativo pela histidina adjacente, ocorre um ataque nucleofílico ao substrato carbonilo pela cisteína desprotonada. Isso resulta na liberação de um fragmento do substrato e na formação de uma ligação intermediária tioéster. Em seguida, a histidina é restaurada à sua forma desprotonada, e o fragmento remanescente do substrato é hidrolisado, resultando na geração de um ácido carboxílico. Ao final do processo, a enzima é regenerada, pronta para participar de novas reações catalíticas.

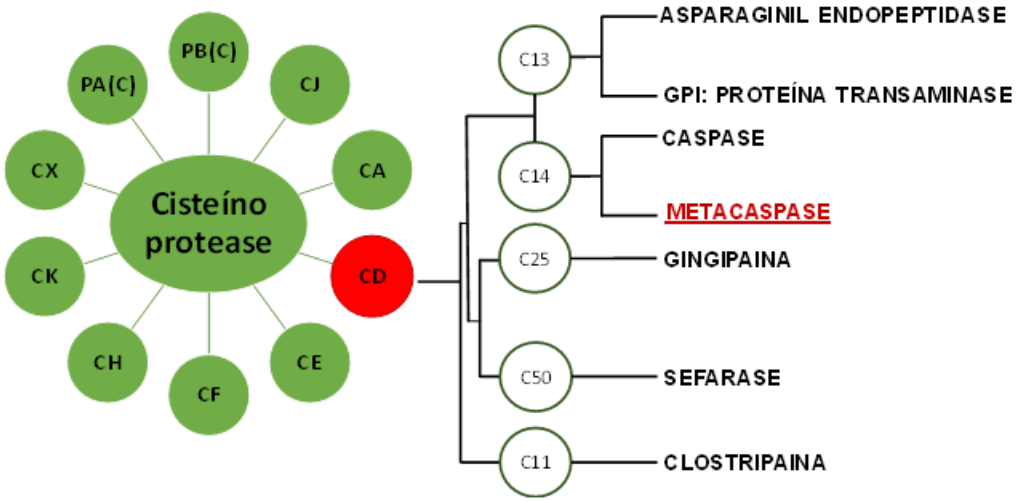


Fonte: ARGILA. 2016

Segundo a classificação atual do banco de dados MEROPS, as cisteíno proteases conhecidas até o momento são agrupadas em 14 clãs distintos com base

em sua estrutura terciária (RAWLINGS *et al.,* 2018). Dentro de cada clã, são organizadas em famílias de acordo com sua similaridade estrutural. As caspases e metacaspases pertencem ao clã CD da família C14 (MININA, *et al.,* 2017). Este clã engloba proteases dependentes de cisteína (Cys) com uma única dobra nas folhas α e β, compostas por uma subunidade grande (P_{20}) contendo a díade catalítica de Histidina/Cisteína (Hys/Cys), juntamente com uma subunidade pequena (P_{10}) (LEHNINGER, NELSON e COX, 2018). Embora existam vários outros clãs entre as cisteíno proteases, nossa pesquisa se concentrará apenas no clã CD.

Figura 13: Classificação das cisteíno protease em famílias e clãs.



Fonte: Adaptado de MOTTRAM, COOMBS & ALEXANDER, 2004

O clã CD se distingue dos demais clãs das cisteíno proteases por suas características notáveis, incluindo diferenças em sua estrutura terciária, sequência de aminoácidos, especificidade de hidrólise e funções catalíticas (MOTTRAM *et al.,* 2004). As proteases agrupadas neste clã têm demonstrado um vasto potencial farmacológico. Por exemplo, as metacaspases têm sido objeto de estudos intensivos devido ao seu possível papel na regulação do ciclo celular de eucariotos simples (TSIATSIANI *et al.,* 2011).

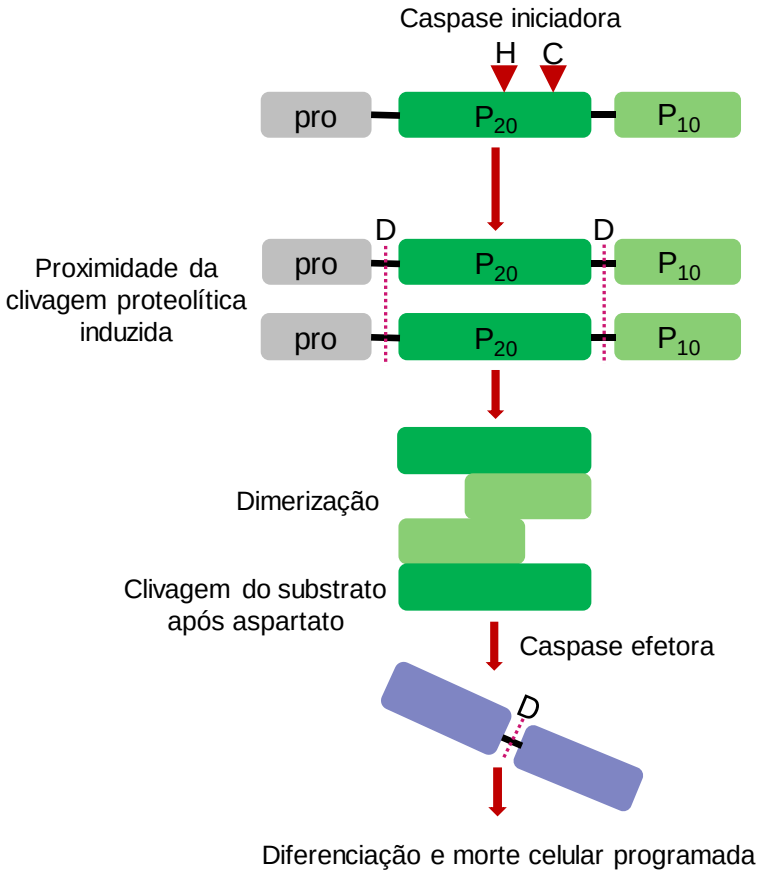
1.6 METACASPASES

Nas últimas décadas, as proteases têm desempenhado um papel central em estudos relacionados a manutenção da fisiologia, metabolismo e homeostase celular (VANDANA *et al.,* 2019). Como alvos farmacológicos as proteases destacam-se no controle e combate de diversas doenças infecciosas (VANDANA *et al.,* 2019). Um exemplo notável da importância das proteases como alvos terapêuticos são os medicamentos antirretrovirais que inibem a integrase viral, aprovados para o tratamento da infecção pelo HIV (ARHEL & KIRCHHOFF, 2010). Além disso, a compreensão das interações proteína-proteína tem sido fundamental no tratamento de vários tipos de câncer (KANHAIYA *et al.,* 2017). As metacaspases, descritas por Uren *et al.,* (2000) através de ferramentas de bioinformática, desempenham um papel crucial na regulação da morte celular programada (UREN *et al.,* 2000).

As metacaspases são encontradas em plantas, fungos e protozoários, mas são ausentes em mamíferos e apresentam similaridade estrutural as caspases destes organismos (UREN *et al.,* 2000). As caspases são sintetizadas como pró-enzimas inativas e sendo compostas por um pró-domínio que antecede a cadeia madura destas proteases. Após a remoção do pró-domínio, as caspases sofrem clivagem proteolítica liberando dois fragmentos peptídicos com pesos moleculares de 10 KDa e 20 KDa, chamados de subunidades P_{10} e P_{20}, respectivamente. A subunidade P_{10} é necessária para a formação de heterodímeros, o que tornam as caspases cataliticamente ativas (Figura 14) (MACKENZIE E CLAK, 2012).

Muitas perguntas em relação as propriedades bioquímicas e aos possíveis papéis das metacaspases ainda não foram respondidas (TSIATSIANE *et al.,* 2011). As metacaspases são definidas pela presença dos domínios P_{10} e P_{20} e não possuem domínios adicionais. As metacaspases são estruturalmente relacionadas com as caspases de mamíferos, possuindo a díade catalítica composta por resíduos de cisteína e histidina, no entanto no que se diz respeito a especificidade pelo substrato, as metacaspases apresentam uma diferença marcante com as caspases.

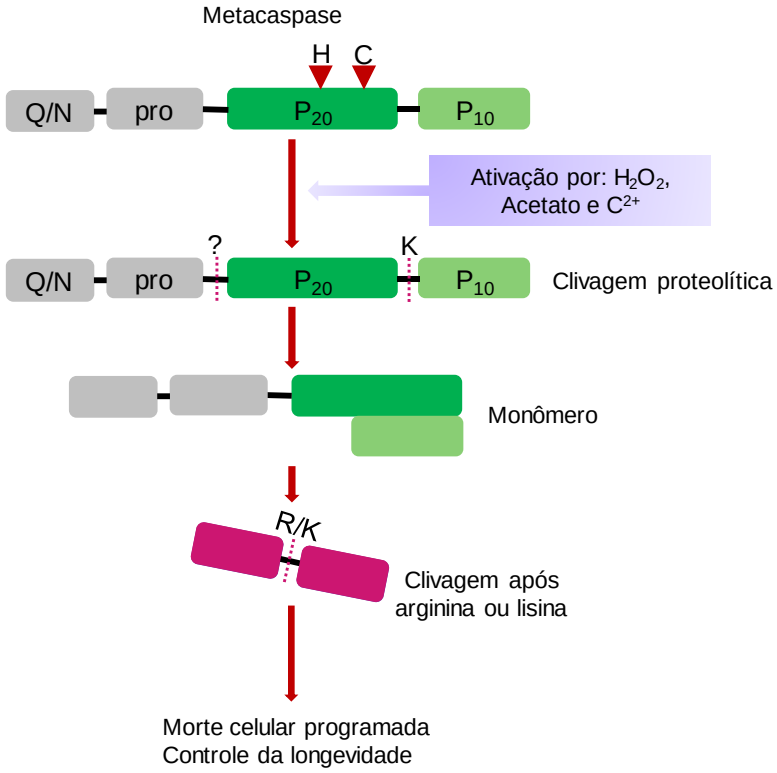
Figura 14: Mecanismo de ativação proposto para as caspases.



Fonte: Adaptado de TSIATSIANE *et al.,* 2011

Enquanto as caspases são especificamente aspartato-proteases, as metacaspases possuem um subsítio S_1 altamente ácido, que confere especificidade por substratos que contenham resíduos básicos (arginina ou lisina) na posição P_1 (MOTTRAM *et al.,* 2003; VERCAMMEN *et al.,* 2004; GONZALEZ *et al.,* 2007; CARMONA *et al.,* 2010; MACHADO *et al*., 2013). Isso ocorre porque os aspartatos conservados estão localizados no sítio de especificidade, resultando na clivagem após resíduos de aminoácidos carregados positivamente (VERCAMMEN *et al.,* 2004) (Figura 15). Além disso, a atividade das metacaspases depende da presença de um cofator, o íon cálcio, uma característica observada em outras enzimas (Tabela 1) (VERCAMMEN *et al.,* 2004; MACHADO *et al.,* 2013).

Figura 15: Mecanismo de ativação proposto para as metacaspases. Todos os três tipos de metacaspases são compostos de um domínio P_{20} (verde escuro), que contém os dois resíduos catalíticos (cisteína e histidina), e um domínio P_{10} regulatório (verde claro). A maioria das metacaspases do tipo I e III contém um pró domínio N-terminal (cinza), enquanto as metacaspases do tipo II contêm uma região de ligação que liga os dois domínios (indicado em preto). Até o presente momento, todos os tipos de metacaspases já identificadas são dependentes do íon Ca^{2+}. O local de ligação do cálcio está localizado no domínio P_{20}.



Fonte: Adaptado de MININA *et al.,* 2017

Tabela 1: Íons inorgânicos que servem como cofatores para enzimas

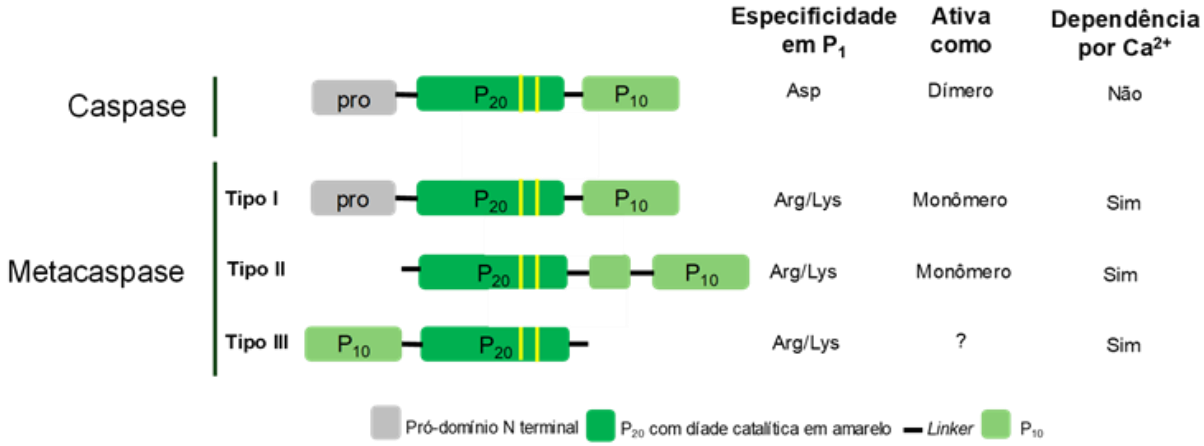
ÍONS	ENZIMAS
Ca^{2+}	Calpaína, metacaspase
Cu^{2+}	Citocromo-oxidase
Fe^{2+} ou Fe^{3+}	Citocromo-oxidase, catalase, peroxidase
K^{+}	Piruvato-quinase
Mg^{2+}	Hexoquinase, glicose-6-fosfatase
Mn^{2+}	Arginase, ribonucleotídeo-redutase
Ni^{2+}	Urease
Zn^{2+}	Anidrase carbônica, carboxipeptidases A e B

Fonte: LEHNINGER, NELSON e COX, 2018

Considerando as diferenças estruturais identificadas até o momento entre as metacaspases, elas podem ser classificadas em três tipos: I, II e III. As metacaspases

do tipo I possuem um pró-domínio na porção N-terminal com sequências repetidas de prolina (Pro) e uma região denominada dedo de zinco. Já as metacaspases do tipo II não apresentam tal pró-domínio e possuem pequenas regiões de ligação entre as subunidades P20 e P10. Nas metacaspases do tipo III, a subunidade P10 antecede a subunidade P20 (Figura 16) (TSIATSIANI *et al.,* 2011; UREN *et al.,* 2000). Um exemplo de metacaspase do tipo I é a metacaspase de *C. albicans* (CaMCA), que possui estrutura homóloga as caspases de mamífero, enquanto a única metacaspase de *S. cerevisiae*, chamada YCA1, também se enquadra nessa categoria (CAO *et al.,* 2009; LEGER *et al.,* 2015).

Figura 16: Comparação das caspases e metacaspases – composição dos domínios e características bioquímicas



Fonte: Adaptado de KLEMENČIČ & FUNK, 2017

A relação entre caspases e metacaspases tem sido amplamente debatida no meio científico (McLUSKEY & MOTTRAM, 2015; GREEN & FITZGERALD, 2016). O principal argumento para aceitar a homologia entre caspases e metacaspases refere-se às diferenças na ativação dessas proteases. Ao contrário das caspases de metazoários, as metacaspases não requerem dimerização ou a presença de proteínas adaptadoras para se tornarem ativas (McLUSKEY & MOTTRAM, 2015).

O fato de as metacaspases estarem envolvidas na mediação da morte celular programada da mesma forma que as caspases, é o que reforça a homologia funcional entre essas proteases. Muitos estudos têm investigado o papel das metacaspases na morte celular programada e o envolvimento dessas enzimas nesses processos se estende a muitos eucariotos inferiores, incluindo vários fungos (MADEO *et al.,* 2002; HAMANN, BRUST & OSIEWACZ, 2007; LOW *et al.,* 2008; GUÉRIN *et al.,* 2009; CAO

et al., 2009), protozoários (LEE *et al.,* 2010; ZALILA *et al.,* 2011) e plantas (SUAREZ *et al.,* 2004).

Apesar da semelhança funcional e estrutural entre as caspases e metacaspases, a ligação evolutiva entre essas proteases ainda é uma incógnita (BELL & MEGENEY, 2017). Desde sua descoberta por Uren *et al.,* (2000), as metacaspases têm se mostrado multifuncionais e essenciais para a fisiologia e patologia de espécies não metazoárias.

Inúmeros genes responsáveis por codificar as metacaspases foram identificados nos últimos anos. Pelo menos treze eucariotos simples possuem metacaspases com função biológica conhecida (TSIATSIANI *et al.,* 2011). Entre os protozoários, são encontradas metacaspases do tipo I nos gêneros *Leishmania spp. e Trypanossoma spp.* O protozoário *Leishmania donovani* apresenta duas metacaspases, LsMc1 e LsMc2, responsáveis pela morte celular do parasito induzida pelo estresse oxidativo (LEE *et al.,* 2007). *Leishmania major* codifica uma única metacaspase, a LmjMCA, essencial para a regulação do ciclo celular do parasita (ZALILA et al., 2011).

O que podemos notar até aqui é que as metacaspases parecem desempenhar funções essenciais para a fisiologia normal dos organismos não metazoários. A metacaspase de *S. cerevisiae* (YCA1) tem sido exaustivamente estudada, e esses estudos podem ser relevantes para explorar a ligação evolutiva entre caspases e metacaspases (BELL & MEGENEY, 2017). Os estudos iniciais sobre a YCA1 identificaram seu papel no processo de morte celular programada nesta levedura; no entanto, pesquisas mais recentes mostraram que a função dessa enzima vai além das funções relacionadas à morte celular. Sua atividade está associada a progressão do ciclo celular da levedura, e a inativação prolonga a fase G_1 e causa desordem no checkpoint mitótico G2/M (LEE *et al.,* 2008).

Um estudo publicado por Lee *et al.,* (2010) demonstrou o envolvimento da YCA1 na remodelagem de agregados insolúveis de proteínas, observando que os mutantes com o gene YCA1 nocauteado apresentavam uma maior quantidade de proteínas insolúveis em comparação com a levedura selvagem. Os achados de Hill *et al.,* (2015) mostraram que a superexpressão da YCA1 prolonga a vida útil da replicação da levedura e reduz agregados de proteínas formados durante o processo de envelhecimento celular e estresse, complementando os dados de Lee et al. (2010);

atividade semelhante foi observada para a metacaspase do tipo I AtMC1 de *Arabidopsis* (COLL *et al.,* 2010).

Outro estudo sobre a YCA1 revelou que essa protease é importante no controle da proteostase, uma vez que quando ocorre o acúmulo de agregados proteicos e esses não podem ser atenuados, a levedura utiliza outro mecanismo de defesa, resultando na distribuição assimétrica de agregados proteicos durante a citocinese. A YCA1 é importante para estabelecer essa assimetria e assegurar que a célula-filha esteja livre de proteínas insolúveis (KACZANOWSKI, SAJID & REECE, 2011), semelhante ao papel emergente das caspases eucarióticas na regulação da divisão simétrica/assimétrica das células-tronco (BELL & MEGENEY, 2017).

Além da *S. cerevisiae*, outros eucariotos inferiores expressam metacaspases que apresentam semelhança funcional (KACZANOWSKI, SAJID & REECE, 2011), como *Aspergillus spp., Podospora anserina, Candida albicans* e, recentemente, no carvão do milho *Ustilago maydis*. Assim como a YCA1, a atividade da maioria dessas metacaspases tem sido associada a respostas relacionadas ao estresse oxidativo e envelhecimento celular em resposta a vários estímulos ambientais (RICHIE *et al.,* 2007; HAMANN, BRUST & OSIEWACK, 2007; CAO *et al.,* 2009; MUKHERJEE *et al.,* 2017; WANG *et al.,* 2014).

O protozoário *T. brucei* expressa cinco metacaspases distintas, denominadas TbMCA1 a TbMCA5, que exibem variações significativas em suas sequências primárias, compartilhando entre 40% e 89% de identidade. As metacaspases TbMCA2 (localizada em endossomos RAB11-positivos e tem papel no controle do ciclo celular pré-citocinese), TbMCA3 e TbMCA5 possuem a díade catalítica composta por resíduos de histidina e cisteína, sendo essenciais para sua atividade enzimática e consideradas cruciais para a forma sanguínea do parasita. TbMCA2 e TbMCA3 são altamente similares, enquanto TbMCA5 tem uma grande extensão no C-terminal. Por outro lado, TbMCA1 e TbMCA4 (específica da forma sanguínea, liberada pelo parasita e processada pela TbMCA3) apresentam substituições nos resíduos catalíticos: histidina por tirosina em TbMCA1 e cisteína por serina em TbMCA4. Apesar de ser cataliticamente inativaTbMCA4 atua como fator de virulência ligando-se a membrana e sendo processada pela TbMCA3 (McLUSKEY *et al.,* 2014).

Estudos recentes indicam que as metacaspases de plantas podem ter um papel *post mortem* na depuração do conteúdo celular (COURTOIS-MOREAU *et al.,* 2009). Um exemplo claro é a atuação na depuração dos elementos do xilema, um processo

crucial para permitir o transporte da água nos tubos dos vasos do xilema (XUAN *et al.,* 2016). *Arabidopsis* codifica apenas uma única metacaspase, a AtMC9, que é regulada positivamente durante o processo de apoptose do xilema e é, portanto, uma *Candida*ta a exercer funções *post mortem* (OLVERA-CARRILLO *et al.,* 2015).

As metacaspases vegetais demonstram ter um papel importante no processo de diferenciação celular (SUAREZ *et al.,* 2004; BOZHKOV *et al.,* 2005; VERCAMMEN *et al.,* 2006). A literatura descreve que os mecanismos de autofagia das plantas e as metacaspases parecem se unir durante o processo de apoptose para compensar a falta de macrófagos, que em mamíferos são responsáveis pela eliminação dos restos celulares (GREGORY E DEVITT, 2004).

Curiosamente, a via de morte vacuolar do *Picea abies* requer tanto a atividade catalítica da metacaspase mcII-Pa quanto a via de morte por autofagia. Nessa via, a metacaspase atua induzindo a formação de autofagossomos, impedindo que as células sofram morte por necrose prematura (HAN *et al.,* 2014). No entanto, ainda não está completamente elucidada a atividade catalítica da metacaspase no processo de autofagia no Picea abies (HAN *et al.,* 2014; OLVERA-CARRILLO *et al.,* 2015).

Os fungos do gênero *Aspergillus spp. (Aspergillus fumigatus e Aspergillus nidulans*) apresentam duas metacaspases do tipo I, CasA e CasB, que exercem funções diferentes dependendo da espécie do microrganismo (RICHIE *et al.,* 2007). Em *A. fumigatus*, CasA e CasB estão relacionadas a citoproteção, promovendo o crescimento sob condições de estresse do retículo endoplasmático (RICHIE *et al.,* 2007). Por outro lado, em *A. nidulans*, CasA e CasB estão envolvidas na morte celular induzida por farnesil, mas a CasB poderia ter uma segunda atuação na proteção contra o estresse do retículo endoplasmático (COLABARDINI *et al.,* 2010).

O fungo filamentoso *Magnaporthe oryzae* que é o agente causador da brusone do arroz e durante o processo de infecção, o *M. oryzae* passa por mudanças morfológicas que permitem que ele se torne capaz de invadir e infectar a célula hospedeira, proliferando dentro das células sem causar sintomas visíveis da infecção. Foram identificadas duas metacaspases do tipo I em *M. oryzae* (MoMca1 e MoMca2). Um estudo publicado por Fernandez *et al.,* (2021) mostrou que os genes de MoMca desempenham papéis importantes no crescimento, conidiação, desenvolvimento e patogênese do *M. oryzae*. A deleção da MoMca1 ou MoMca2 impactou negativamente nos processos de desenvolvimento do fungo.

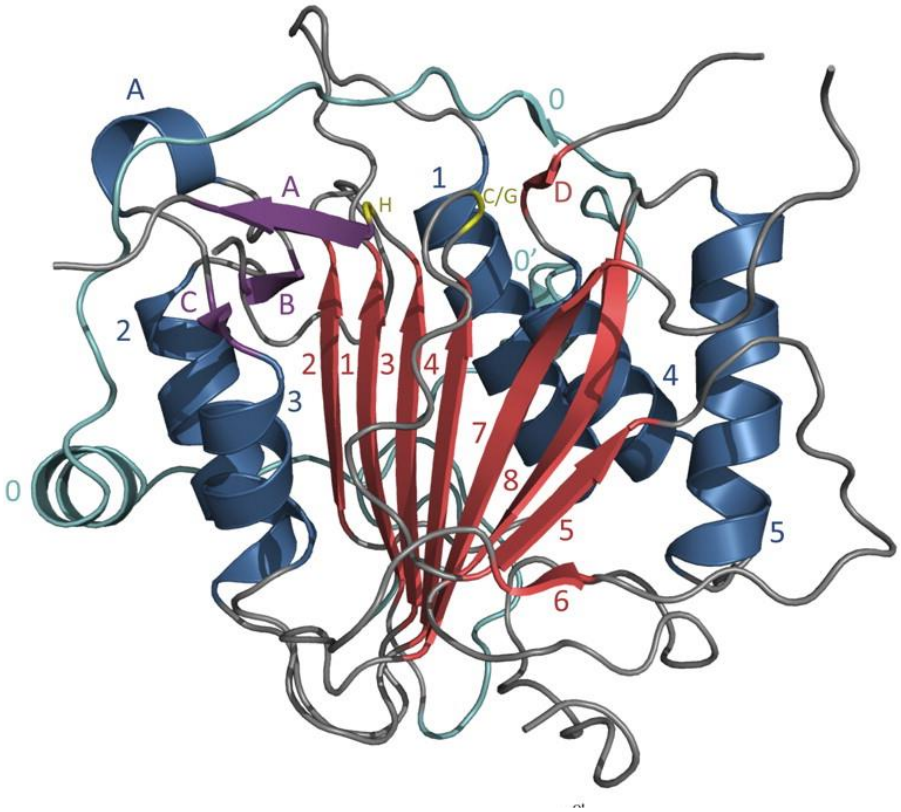
1.6.1 Análise estrutural e funcional das metacaspases: implicações na atividade proteolítica e regulação por íons metálicos

Diversas tentativas foram realizadas para encontrar semelhanças entre caspases e metacaspases em termos de estrutura, ativação e função. No entanto, duas diferenças notáveis entre metacaspases e caspases são suas especificidades de substrato e os requisitos para sua ativação (TSIATSIANI, *et al.,* 2011).

Nas estruturas das caspases, o domínio catalítico essencial é formado por uma folha β de seis fitas, que inclui uma subunidade maior (p20) e uma menor (p10), separadas por um *linKer* entre as fitas 4 e 5. As caspases ativas funcionam como dímeros (ARAVIND *et al.,* 2002). As metacaspases possuem um domínio semelhante ao das caspases, composto por subunidades p20 e p10, mas se distinguem pelo fato de que apenas o tipo I possui um pró-domínio N-terminal. Enquanto os genomas de plantas codificam ambos os tipos de metacaspases, apenas o tipo I foi identificado em protozoários e fungos (UREN *et al.,* 2000).

As tentativas de cristalização da forma ativa da TbMCA2 por McLUSKEY *et al.,* (2012) não tiveram sucesso devido a presença de produtos de degradação resultantes da autoproteólise da enzima recombinante, sendo necessário construir mutantes inativos (TbMCA C213G e TbMCA C213A). A TbMCA2 é monomérica e composta por uma folha β de oito fitas e cinco α-hélices circundantes. Uma pequena seção de folha β antiparalela é encontrada no C-terminus do β3 (Figura 17).

Figura 17: Estrutura e sequência do *T. brucei* MCA2^{C213G}. As regiões de loop geral são mostradas em cinza, a região N-terminal em ciano, as α-hélices em azul e as β-folhas em vermelho, exceto βA-βC, que é mostrada em roxo. Estrutura terciária do monômero com a posição da diade catalítica em amarelo.



Fonte: McLUSKEY *et al.,* (2012).

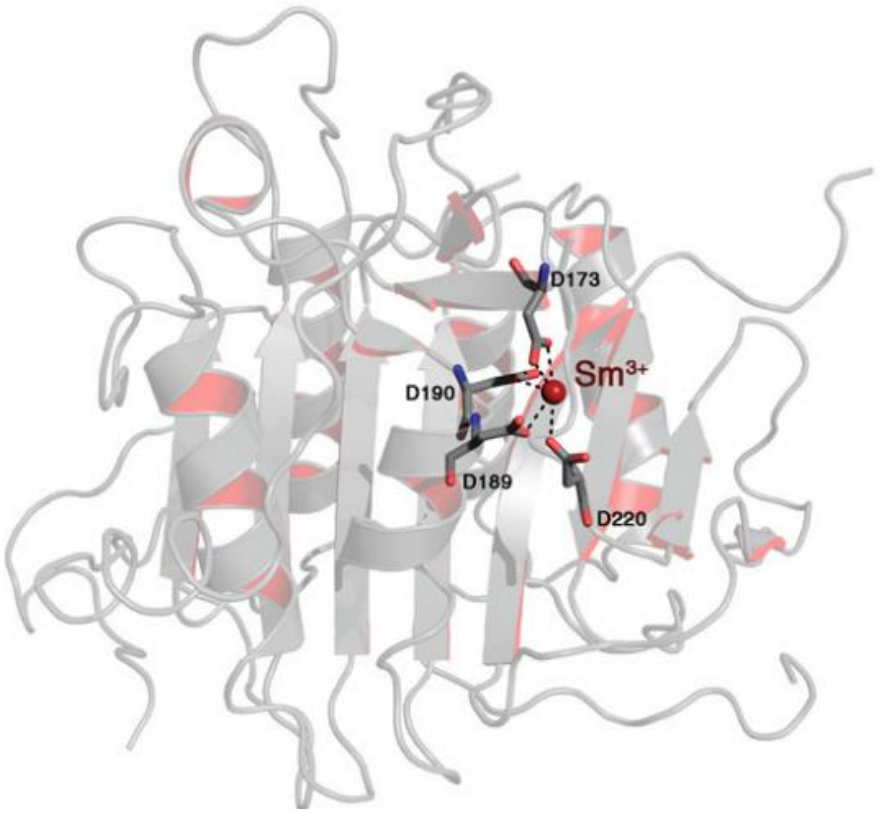
Os resíduos que formam a díade catalítica (His^{158} e Cys$^{213G/A}$) estão localizados nas extremidades C-terminais das fitas β3 e β4, respectivamente. A alça que conecta as folhas β4 e β5, onde se encontra a cisteína catalítica, possui 11 resíduos e é flexível. A díade catalítica da TbMCA2 está localizada abaixo do domínio N-terminal, que se estende sobre o sítio ativo da enzima desde o término N-terminal até o término C-terminal. Como resultado, o pró-domínio N-terminal impede o acesso do substrato ao sítio ativo devido a presença de resíduos na região de junção, que bloqueiam a autoproteólise intramolecular (McLUSKEY *et al.,* 2012).

Conforme abordado por Vercammen *et al.,* (2004), o pró-domínio N-terminal é uma característica comum em metacaspases tipo I, como a CaMCA, YCA1 e a TbMCA2, e tem sido associado a interações proteína-proteína e a regulação da atividade da enzima. Estudos como o de Tsiatsiani *et al.,* (2011), sugeriram que a presença desse pró-domínio pode influenciar a dobragem correta da proteína ou interações específicas que são necessárias para sua atividade catalítica.

O pró-domínio N-terminal da YCA1, é composto por sequências ricas em Asn/Gln, contendo 22 resíduos de Gln, 12 de Asn, 11 de Gly e 16 de Pro nos primeiros 100 aminoácidos (WONG *et al.,* 2012) que é característica para proteínas priônicas de levedura e proteínas propensas a agregação (ERHARDT *et al.,* 2010).

A estrutura de TbMCA2 C213A foi a primeira elucidada de uma metacaspase, e está disponível no Banco de Dados de Proteínas (PDB). Para determinar a estrutura, foi necessário incorporar um átomo pesado nos cristais, pois tentativas de substituição molecular usando estruturas de caspases falharam. Apesar das dificuldades em encontrar um átomo pesado adequado, o acetato de samário (SmAc) foi testado sendo eficiente, resultando em um sítio de ligação de Sm^{3+}. Isso permitiu a determinação da estrutura de TbMCA2 e definiu seu sítio de ligação de Ca^{2+}. O Sm^{3+} é coordenado por quatro resíduos de ácido aspártico (Asp^{173}, Asp^{189}, Asp^{190} e Asp^{220}) que definem o sítio de ligação de cálcio nesta enzima (Figura 18) (McLUSKEY *et al.,* 2012).

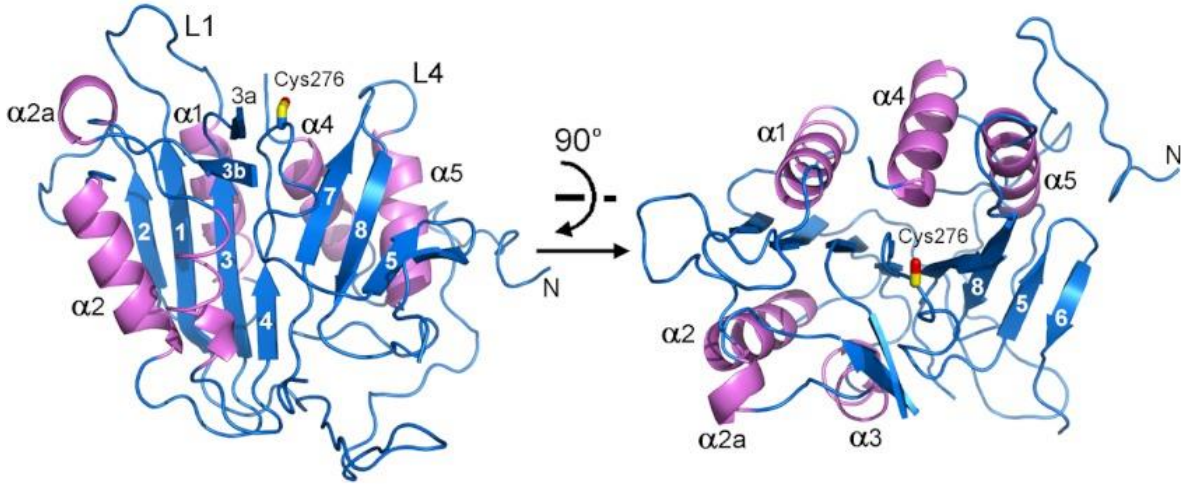
Figura 18: O íon de Sm^{3+} se liga firmemente a $TbMCA2^{C213A.}$



Fonte: McLUSKEY *et al.,* (2012).

O cristal da YCA1 foi determinado por Wong *et al* (2012), e ao compararmos as estruturas da TbMCA2 e da YCA1, algumas diferenças são notáveis em suas características estruturais e funcionais. Enquanto a TbMCA2 é monomérica e possui uma folha β de oito fitas e cinco α-hélices circundantes, a YCA1 apresenta uma estrutura com uma folha β central de oito cadeias acompanhada por três α-hélices de um lado e duas do outro. Além disso, a posição dos resíduos catalíticos e a presença de domínios adicionais, como o pró-domínio N-terminal na TbMCA2, indicam variações na organização e regulação das atividades enzimáticas entre essas proteínas. Enquanto a TbMCA2 possui resíduos que formam a díade catalítica nas extremidades C-terminais das fitas β3 e β4, a YCA1 contém seu resíduo catalítico, Cys^{276}, na alça L2, entre as alças L1 e L4 (Figura 19).

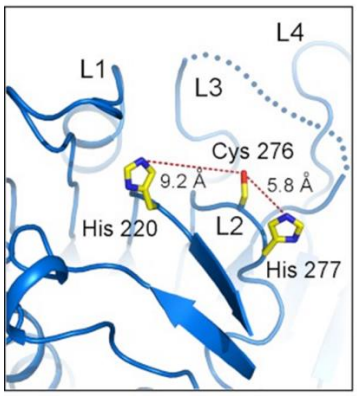
Figura 19: Estrutura da YCA1. A estrutura d YCA1 consiste em cinco α-hélices (representadas em magenta) e oito fitas β (em azul), que se organizam para formar uma folha β central, circundada pelas α-hélices. Além disso, são identificados os elementos estruturais secundários, como as alças do sítio ativo L1 e L4, junto com o resíduo catalítico Cys^{276}.



Fonte: WONG *et al.,* (2012).

O alinhamento da sequência de outras caspases com a YCA1 revelou dois aminoácidos conservados na YCA1, Cys^{276} e His^{220}, que formam a díade catalítica. No entanto, é curioso observar que o átomo Nϵ do anel imidazol da His^{220} está aproximadamente a 9.2 Å de distância do átomo Sγ da Cys^{276}, enquanto a distância entre o His^{277}-Nϵ e o Cys^{276}-Sγ é de 5.8 Å (Figura 20).

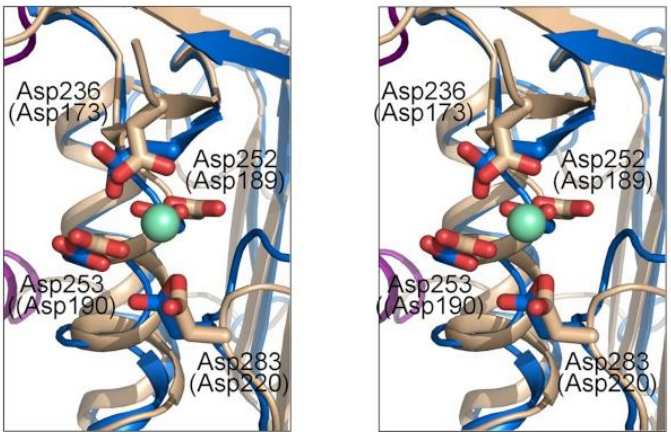
Figura 20: Caracterização do sítio ativo da YCA1. O sítio ativo é composto pelos resíduos: Cys276 His220, e His277.



Fonte: WONG *et al.,* (2012).

A TbMCA2 e a YCA1 apresentam baixa identidade de sequência de aminoácidos entre MCA2 e a metacaspase Yca1, no entanto suas estruturas 3D revelaram uma notável semelhança estrutural, e a partir da análise das sequências de aminoácidos, observa-se uma conservação de resíduos críticos envolvidos na ligação de íons metálicos, em TbMCA2 os quatro resíduos que se ligam ao samário (Asp^{173}, Asp^{189}, Asp^{190} e Asp^{220}) estão presentes e conservados em YCA1, correspondendo a Asp^{236}, Asp^{252}, Asp^{253} e Asp^{283} (Figura 21). A similaridade estrutural entre YCA1 e a TbMCA2 também é evidenciada pela conformação muito semelhante das alças do sítio ativo L1 e L4 em ambas. Além disso, a alça L3, que forma a base do sulco de ligação ao substrato, está desordenada em ambas as estruturas (WONG *et al.,* 2012).

Figura 21: Comparação estrutural entre Yca1 e TbMCA2. Na sobreposição estrutural ao redor do sítio de ligação do samário na TbMCA2, os quatro resíduos que se ligam ao samário na TbMCA2 estão em parênteses (Asp^{173}, Asp^{189}, Asp^{190} e Asp^{220}) são invariantes na YCA1. Os quatro resíduos da Yca1 também estão presentes e são marcados.



Fonte: WONG *et al.,* (2012).

O estudo publicado por Watanabe *et al.,* (2011) mostrou que a metacaspase AtMCP2d de *Arabidopsis* requer Ca^{2+} de forma essencial para sua atividade proteolítica em condições *in vitro*. Além disso, Wong *et al.,* (2012) observaram que a YCA1, sofre um processamento adicional em fragmentos menores após incubação com Ca^{2+}. Este processamento autocatalítico ocorre após os resíduos Arg^{72} e Lys^{86}, como revelado pelo sequenciamento de peptídeos do N-terminal. Enquanto outros cátions divalentes testados não tiveram efeito semelhante, o Ca^{2+} demonstrou ser específico na indução desse processamento na YCA1.

1.6.2 Metacaspase de *C. albicans* – CaMCA

A função da metacaspase em *C. albicans*, semelhante a YCA1 e as caspases de mamíferos, foi comprovada por estudos (YUN & LEEN, 2016). Assim como observado na levedura *S. cerevisiae*, foi demonstrada a ocorrência de apoptose em *C. albicans* em resposta a estímulos como peróxido de hidrogênio, ácido acético e anfotericina B (PHILLIPS, SUDBERY & RAMSDALE, 2003; PHILLIPS, CROWE & RAMSDALE, 2006; CAO *et al.,* 2009; DAI *et al.,* 2009; ZHU *et al.,* 2011).

Durante a apoptose em *C. albicans*, foram observadas alterações celulares semelhantes às que ocorrem em células de mamíferos, como a condensação da cromatina, fragmentação nuclear e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (KHAN, CHOSK & STADTMAN, 2005; PHILLIPS, CROWE & RAMSDALE, 2006).

A calcineurina, uma fosfatase ativada por cálcio e a calmodulina presente em todos os eucariotos, atua na sinalização de eventos em resposta a estímulos do ambiente em fungos, incluindo a *C. albicans* (CRUZ *et al.,* 2002). Estudos demonstraram que na morte celular programada induzida por peróxido de hidrogênio em *C. albicans*, apresentou modulação da atividade da calcineurina e ativação da metacaspase CaMCA (LU *et al.,* 2011).

Outro estudo publicado em 2011 por Dai *et al.,* mostra uma relação entre a atividade da Hsp90 (um regulador chave da proteostase em condições fisiológicas e estresse em células eucarióticas) e a apoptose em *C. albicans*. Foi observado que as células com Hsp90 nocauteadas foram mais resistentes a apoptose induzida por ácido acético, peróxido de hidrogênio e anfotericina B quando comparadas com as do tipo

selvagem. O mais interessante neste estudo foi a regulação negativa na expressão da CaMCA em células Hsp90 nocaute, sugerindo que o comprometimento da regulação da apoptose está relacionado com a regulação negativa da via calcineurina-metacaspase CaMCA (DAI *et al.,* 2012).

Em 2015, Lee & Lee avaliaram a modulação da atividade da metacaspase de *C. albicans* frente ao tratamento com resveratrol e observaram que o tratamento induziu fortemente a ativação da metacaspase e promoveu a liberação do citocromo c e de cálcio mitocondrial, indicando que o composto foi capaz de induzir a apoptose fúngica envolvendo vias mitocondriais dependentes da metacaspase.

As pesquisas envolvendo algumas drogas antifúngicas e a combinação com outras classes farmacológicas para ativação da metacaspase intracelular em *C. albicans* têm se intensificado nos últimos anos (PHILLIPS, SUDBERY & ROMSDALE, 2003; HAO *et al.,* 2013; SHIRAZI & KONTOVIANNIS, 2015; CHEN *et al.,* 2021).

Estudos têm explorado a combinação de drogas para o tratamento de infecções causadas por *C. albicans*. Zhang *et al.,* (2013) avaliaram a combinação de fluconazol e geldanamicina (um inibidor específico de Hsp90) e a combinação foi sinérgica contra cepas de *C. albicans*. Um estudo publicado por Su *et al.,* (2020) avaliou a ação da combinação de panobinostat e fluconazol, foi demonstrado que esses fármacos podem atuar de forma sinérgica em cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, com consequente diminuição da concentração inibitória mínima. Além disso, houve diminuição na formação das hifas e ativação da metacaspase CaMCA. A ativação da metacaspase por combinação de drogas também foi observada em outros estudos, que combinaram isoquercitrina e fluconazol (KIM, WOO & LEE, 2019) e D-penicilamina e fluconazol (LE *et al.,* 2019).

Um estudo publicado por Shirazie & Kontoyiannis em 2015 evidenciou que a micafugina foi capaz de desencadear morte por apoptose, mediada por atividade mitocondrial em biofilmes de *C. albicans* sendo este processo dependente da atividade proteolítica da CaMCA.

A YCA1 e CaMCA compartilham características estruturais essenciais, como a conformação das alças do sítio ativo e a presença de resíduos críticos de cálcio. Por essa razão é importante estudar os resíduos de cálcio na CaMCA, uma vez que no alinhamento entre as sequências, esses resíduos são conservados quando comparados com a YCA1 e a TbMCA2. A fim de investigar o papel desses resíduos na função da CaMCA realizamos estudos dos mutantes do sítio de cálcio, visando

elucidar sua contribuição para a atividade enzimática da *C. albicans.* Além disso, o N-terminal, rico em resíduos de Gln, Asn, Gly e Pro e que causa agregação proteica, também está presente em ambas as proteínas, por esse motivo produzimos a CaMCA com o truncamento do N-terminal na CaMCA, seguindo uma abordagem semelhante a realizada na YCA1.

Este estudo tem como objetivo principal investigar a metacaspase de CaMCA por meio de modificações estruturais e funcionais. *C. albicans* é um patógeno oportunista conhecido por sua capacidade de se adaptar e causar infecções em humanos, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. A compreensão da estrutura e dos mecanismos moleculares dos patógenos, como o *C. albicans*, é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo principal investigar a metacaspase de *Candida albicans* (CaMCA) por meio de modificações estruturais e funcionais. Para alcançar esse objetivo, foram realizadas duas abordagens principais:

- Produzir a metacaspase de *C. albicans* (CaMCA) recombinante com a deleção no N-terminal e contendo mutações sítio dirigidas: Esta etapa visou gerar variantes da CaMCA com alterações específicas na região N-terminal, bem como mutações direcionadas em sítios-chave da proteína.
- Estudar o efeito dos resíduos do sítio de cálcio para atividade enzimática e auto processamento da metacaspase de *C. albicans* (CaMCA): Nesta fase, foi examinado o impacto dos resíduos do sítio de cálcio na atividade enzimática e no processo de auto processamento da CaMCA.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir a CaMCA nativa incapaz de se autoprocessar, através da obtenção de mutantes dos resíduos chaves para o autoprocessamento desta proteína;
- Compreender os mecanismos moleculares envolvidos no autoprocessamento da CaMCA e seu impacto na regulação da atividade enzimática.
- Estudar as características bioquímicas desta peptidase através de análises das propriedades bioquímicas da CaMCA.
- Elucidar como o cálcio pode influenciar na relação estrutura-atividade desta protease e a importância deste íon sobre a seletividade por substrato e autoprocessamento da CaMCA

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROJEÇÃO DOS *PRIMERS*

Os iniciadores para a amplificação foram desenhados com base na sequência completa do gene da metacaspase CaMCA depositada no banco de dados *GeneBanK* do "*National Center for Biothecnology Information*", código de acesso: EF626931 (Figura 22).

Figura 22: Sequência completa do gene codificador da metacaspase de *C. albicans* (CaMCA). Esse gene não apresenta íntrons (https://www.ebi.ac.uK/ena/data/view/EF626931)

5′ ATGTTTCCAGGACAAGGTAGACATACATACGGAGGACAACAGTCCAATTATAGTAATCAACAACAGGGTT
ACGACCAAGGGTATAACCAAGGTTACGGCCAAGCTTATGGCCAAGAATACAATCAAGGATATGACAGACCTT
CTGGTCCACCACCAGGCCAAGGTCAATACAATAGACCATCGGGTCCTCCACCAGGTCCACCACCAGGTCAAG
GACAATATAATAGACCTTCTGGACCTCCACCAAGTCAACAAGGACAATACAATAGACCTTCTGGCCCACCAC
CAGGTCAATATGGAAATAATCAAACTAGGGGATCAGGAAACGAACAAAATTATGGTAATATGCATGGTAGTG
GTCATTATTCTCGTCCACCAACTGATTCCCAATCTTTTGGTGTTGAGAATTACAATTATCAATATTCCAACT
GTAGTGGTCGGAAAAAGGCATTGTTGATAGGGATCAATTATATTGGTACTAAAAATGAATTGAGGGGTCCAA
TCAATGATGTCAATAATGTTGAACAATTTTTATTAGCTAATGGTTATTCAAGTGATAACATTGTTAAATTGA
CTGATGATCAAAGAGTTCAAAGAGCAATTCCAACTCGACAAAACATTCTTGATGCCATTCAATGGTTAGTTA
AAGATGCTCGTCCTAATGATGCATTGTTTTTCCATTATTCTGGCCATGGTGGACAAACAGAAGATCAACCCG
ATGAATATGGGAATTATGATGAAGATGATGGCTACGATGAAGTTATTTATCCATTAGATTTTGAAACCAATG
GGTTTATCATTGATGATTTGTTGCATACAATGATGGTGAAAACATTGCCTCAAGGTTGTAGATTGACAGCAT
TATTTGATTCTTGTCATTCTGGATCAGTTTTGGATTTGCCTTACATGTACTCAACCAAAGGTGTTTTGAAAG
AACCAAATGTAATGAAAGAAGCCGGAGCAGGGTTATTGCAATCTGCCATGGCTTATGCAACAGGTG3′

Fonte: European Nucleotide Archive, 2020

Os *primers* foram projetados para a mutação de 1 a 3 nucleotídeos, a fim de que ocorresse a alteração de uma sequência de códons, de modo a se obter as mutações dos aminoácidos desejados, sendo que para cada mutação foi desenhado *primers* complementares *forward* (5'- 3') e *reverse* (3'- 5'), ambos contendo o novo códon para o aminoácido desejado.

A tabela 2 inclui os conjuntos da sequência de *primers* que foram utilizados para a mutação sítio dirigida. Os *primers forward* e *reverse* foram projetados usando

diretrizes semelhantes as comumente empregados em reação de PCR de duplo *primer.*

Tabela 2: Iniciadores *forward* e *reverse* usados para as mutações pontuais no gene codificante da CaMCA-WT. As sequências correspondentes as mutações pontuais estão em negrito.

MUTAÇÂO	TM (°C)	SEQUÊNCIA
D252A	61,1	**5'** TGA GGA TGA TGG CTA TGC CGA AGT GAT TTA TC **3'**
D269A	59,9	**5'** CTT TAT TAT CGA TGC TCT GCT GCA TAC CAT GA **3'**
D268A	62,9	**5'** CGG CTT TAT TAT CGC TGA TCT GCT GCA TAC CA **3'**
D268/269A	64,5	5' CGG CTT TAT TAT CGC TGC TCT GCT GCA TAC CA 3'
D299A	63,2	**5'** CGG TAG CGT TCT GGC TCT GCC GTA TAT GTA TA **3'**
C292A	64,3	**5'** CAC TGT TTG ATA GCG CTC ATA GCG GTA GCG TT **3'**

3.2 DNA MOLDE

Para a realização das amplificações contendo as mutações desejadas, nós utilizamos como DNA molde o clone da CaMCA em vetor de expressão pET28(a)+, obtido previamente durante o projeto de mestrado. O plasmídeo pET28(a)+ têm aproximadamente 5369 pb de comprimento e inclui um promotor e terminador T7 que flanqueiam a inserção do gene, além de ser usado para a transcrição e expressão de proteínas em *E. coli.* Todos os plasmídeos usados neste estudo foram isolados de células *E. coli* (DH5α).

3.3 PREPARAÇÃO DO VETOR E INSERTO PARA APLICAÇÃO DO PROTOCOLO TEDA

O plasmídeo usado nesse estudo foi o pET28(a), e todos os *primers* usados para a construção do plasmídeo recombinante estão descritos na Tabela 3 .

Tabela 03: *Primers* usados para a construção do plasmídeo recombinante usando o TEDA.

Primer	TM °C	Sequência
*Primer p*ET26(a) FW	72 °C	**5'** CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC T **3'**
*Primer p*ET28(a) RV	72 °C	**5'** CAT ATG GCT GCC GCCG CGG CAC **3'**
Primer CaMCA íntegra FW	62 °C	**5'** CTG GTG CCG GCG GGC AGC CAT ATG **3'**
Primer CaMCA-ΔN86 FW	62 °C	**5'** CTG GTG CCG CGC GGC AGC CAT CAG**3'**
Primer CaMCA RV	62 °C	**5'** GTG GTG GTG GTG GTG GTG CTC GAG **3'**
Primer T7 FW	47 ºC	**5'** TAATACGACTCACTATAGGG **3'**
Primer T7 RV	47 ºC	**5'** TAGTTATTGCTCAGCGGTGG **3'**

3.3.1 Amplificação do pET28(a) através da reação de PCR

Para a amplificação do pET28(a)+, foram desenhados *primers* específicos para realização da amplificação do DNA com base no protocolo *T5 exonuclease DNA assembly* (TEDA), de modo que a sequência amplificada contenha as bases que formam as extremidades homólogas (15 pb). A reação foi construída utilizando 60 ng de DNA molde e 25 pmol de cada *primer forward* e *reverse* desenhados para o protocolo TEDA. A reação foi catalisada pela TransStart Fast Pfu fly DNA polimerase (Transgen), seguindo as orientações do fabricante.

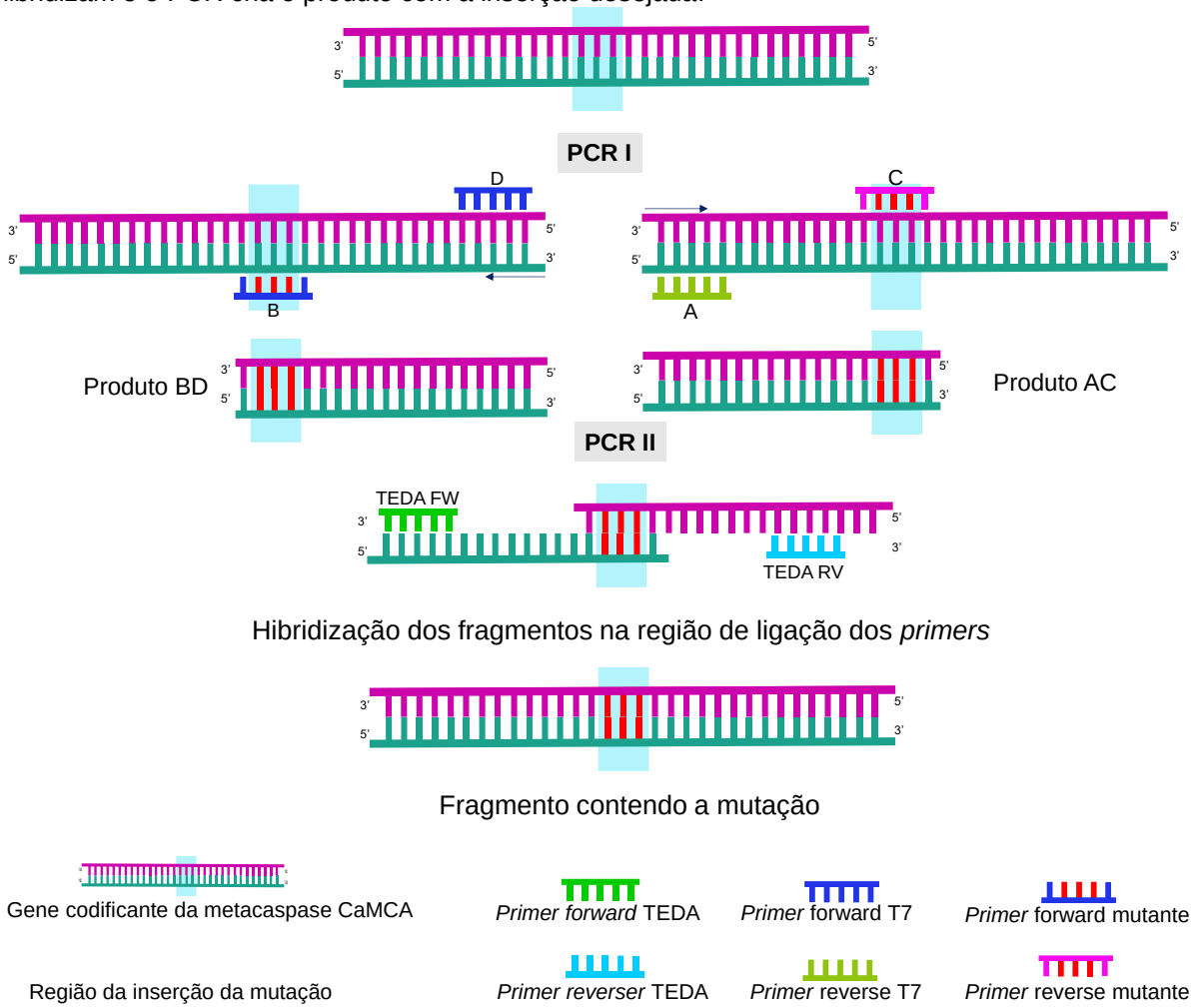
As condições da amplificação compreenderam as seguintes etapas: (1) 1 ciclo a 98º C por 30 segundos (desnaturação inicial), (2) repetições de 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 98º C por 20 segundos (desnaturação), 72º C por 2 minutos (anelamento e extensão), e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72º C (extensão final). A análise foi realizada da mesma forma descrita anteriormente no item 3.1.3. Após as etapas de amplificações, foram preparadas as bactérias para submeter os produtos ao procedimento TEDA.

O produto da amplificação foi analisado aplicando-se 5 µL da mistura de reação em gel de agarose preparado a 1% (m/v) contendo 0,5 $\mu g.mL^{-1}$ de brometo de etídio, em tampão TAE (TRIS 80 mM; Ácido Acético glacial 40 mM; EDTA 2,5 mM, em pH 8,3) e em seguida foi submetido a uma tensão de 80 V durante 30 min em cuba horizontal. Após migração, as bandas foram visualizadas sob luz UV no fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad).

3.3.2 Mutação *in vitro* do DNA codificante da CaMCA usando a reação de extensão de sobreposição de *primer*

Para estes experimentos, nos baseamos no protocolo de Ho *et al.,* (1989), com sutis alterações. A técnica de extensão de sobreposição consiste na incorporação de *primers* flanqueadores do gene (A e D) complementares a sequência alvo e um *primer* interno contendo a mutação desejada e que hibridizarão com a região a ser alterada (B e C). Realizamos a amplificação do sentido *forward* e *reverse* em tubos distintos, nas reações intituladas PCR I-FW e PCR I-RV, que deram origem aos fragmentos AC e DB, respectivamente. Foi utilizado 10 ng dos fragmentos formados (AC e DB) para a realização da PCR II, usando os *primers* desenhados para o protocolo TEDA (Figura 23). As extremidades complementares formadas na região de ligação dos *primers* B e C se hibridizam neste segundo PCR para criar o produto contendo a sequência mutada. O produto oriundo da reação foi submetido ao procedimento TEDA.

Figura 23: Mutação sítio dirigida por sobreposição de *primers*. Os *primers* B e C contêm a sequência complementar contendo a mutação desejada. Duas reações são realizadas na primeira etapa usando os iniciadores B/D (PCR I-FW) e A/C (PCR I-RV). As amplificações obtidas das respectivas reações são misturadas com o par de *primers* A e D para a segunda etapa da reação de amplificação. As extremidades complementares resultantes das amplificações da primeira reação se hibridizam e o PCR cria o produto com a inserção desejada.



As condições da amplificação compreenderam em uma desnaturação inicial a 94ºC durante 3 minutos, seguido por repetições de 35 ciclos em diferentes temperaturas: Desnaturação a 94 ºC durante 30 segundos, Anelamento a 55 ºC durante 1 minuto e Extensão a 72 ºC durante 1 minuto e por fim realizamos uma extensão final a 72 ºC com duração de 10 minutos. Ao final da reação a mesma passou por resfriamento a 4 ºC durante 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados após eletroforese em gel agarose 1% (m/v) sob luz ultravioleta, conforme já descrito anteriormente.

3.3.3 Procedimento TEDA

Para a realização do procedimento TEDA, nos baseamos no trabalho descrito por Xial *et al.,* (2019). Este trabalho descreve um método que combina a ação da T5 exonuclease e os mecanismos de reparo da *E. coli*. Trata-se de um método eficiente e de baixo custo que pode ser utilizado para protocolos de clonagem e mutação sítio dirigida.

A metodologia se baseia na montagem de fragmentos de DNA com extremidades homólogas utilizando principalmente a ação da T5 exonoclease capaz de remover as bases nitrogenadas apenas na direção 5´-3´ (XIA *et al.,* 2019).

A primeira etapa para realização do TEDA, foi a preparação da solução estoque 5X (0,5 M TRIS; 50 mM $MgCl_2$; 50 mM DTT; PEG 8000 0,25 g mL^{-1}; 10 U T5 exonuclease/mL, pH 7,5 HCl). A solução foi armazenada em alíquotas de 1 mL no freezer a -80 °C. Para o preparado da solução 5X TEDA + T5, acrescentou-se 10 U da T5 exonuclease a uma alíquota de 1 mL e preparamos alíquotas de 100 µL.

A reação foi preparada seguindo as orientações descritas pelo autor quanto as condições ótimas para a reação TEDA. A proporção da reação foi 1:4 (vetor/inserto). Utilizamos 100 ng do vetor pET28(a) linearizado, e para calcularmos a concentração do inserto, utilizamos o cálculo abaixo.

$$Inserto = \frac{ng\ Vetor\ x\ pb\ Inserto}{pb\ Vetor}$$

Para cada reação TEDA foi utilizado uma 4 µL da solução 5X TEDA + T5 exnoclease. Adicionou-se a solução a mistura dos fragmentos do inserto e vetor linearizado para a construção do cassete (o volume final da reação foi de 20 µL). O vetor linearizado foi obtido por reação de PCR. O inserto foi obtido por amplificação via PCR e as extremidades homólogas foi introduzida via *primer,* conforme descrito anteriormente. Ambos, vetor e inserto, foram purificados utilizando Kit de purificação Easypure PCR Purification (Transgen Biotech). A mistura foi homogeneizada e incubada a 30 °C durante 40 minutos, seguida de incubação no gelo durante 10 minutos. Procedemos com o protocolo de transformação utilizando 5 µL da solução reacional para uma alíquota de 100 µL de células competentes *E. coli* DH5α. As células foram incubadas por 30 min em gelo, submetidas a choque térmico a 42 ° C

por 90 segundos e depois transferidos para gelo durante 2 min. Depois foi adicionado 800 µL de meio LB. A suspensão foi incubada em um agitador a 37 °C durante 60 minutos. Alíquotas de 100 µL foram espalhadas em placas de LB contendo + Kanamicina (35 µg/mL) para triagem. As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C.

3.4 PREPARAÇÃO DAS BACTÉRIAS *E. coli* Dh5α E BL21 (DE3) plysS COMPETENTES PARA TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

O protocolo adotado foi elaborado com base no trabalho descrito por Inoure *et al.,* (1990). Neste trabalho foram otimizadas algumas condições frente ao protocolo descrito por Hanaha (1983). Inoure *et al.,* afirmam que com este protocolo é possível gerar células competentes de *E. coli* com alta eficiência de transformação 1 – 3 UFC ug^{-1} plasmídeo. Um estudo publicado por Chan *et al.,* (2013) demostrou que o método de Hanahan apresentou melhores resultados quando comparados com outros métodos de prepara de células quimio competentes, como por exemplo $CaCl_2$, DMSO. Neste protocolo utilizamos a estratégia de iniciar a cultura utilizando pré inóculos de forma a ganhar agilidade no processo de acompanhar a DO.

O primeiro passo foi a inoculação de uma colônia isolada da bactéria em 40 mL de meio LB (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L). No outro dia na parta da tarde (por volta das 17h), inoculamos 3 erlenmeyers de 1 L contendo 250 mL de meio SOB (triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,5 g/L contendo 5 m/L de $MgCl_2$ 2M – pH 7,0 NaOH) da seguinte maneira:

1° Utilizando 10 mL do pré inóculo
2° Utilizando 4 mL do pré inóculo
3° Utilizando 2 mL do pré inóculo

A suspensão foi incubada durante a noite em shaKer a 18 °C sob agitação de 150 – 180 rpm. No dia seguinte pela manhã acompanhamos a DO_{600} a cada 45 minutos até que a cultura atingiu a DO_{600} 0,35 – 0,5. Em seguida as células foram submetidas as seguintes etapas: (1) banho de gelo durante 10 minutos; (2) seguida de centrifugação 2500 g durante 10 minutos a 4 °C; (3) desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu o pellet em 1/3 do volume original (250 mL → 80 mL) em solução ITB ice cold ($CaCl_2$ 15 mM; KCl 250 mM; $MnCl_2$ e HEPES 10 mM – pH 6,7 KOH); (4) em

seguida foi incubada no gelo durante 10 minutos e centrifugou-se conforme etapa 2; (5) as células foram ressuspensas em 1/12,5 do volume original (250 mL → 20 mL) de ITB ice cold; (6) adicionou-se 7% de DMSO (1,4 mL), homogeneizou-se cuidadosamente, seguido de incubação no gelo durante 10 minutos; (7) por fim, as células foram separadas em alíquotas d e100 µL em tubos esterilizados, e procedeu com o congelamento ultra rápido (N_2 líquido). As alíquotas foram congeladas no freezer a -80 °C.

3.5 TRIAGEM DAS COLÔNIAS POSITIVAS

Para confirmação do sucesso da transformação, realizamos a extração do DNA plasmidial através do método descrito por SambrooK (2001). Selecionamos 10 colônias aleatórias e as submetemos ao processo de *miniprep* de DNA plasmidial. O processo para todos os mutantes seguiu as etapas descritas a seguir: (1) inoculou uma colônia isolada em 2 mL de meio LB contendo canamicina (50 mg/mL) a 37 °C, sob agitação orbital constante de 180 rpm *overnight*; (2) a suspensão celular foi centrifugada a 13.000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente; (3) o pellet formado foi ressuspenso em 100 µL da solução de lise alcalina I (TRIS 25 mM, pH 8,0 contendo EDTA 10 mM, glicose 50 mM e RNAse 100 µg/mL), utilizando agitador vórtex; (4) em seguida, adicionou-se 200 µL da solução de lise alcalina II (NaOH 0,2 N e 1% p/v de SDS) agitando cuidadosamente por inversão; (5) foi adicionado a mistura 150 µL da solução de lise alcalina III (acetato de potássio 5 M; ácido acético 5 M) seguido de agitação conforme por inversão, seguido de incubação no gelo durante 10 minutos; (6) dado o tempo de incubação, o lisado foi submetido ao processo de centrifugação durante 20 minutos, em temperatura ambiente a 13.0000 rpm; (7) o sobrenadante formado foi transferido para um tubo estéril e acrescentou 700 µL de etanol absoluto, procedeu com agitação por inversão e incubou durante tem minutos em temperatura ambiente; (8) dado o tempo de incubação, a mistura foi submetido ao processo de centrifugação durante 5 minutos, em temperatura ambiente a 13.0000 rpm; (9) o sobrenadante formado foi desprezado e o pellet formado foi lavado com 250 µL de etanol 70 %; (10) dado o tempo de incubação, a mistura foi submetido ao processo de centrifugação durante 5 minutos, em temperatura ambiente

a 12.0000 rpm; (11) por fim, o sobrenadante foi desprezado, aguardou-se até que todo etanol evaporasse e ressuspendeu o pellet em 100 µL de água estéril.

3.6 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO PLASMÍDEO OBTIDO POR PCR USANDO *PRIMERS* T7

As *miniprep*s obtidas foram submetidas a uma reação de PCR usando os *primers* de reconhecimento do promotor e do terminador T7 para confirmar os clones positivos (usados como flanqueadores na reação PCR II), uma vez que no plasmídeo pET28(a)+ o promotor e o terminador T7 flanqueiam o gene clonado em pET28(a)+.

As condições da amplificação compreenderam em uma desnaturação inicial a 94ºC durante 3 minutos, seguido por repetições de 35 ciclos em diferentes temperaturas: Desnaturação a 94 ºC durante 15 segundos, Anelamento a 47 ºC durante 1 minuto e Extensão a 72 ºC durante 1 minuto e por fim realizamos uma extensão final a 72 ºC com duração de 10 minutos. Ao final da reação a mesma passou por resfriamento a 4 ºC durante 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados após eletroforese em gel agarose 1% (m/v) sob luz ultravioleta, conforme já descrito anteriormente.

Plasmídeos obtidos nas cepas de *E.coli* DH5α contendo o inserto de interesse foram extraídos por lise alcalina usando o Kit *Wizard*® *Plus SV Miniprep DNA.*

3.7 SEQUENCIAMENTO

As amostras amplificadas e purificadas foram enviadas a empresa Ludwig Biotecnologia (Brasil) para realização do sequenciamento. Os dados obtidos no sequenciamento foram alinhados com a sequência de nucleotídeos do gene sintético através da plataforma Clustal-O (https://www.ebi.ac.uK/Tools/msa/clustalo/).

3.8 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS DE *Escherichia coli* BL21 (DE3) plysS COM O PRODUTO DA LISE ALCALINA

O material obtido após a lise alcalina foi então transformado por choque térmico conforme descrito anteriormente na cepa de *E. coli* BL21(DE3)plysS, que foram então

utilizadas para expressão proteica. Um total de 10 ng do DNA recombinante foi transformado em 100 µL de *E. coli* BL21(DE3)plysS competentes. Posteriormente foi realizado uma reação de PCR utilizando os *primers* da T7 em 5 colônias escolhidas aleatoriamente. A reação foi por fim avaliada através de uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) conforme já descrito.

3.9 ENSAIOS PARA EXPRESSÃO DA CaMCA CONTENDO AS RESPECTIVAS MUTAÇÕES

Os ensaios de expressão foram realizados em *E. coli* BL21(DE3) plysS. A expressão foi realizada a partir de cultura celular em 10 mL preparada em meio LB e incubada a 37 °C, com agitação orbital constante a 180 rpm durante 16 horas contendo 50 µg/mL de canamicina. Após o tempo da incubação, 2 mL da cultura celular foram transferidos para 600 mL de meio LB e incubado sob as mesmas condições anteriores. Realizou-se o acompanhamento da densidade ótica em λ = 600 nm (DO_{600}) até alcançar uma faixa entre 0,6 e 0,8.

A expressão em *E. coli* BL21(DE3) plysS foi induzida por IPTG, pois o pET28(a)+ possui o *operon lac* que é induzido por lactose. Como o IPTG é um análogo deste composto que não é degradado pela bactéria, utilizamos o mesmo para a indução. Portanto, neste momento da expressão foi adicionado IPTG em uma concentração de 0,25 mM/mL e ajustamos a temperatura para 20°C. As células permaneceram incubadas durante aproximadamente 18h.

Para verificar a expressão, as células foram centrifugadas, lisadas com tampão de lise [TRIS 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol 5% (v/v) - pH 8,0]. Em seguida o material foi submetido a lise mecânica através de sonicação (6 ciclos de 30 segundos a 60 Hz) seguido de incubação com 1 mg/mL de lisozima (Sigma) durante 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se 1 M/mL de $MgCl_2$ e 1 mg/mL de DNase. Por fim, o material foi incubado em temperatura ambiente durante 30 minutos e centrifugado a 12.000 xg para remover os detritos insolúveis. O sobrenadante foi filtrado usando um filtro com poro de 0,45 µm.

3.10 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DA CaMCA CONTENDO AS RESPECTIVAS MUTAÇÕES ATRAVÉS DA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-Page)

O gel de corrida foi preparado em uma malha de 15% de acrilamida, partindo das seguintes soluções: acrilamida 30% [acrilamida 30%, bis-acrilamida 0,8% (p/v)], dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (p/v), TEMED 0,12%, persulfato de amônio 100 mg/mL (p/v) e tampão TRIS/HCl 1,0 M - pH 8,8.

O gel de entrada foi preparado em uma concentração de 4% de acrilamida utilizando as soluções descritas acima, diferindo apenas no tampão, neste caso o TRIS/HCl 0,5 M - pH 6,8.

As amostras foram preparadas em tampão de amostra [TRIS/HCl 60 mM, SDS 2% (p/v), glicerol 6% (v/v), azul de bromofenol 10% e β-mercaptoetanol a 3% (v/v) - pH 6,8] e aquecidas em banho seco a 100°C por 10 minutos.

A corrida eletroforética foi realizada na presença de tampão de corrida (TRIS/HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1% - pH 8,3), em uma cuba sob uma corrente elétrica de 80 mA. Utilizamos um marcador de peso molecular padrão de 14,4 KDa a 116 KDa (*Thermo Scientific*).

Após corrida eletroforética o gel foi corado com comassie brilhante blue R250 (Vetec) e a documentação foi realizada no equipamento fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad), as imagens foram capturadas com o auxílio do *software* ImageLab v.4.0 (BioRad).

3.11 PURIFICAÇÃO ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A purificação das proteínas foi realizada por cromatografia de afinidade, método pelo qual ocorre a separação das proteínas de acordo com a afinidade a um ligante.

O sobrenadante obtido durante a etapa de lise foi injetado em uma coluna contendo a resina Ni-NTA. A coluna foi previamente equilibrada com tampão de partida (TRIS 50 mM, NaCl 100mM). A eluição da enzima foi realizada usando gradiente crescente de imidazol, nas concentrações de 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300mM e 500mM do tampão de eluição (TRIS 50 mM, NaCl 100mM, Imidazol 1 M).

A purificação foi realizada utilizando o equipamento AKTA-Start (GE Healthcare). O grau de pureza da enzima foi monitorado por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.

Após a cromatografia de afinidade foi realizada uma cromatografia de gel filtração, conhecida também como cromatografia de exclusão molecular para a remoção do sal imidazol. É uma técnica cromatográfica na qual as proteínas são separadas por meio de seus tamanhos e massas moleculares. Para este experimento, foi utilizada uma coluna com uma resina constituída por uma base polimérica (Superdex). A coluna utilizada foi *HiTrap™ 26/10 Desalting* de 5 mL (GE Healthcare), e o tampão utilizado para esta proteína foi o tampão Na_2HPO_4 20mM, NaCl 300mM, pH 7,5. As características da coluna estão descritas na tabela 4.

Tabela 04: Características da HiTrap *Desalting*

Matriz	Sephadex G-25 Superfino, dextrano reticulado
Volume da coluna	5 mL
Dimensão da coluna	1.6 x 2.5 cm
Tamanho médio da partícula	90 µm

Fonte: GE Healthcare

3.12 WESTERN BLOTTING

A confirmação da expressão da CaMCA íntegra e truncada, foi realizada através da técnica de *Western blotting* com anticorpo *6x-His Tag Antibody* (MA1-21315-HRP - ThermoFisher). Após a corrida eletroforética, o gel de poliacrilamida foi colocado em contato com a uma membrana de PVDF (Bio-Rad). O sistema foi colocado em uma cuba de transferência Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). A eletrotransferência foi realizada usando o Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad), segundo as orientações do fabricante.

A membrana foi então lavada com solução bloqueadora PBS (Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 150 mM - pH 7,4) com adição de 5 % de albumina e 0,01 % *Tween 20*, e mantida sob agitação constante durante 1h em temperatura ambiente.

Utilizamos o anticorpo específico Anti-6X *His®tag* (ThermoFisher) diluído na proporção 1:1000 em PBS (Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 150 mM - pH 7,4) com adição de 5 % de albumina e 0,01 % *Tween 20.* A membrana foi incubada a 4°C sob agitação

durante aproximadamente 18 horas. Após o período de incubação, a membrana foi lavada com tampão de lavagem PBS + *Tween* 0,01 % por 10 minutos (3x).

A revelação da membrana de PVDF foi feita através do método de quimiluminescência com uso do *Kit SuperSignal - West Pico* (ThermoFisher) diluído 1:1, que continham as soluções com substrato orgânico *SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution* e solução reveladora *Luminol Encharc Solution* a membrana foi revelada com o auxílio do aparelho fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad).

3.13 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO Ca^{2+} SOBRE A ESTRUTURA DA CaMCA

O efeito do cálcio sobre estrutura da CaMCA foi avaliado através da fluorescência intrínseca da proteína em tampão TRIS 50 mM, NaCl 150 mM – pH 7,4 onde foram adicionadas concentrações crescentes de $CaCl_2$ (10 µM – 30 mM). Utilizamos um espectrofluorímetro Hitachi modelo F-2700, onde os espectros de emissão foram coletados em um intervalo de 300 – 500 nm com fenda de 10 nm a 30ºC, usando um ʎ 280 nm com fenda de 5 nm. Os dados foram analisados utilizando a equação Adair utilizando o software de análise Grafit vs 5.0.

3.14 TESTE DE PROCESSAMENTO USANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO

Para este ensaio, a CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86 e seus respectivos mutantes foram incubadas com diferentes concentrações de $CaCl_2$ (0 – 15 mM) e 5 mM de ditiotretol, a 25 °C em tampão TRIS 50 mM e NaCl 150 mM, pH 7,4, durante 96 horas. Usamos como controle a incubação da protease na presença de 5 mM de EGTA e apenas a protease em tampão de ensaio sem cálcio adicional. Analisamos a capacidade de maturação da protease frente a diferentes concentrações de Ca^{2+} através de eletroforese SDS-page 15%.

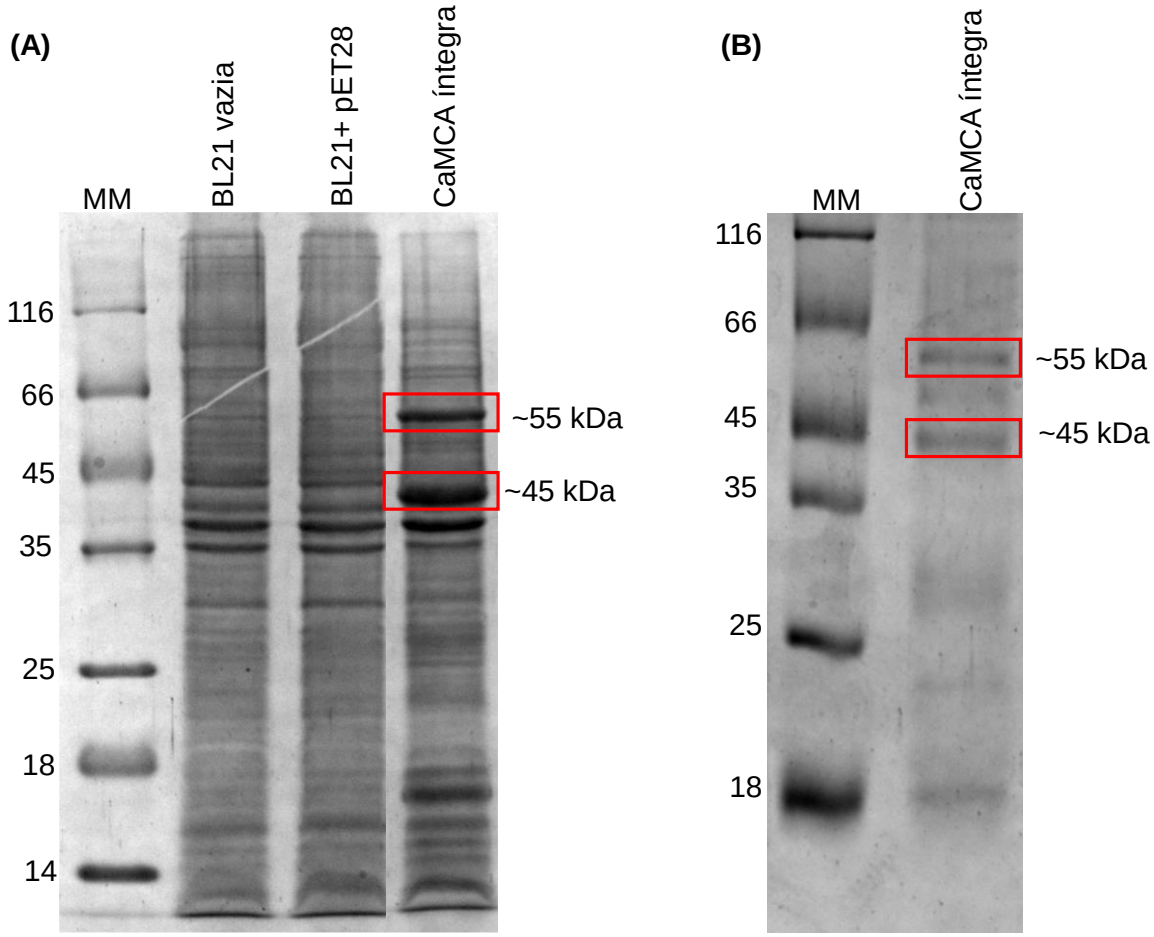
4 RESULTADOS

Na presente seção, são apresentados os resultados referentes a clonagem, expressão e purificação da metacaspase de *C. albicans* (CaMCA), com destaque para a deleção do N-terminal (CaMCA-ΔN115 e CaMCA-ΔN86) e as mutações sítio-dirigidas nos resíduos do sítio de ligação do cálcio (Asp^{268}, Asp^{269}, Asp^{252} e Asp^{299}). O propósito deste estudo foi investigar os impactos dessas mutações no sítio de cálcio na estrutura e na função da CaMCA.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA CaMCA ÍNTEGRA

O resultado da análise do gel de poliacrilamida com a expressão da CaMCA íntegra mostra a presença de duas bandas que se referem a CaMCA. Uma banda com aproximadamente 55 KDa referente a forma não processada da protease, e outra banda de cerca de 45 KDa referente a forma processada da CaMCA (Figura 24A). Após a purificação, a eletroforese revelou a presença das bandas correspondentes a forma processada (45 KDa) e não processada da CaMCA (55 KDa), sem sinais de autodegradação (Figura 24B).

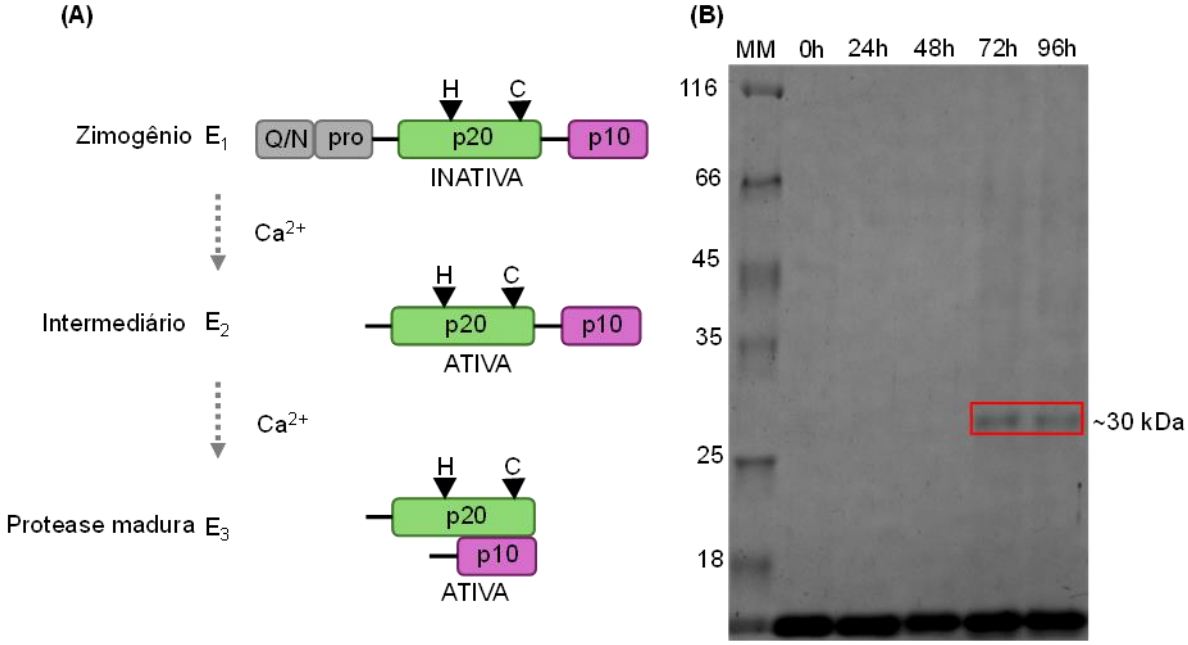
Figura 24: Eletroforese da expressão e purificação a CaMCA íntegra. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS-PAGE 15%: Canaleta 1 - Marcador de massa molecular (MM); Canaleta 2 - BL21 sem inserção genética; Canaleta 3 - BL21 + vetor pET28(a); Canaleta 4 - CaMCA íntegra com indução de 0,25 mM de IPTG. (B) Eletroforese da purificação da CaMCA íntegra com 200 mM de imidazol. Canaleta 1 - Marcador de massa molecular (MM); Canaleta 2 - CaMCA purificada.



Avaliamos o efeito do íon Ca^{2+} no autoprocessamento e ativação da CaMCA. A Figura 25A ilustra a sequência de eventos que conduzem da inativação a ativação completa da enzima.

Através da eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (Figura 25B), conseguimos confirmar o impacto do Ca^{2+} no processo de ativação e processamento da CaMCA íntegra. Após uma incubação durante 72 horas com uma concentração de 5mM de cálcio, observamos a presença de uma banda com peso molecular aproximado de ~30 KDa. Essa banda foi exclusivamente detectada na amostra tratada com cálcio, enquanto ausente nos controles positivo e negativo. Esta evidência experimental corrobora a sequência de eventos descrita na Figura 25A, demonstrando a relação direta entre a presença de cálcio e o processo de ativação da CaMCA.

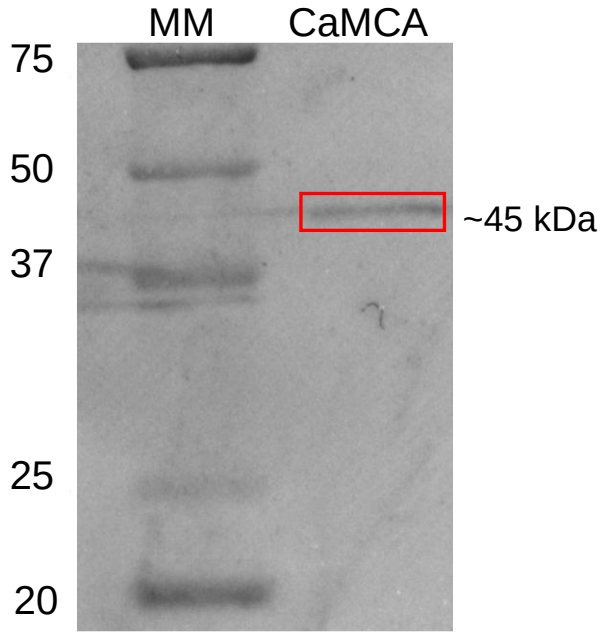
Figura 25: Impacto do Ca^{2+} na ativação e processamento da CaMCA íntegra. (A) Ilustração da progressão da inativação para a completa ativação da enzima CaMCA íntegra em resposta ao aumento da concentração de cálcio intracelular. A figura destaca os eventos moleculares envolvidos, incluindo a liberação do pró-domínio inibidor e a conversão da metacaspase para sua forma intermediária ativa em presença de cálcio. (B) Resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida 15% demonstrando o impacto do cálcio no processo de ativação e processamento da CaMCA íntegra.



Fonte (Figura A): Adaptado de ŠTRANCAR *et al.,* 2022

Para validar a integridade da CaMCA íntegra, realizamos um ensaio de *Western blotting* utilizando um anticorpo específico contra a sua cauda de histidina (His-tag), cuja inserção ocorreu no N-terminal através do vetor pET28(a)+. Durante a análise, constatamos a detecção exclusiva da fração processada da CaMCA, com um peso molecular aproximado de ~45 KDa (Figura 26).

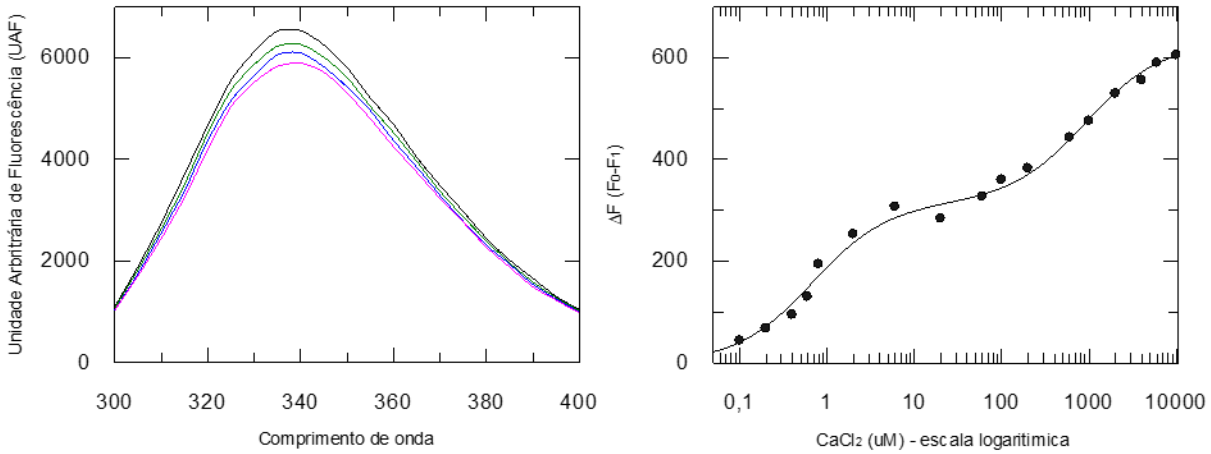
Figura 26: Resultado do ensaio de Western blotting, evidenciando a detecção seletiva da fração processada da enzima CaMCA, com um peso molecular aproximado de 45 KDa, utilizando um anticorpo específico contra a sua tag de histidina (His-tag).



Decidimos avaliar o efeito na estrutura da interação da CaMCA íntegra em decorrência da sua interação com o Ca^{2+}.

Após a análise, constatamos que a CaMCA íntegra apresenta dois pontos de inflexão, evidenciados por uma alta afinidade (K_{D1} = 7 µM) e uma baixa afinidade (K_{D2} = 9,3 mM), conforme evidenciado na Figura 27B. Além disso, verificamos que a adição de 30 mM de ácido etilenoglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N′,N′-tetra-acético (EGTA), um quelante específico de íons Ca^{2+}, resultou na completa reversão do efeito do íon sobre a estrutura da CaMCA íntegra, como ilustrado na Figura 27A.

Figura 27: **Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA.** (A) Espectro de fluorescência da CaMCA íntegra na ausência de CaCl2 (preto), com 10 µM de CaCl2 (verde), com 1 mM de CaCl2 (azul) e com 10 mM de CaCl2 (rosa); (B) O gráfico mostra as mudanças na intensidade máxima do pico de emissão de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 330 nm) com o aumento da concentração de CaCl2 (escala logarítmica)



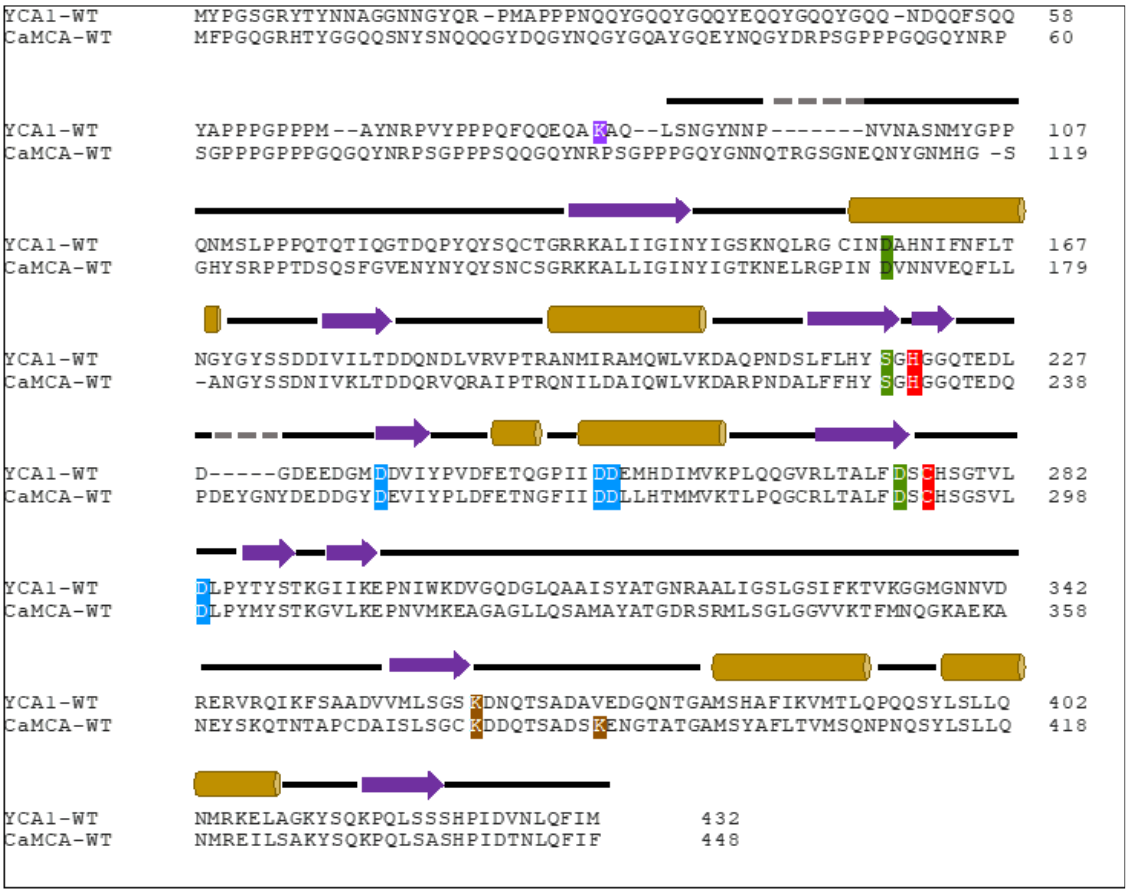
Durante o processo de caracterização bioquímica da CaMCA íntegra, enfrentamos um desafio relacionado a sua insolubilidade. Um estudo publicado por ERHARDT *et al.*, (2010) demonstrou que a composição da porção N-terminal da metacaspase YCA1 da levedura *S. cerevisiae* exerce grande influência na capacidade de precipitação desta protease, uma vez que essa região é rica em glutamina e asparagina. Semelhante a YCA1 foi descrito que as metacaspases de M. oryzae (MoMca1 e MoMca2) também apresentam um N-terminal rico em resíduos de Q/N, sugerindo ser uma característica comum entre as metacaspases do tipo I (FERNANDEZ *et al.,* 2021).

Ao avaliarmos a constituição da região N-terminal da CaMCA, observamos que ela compartilha características importantes da região N-terminal com a YCA1. Diante destes fatos, durante a realização do projeto de mestrado, traçamos um novo caminho para obtenção da proteína recombinante com a deleção desta região, visando obter uma enzima solúvel que possibilitaria sua caracterização bioquímica. Portanto, iniciamos a clonagem da CaMCA com a deleção de 115 aminoácidos da região N-terminal, a qual chamaremos de CaMCA-ΔN115.

4.2 DELEÇÃO DO N-TERMINAL – CaMCA TRUNCADA (CaMCA-ΔN115)

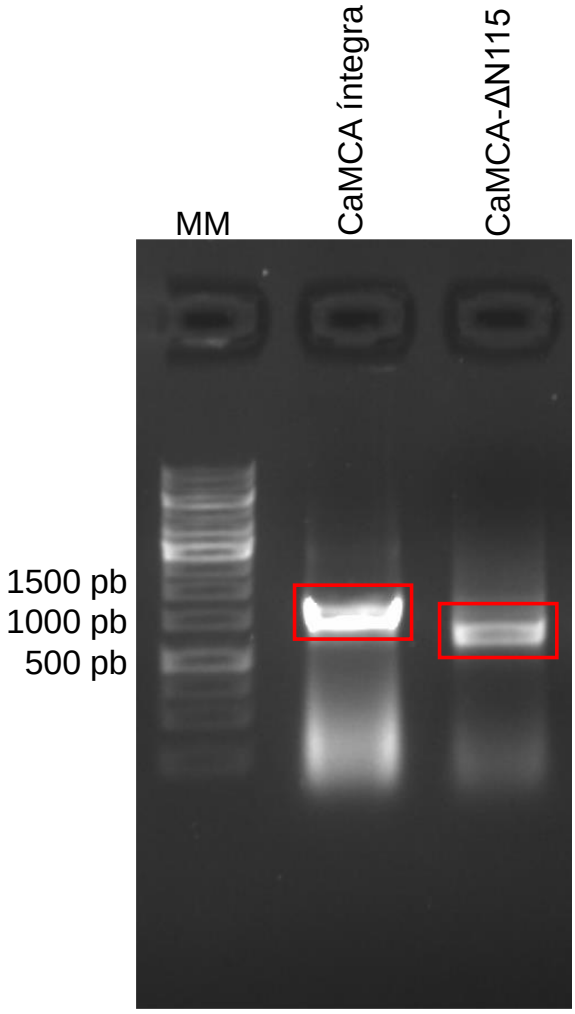
Para realizar a deleção do N-terminal e as mutações sítio-dirigidas no gene que codifica a metacaspase de *C. albicans* (CaMCA), primeiro identificamos os resíduos de interesse com base no alinhamento da sequência de aminoácidos da YCA1 de *Saccharomyces cerevisiae* com a sequência de aminoácidos da CaMCA (Figura 28), uma vez que a YCA1 possui sua estrutura cristalográfica resolvida (WONG & YAN SHI, 2012). Além disso, ambas as enzimas são metacaspases do tipo I que apresentam a porção hidrofóbica em seu N-terminal (WONG & YAN SHI, 2012). Constatamos que a deleção dos aminoácidos da porção N-terminal da CaMCA não interfere na estrutura tridimensional da CaMCA.

Figura 28: Alinhamento da sequência primária da YCA1 selvagem com a sequência primária da CaMCA íntegra. Comparação da estrutura primária das metacaspases YCA1 de *S. cerevisiae* e CaMCA de *C. albicans.* As estruturas aleatórias são representadas pela linha preta, as folhas β estão indicadas por setas roxas e as α-hélices são representadas por cilindros amarelos.



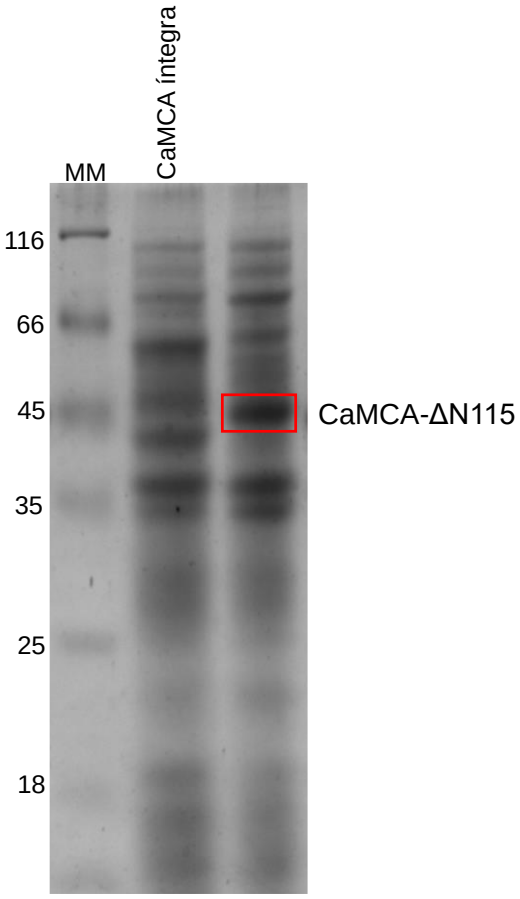
A clonagem da CaMCA-ΔN115 se baseou no método que utiliza enzimas de restrição e T4 ligase para construir o DNA recombinante. Para a amplificação do gene, foi realizada uma reação de PCR utilizando a enzima *HiFidelity* DNA *Polymerase* (Qiagen), tendo o DNA da CaMCA íntegra como molde para amplificação do segmento de DNA que codifica a CaMCA-ΔN115. Foram empregados *primers* específicos para a região de interesse, visando a deleção dos pares de bases que codificam os aminoácidos a serem removidos. Desta forma, foi possível amplificar a região codificadora da CaMCA-ΔN115 com ~997 pb (Figura 29).

Figura 29: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação da região codificadora da CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN115. Purificação da amplificação do gene da CaMCA-ΔN115, onde a coluna 1 é o padrão de massa molecular 1Kb DNA Ladder; a coluna 2 é o produto da PCR do gene da CaMCA (1360 pb) íntegra e a coluna 3 é a amplificação do gene da CaMCA-ΔN115 (997 pb)."



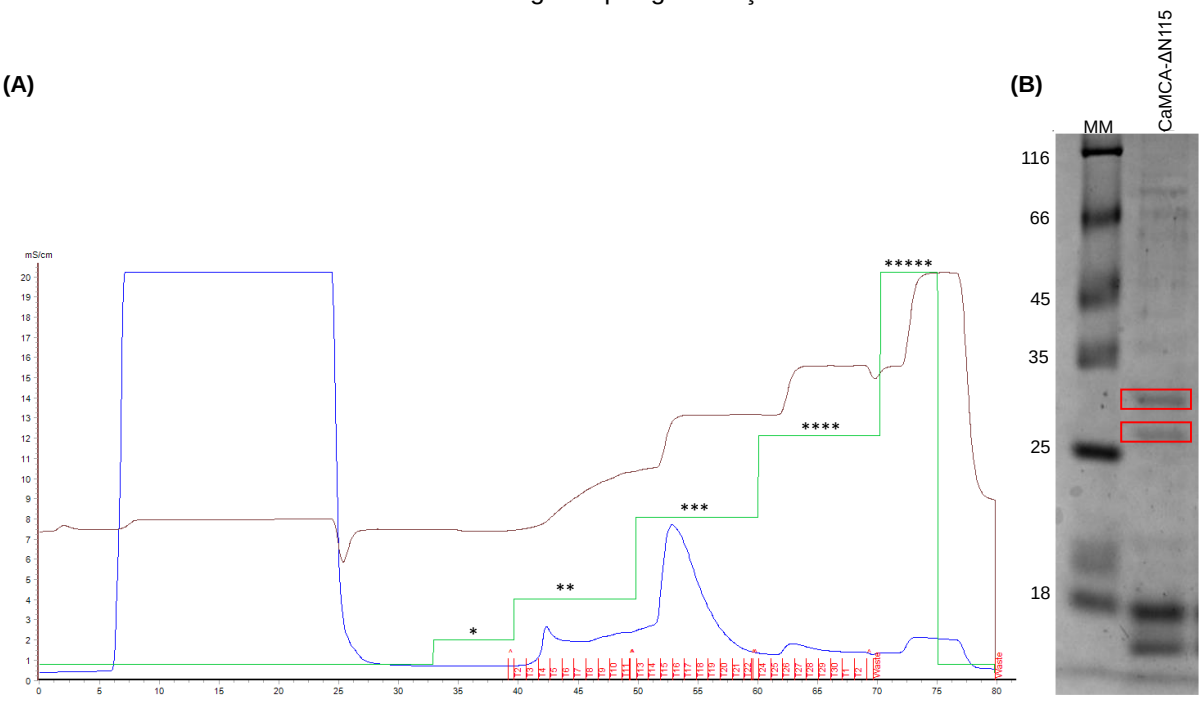
A CaMCA-ΔN115 foi expressa em BL21(DE3)pLysS. Na análise por gel de poliacrilamida, observou-se a presença de uma banda com aproximadamente 43 KDa. Entretanto, não é possível determinar pelo gel de expressão se houve processamento ou não da proteína (Figura 30).

Figura 30: Expressão da CaMCA-ΔN115 e CaMCA íntegra. A análise foi realizada em SDS-PAGE a 15%. A coluna 1 refere-se ao marcador molecular (MM); a coluna 2 refere-se ao extrato proteico total induzido com 0,25 mM de IPTG para CaMCA íntegra (~55 KDa e ~40 KDa) e CaMCA-ΔN115 (~45 KDa), respectivamente.



Após a expressão da proteína CaMCA-ΔN115, avançamos para sua purificação usando cromatografia por afinidade. Observamos um perfil de purificação distinto ao da CaMCA íntegra, com picos de eluição ocorrendo em concentrações de 100, 200 e 300 mM de imidazol (Figura 20A). Na análise por eletroforese em gel de SDS-PAGE (15% de acrilamida), verificamos que a CaMCA-ΔN115 estava eluida na fração com 200 mM de imidazol. Além disso, notamos evidências de autoprocessamento mais rápido em comparação com a CaMCA íntegra, junto com a presença de bandas indicativas de autodegradação (Figura 31).

Figura 31: Cromatograma da purificação da CaMCA-ΔN115 e d*esalting* das frações purificadas da CaMCA-ΔN115. (A) Cromatograma da purificação da CaMCA-ΔN115 com coluna de afinidade Ni^{2+}-*sepharose*. No cromatograma a cor marrom representa a condutividade, o azul o perfil de purificação com absorbância monitorada em 280 nm, em verde o limiar de concentração de imidazol, sendo 50 mM (*), 100 mM (**), 200 mM (***), 300mM (****) e 1 M (*****) e as frações em vermelho (B) Resultado da eletroforese em SDS-PAGE a 15% das amostras eluidas na cromatografia por gel filtração com coluna *HiTrap*™ 5mL (GE Healthcare) para CaMCA-ΔN115. A coluna 1 é referente ao MM; a coluna 2 é referente a CaMCA-ΔN115 obtida na cromatografia por gel filtração.



Após constatarmos a ocorrência de autodegradação da CaMCA-ΔN115 durante o processo de purificação, optamos por adotar uma estratégia de deleção menos abrangente para a obtenção da CaMCA com deleção do N-terminal. Essa decisão foi fundamentada na necessidade de mitigar a possibilidade de autodegradação da proteína resultante.

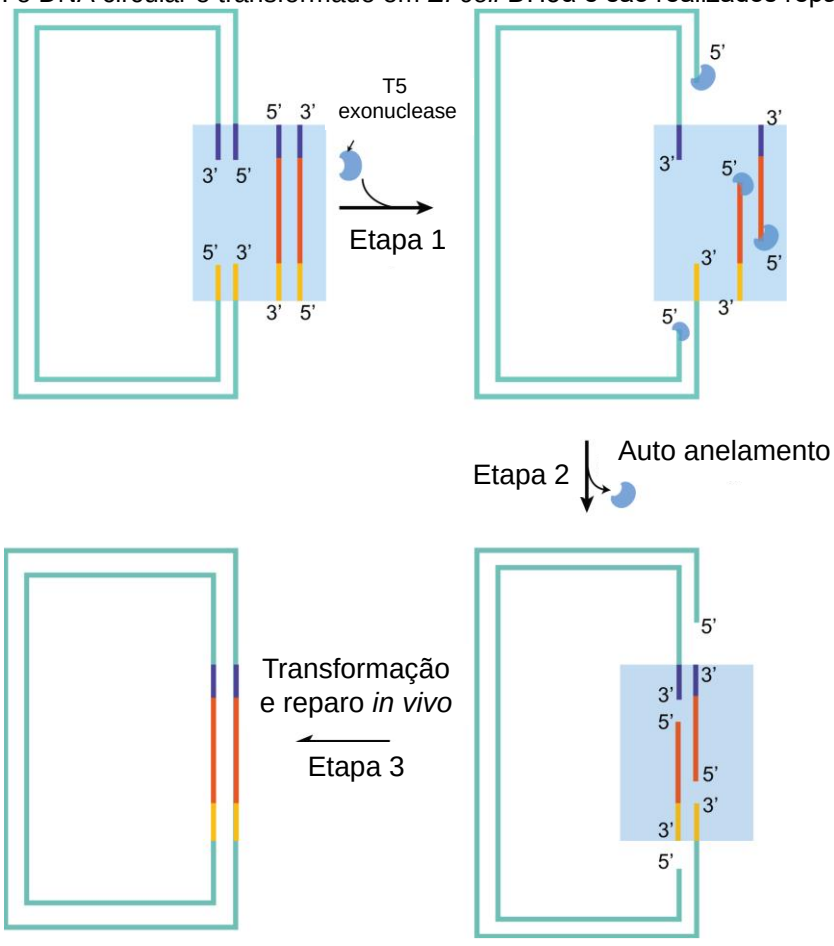
4.3 DELEÇÃO DO N-TERMINAL – CaMCA TRUNCADA (CaMCA-ΔN86)

A construção da CaMCA-ΔN86 foi orientada pelos resultados obtidos com a CaMCA-ΔN115. Embora o método tradicional de clonagem usando a T4 ligase e enzimas de restrição ainda seja amplamente utilizado, durante nossas tentativas não obtivemos sucesso na clonagem ao empregar este método para a obtenção da CaMCA-ΔN86. Com os avanços na área da biologia molecular, a construção e modificação de genes usando a clonagem se tornaram mais corriqueiras, implicando no desenvolvimento de métodos mais simples e econômicos (CHAO, YUAN & ZHAO,

2015). Métodos que utilizam a montagem de fragmentos de DNA *in vivo* e *in vitro*, empregando extremidades homólogas, foram desenvolvidos (YONGZHEN *et al.,* 2019).

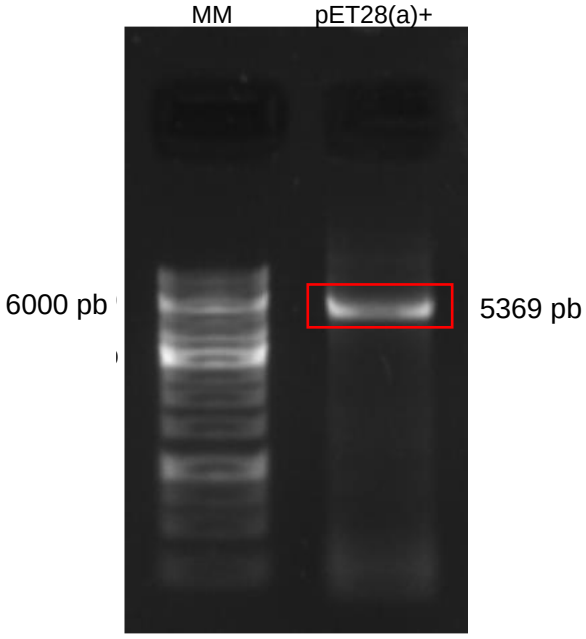
A estratégia de clonagem da CaMCA-ΔN86 empregou o procedimento *T5 Exonuclease DNA Assembly* (TEDA), um método que se baseia na construção de um DNA recombinante usando exclusivamente a T5 exonuclease. Durante a incubação do inserto com o vetor, a T5 exonuclease atua clivando as extremidades homólogas para gerar pontas 3', que então se hibridam umas as outras. Em seguida, ocorre o reparo *in vivo* na célula hospedeira, onde a atividade da DNA polimerase entra em ação para preencher as lacunas, seguido pela ligação covalente dos fragmentos pela ligase. Essa sequência de eventos é ilustrada na Figura 32 e foi empregada para a confecção dos mutantes conforme descrito por YONGZHEN *et al.,* (2019).

Figura 32: Esquema do método TEDA. A meia-lua (azul) representa a T5 exonuclease; o retângulo em dupla fita com lacuna representa o plasmídeo pET28(a) linearizado. As linhas verticais em dupla fita representam o inserto; linhas da mesma cor indicam a região homóloga. Etapa 1: durante a incubação a 30 °C, a T5 exonuclease cliva as extremidades 5' do plasmídeo linearizado e do inserto, gerando pontas complementares; etapa 2: as pontas complementares 5' se ligam umas as outras. Etapa 3: o DNA circular é transformado em *E. coli* DH5α e são realizados reparos *in vivo.*



O vetor pET28(a)+ foi amplificado por PCR utilizando *primers* específicos para o protocolo TEDA. A confirmação da amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%. O fragmento de DNA obtido utilizando os *primers* designados para o protocolo TEDA, foi purificado utilizando o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e quantificado por espectrofotometria (NanoDrop - Invitrogen). A concentração do DNA obtido foi de 80 ng/µL, com uma relação de densidade óptica de 260/280 de 1,90. Após a confirmação da amplificação, procedemos com a digestão utilizando a enzima DpnI. Na análise por eletroforese, observamos uma banda única no tamanho esperado, sem aparição de bandas menores, o que indica a ausência de anelamento inespecífico durante a amplificação (Figura 33).

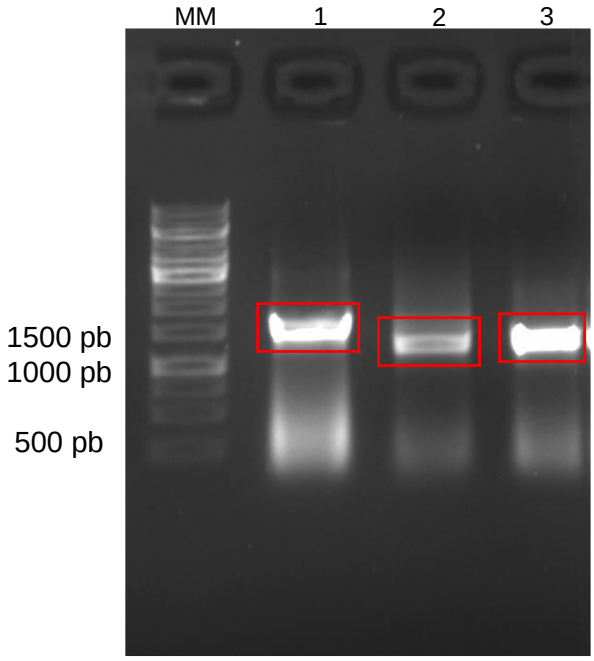
Figura 33: Eletroforese em gel de agarose 1% indicando a eficiência da amplificação do pET28(a)+ por PCR, utilizando os *primers* do protocolo TEDA. Na canaleta 1 está indicado o marcador molecular 1 Kb Ladder (MM); na canaleta 2, a reação de amplificação do pET28(a)+ pós digestão com DpnI.



Após a confirmação da amplificação bem-sucedida do vetor pET28(a)+ por PCR, procedemos a amplificação do gene codificador da CaMCA-ΔN86 utilizando os *primers* designados para o procedimento TEDA. A reação de PCR foi realizada seguindo as condições estabelecidas. O fragmento foi purificado utilizando o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e quantificado por espectrofotometria (NanoDrop - Invitrogen). A concentração do DNA obtido foi de 120 ng/µL, com uma relação de densidade óptica de 260/280 de 1,99 e o produto obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 34). Nesta análise, foi

possível visualizar um fragmento único no tamanho esperado para o gene da CaMCA-ΔN86, indicando o sucesso da amplificação.

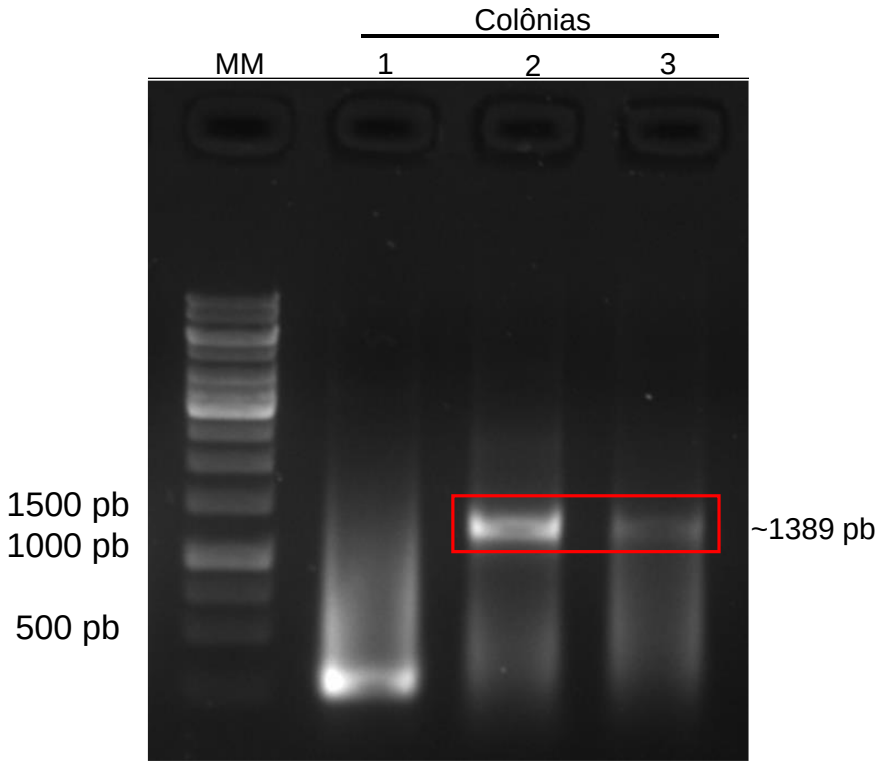
Figura 34: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação da região codificadora da CaMCA íntegra, CaMCA-ΔN115 e CaMCA-ΔN86. A canaleta 1 é o padrão de massa molecular 1Kb DNA Ladder; A coluna 2 é o produto da PCR do gene da CaMCA íntegra (~1347 pb); A canaleta 3 é o produto da PCR do gene da CaMCA-ΔN115 (~1002 pb); A canaleta 4 é o produto da PCR do gene da CaMCA-ΔN86 (~1089 pb).



O produto purificado foi submetido ao protocolo TEDA, no qual ocorreu a recombinação entre duas moléculas lineares de DNA: um inserto e um vetor plasmidial flanqueado por duas regiões de sequência curta homóloga ao inserto (YONGZHEN *et al.,* 2019). A reação foi preparada na proporção de 1:4 (vetor/inserto), utilizando 100 ng de vetor. Para calcular a concentração do inserto, foi aplicada a fórmula $ng_{Inserto}$ = (ng Vetor x pb Inserto)/(pb Vetor). Após a incubação a 30 °C por 40 minutos, a suspensão foi submetida ao processo de transformação por choque térmico em cepas de *E. coli* DH5α.

Após a realização da eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), observamos a presença de uma única banda na altura de ~1389 pb, correspondente à CaMCA-ΔN86, conforme esperado (Figura 35).

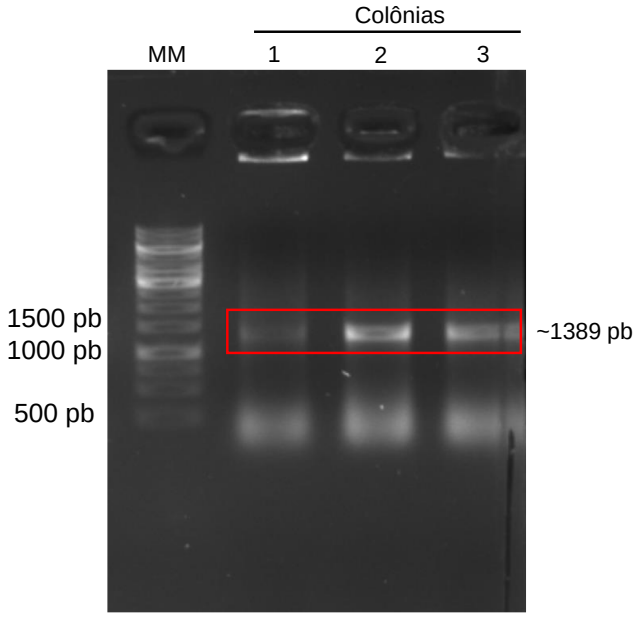
Figura 35: PCR da *miniprep* da CaMCA-ΔN86 para análise da transformação em *E. coli* DH5α utilizando *primers* T7. Na canaleta 1 refere-se ao MM; as canaletas 2, 3 e 4 referem-se às colônias selecionadas para o clone CaMCA-ΔN86.



A presença e o tamanho do inserto confirmaram o sucesso das etapas de clonagem e transformação em *E. coli* DH5α. Utilizamos uma colônia (colônia 2) para a preparação de *miniprep,* utilizando o Kit Wizard® Plus SV *Miniprep* DNA Purification Systems (Promega). O material obtido foi quantificado por espectrofotometria, apresentando uma concentração de 57 ng/µL (CaMCA-ΔN86).

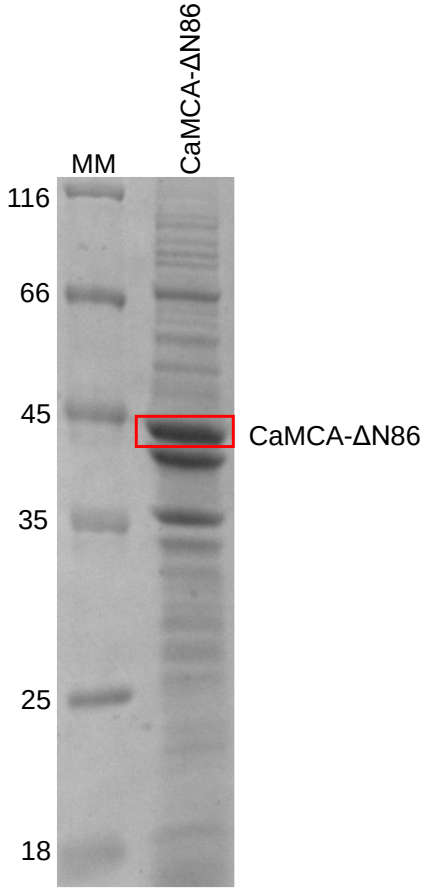
Com a confirmação do sucesso da clonagem, avançamos para a etapa de expressão. Os plasmídeos obtidos foram transformados em células competentes de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Após a transformação, os clones foram selecionados com canamicina e, em seguida, realizou-se uma PCR de colônia, tal qual realizado para confirmação em DH5α (Figura 36).

Figura 36: PCR de colônia da CaMCA-ΔN86 para análise da transformação em *E. coli* BL21(DE3)pLysS utilizando *primers* T7. Na canaleta 1, temos o marcador molecular (MM), e nas demais canaletas, o produto da PCR dos clones selecionados (1-3).



Dada a confirmação da presença do DNA recombinante na *E. coli* BL21(DE3)pLysS avançamos para os ensaios de expressão. Assim como fizemos com a CaMCA íntegra e a CaMCA-ΔN115, realizamos a expressão da CaMCA-ΔN86 a 20°C por 16 horas, induzida com 0,25 mM de IPTG. Optamos por usar a colônia 2 para a expressão. A Figura 37 mostra o gel de SDS-PAGE com uma malha de 15% de acrilamida, obtido após submeter as amostras a condições desnaturantes. A análise dos extratos proteicos totais induzidos com 0,25 mM de IPTG para CaMCA-ΔN86 revelou a presença de uma banda correspondente a uma proteína solúvel com aproximadamente 43 KDa, conforme visualizado no gel SDS-PAGE a 15%.

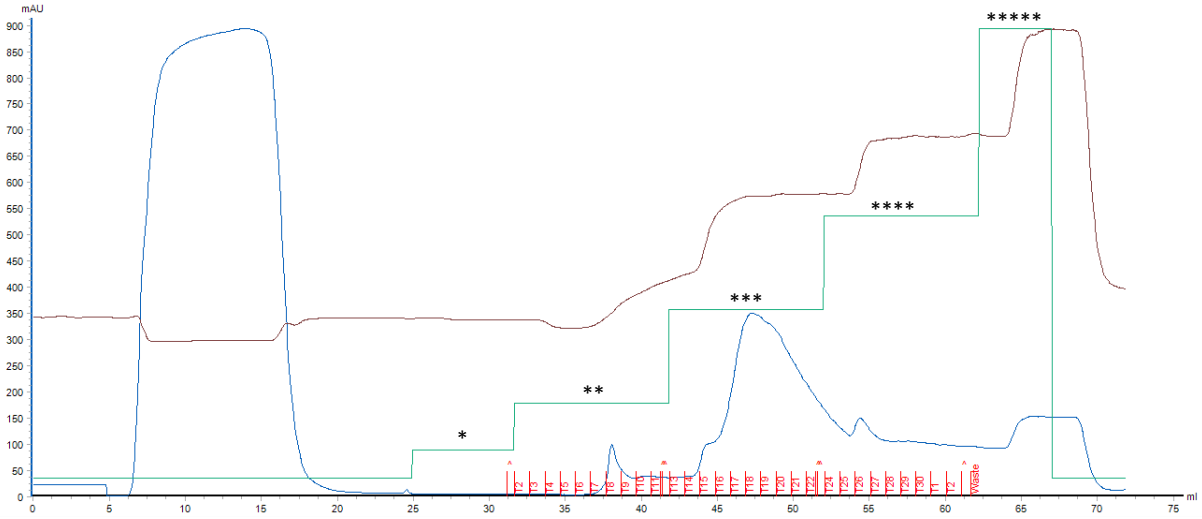
Figura 37: Expressão da metacaspase CaMCA-ΔN86. A análise foi realizada em SDS-PAGE a 15%. Na canaleta 1, temos o padrão de massa molecular (MM); na canaleta 2, estão os extratos proteicos totais induzidos com 0,25 mM de IPTG para CaMCA-ΔN86.



O processo inicial para a purificação da CaMCA-ΔN86 envolveu o uso de uma resina de afinidade Níquel-sepharose em conjunto com um sistema automatizado de cromatografia líquida em coluna, o modelo AKTA-Start (GE Healthcare). Na fase inicial, o material injetado na coluna foi eluido por gradientes crescentes de imidazol, variando de 50 mM a 500 mM.

Após a análise do cromatograma identificamos a presença de um pico de eluição na concentração de 200 mM, seguido por outro pico em 300 mM de imidazol. Ao examinarmos as amostras em gel de poliacrilamida 15%, verificamos que a proteína foi eluida em sua forma pura com 200 mM de imidazol (Figura 38).

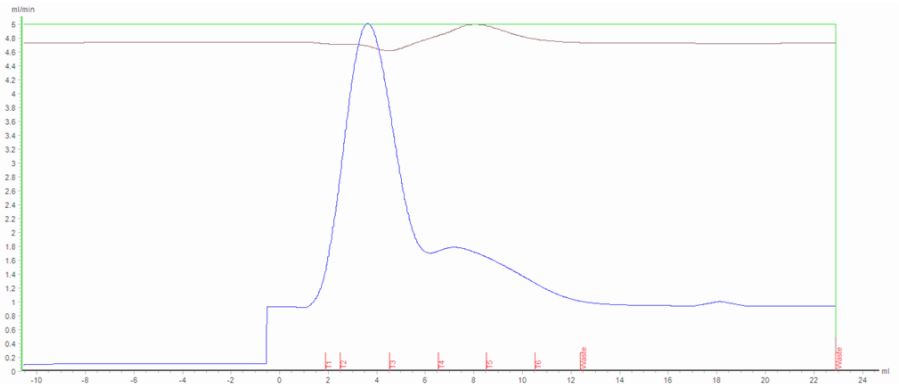
Figura 38: Cromatograma da purificação da CaMCA-ΔN86. Cromatograma da purificação da CaMCA-ΔN86 com coluna de afinidade Ni^{2+}-*sepharose*. A proteína foi tratada com tampão de ligação (20mM TRIS + 150mM NaCl - pH 7,4) e tampão eluente contendo imidzol (20mM TRIS + 150mM NaCl + 1 M Imidazol). No cromatograma a cor marrom representa a condutividade, o azul o perfil de purificação com absorbância monitorada em 280 nm, em verde o limiar de concentração de imidazol, sendo 50 mM (*), 100 mM (**), 200 mM (***), 300mM (****) e 1 M (*****) e as frações em vermelho.



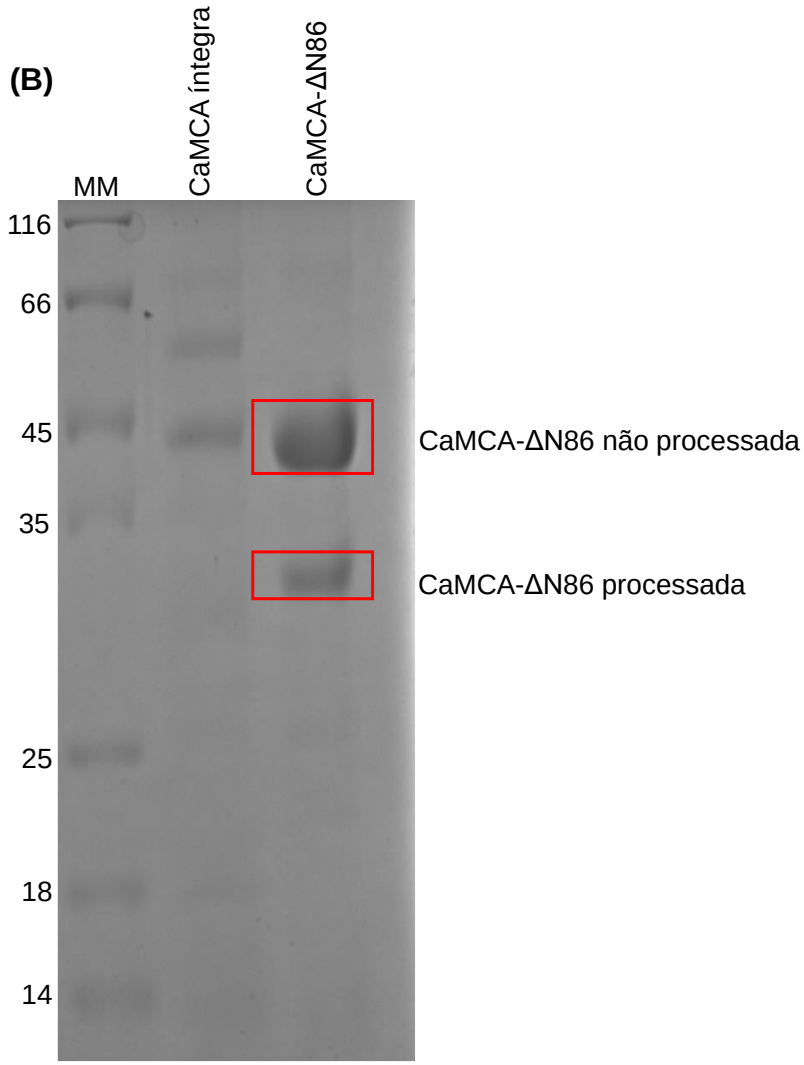
Depois da confirmação da purificação as amostras foram submetidas ao processo de dessalinização para remoção do imidazol. A CaMCA-ΔN86 foi eluida em tampão TRIS 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4 (Figura 39A). A análise subsequente em gel SDS-Page revelou que a CaMCA-ΔN86 não sofreu degradação durante o processo de dessalinização (Figura 39B), mantendo o perfil de bandas observado durante a purificação. A CaMCA-ΔN86 apresenta uma banda com ~43 KDa e sofre um autoprocessamento, gerando uma banda adicional com peso molecular ~33 KDa.

Figura 39: Cromatograma da dessalinização da CaMCA-ΔN86 e gel SDS-Page 15% das frações eluidas da CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86. (A) Cromatograma da CaMCA-ΔN86 por gel filtração com coluna HiTrap™ 5mL (GE Healthcare). Em azul, a absorbância em λ=280 nm; em marrom, o pico da condutividade e em vermelho as frações da CaMCA-ΔN86. (B) Resultado da eletroforese em SDS-PAGE a 15% das amostras eluidas na cromatografia por gel filtração com coluna HiTrap™ 5mL (GE Healthcare) para a CaMCA-ΔN86. A coluna 1 é referente ao MM; a coluna 2 é referente a CaMCA-ΔN86.

(A)



(B)



Para investigar a dependência do íon Ca^{2+} no processo de maturação e ativação da enzima CaMCA-ΔN86, realizamos incubações em diferentes concentrações de $CaCl_2$ (0 a 15 mM), em tampão contendo TRIS 50 mM e NaCl 150 mM, com pH ajustado para 7,4. Essas incubações foram conduzidas por um período de 72 horas, em temperatura ambiente.

A análise revelou que a CaMCA-ΔN86 foi ativada em todas as concentrações de Ca^{2+} desde o início da incubação (Figura 40A). Conforme observado na Figura 39 (gel pós-dessalinização), ainda durante os estágios de expressão e purificação, a protease passou por seu primeiro processamento, resultando na formação de fragmentos correspondentes a forma processada (~33 KDa) e a forma não processada (~43 KDa). Notavelmente, após a adição de Ca^{2+}, observou-se um segundo processamento da protease, evidenciado pela formação de bandas ausentes nos controles positivo e negativo. Além disso, observou-se uma correlação entre a velocidade de ativação da CaMCA-ΔN86 e a concentração de íon Ca^{2+}, com maior evidência de processamento da CaMCA-ΔN86 em concentrações mais elevadas, notadamente em 10 e 15 mM de $CaCl_2$ (indicado pelo retângulo vermelho na figura 40A).

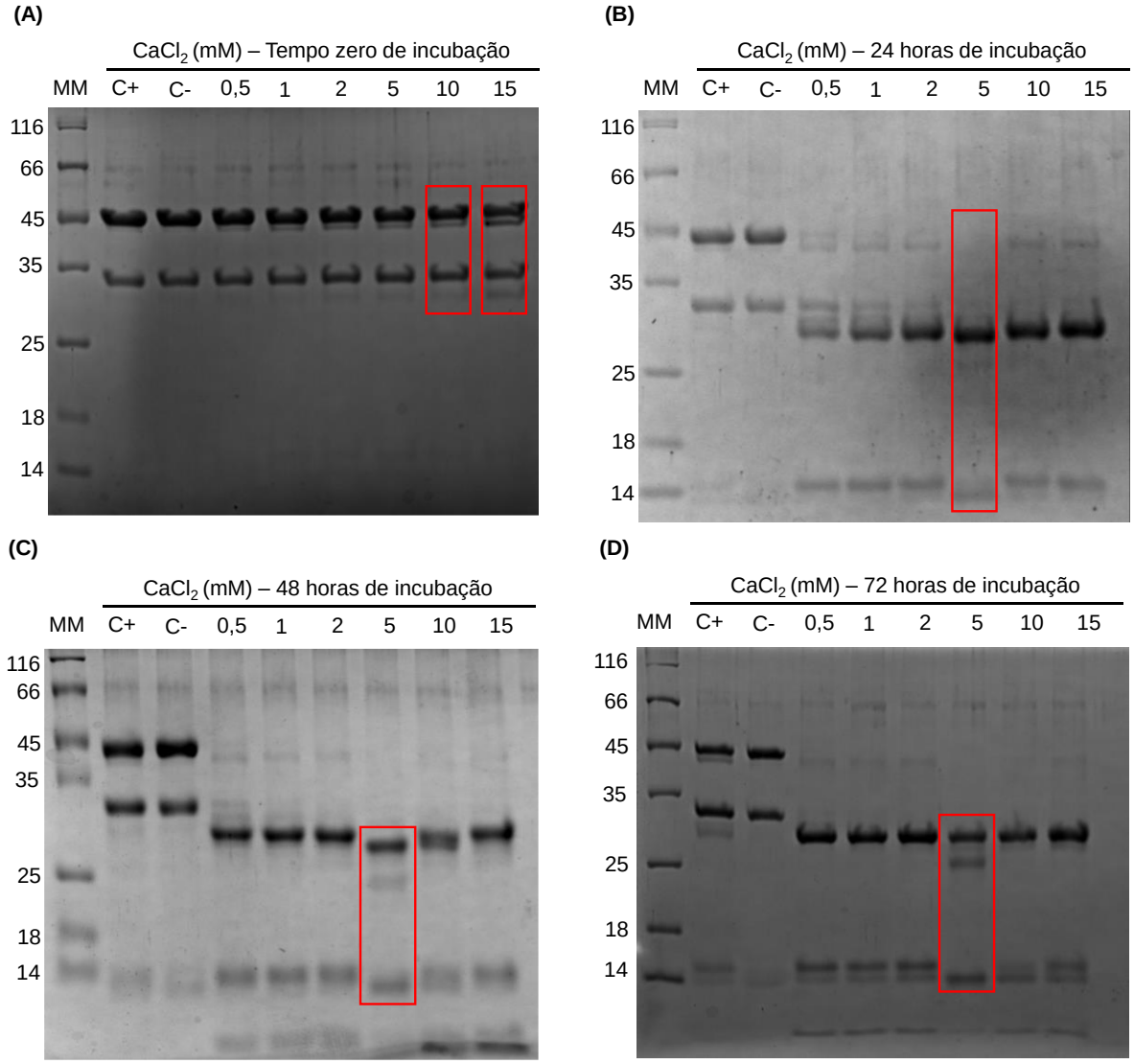
Após 24 horas de incubação, houve uma evolução significativa na maturação e ativação da CaMCA-ΔN86, com a formação de um fragmento de aproximadamente ~30 KDa em todas as concentrações de Ca^{2+} testadas (Figura 40B). No entanto, apenas na presença de 5 mM de $CaCl_2$ a protease demonstrou estar completamente processada, como indicado pelo retângulo vermelho na Figura 40B.

Após 48 horas de incubação com $CaCl_2$ apenas na concentração de 5 mM houve a formação de uma banda com ~25 KDa e o fragmento de 30 KDa formado em decorrência no processamento até 24 horas sofreu um terceiro processamento, gerando um fragmento de ~28 KDa, como indicado pelo retângulo vermelho na Figura 40C. Os controles não apresentaram nenhum tipo de processamento e nas demais condições de incubação, não foi observado nenhuma mudança significativa.

Ao completarmos 72 horas de incubação, observamos que em todas as concentrações testadas a protease passou por um terceiro processamento. O fragmento de 30 KDa, formado até as 24 horas de processamento, resultou em um fragmento de aproximadamente 28 KDa. No entanto, somente na concentração de 5 mM ocorreu a formação de uma banda com cerca de 25 KDa, conforme indicado pelo retângulo vermelho na Figura 40D. No controle positivo (enzima + tampão) o mesmo

padrão de processamento foi observado após 72 horas de incubação, similar ao observado no tempo inicial para as amostras tratadas com cálcio. O controle positivo (enzima + tampão + EGTA) não apresentou nenhum tipo de processamento (Figura 40D).

Figura 40: Maturação da CaMCA-ΔN86 na presença de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0 – 15 mM). Canaleta 1: marcador molecular; Canaleta 2: enzima + tampão; Canaleta 3: enzima + tampão + EGTA; Canaletas 4 – 9 variações na concentração de Ca^{2+} (0 – 15 mM). (A) Processamento da CaMCA-ΔN86 em diferentes concentrações de $CaCl_2$ no tempo zero de incubação; (B) Processamento da CaMCA-ΔN86 em diferentes concentrações de $CaCl_2$ após 24 horas de incubação; (C) Processamento da CaMCA-ΔN86 em diferentes concentrações de $CaCl_2$ após 48 horas de incubação; (D) Processamento da CaMCA-ΔN86 em diferentes concentrações de $CaCl_2$ após 72 horas de incubação.



Após identificarmos que a maturação da protease ocorre sem adição de Ca^{2+}, ainda durante o processo de purificação da CaMCA-ΔN86 (Figura 39 – desalinização), levantando a hipótese de que o cálcio pode se ligar parcialmente a protease durante a expressão ou que outro cátion divalente pode estar presente, e mesmo em baixa

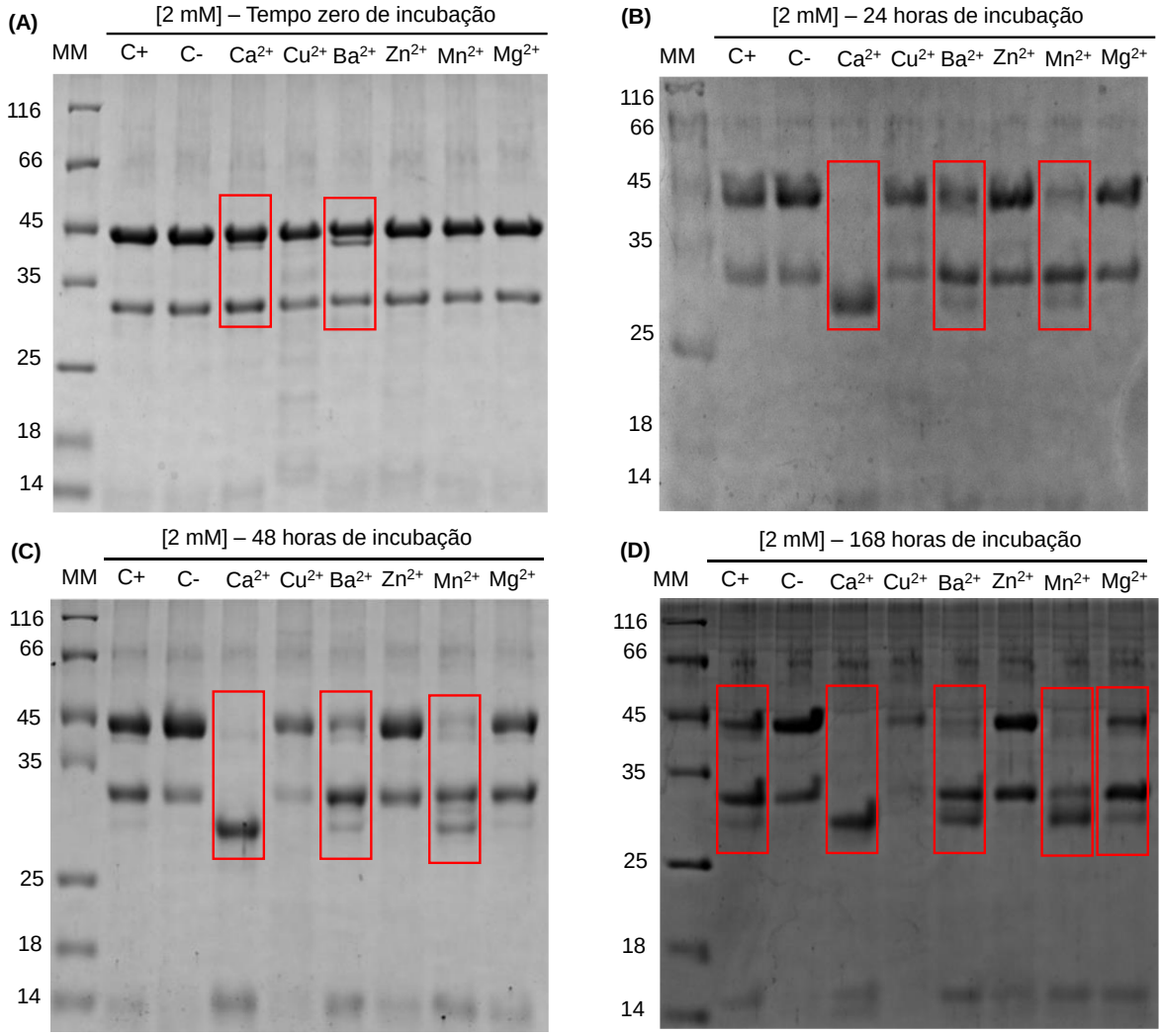
concentração pode se ligar a CaMCA-ΔN86 resultando na sua ativação. Decidimos então avaliar a influência não apenas do cálcio, mas também de outros cátions divalentes, tais como cobre, bário, zinco, manganês e magnésio (Figura 41), no processo de maturação e ativação da CaMCA-ΔN86. Essa abordagem visa avaliar se outros íons divalentes têm um papel semelhante ao cálcio na ativação da CaMCA-ΔN86. Isso nos permitirá determinar se a CaMCA-ΔN86 é seletiva para o cálcio ou se pode ser ativada por diferentes íons divalentes, esclarecendo assim a especificidade do cofator necessário.

No tempo zero de incubação apenas o íon Ba^{2+} foi capaz de induzir o processamento da CaMCA-ΔN86, conforme identificado pelo retângulo vermelho (Figura 41A), semelhante ao que observamos com o Ca^{2+} no teste de processamento com a CaMCA-ΔN86 (Figura 40A – processamento da CaMCA-ΔN86).

Semelhante ao Ba^{2+}, após 24 horas de incubação, o Mn^{2+} mostrou influenciar na ativação e processamento da CaMCA-ΔN86, como evidenciado pela formação de novas bandas destacadas pelo retângulo vermelho na Figura 41B. O evento de ativação e processamento na presença desses íons (Ba^{2+} e Mn^{2+}) evoluiu após 48 horas de incubação, como evidenciado pela diminuição na intensidade da banda referente fração não processada (~43 KDa) em relação às frações processadas (~33 KDa e 30 KDa, respectivamente) (Figura 41C).

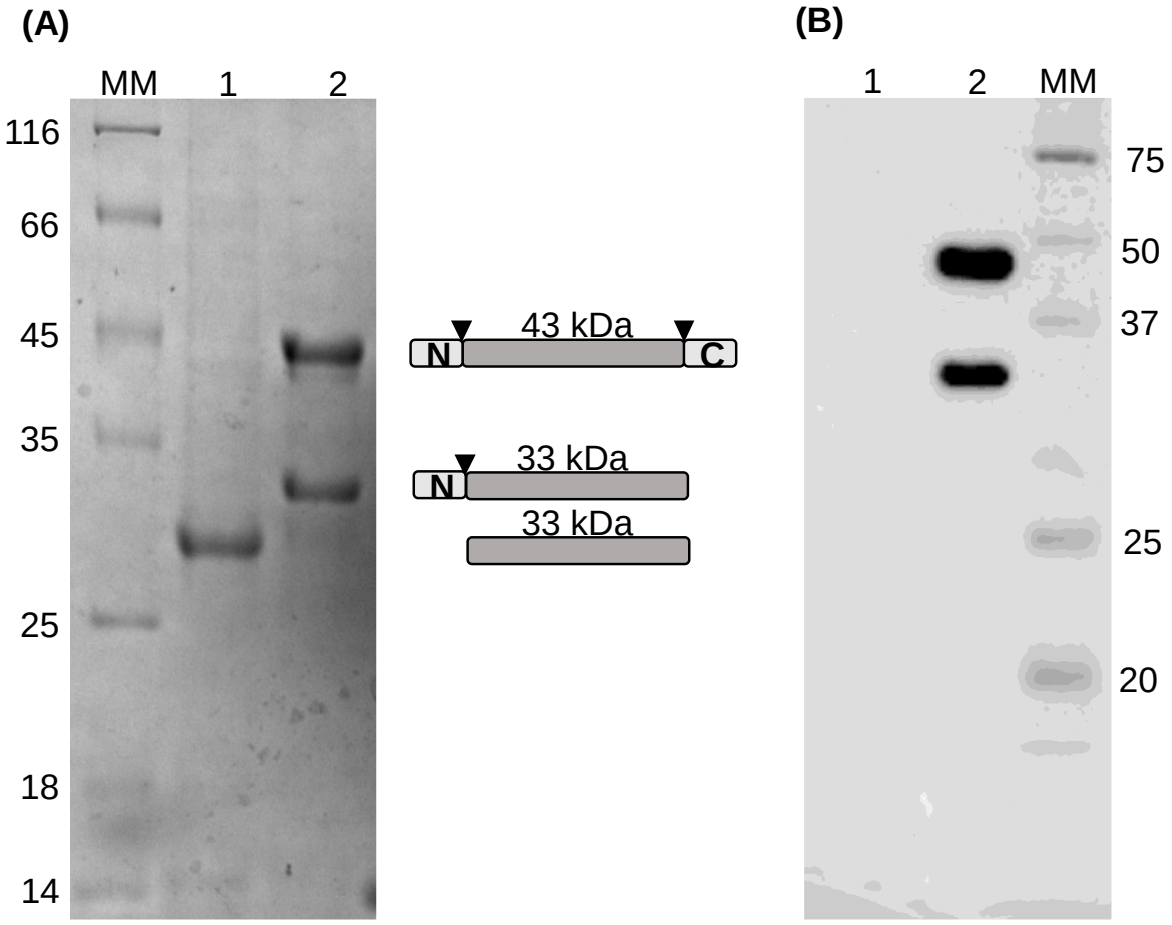
O perfil de processamento da CaMCA-ΔN86 na presença do Ba^{2+} e Mn^{2+} permaneceu inalterado mesmo após 168 horas de incubação, tempo necessário para observarmos o processamento da CaMCA-ΔN86 na presença do Mg^{2+} (Figura 41D).

Figura 41: Maturação da CaMCA-ΔN86 na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio (2 mM). Canaleta 1: marcador molecular; Canaleta 2: enzima + tampão; Canaleta 3: enzima + tampão + EGTA; (A) Processamento da CaMCA-ΔN86 na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio no tempo zero de incubação; (B) Processamento da CaMCA-ΔN86 na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio após 24 horas de incubação; (C) Processamento da CaMCA-ΔN86 na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio após 48 horas de incubação; (D) Processamento da CaMCA-ΔN86 na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio após 72 horas de incubação.



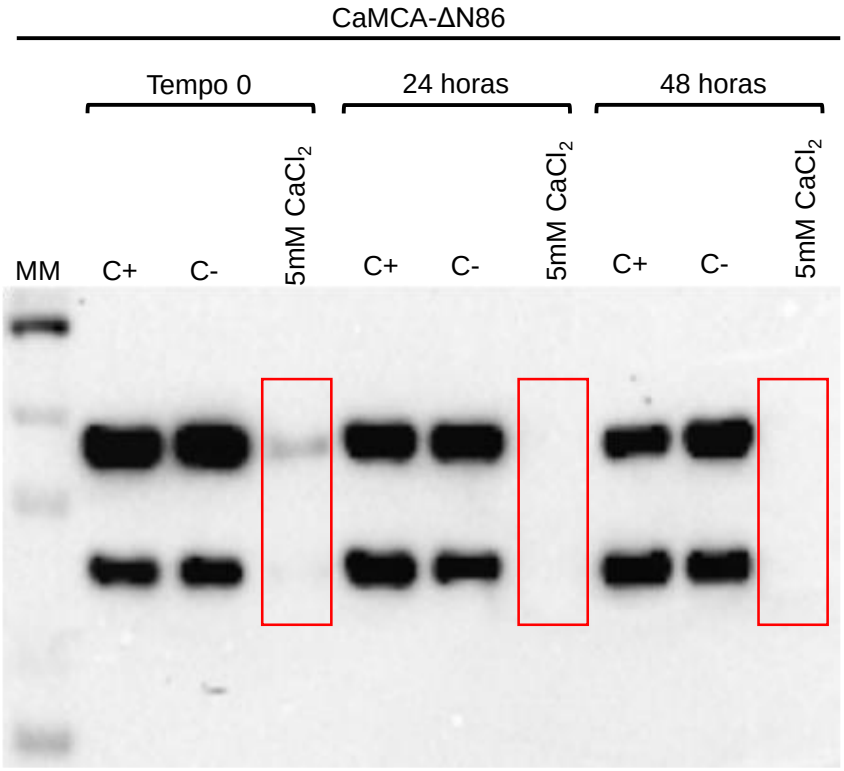
Resultados do *Western blotting* revelaram a integridade da CaMCA-ΔN86 quando expressa em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. A presença da His-Tag no N-terminal da CaMCA-ΔN86 foi confirmada pela detecção da proteína utilizando um anticorpo anti-6XHis (Figura 42B). No entanto, após 72 horas de incubação com 5 mM de $CaCl_2$, a detecção da CaMCA-ΔN86 utilizando o mesmo anticorpo não foi possível (Figura 42B).

Figura 42: Resultado da análise por Western blotting da CaMCA-ΔN86 após 72 horas de incubação com 5 mM de $CaCl_2$. (A) Eletroforese SDS-Page 15%: marcador de peso molecular; 1. CaMCA-ΔN86 após 72 horas de incubação com 5 mM de $CaCl_2$; 2. CaMCA-ΔN86 sem incubação com cálcio. (B) Resultado da análise por Western blotting: marcador de peso molecular; 1. CaMCA-ΔN86 após 72 horas de incubação com 5 mM de $CaCl_2$; 2. CaMCA-ΔN86 sem incubação com cálcio



A fim de avaliar o período necessário para a CaMCA-ΔN86 realizar a clivagem do N-terminal quando incubada com 5 mM de $CaCl_2$, conduzimos uma nova análise por *Western blotting*, abrangendo tempos de incubação que variaram de 0 a 48 horas, com intervalos de leitura de 24 horas entre cada análise (Figura 43).

Figura 43: Resultado da análise por Western blotting da CaMCA-ΔN86 após 48 horas de incubação com 5 mM de $CaCl_2$, com intervalo de 24 horas entre cada análise. Resultado da análise por Western blotting: Na canaleta 1: marcador de peso molecular; nas canaletas 2 a 10: CaMCA-ΔN86 C+ (enzima + tampão); CaMCA-ΔN86 C- (enzima + tampão + EGTA); CaMCA-ΔN86 com 5 mM nos tempos: 0 horas, 24 horas e 48 horas, respectivamente.

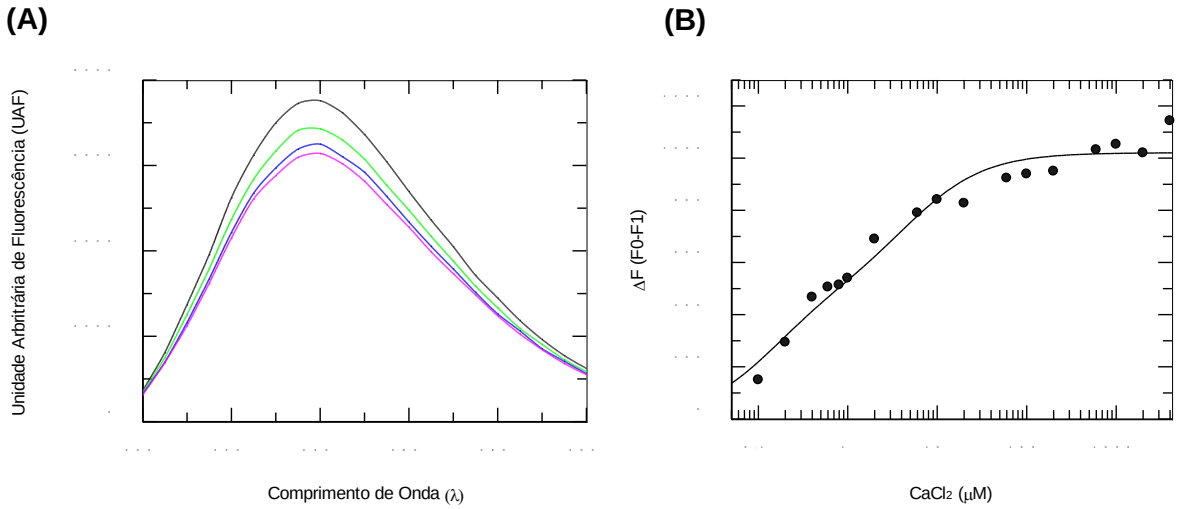


A análise revelou que a presença de Ca^{2+} resultou na remoção do C-terminal e, em seguida, do N-terminal da CaMCA-ΔN86 já no tempo zero de incubação. Nos períodos de incubação de 24 e 48 horas, a proteína não foi detectada por *Western blotting*. Não foram observadas mudanças significativas nos controles positivo e negativo.

Avaliamos a influência do Ca^{2+} em desencadear alterações conformacionais na CaMCA-ΔN86 por meio da técnica de fluorescência intrínseca, que se baseia na capacidade do triptofano de absorver luz ultravioleta (UV) e emitir fluorescência na faixa do UV (GHISAIDOOBE & CHUNG, 2014).

Ao analisar os dados de fluorescência intrínseca da CaMCA-ΔN86 na presença de $CaCl_2$, observamos mudanças na intensidade da fluorescência, com uma diminuição progressiva à medida que aumentamos a concentração de $CaCl_2$ (Figura 44A). Além disso, determinamos apenas uma constante de dissociação (K_D) de 4 mM (Figura 44B).

Figura 44: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA-ΔN86. (A) Espectro de fluorescência da CaMCA-ΔN86 na ausência de $CaCl_2$ (preto), com 1 µM de $CaCl_2$ (verde), com 1 mM de $CaCl_2$ (azul) e com 10 mM de $CaCl_2$ (rosa); (B) O gráfico mostra as mudanças na intensidade máxima do pico de emissão de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 330 nm) com o aumento da concentração de $CaCl_2$ (escala logarítmica)



4.1 MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS

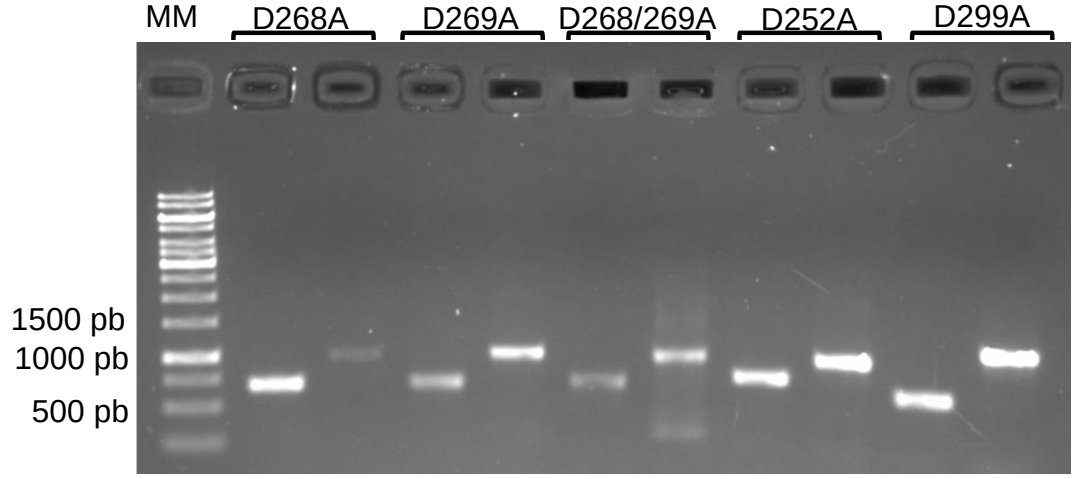
Além do N-terminal, a YCA1 e a CaMCA compartilham uma região conservada composta por resíduos importantes para a atividade e função da YCA1. Na YCA1, os resíduos de aspartato responsáveis pela interação com íons de Ca^{2+} (Asp^{236}, Asp^{252}, Asp^{253} e Asp^{283}), que correspondem aos resíduos Asp^{268}, Asp^{269}, Asp^{252} e Asp^{299} na CaMCA. No alinhamento da sequência primária de ambas as enzimas, esses resíduos ocupam a mesma posição (Figura 28 - alinhamento).

Com base na homologia entre a CaMCA e a YCA1, desenhamos *primers* para mutar os resíduos de aspartato que acreditamos serem responsáveis pela interação com íons de Ca^{2+} na CaMCA (Asp^{268}, Asp^{269}, Asp^{252} e Asp^{299}).

Para obtenção dos mutantes desejados, empregamos a técnica de sobreposição de fragmentos, descrita por Ho *et al.*, (1989). Essa metodologia foi estabelecida para obtenção de mutantes por inserção, deleção ou modificação de sequências de DNA, permitindo substituições, inserções ou deleções de pares de bases. O processo envolve a geração de produtos de PCR que se sobrepõem entre si (Ho et *al.,* 1989; MIKAELIAN & SERGEAN, 1996). No presente trabalho, aplicamos a mutação sítio dirigida para substituição de bases nitrogenadas, que consiste na troca de pares de bases em duas etapas de PCR: uma PCR primária (na qual são realizadas duas PCRs independentes) e uma segunda PCR de ligação utilizando o produto da PCR primária.

Realizamos a amplificação do sentido *forward* e *reverse* em tubos separados. Nas reações intituladas PCR I-FW e PCR I-RV, foram gerados os fragmentos AC (com o *primer reverse* T7 e o *primer forward* mutante) e DB (com o *primer forward* T7 e o *primer reverse* mutante), respectivamente. Ajustamos a temperatura de anelamento para 55 °C para todos os mutantes. Os fragmentos formados consistem na região do gene abrangida pelo conjunto de *primers*, somada ao tamanho da região T7 do vetor pET28(a)+ (Figura 45).

Figura 45: Primeira PCR para a reação de sobreposição de fragmento: PCR-1 FW e PCR-I RV. Na canaleta 1 está o marcador de peso molecular seguido das reações de amplificação FW e RV dos mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A, D299A, respectivamente.



Os fragmentos AC e DB foram amplificados com sucesso, sem a presença de bandas secundárias. Todos os fragmentos amplificados apresentaram o tamanho esperado, indicando que a região desejada foi efetivamente amplificada. Os tamanhos dos fragmentos obtidas estão detalhados na Tabela 5.

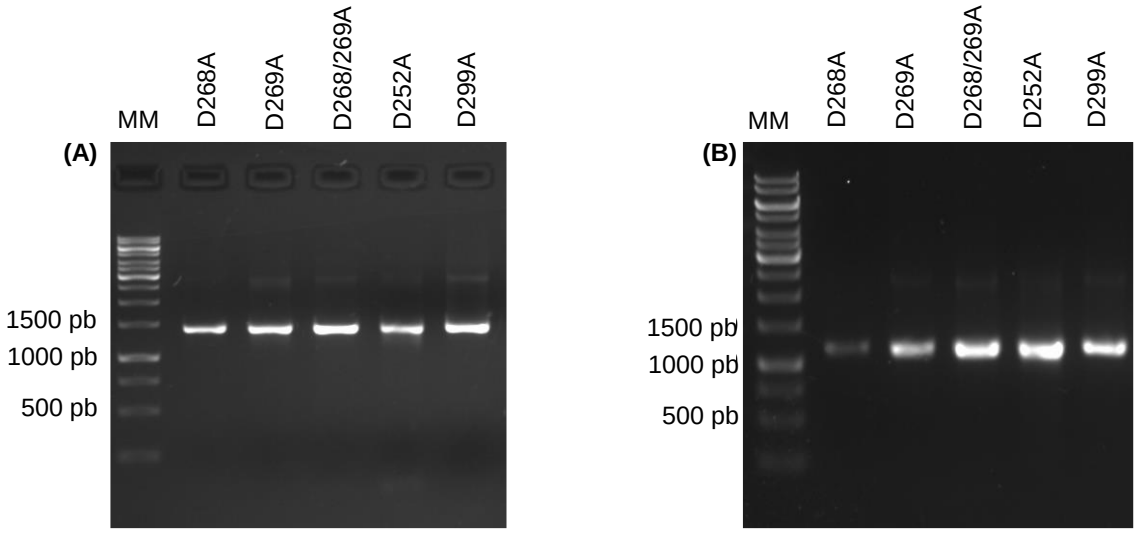
Tabela 05: Tamanho dos fragmentos obtidos na reação de PCR-I FW e RV para os mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A, D299A, D170A e D290A.

Mutante	PCR-I FW	PCR-I RV
D268A	706 pb	954 pb
D269A	703 pb	957 pb
D268/269A	703 pb	957 pb
D252A	754 pb	906 pb
D299A	613 pb	1047 pb

Após confirmar o tamanho dos fragmentos obtidos na PCR-I, avançamos para a segunda etapa da reação de sobreposição de fragmentos. Para obter os genes da

CaMCA íntegra e da CaMCA-ΔN86 com suas respectivas mutações, realizamos uma segunda PCR. Os fragmentos gerados na primeira reação serviram como molde para a segunda reação, tanto para a CaMCA íntegra quanto para a CaMCA-ΔN86. Utilizamos 10 ng dos fragmentos AC e DB formados na PCR-I FW e PCR-I RV para realizar a PCR-II, utilizando os *primers forward* TEDA e os *primers reverse* TEDA. (Figura 46).

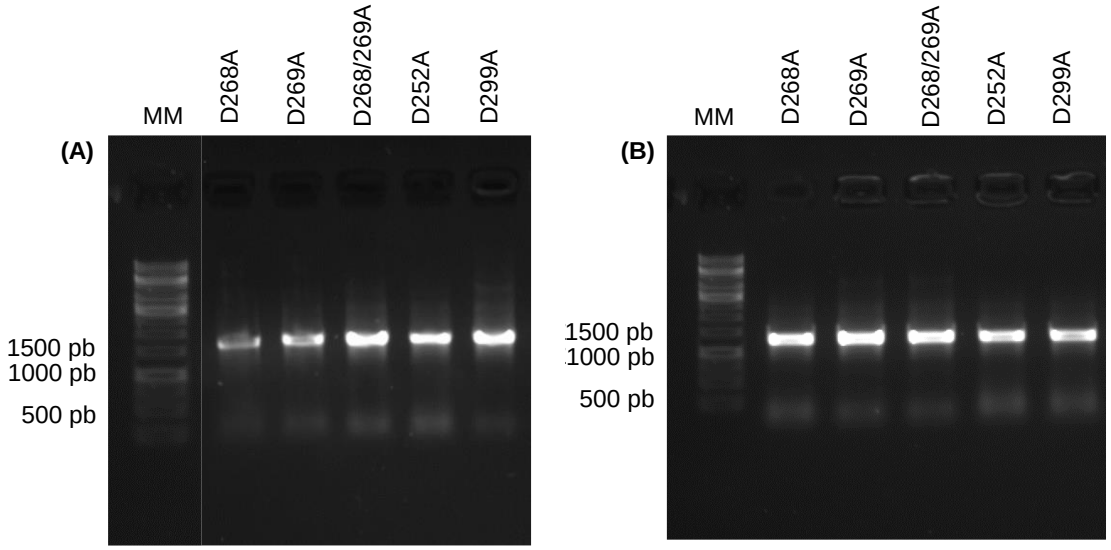
Figura 46: PCR II da reação de sobreposição de *primers.* As extremidades complementares resultantes das amplificações da primeira reação se hibridizam, criando um fragmento único. (A) CaMCA íntegra e (B) CaMCA-ΔN86



Conforme demonstrado na Figura 46, a reação ocorreu conforme o esperado. As extremidades complementares localizadas na região de mutação se hibridizaram, resultando na formação de um único fragmento com tamanho de aproximadamente 1360 pb para a CaMCA íntegra e 1102 pb para a CaMCA-ΔN86. Os fragmentos gerados foram purificados e quantificados.

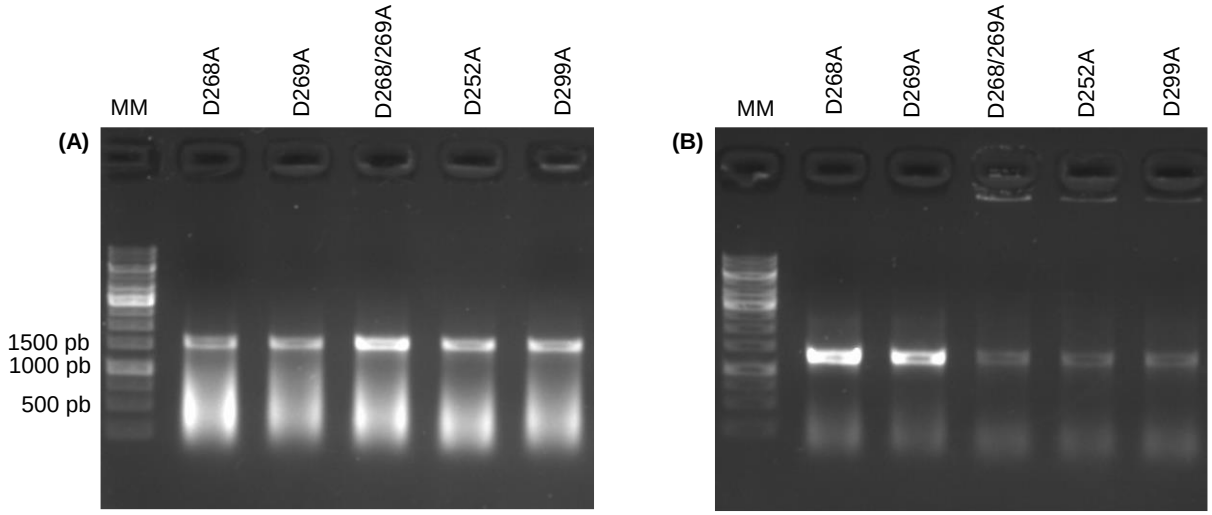
Utilizamos a mesma fórmula usada para construir a CaMCA-ΔN86 para calcular a massa do inserto que foi usada na reação. As condições de preparação da amostra foram as mesmas estabelecidas para a CaMCA-ΔN86. Em seguida, a reação foi transformada em *E. coli* DH5α utilizando choque térmico. Foram selecionadas aleatoriamente 10 colônias para triagem utilizando o protocolo de *miniprep*, conforme descrito no protocolo de SambrooK. O DNA extraído foi então submetido a uma reação de PCR utilizando os *primers* flanqueadores da região T7 para confirmar a inserção do inserto no local desejado. As Figuras 47A e 47B mostram o resultado da amostra de PCR após ser submetida à eletroforese em gel de agarose 1%.

Figura 47: PCR da *miniprep* CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86 para análise da transformação em *E. coli* DH5α utilizando *primers* T7. Na canaleta 1 refere-se ao MM, seguido dos mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A e D299A para a (A) CaMCA íntegra e (B) para a CaMCA-ΔN86



Os plasmídeos foram transformados em células competentes de *E. coli* BL21(DE3)pLysS através de um processo de transformação por choque térmico. Os clones resultantes foram selecionados utilizando canamicina como marcador de resistência. Posteriormente, para confirmar a presença dos plasmídeos nos clones selecionados, realizamos uma PCR a partir das colônias bacterianas, seguindo o mesmo procedimento utilizado para a confirmação dos clones em DH5α, conforme ilustrado na Figura 48. Todos as amplificações foram bem-sucedidas, tanto para CaMCA íntegra (Figura 48A) e CaMCA-ΔN86 (Figura 48B).

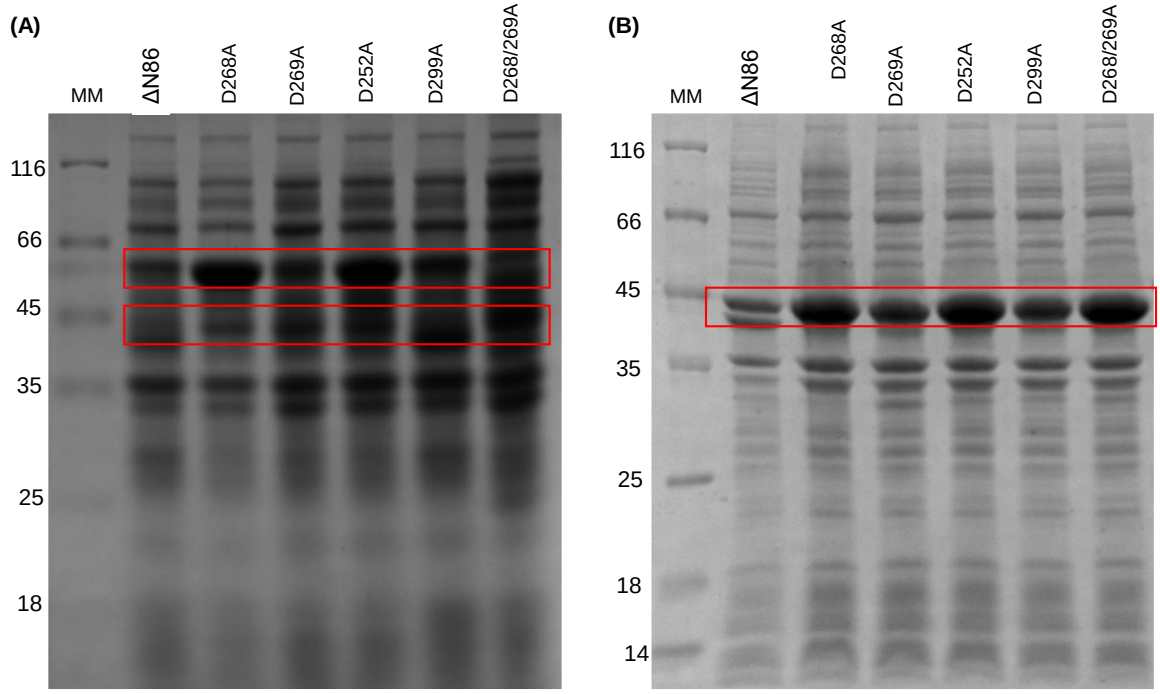
Figura 48: PCR de colônia da CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86 para análise da transformação em *E. coli* BL21(DE3)plysS utilizando *primers* T7. Na canaleta 1 refere-se ao MM, seguido dos mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A e D299A para a (A) CaMCA íntegra e (B) para a CaMCA-ΔN86.



Após a confirmação da clonagem em BL21(DE3)pLysS, procedemos com a etapa de expressão. A expressão foi realizada a 20°C por um período de 16 horas, utilizando 0,25 mM de IPTG como indutor. O extrato proteico total produzido durante a expressão foi então analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida com uma concentração de malha de 15%.

O gel de expressão revelou a presença de bandas condizentes com o tamanho esperado para os mutantes da CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86 sob as condições de expressão utilizadas. Para os mutantes da CaMCA íntegra (Figura 49A), observou-se evidências de processamento, indicadas pela presença de bandas de peso molecular diferente (indicadas pelo retângulo vermelho). Por outro lado, para os mutantes da CaMCA-ΔN86 (Figura 49B), ainda não podemos afirmar com certeza se houve processamento.

Figura 49: Análise do extrato proteico total induzidos com 0.25 mM de IPTG para os mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A, D299A. (A) Análise do extrato proteico total induzido com 0.25 mM de IPTG para os mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A, D299A CaMCA íntegra; (B)Análise do extrato proteico total induzido com 0.25 mM de IPTG para os mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A, D299A CaMCA-ΔN86.



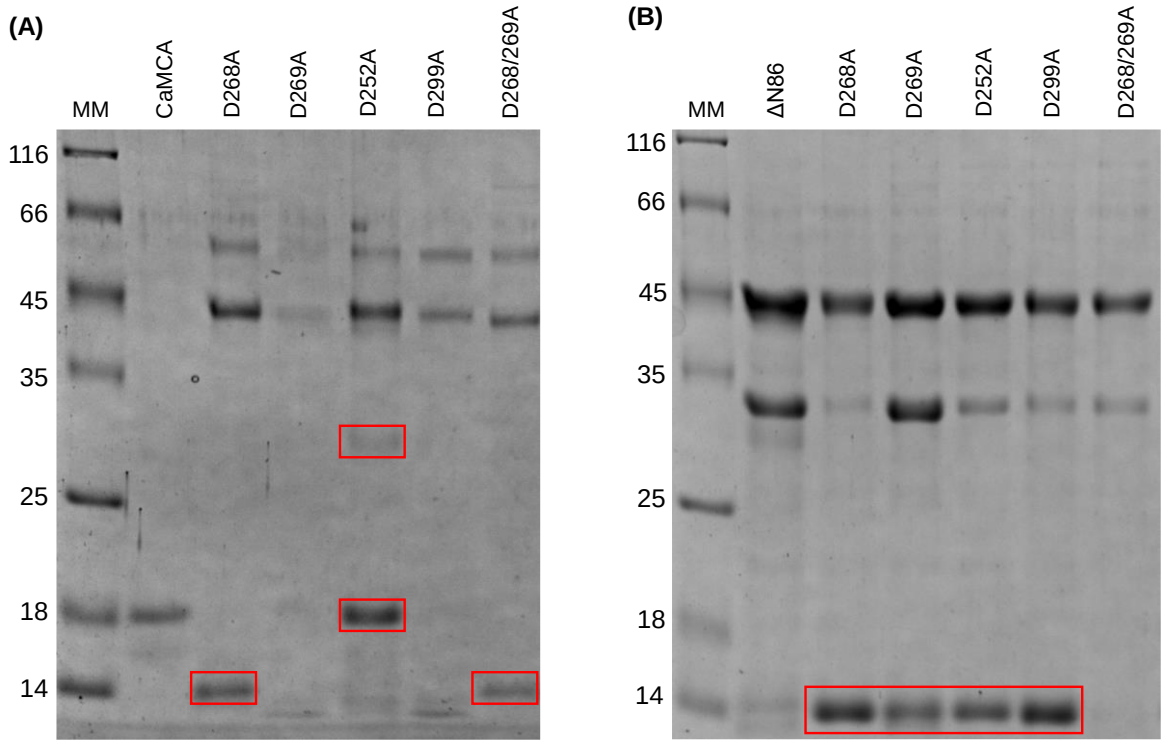
A suspensão celular foi submetida a lise química utilizando o tampão [TRIS 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol 5% (v/v) - pH 8,0] contendo lisozima 1 mg/mL, seguida de lise mecânica por meio de sonicação (4 ciclos de 30 segundos a 60 Hz). Em seguida, adicionou-se 1 M de MgCl2 e 1 mg/mL de DNase a suspensão celular. O material obtido da lise celular foi então purificado utilizando cromatografia de afinidade com a coluna HisTra Ni^{2+}-sepharose. O material eluido foi avaliado por meio de gel de SDS-PAGE a 15%.

Após a purificação, observamos que cada resíduo tem um impacto distinto no processo de ativação e autoprocessamento da CaMCA. Os mutantes dos resíduos Asp^{268}, Asp^{299} e o duplo mutante $Asp^{268/269}$ mostraram uma influência negativa na capacidade de ativação da CaMCA íntegra, evidenciada pela redução na capacidade da protease de se autoprocessar, e apenas o mutante do Asp^{268} e o duplo mutante $Asp^{268/269}$ apresentaram um fragmento de ~14 KDa, não observado na íntegra (destacado com um retângulo vermelho) (Figura 50A). Este fenômeno se torna ainda mais evidente ao compararmos o perfil de bandas dos mutantes com a CaMCA íntegra. Apenas o mutante no Asp^{269} apresentou um processo de ativação e autoprocessamento semelhante ao da CaMCA íntegra. O mutante do Asp^{252}, apesar

de uma notória diminuição na capacidade de ativação e autoprocessamento, exibiu um perfil de processamento com bandas de baixo peso molecular, destacadas pelo retângulo vermelho (Figura 50A).

O efeito das mutações no processo de ativação da CaMCA-ΔN86 foi mais evidente. Os mutantes Asp^{268}, Asp^{252}, Asp^{299} e $Asp^{268/269}$ mostraram uma redução no autoprocessamento, evidenciada pela diminuição da formação do fragmento correspondente a forma processada (~33 KDa), enquanto o mutante no Asp^{269} exibiu um perfil de processamento semelhante ao da CaMCA-ΔN86 (Figura 50B). Assim como o mutante Asp^{268} e o duplo mutante $Asp^{268/269}$ (Figura 50A), os mutantes Asp^{268}, Asp^{269}, Asp^{252} e Asp^{299} da CaMCA-ΔN86 também apresentaram um fragmento de baixo peso molecular (~14 KDa), destacado com um retângulo vermelho (Figura 50B).

Figura 50: Resultado da eletroforese em SDS-PAGE a 15% das amostras eluidas na cromatografia por gel filtração com coluna HiTrap™ 5mL (GE Healthcare) para os mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A, D299A). (A) Mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A, D299A CaMCA íntegra; (B) Mutantes D268A, D269A, D268/269A, D252A, D299A CaMCA-ΔN86.



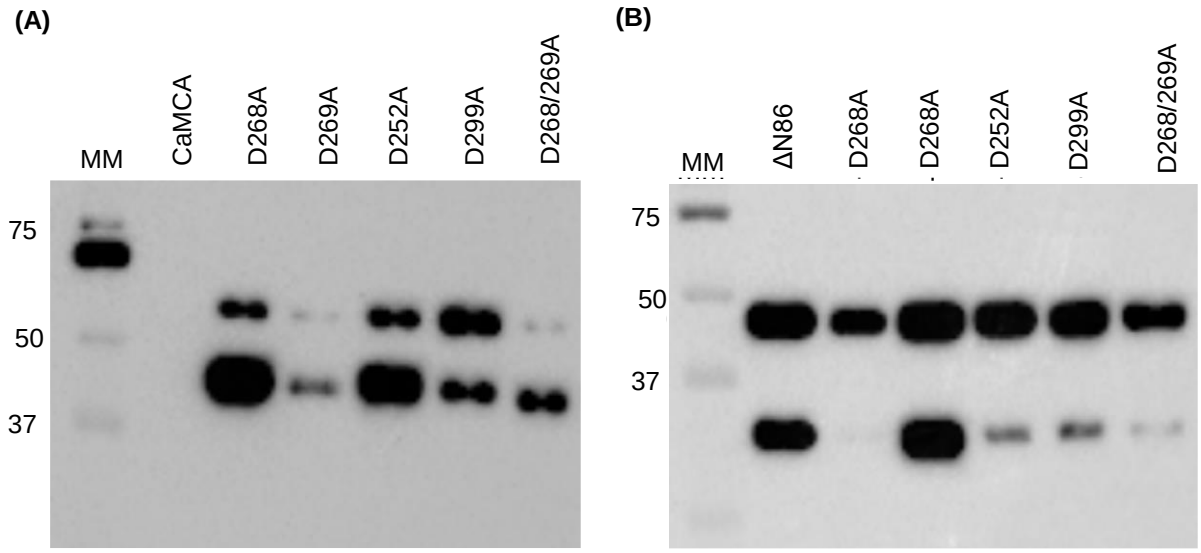
Durante a expressão em sistema heterólogo em *E. coli*, uma sequência de seis histidinas foi introduzida na CaMCA por meio do vetor pET28(a)+. A detecção da CaMCA marcada com histidina foi realizada utilizando um anticorpo específico contra

a sequência de histidina. Neste experimento, utilizamos o anticorpo Anti-6XHis da *Thermo Fisher Scientific* (Figura 51A e 51B).

No resultado, constatou-se a ausência de detecção da forma íntegra da CaMCA, indicando sua presença predominantemente madura. Todos os mutantes da CaMCA íntegra foram identificados, observando-se que nos mutantes D268A e D252A, a intensidade do fragmento processado (~45 KDa) foi notavelmente superior à não processada (~55 KDa). Para o mutante D269A e o duplo mutante (D268/269A), apenas o fragmento processado foi detectado. Notavelmente, no mutante D299A, a intensidade do fragmento não processado foi significativamente maior em comparação com o processado (Figura 51A).

Os mutantes D252A, D299A e D268/269A da CaMCA-ΔN86 foram majoritariamente detectados na forma não processada (43 KDa). No entanto, o mutante D252A exibiu um perfil de detecção semelhante ao da CaMCA-ΔN86. Apenas o mutante D268A foi observado apenas na forma não processada (Figura 51B).

Figura 51: *Western Blotting* da (A) CaMCA íntegra e (B) CaMCA-ΔN86 e seus respectivos mutantes (D268A, D269A, D252A, D299A E D268/269) através de reconhecimento por anticorpo primário anti-6X*His*-tag.



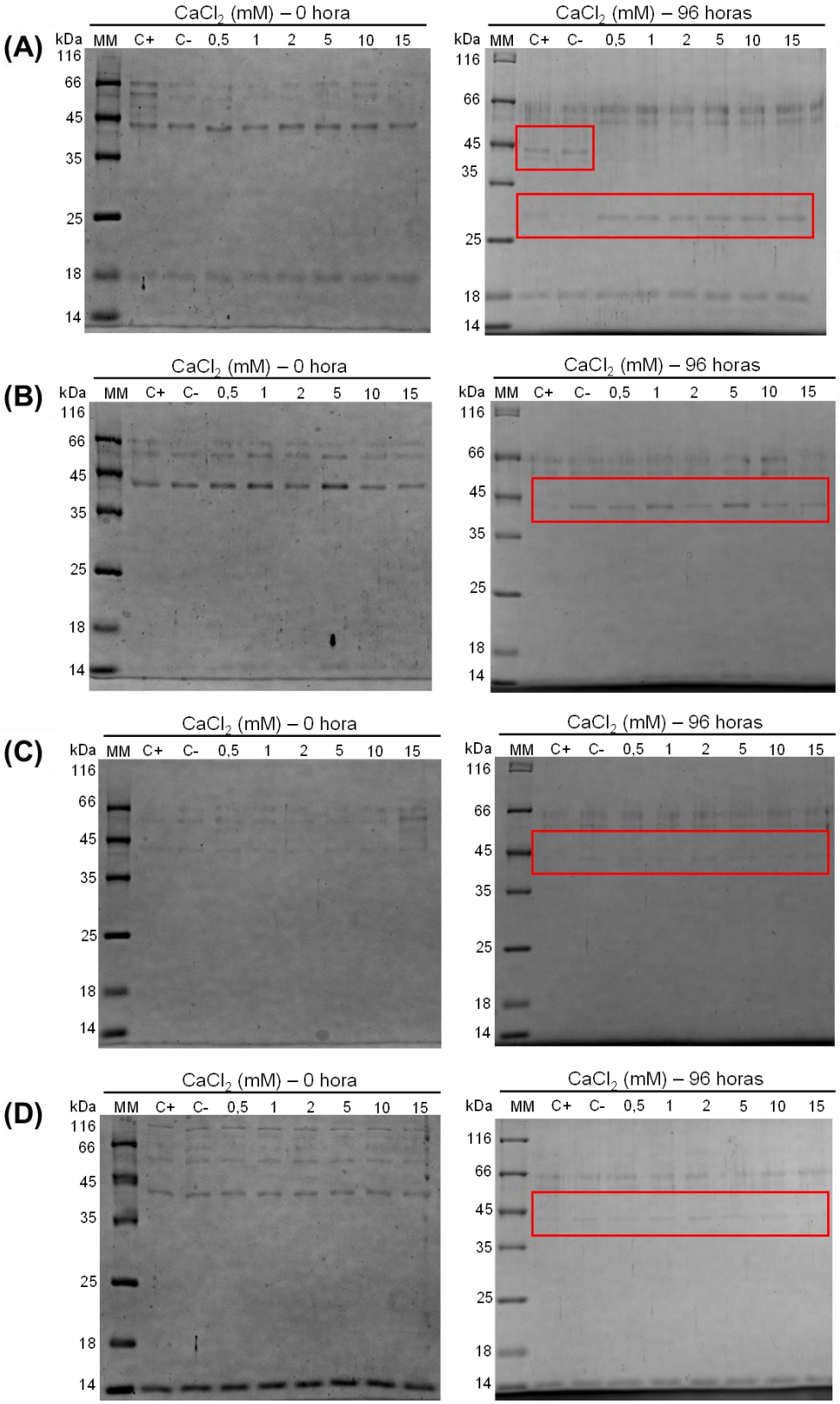
Com base nos resultados obtidos pela análise da CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86, realizamos um experimento de processamento que envolveu a variação da concentração de $CaCl_2$ (0 a 15 mM), juntamente com os mutantes do sítio de cálcio. A incubação foi conduzida nas mesmas condições descritas anteriormente para a

CaMCA íntegra e a CaMCA-Δ86. As amostras foram posteriormente analisadas utilizando um gel SDS-PAGE com uma concentração de 15% (Figura 52).

O mutante D252A (Figura 52A) não sofreu efeito do Ca^{2+} no tempo inicial de incubação. Entretanto, após 96 horas observou-se um processo de ativação, resultando em um fragmento menor (~30 KDa) semelhante ao que é observado para a CaMCA-Δ86 após 24 horas de incubação com Ca^{2+} (Figura 52B – processamento da CaMCA-Δ86 na presença do Ca^{2+}). Embora no controle positivo tenha ocorrido o processamento, este efeito foi menos pronunciado em comparação com a presença de Ca^{2+}. Em todas as concentrações de Ca^{2+}, houve processamento, gerando um fragmento com tamanho semelhante ao observado para a CaMCA íntegra após 72 horas de incubação (Figura 52D – processamento da CaMCA íntegra após 72 horas de incubação com 5 mM de $CaCl_2$).

Já os mutantes D268A, D299A e D268/269A (Figura 52B, 52C e 52D, respectivamente) não apresentaram processamento na presença de Ca^{2+}. Devido ao fato de o mutante D269A já se encontrar totalmente processado, optamos por não realizar o experimento com este mutante.

Figura 52: Teste de maturação dos mutantes da CaMCA íntegra na presença de cálcio. SDS-PAGE das amostras após a incubação na presença ou ausência de Ca^{2+} e EGTA. Na canaleta 1: marcador de peso molecular; na canaleta 2 CaMCA C+ (enzima + tampão); na canaleta 3 CaMCA C- (enzima + tampão + EGTA); (A) CaMCA íntegra D252A; (B) CaMCA íntegra D268A; (C) CaMCA íntegra D299A; (D) CaMCA íntegra D268/269A



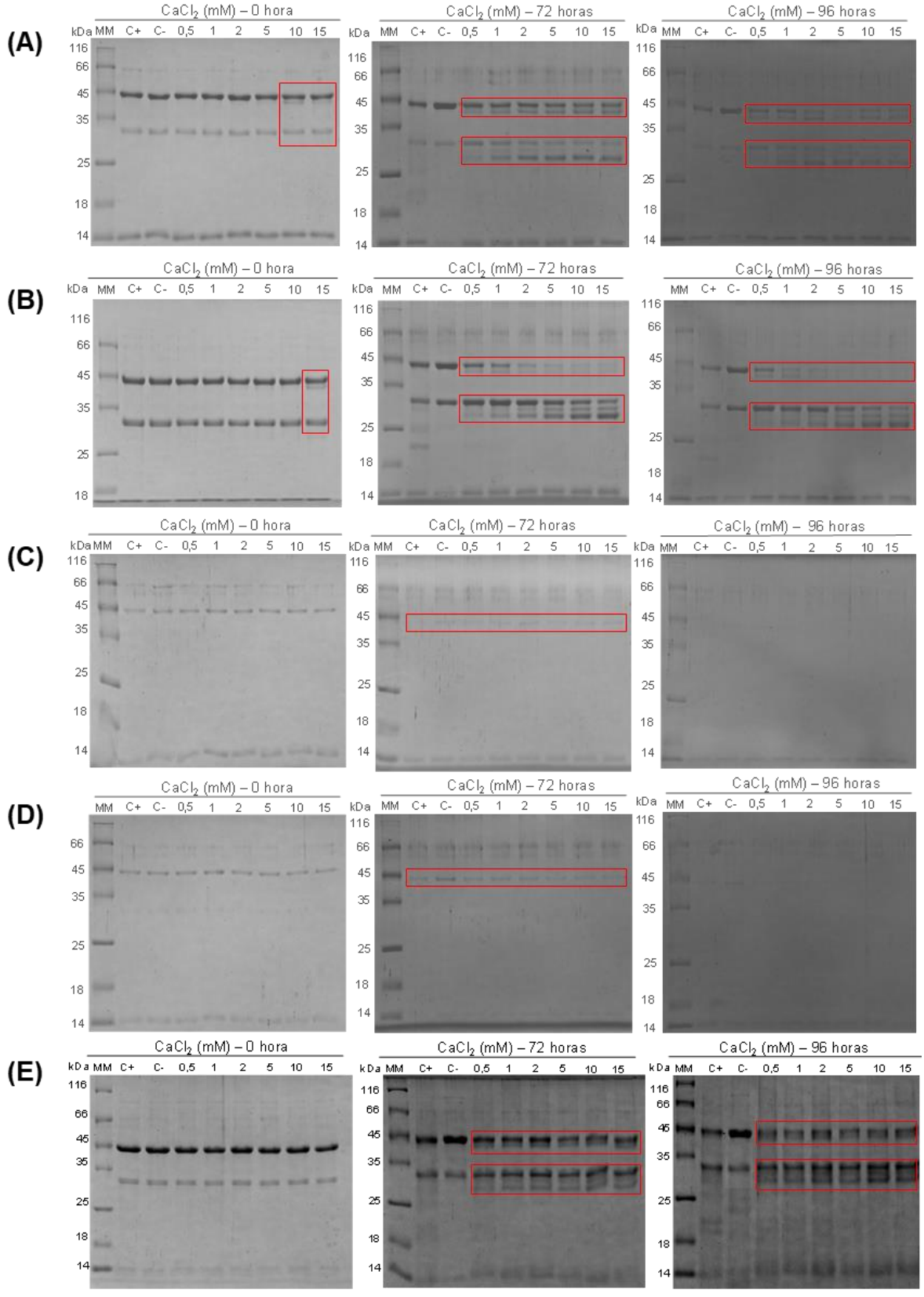
Para a CaMCA-Δ86, observamos que o mutante D252A apresentou processamento imediato (tempo zero de incubação) nas concentrações de 10 e 15 mM de Ca^{2+}, similar ao observado para a CaMCA-Δ86 no mesmo tempo de incubação. Após 72 horas, constatamos o processamento em todas as concentrações de Ca^{2+} testadas, com evidência tanto do primeiro quanto do segundo processamento. Entretanto, ao atingir 96 horas de incubação não observamos progressão adicional no processamento, sem a presença de fragmentos menores. Nos controles não foram detectados processamento até o período de incubação de 96 horas (Figura 53A).

O mutante D269A demonstrou processamento no início da incubação, sendo observado somente na presença de 15 mM de Ca^{2+}. Após 72 horas de incubação, o processamento foi observado em todas as concentrações de Ca^{2+} testadas, sendo mais evidente em concentrações maiores (10 e 15 mM) indicando uma clara dependência da concentração de Ca^{2+}. Esse perfil de processamento manteve-se estável até 96 horas de incubação. Nos controles, não foi evidenciado nenhum tipo de processamento até o período de incubação de 96 horas (Figura 53B).

Os mutantes D268A e D299A não apresentaram processamento em nenhuma das concentrações de Ca^{2+} testadas, mesmo após 96 horas de incubação (Figuras 53C e 53D, respectivamente).

O duplo mutante (D268/269A) não demonstrou processamento no tempo inicial de incubação, e após 72 horas o perfil observado assemelhou-se ao descrito para o mutante D269A, esse perfil foi mantido até 96 horas. Nos controles não foram detectados nenhum autoprocessamento até o período de incubação de 96 horas (Figura 53E).

Figura 53: Teste de maturação dos mutantes da CaMCA-ΔN86 do sítio de cálcio na presença de cálcio. SDS-PAGE das amostras após a incubação na presença ou ausência de Ca^{2+} e EGTA. SDS-PAGE das amostras após a incubação na presença ou ausência de Ca^{2+} e EGTA. Na canaleta 1: marcador de peso molecular; na canaleta 2 CaMCA-ΔN86 C+ (enzima + tampão); na canaleta 3 CaMCA-ΔN86 C- (enzima + tampão + EGTA); (A) CaMCA-ΔN86 D252A; (B) CaMCA-ΔN86 D269A; (C) CaMCA-ΔN86 D268A; (D) CaMCA-ΔN86 D299A; (E) CaMCA-ΔN86 D268/269A



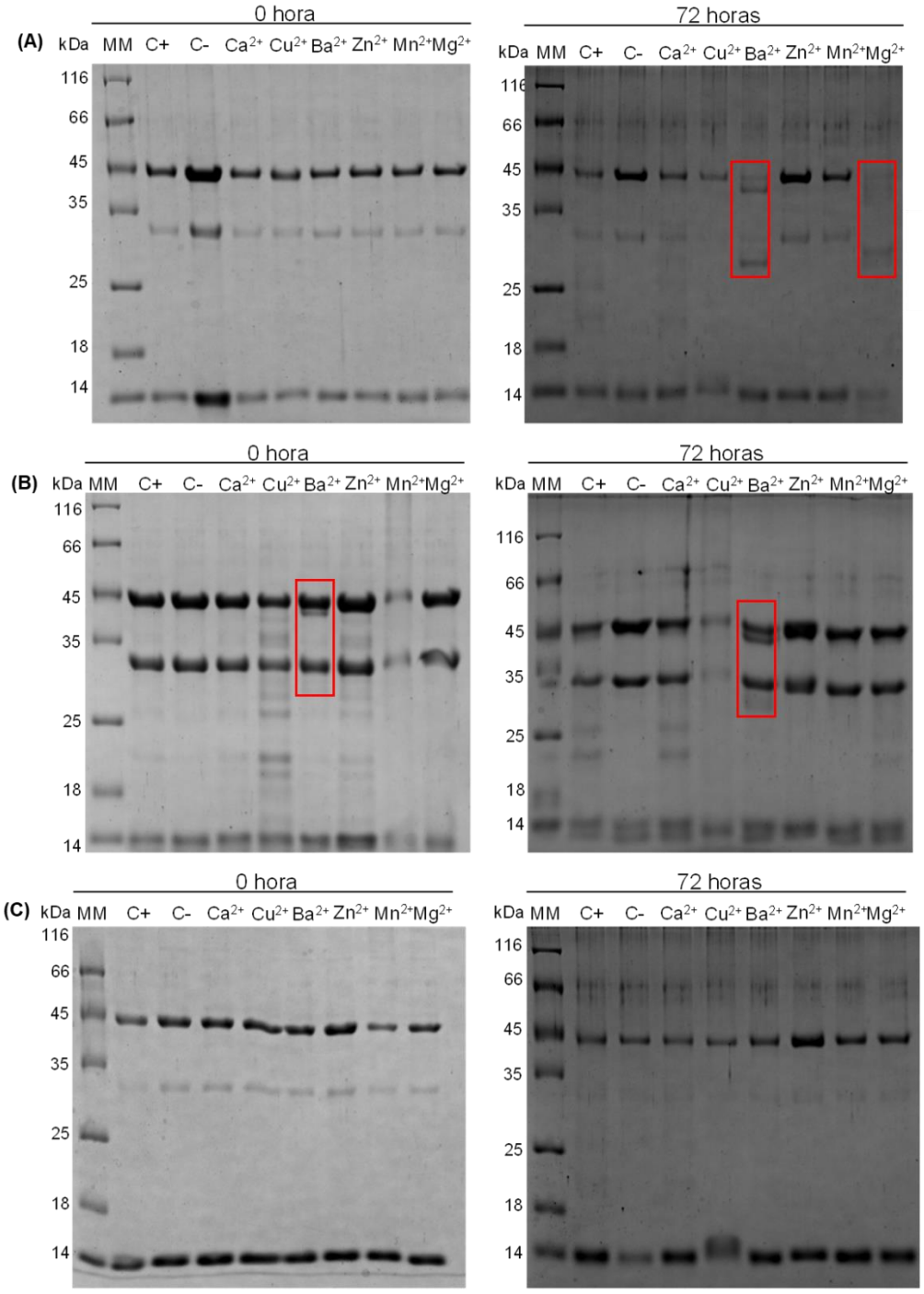
Assim como realizado para a forma selvagem da CaMCA-Δ86, nós investigamos a influência de outros íons bivalentes no processo de maturação dos mutantes dos aspartatos, que acreditamos serem os responsáveis pela interação do íon cálcio com a CaMCA. O experimento foi conduzido para a CaMCA-Δ86, seguindo as mesmas condições utilizadas para o teste com diferentes concentrações de cálcio (Figura 54).

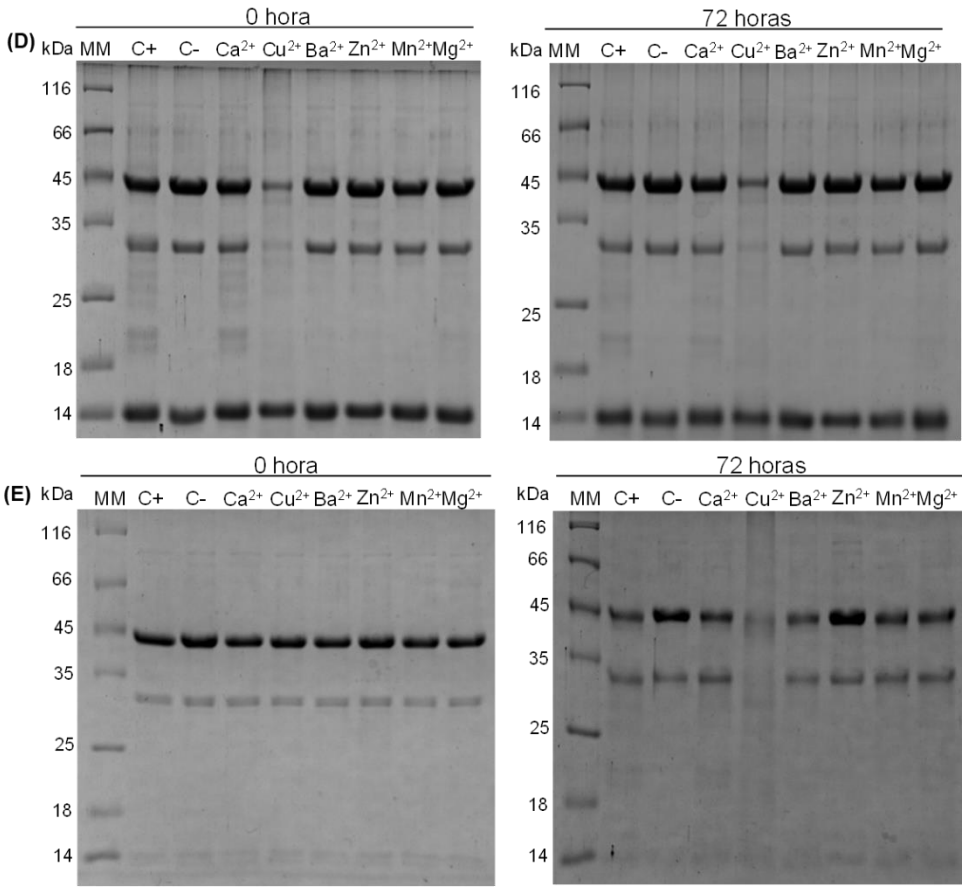
No início da incubação nenhum dos íons divalentes testados pareceu influenciar a ativação e autoprocessamento da CaMCA-Δ86 D252A. Após 72 horas de incubação apenas na presença de Ba^{2+} e Mg^{2+} o mutante D252A sofreu o primeiro processamento, conforme destacado pelo retângulo vermelho na Figura 54A.

Por outro lado, o mutante CaMCA-Δ86 D269A apresentou processamento já no início do tempo de incubação na presença de Ba^{2+} (semelhante a CaMCA-Δ86 na presença de Ca^{2+} - Figura 54A). No entanto, o processamento não progrediu mesmo após 72 horas de incubação (Figura 54B). Os demais íons não demonstraram influência na ativação e processamento da CaMCA-Δ86 D269A.

Os mutantes D268A, D299A e o duplo D268/269A da CaMCA-Δ86 não demonstraram influência de ativação e processamento em resposta a nenhum dos íons testados, mostrando uma ausência de resposta aos estímulos de ativação e processamento, independentemente do tipo de íon bivalente utilizado (Figura 54C, 54D e 54E, respectivamente).

Figura 54: Maturação das mutantes do sítio de Ca^{2+} da CaMCA-ΔN86 na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio (2 mM). Canaleta 1: marcador molecular; Canaleta 2: enzima + tampão; Canaleta 3: enzima + tampão + EGTA; (A) Processamento da CaMCA-ΔN86 D252A na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio no tempo zero e 72 horas de incubação; (B) Processamento da CaMCA-ΔN86 D269A na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio no tempo zero e 72 horas de incubação; Processamento da CaMCA-ΔN86 D268A na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio no tempo zero e 72 horas de incubação; Processamento da CaMCA-ΔN86 D299A na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio no tempo zero e 72 horas de incubação; Processamento da CaMCA-ΔN86 D268/269A na presença dos íons divalentes: cálcio, cobre, bário, zinco, manganês e magnésio no tempo zero e 72 horas de incubação;





Sabendo que a alteração em um dos resíduos no sítio de ligação de cálcio da CaMCA pode afetar significativamente as constantes de dissociação para os sítios de alta e baixa afinidade (NEYROZ *et al.,* 1996; ASANOV *et al.,* 2001; EFTINK, 2016) avaliamos a fluorescência intrínseca para os mutantes do sítio de cálcio. Os valores de K_Ds observados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 06: Valores de K_D para os mutantes da CaMCA íntegra e CaMCA-Δ86

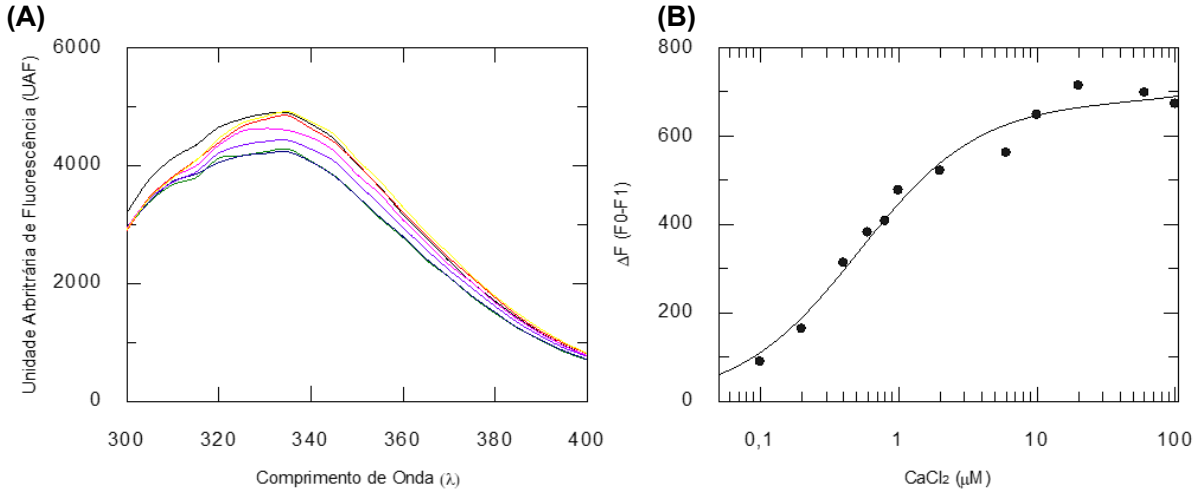
CaMCA íntegra			CaMCA-Δ86		
Mutante	**K_{D1}**	**K_{D2}**	**Mutante**	**K_{D1}**	**K_{D2}**
CaMCA	7 µM	9,3 mM	CaMCA-Δ86	**ND**	4 mM
D252A	**ND**	**ND**	D252A	1,33 µM	**ND**
D269A	3,05 µM	**ND**	D269A	**ND**	**ND**
D268A	0,51 µM	**ND**	D268A	1,71 µM	**ND**
D299A	1,03 µM	**ND**	D299A	1,41 µM	**ND**
D268/269A	2,35 µM	**ND**	D268/269A	0,2 µM	2,61 mM

ND = não detectado

Para o mutante do Asp^{252} da CaMCA íntegra não houve alteração da fluorescência intrínseca, apesar de nos dados de processamento termos observado bandas resultantes de auto processamento na presença do cálcio, com notável diferença entre os controles.

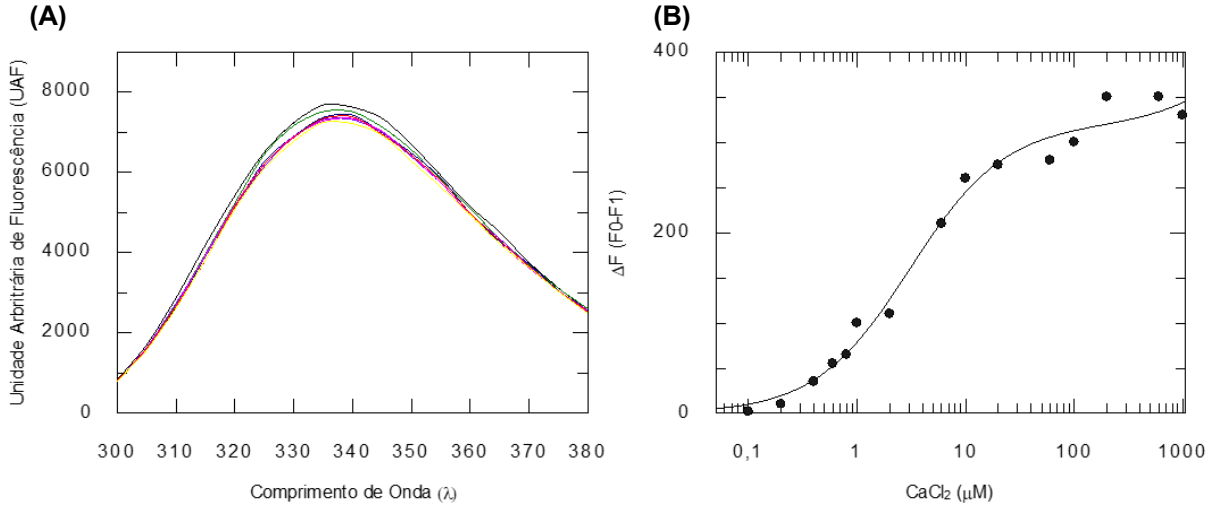
O mutante D268A da CaMCA íntegra apresentou um padrão diferente de fluorescência em resposta a variação da concentração de Ca^{2+}. Inicialmente, houve uma diminuição na fluorescência nas concentrações mais baixas de Ca^{2+} (até 600 µM). No entanto, a partir de 600 µM observou-se um aumento gradual na fluorescência, e ao atingir 10 mM de Ca^{2+} a fluorescência tornou-se muito semelhante à observada na ausência de Ca^{2+} (preto) (Figura 55A). Após análise, constatou-se que o CaMCA D268A apresenta apenas um ponto de inflexão (K_D de 0,51 µM), conforme evidenciado na Figura 55B. Os valores de K_D estão descritos na Tabela 7.

Figura 55: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA íntegra D268A. (A) Espectro de fluorescência do mutante CaMCA íntegra D268A na ausência de $CaCl_2$. (preto) 10 µM de $CaCl_2$ (verde); 100 µM de $CaCl_2$ (azul); 600 µM de $CaCl_2$ (roxo); 1 mM de $CaCl_2$ (rosa); 4 mM de $CaCl_2$ (vermelho); 10 mM de $CaCl_2$ (amarelo); (B) O gráfico mostra as mudanças na intensidade máxima do pico de emissão de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 330 nm) com o aumento da concentração de $CaCl_2$ (escala logarítmica).



Ao contrário do mutante D268A da CaMCA íntegra, o mutante D269A exibiu uma diminuição gradual na fluorescência à medida que a concentração de Ca^{2+} aumentava (Figura 56A). Apesar da diferença no perfil de fluorescência, assim como o mutante D268A, apresentou apenas um ponto de inflexão, com um K_D de 3,05 µM (Figura 56B). Os valores de K_D estão descritos na Tabela 7.

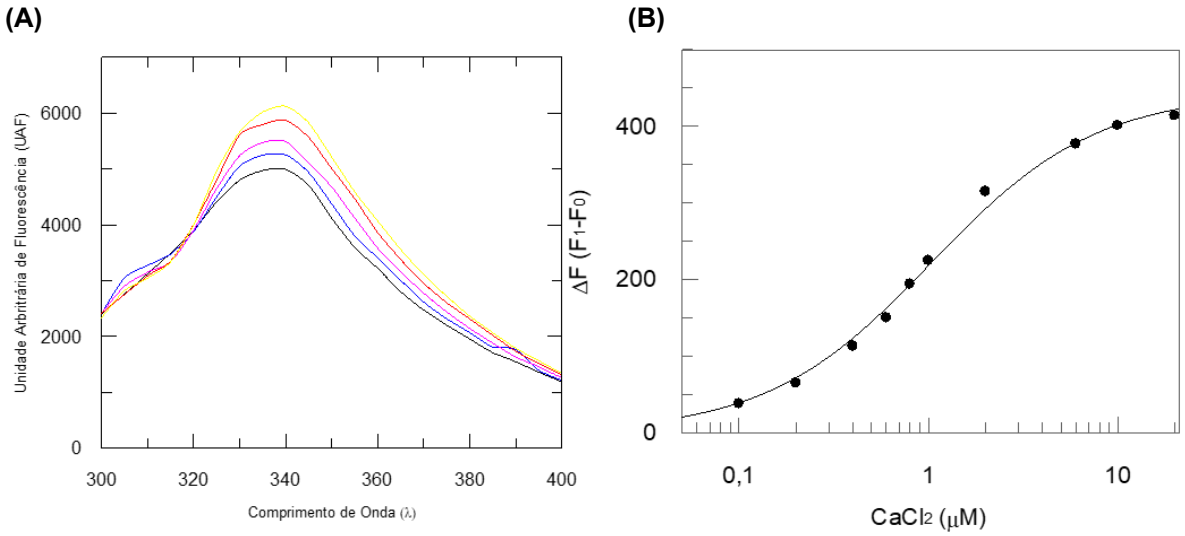
Figura 56: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA íntegra D269A. (A) Espectro de fluorescência do mutante CaMCA íntegra D269A na ausência de $CaCl_2$. (preto) 6 µM de $CaCl_2$ (verde); 600 µM de $CaCl_2$ (azul); 2 mM de $CaCl_2$ (roxo); 4 mM de $CaCl_2$ (rosa); 6 mM de $CaCl_2$ (vermelho); 10 mM de $CaCl_2$ (amarelo); (B) O gráfico mostra as mudanças na intensidade máxima do pico de emissão de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 330 nm) com o aumento da concentração de $CaCl_2$ (escala logarítmica).



Para a CaMCA íntegra D299A, o Ca^{2+} demonstrou ter uma influência significativa na indução de alterações em sua conformação estrutural. Foi observado

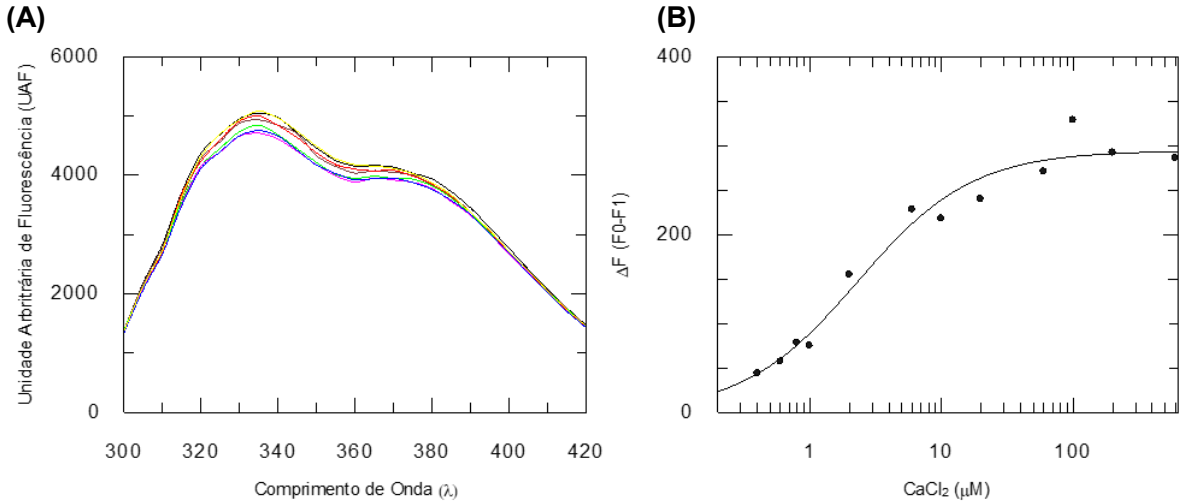
um aumento na fluorescência intrínseca em resposta à adição de cálcio no teste de fluorescência intrínseca (Figura 57A). Similarmente aos mutantes D268A e D269A, este mutante apresentou apenas um ponto de inflexão, com um K_D de 1,03 µM (Figura 57B).

Figura 57: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA íntegra D299A. (A) Espectro de fluorescência do mutante CaMCA íntegra D299A na ausência de $CaCl_2$. (preto) 800 nM de $CaCl_2$ (azul); 10 µM de $CaCl_2$ (rosa); 600 µM de $CaCl_2$ (vermelho); 10 mM de $CaCl_2$ (amarelo); (B) O gráfico mostra as mudanças na intensidade máxima do pico de emissão de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 330 nm) com o aumento da concentração de $CaCl_2$ (escala logarítmica).



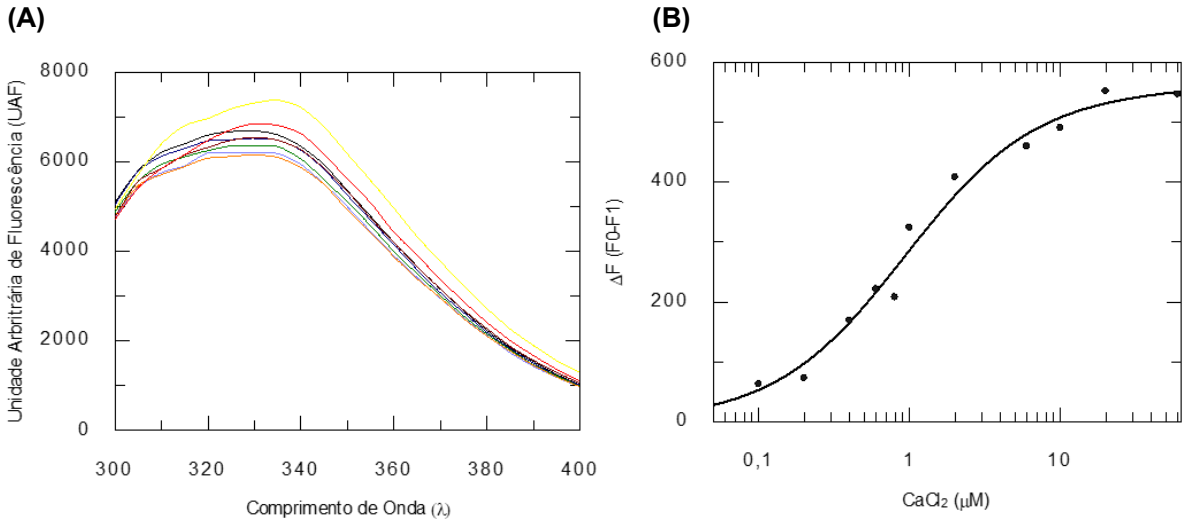
O mutante D268/269A da CaMCA íntegra apresentou um padrão diferente de fluorescência em resposta a variação da concentração de Ca^{2+}. Inicialmente houve uma diminuição na fluorescência nas concentrações mais baixas de Ca^{2+} (até 600 µM). No entanto, a partir de 600 µM observou-se um aumento gradual na fluorescência e ao atingir 10 mM de Ca^{2+} a fluorescência tornou-se muito semelhante à observada na ausência de Ca^{2+} (preto) (Figura 58A). Após análise, constatou-se que o CaMCA D268A apresenta apenas um ponto de inflexão (K_D de 2,35 µM), conforme evidenciado na Figura 58B. Os valores de K_D estão descritos na Tabela 7.

Figura 58: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA íntegra D268/269A. (A) Espectro de fluorescência do mutante CaMCA íntegra D268/269A na ausência de $CaCl_2$. (preto); 1 µM de $CaCl_2$ (marrom); 10 µM de $CaCl_2$ (verde); 200 µM de $CaCl_2$ (rosa); 600 µM de $CaCl_2$ (azul); 4 mM de $CaCl_2$ (vermelho); 10 mM de $CaCl_2$ (amarelo); (B) O gráfico mostra as mudanças na intensidade máxima do pico de emissão de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 330 nm) com o aumento da concentração de $CaCl_2$ (escala logarítmica).



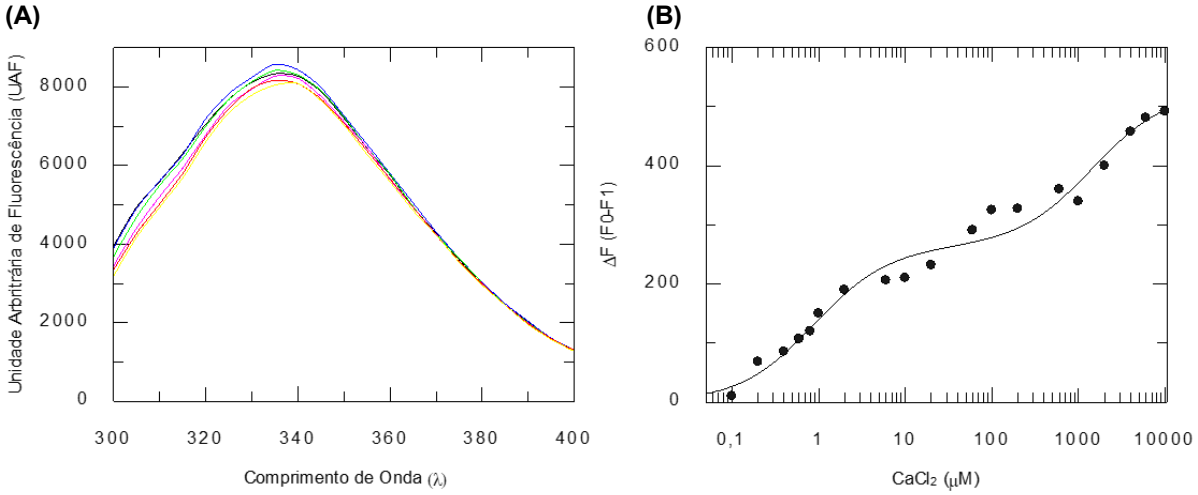
Para o mutante do Asp^{252} da CaMCA íntegra, não foi observada nenhuma alteração na fluorescência intrínseca, apesar das mudanças nos dados de processamento. Por outro lado, para o mutante D252A da CaMCA-ΔN86, observamos que em baixas concentrações de Ca^{2+}, houve uma diminuição na fluorescência, seguida de um aumento gradual conforme a adição de $CaCl_2$ (Figura 59A). Após análise, constatou-se que o mutante D252A da CaMCA-ΔN86 apresenta apenas um ponto de inflexão (K_D de 1,33 µM), conforme evidenciado na Figura 59B. Os valores de K_D estão descritos na Tabela 7.

Figura 59: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA-ΔN86 D252A. (A) Espectro de fluorescência do mutante CaMCA-ΔN86 D252A na ausência de $CaCl_2$. (preto); 400 nM de $CaCl_2$ (azul); 1 µM de $CaCl_2$ (verde); 10 µM de $CaCl_2$ (roxo); 100 µM de $CaCl_2$ (laranja); 1 mM de $CaCl_2$ (marrom); 4 mM de $CaCl_2$ (vermelho); 10 mM de $CaCl_2$ (amarelo); (B) O gráfico mostra as mudanças na intensidade máxima do pico de emissão de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 330 nm) com o aumento da concentração de $CaCl_2$ (escala logarítmica).



O mutante D268A da CaMCA-ΔN86, observamos que em baixas concentrações de Ca^{2+} houve um aumento na fluorescência (até 400 nM), seguida de uma diminuição gradual conforme a adição de $CaCl_2$ (Figura 60A). Após análise, constatou-se que o mutante D252A da CaMCA-ΔN86 apresenta apenas um ponto de inflexão (K_D de 1,71 µM), conforme evidenciado na Figura 60B. Os valores de K_D estão descritos na Tabela 7.

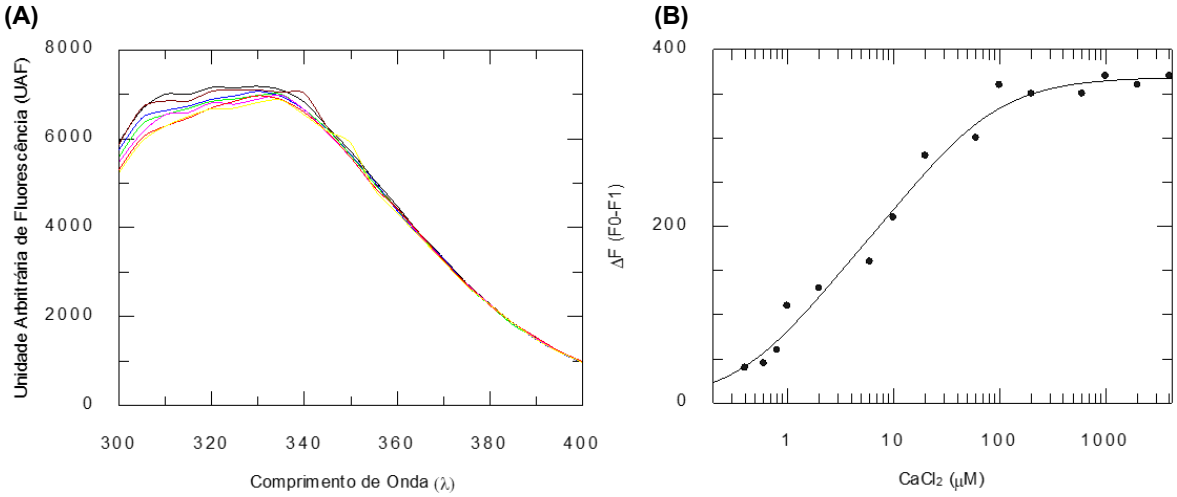
Figura 60: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA-ΔN86 D268A. (A) Espectro de fluorescência do mutante CaMCA-ΔN86 D268A na ausência de $CaCl_2$. (preto); 400 nM de $CaCl_2$ (azul); 1 µM de $CaCl_2$ (verde); 100 µM de $CaCl_2$ (rosa); 2 mM de $CaCl_2$ (vermelho); 10 mM de $CaCl_2$ (amarelo); (B) O gráfico mostra as mudanças na intensidade máxima do pico de emissão de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 330 nm) com o aumento da concentração de $CaCl_2$ (escala logarítmica).



Para o mutante do Asp^{269} da CaMCA-ΔN86 não houve alteração da fluorescência intrínseca, apesar de nos dados de processamento termos observado bandas resultantes de auto processamento na presença do cálcio, com notável diferença entre os controles positivo e negativo.

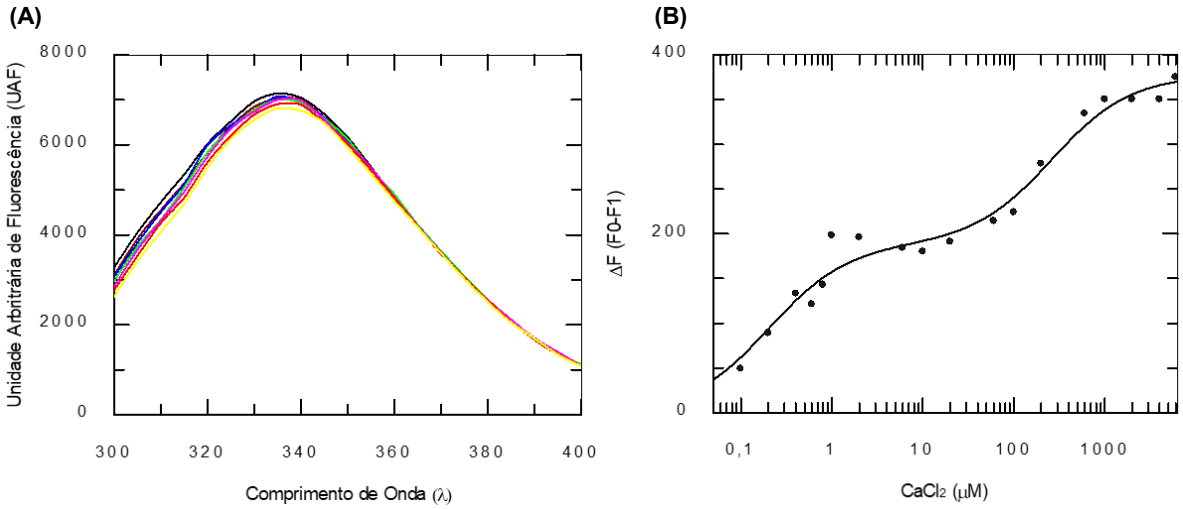
O mutante D299A da CaMCA-ΔN86 exibiu uma diminuição gradual na fluorescência à medida que a concentração de Ca^{2+} aumentou (Figura 61A). Apesar da diferença no perfil de fluorescência, assim como o mutante D299A, apresentou apenas um ponto de inflexão com um K_D de 1,41 µM (Figura 61B).Os valores de K_D estão descritos na Tabela 7.

Figura 61: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA-ΔN86 D299A. (A) Espectro de fluorescência do mutante CaMCA-ΔN86 D299A na ausência de $CaCl_2$. (preto); 400 nM de $CaCl_2$ (marrom); 1 µM de $CaCl_2$ (azul); 10 µM de $CaCl_2$ (verde); 100 µM de $CaCl_2$ (rosa); 2 mM de $CaCl_2$ (vermelho); 10 mM de $CaCl_2$ (amarelo); (B) O gráfico mostra as mudanças na intensidade máxima do pico de emissão de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 330 nm) com o aumento da concentração de $CaCl_2$ (escala logarítmica).



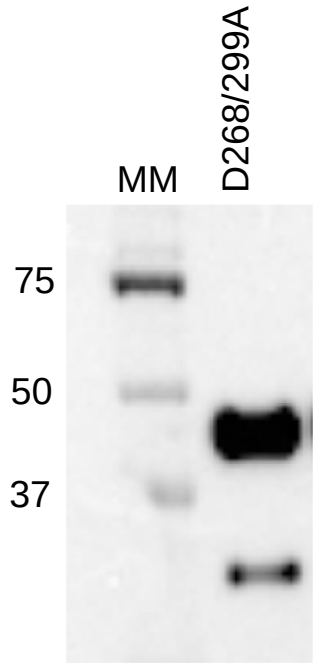
O mutante D268/269A da CaMCA-ΔN86 exibiu uma diminuição gradual na fluorescência à medida que a concentração de Ca^{2+} aumentou (Figura 62A). E apresentou dois pontos de inflexão, com um K_{D1} de 0,20 µM e K_{D2} de 2,61 mM (Figura 62B).Os valores de K_D estão descritos na Tabela 7.

Figura 62: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca da CaMCA-ΔN86 D268/269A. (A) Espectro de fluorescência do mutante CaMCA-ΔN86 D268/269A na ausência de $CaCl_2$. (preto); 600 nM de $CaCl_2$ (marrom); 1 µM de $CaCl_2$ (azul); 10 µM de $CaCl_2$ (verde); 100 µM de $CaCl_2$ (rosa); 1 mM de $CaCl_2$ (vermelho); 10 mM de $CaCl_2$ (amarelo); (B) O gráfico mostra as mudanças na intensidade máxima do pico de emissão de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 330 nm) com o aumento da concentração de $CaCl_2$ (escala logarítmica).



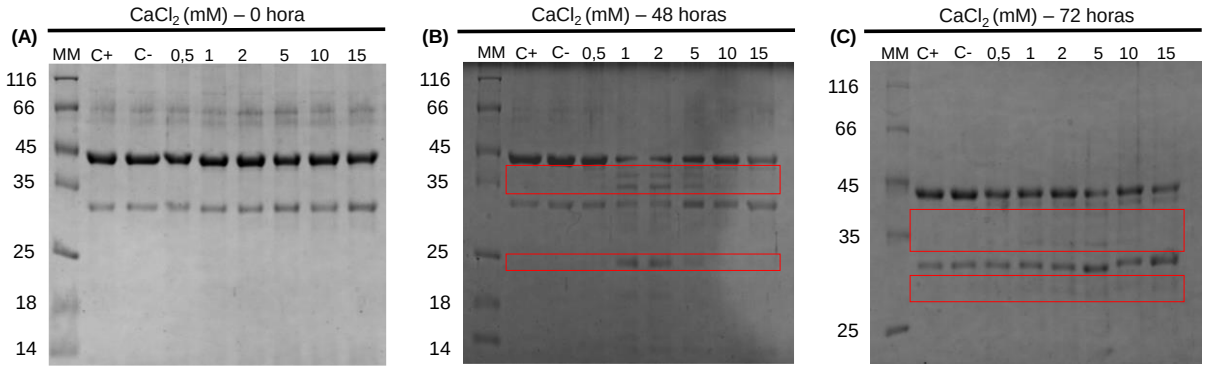
O mutante D268/299A foi construído com base nos resultados obtidos pelos mutantes D268A e D299A. Confirmamos a integridade através de *Western blotting* (Figura 63) e o identificamos na sua forma não processada (~43 KDa) e na sua forma processada (~33 KDa).

Figura 63: *Western blotting* do mutante D268/299A da CaMCA-ΔN86 através de reconhecimento por anticorpo primário anti-6X*His*-tag.



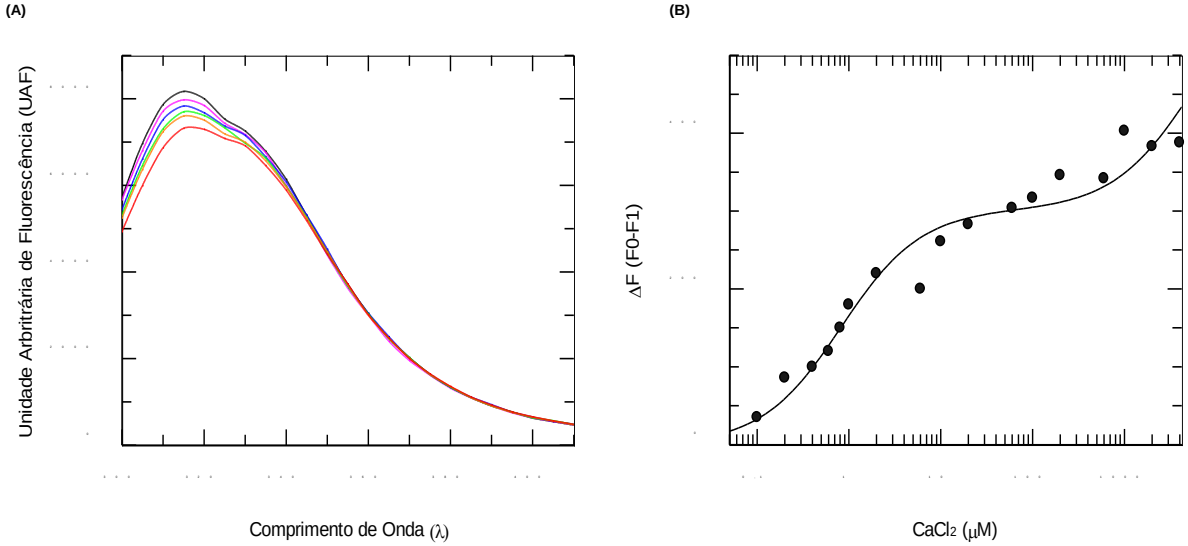
Realizamos o teste de processamento usando as mesmas concentrações de $CaCl_2$ e condições usadas para os demais mutantes do sítio de cálcio da CaMCA. Após 24 horas, não observamos nenhum processamento (dados não mostrados). No entanto, após 48 horas observamos um segundo processamento nas concentrações de 1, 2 e 5 mM de $CaCl_2$, evidenciado pela presença de bandas não presentes nos controles positivo e negativo (Figura 64A). Além disso, foi observado um terceiro processamento da protease, resultando na formação de uma banda de aproximadamente 25 KDa também nas concentrações de 1, 2 e 5 mM (Figura 64B). Não foram detectadas mudanças adicionais no processamento do mutante mesmo após 96 horas de incubação (Figura 64C).

Figura 64: Teste de maturação do mutante D268/299A da CaMCA-ΔN86. SDS-PAGE das amostras após a incubação na presença ou ausência de Ca^{2+} e EGTA. SDS-PAGE das amostras após a incubação na presença ou ausência de Ca^{2+} e EGTA. Na canaleta 1: marcador de peso molecular; na canaleta 2 CaMCA-ΔN86 C+ (enzima + tampão); na canaleta 3 CaMCA-ΔN86 C- (enzima + tampão + EGTA); (A) CaMCA-ΔN86 D252A; (B) CaMCA-ΔN86 D269A; (C) CaMCA-ΔN86 D268A; (D) CaMCA-ΔN86 D299A; (E) CaMCA-ΔN86 D268/269A



Analisamos a fluorescência intrínseca do mutante D268/299A da CaMCA-ΔN86 o qual apresentou um padrão de fluorescência semelhante a CaMCA-ΔN86 em resposta a variação da concentração de Ca^{2+}, com uma diminuição progressiva à medida que aumentamos a concentração de $CaCl_2$ (Figura 65A). No entanto, o mutante D268/299A apresentou dois pontos de inflexão e determinamos uma constante de dissociação de alta afinidade (K_{D1}) de 1 µM e constante de dissociação de baixa afinidade (K_{D2}) de 5 mM (Figura 65B).

Figura 65: Influência do Ca^{2+} na fluorescência intrínseca do mutante D268/299A da CaMCA-ΔN86. (A) Espectro de fluorescência do mutante D268/299A da CaMCA-ΔN86 na ausência de $CaCl_2$. (preto) 200 nM de $CaCl_2$ (rosa); 800 nM de $CaCl_2$ (azul); 2 µM de $CaCl_2$ (verde); 10 µM de $CaCl_2$ (laranja); 10 mM de $CaCl_2$ (vermelho). (B) O gráfico mostra as mudanças na intensidade máxima do pico de emissão de fluorescência (comprimento de onda de emissão de 330 nm) com o aumento da concentração de $CaCl_2$ (escala logarítmica).



5 DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA CaMCA ÍNTEGRA

Neste trabalho realizamos a clonagem, expressão e purificação da metacaspase de *C. albicans* (CaMCA) com deleção do N-terminal (CaMCA-ΔN115 e CaMCA-ΔN86) e efetuamos mutações sítio-dirigidas nos resíduos do sítio de ligação do cálcio (Asp^{252}, Asp^{268}, Asp^{269} e Asp^{299}).

As metacaspases desempenham funções cruciais em diversos processos fisiológicos em organismos não metazoários como morte celular regulada, resposta ao estresse oxidativo e desenvolvimento celular. Sua conservação em plantas, fungos e protozoários as torna alvos promissores para investigações sobre sua estrutura e função (GARCIA *et al.,* 2022).

Como a metacaspase de *C. albicans* ainda não foi caracterizada bioquimicamente, inicialmente começamos a determinar as condições ótimas para sua atividade proteolítica em diferentes valores de pH na presença de cálcio (5 mM) usando os dipeptídeos fluorescentes Z-FR-AMC e Z-RR-AMC. A CaMCA íntegra não exibiu atividade em nenhuma das condições de ensaio testadas.

Este fato pode estar relacionado a estrutura da metacaspase, especialmente ao seu pró-domínio N-terminal. Conforme discutido por Vercammen *et al.,* (2004), o pró-domínio N-terminal é uma característica comum em metacaspases tipo I, como a CaMCA, e tem sido associado a interações proteína-proteína e a regulação da atividade da enzima. Estudos como o de Tsiatsiani *et al.,* (2011), demonstraram que a presença desse pró-domínio pode influenciar a dobragem correta da proteína ou interações específicas que são necessárias para sua atividade catalítica.

Nos experimentos direcionados a avaliação da dependência do Ca^{2+} pela CaMCA íntegra nos processos de ativação e processamento, nossos dados mostraram que a presença de Ca^{2+} é essencial para a ativação completa da CaMCA, como evidenciado pelo autoprocessamento levando a formação de uma banda de ~30 KDa, indicando a conversão da forma inativa para a forma ativa da enzima (Figura 25B). Este processo de ativação parece ocorrer em duas etapas, onde o primeiro processamento (E1 para E2) representa uma ativação inicial, enquanto o segundo processamento (E2 para E3) indica a maturação completa da CaMCA íntegra, como

ilustrado na Figura 25A. Inicialmente, a CaMCA íntegra é representada como inativa, na forma de um zimogênio, contendo um pró-domínio que atua como inibidor proteolítico. Sob a influência de estímulos ambientais, como o aumento da concentração de íons cálcio, ocorre a liberação do domínio catalítico da metacaspase por autoprocessamento, levando-a a uma forma intermediária ativa. Neste estágio, a protease está parcialmente ativada e pronta para realizar suas funções proteolíticas. A presença de cálcio é crucial para a conversão completa da metacaspase em sua forma ativa, essencial para sua função. Nesta fase, a CaMCA íntegra está presente como um monômero funcional, capaz de realizar clivagens específicas em suas proteínas alvo.

Assim como demonstrado pelo estudo de Conchou *et al.,* (2022) sobre a maturação da metacaspase CgMCA-I de *C. glabrata*, que também é dependente do íon Ca^{2+}, reforça ainda mais a importância desse cofator nesse processo. A presença de Ca^{2+} mostrou ser um fator chave para o segundo processamento, indicando que o Ca^{2+} desencadeia eventos conformacionais necessários para a conclusão desse processo. Esses resultados são consistentes com estudos anteriores, como os de Watanabe *et al.,* (2011), McLusKey *et al.,* (2012) e Wong *et al.,* (2012), que também demonstraram a importância do cálcio no processo de ativação e maturação de metacaspases em outros organismos.

É descrito que as caspases de mamíferos convertem seus zimogênios inativos em peptidases ativas através de processamento (SHI, 2002). As metacaspases de *Leishmania major* (GONZALES *et al.,* 2007; FASEL et al., 2007), *Arabidopsis thaliana* (VERCAMMEN *et al.,* 2004) e de *S. cerevisiae* (MADEO *et al.,* 2002) também necessitam de um processamento prévio para estarem ativas. As metacaspases, através da interação com cálcio, possuem a capacidade de se autoprocessarem; no entanto, esse autoprocessamento não é um pré-requisito para sua atividade enzimática (MOSS *et al.,* 2007; GILIO *et al.,* 2017).

Durante o ensaio de *Western blotting*, o qual utilizamos o anticorpo direcionado a cauda de histidina (Anti-6XHis) presente no N-terminal da CaMCA, observamos a detecção exclusiva da fração processada da enzima, com um peso molecular aproximado de 45 KDa (Figura 26). Ao analisarmos o gel resultante da purificação (Figura 24A), é evidente que a fração não processada (~50 KDa) está presente em baixa concentração em comparação com a fração processada (~40 KDa), o que justifica a detecção exclusiva desta última pelo anticorpo. Notavelmente, ao considerar

a região de inserção da cauda de histidina, observamos que o primeiro processo de clivagem da CaMCA íntegra ocorre na porção C-terminal.

A espectroscopia de fluorescência é uma ferramenta muito empregada na pesquisa bioquímica devido a sua capacidade de resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos e alta sensibilidade (LADOKHIM & BRANCO, 2000). Uma vez que a CaMCA contém apenas um resíduo de triptofano, utilizamos a sua fluorescência, que é uma fonte de fluorescência intrínseca presente na CaMCA. O método empregado baseia-se na análise das propriedades de fluorescência do triptofano, incluindo mudanças no comprimento de onda e na intensidade de emissão (GHISA *et al.,* 2014). Embora a tirosina também tenha um rendimento quântico semelhante ao triptofano, o grupo indol do triptofano é considerado a fonte dominante de absorbância UV em ~280 nm e emissão em ~350 nm em proteínas (GHISA *et al.,* 2014).

Aqui, utilizamos o triptofano (Trp), que é a fonte dominante de fluorescência intrínseca de proteínas. O método empregado baseia-se na análise das propriedades de fluorescência do triptofano, com base nas mudanças no comprimento de onda e na intensidade de emissão (GHISAIDOOBE & CHUNG, 2014). A tirosina tem um rendimento quântico semelhante ao do triptofano; no entanto, o grupo indol do triptofano é considerado a fonte dominante de absorbância UV a ~280 nm e emissão a ~320-350 nm em proteínas (GHISAIDOOBE & CHUNG, 2014).

A fluorescência intrínseca refere-se a capacidade natural de determinadas proteínas emitirem luz fluorescente quando excitadas por luz de comprimento específico. Esse fenômeno está relacionado a presença de aminoácidos aromáticos como triptofano, tirosina e fenilalanina que têm a capacidade intrínseca de absorver luz ultravioleta em λ = 280 nm e emitir luz visível em λ = 320-350 nm (GHISAIDOOBE & CHUNG, 2014; YAMMINE, GAO & KWAN, 2019; SINDREWICZ *et al.,* 2019). É importante destacar que a absorção ocorre principalmente devido as ligações π dos anéis aromáticos desses aminoácidos.

O triptofano é o aminoácido mais significativo nesse contexto, pois possui um elevado coeficiente de extinção molar e uma alta eficiência quântica de fluorescência (GHISAIDOOBE & CHUNG, 2014). Quando um feixe de luz UV incide sobre uma proteína contendo triptofano, os fótons são absorvidos pela porção aromática do triptofano, excitando-o para um estado energético mais elevado. Posteriormente, o

triptofano relaxa para o estado fundamental, liberando energia na forma de luz na faixa de 320 a 350 nm (SINDREWICZ et al., 2019).

A fluorescência intrínseca pode ser utilizada como uma ferramenta em estudos bioquímicos e biológicos para investigar a estrutura e dinâmica de proteínas. Por meio da análise da fluorescência intrínseca é possível obter informações sobre o microambiente do triptofano na proteína, como a exposição a água, interações com outros resíduos e até mesmo alterações conformacionais (CAIRES, COSTA & FERNANDES, 2013).

O efeito do tampão polar na fluorescência de uma proteína é influenciado pelo ambiente em que o triptofano está localizado. Quando o triptofano está protegido em um ambiente hidrofóbico, como quando está inserido no interior da proteína, a fluorescência tende a ser maior devido a proteção contra a interação com o solvente. No entanto, quando o triptofano é exposto ao solvente a fluorescência pode diminuir devido a interação com o solvente, resultando em *quenching* da fluorescência. Além disso, variações na fluorescência podem ocorrer sem mudanças estruturais significativas na proteína, como a protonação ou desprotonação de aminoácidos próximos ao triptofano e alterações no pH do meio que podem influenciar a fluorescência (GROENEVELD *et al.,* 2022).

Machado *et al*., (2013) descreveram que a TbMCA2 apresenta dois sítios de interação com o Ca^{2+}, chamado sítio de alta afinidade que é o responsável pelo auto processamento da TbMCA2 e o de baixa afinidade que é o responsável por um efeito alostérico na estrutura da enzima e esta mudança interfere na afinidade por diferentes substratos. Assim como visto para a TbMCA2, quando avaliamos o efeito na estrutura da interação da CaMCA íntegra em decorrência da sua interação com o Ca^{2+}, observamos uma interação entre a CaMCA e o íon Ca^{2+}. A curva de ligação de cálcio evidenciou dois pontos de inflexão distintos, indicando a presença de dois sítios de ligação de Ca^{2+} com diferentes afinidades (Figura 27B).

O primeiro ponto de inflexão revelou uma alta afinidade para o cálcio, com uma constante de dissociação (K_D) de 7 µM. Esse sítio de ligação pode desempenhar um papel crucial na regulação da atividade da CaMCA em condições intracelulares onde a concentração de cálcio é relativamente alta, como durante respostas a estresses ou em eventos de apoptose (LIMBU *et al.,* 2016).

A concentração de cálcio intracelular durante a apoptose em *C. albicans* pode variar dependendo das condições específicas do ambiente e do estágio do processo

apoptótico (LIMBU *et al.,* 2016). Em células eucarióticas, incluindo a *C. albicans*, a regulação do cálcio desempenha um papel crucial na sinalização celular e em eventos apoptóticos. Durante a apoptose, ocorrem alterações na homeostase do cálcio, levando a um aumento transitório da sua concentração intracelular (LEE *et al.,* 2017; LEE & LEE, 2018). No entanto, a concentração exata de cálcio intracelular durante a apoptose em *C. albicans* não foi completamente caracterizada na literatura. Estudos em outros organismos eucarióticos sugerem que o pico de cálcio apoptótico pode variar em diferentes contextos celulares e pode estar na faixa de micromolar a milimolar, dependendo da espécie, do tipo celular e das condições experimentais (LEE *et al.,* 2017; TIAN *et al.,* 2017).

Em um estudo publicado por Tian *et al.,* (2017), os resultados do estudo revelaram que o aumento dos níveis de cálcio intracelular e espécies reativas de oxigênio resultou em uma diminuição significativa do potencial de membrana mitocondrial e na liberação de citocromo c das mitocôndrias para o citosol. Além disso, a ativação da metacaspase foi observada, sugerindo a ativação da via apoptótica.

5.2 DELEÇÃO DO N-TERMINAL – CaMCA-ΔN115

Um estudo publicado por Erhardt *et al.,* (2010), demonstrou que a composição da porção N-terminal da metacaspase YCA1 da levedura *S. cerevisiae* detém uma grande influência na capacidade de precipitação desta protease, uma vez que essa região é rica em glutamina e asparagina. Semelhante a YCA1 e CaMCA, foi descrito que as metacaspases de *M. oryzae* (MoMca1 e MoMca2) também apresentam um N-terminal rico em resíduos de Q/N, indicando ser uma característica comum entre as metacaspases do tipo I (FERNANDEZ *et al.,* 2021).

Avaliando a constituição da região N-terminal da CaMCA observamos que ela compartilha características importantes da região N-terminal com a YCA1. Diante destes fatos, durante a realização do projeto de mestrado, traçamos um novo caminho para obtenção da proteína recombinante com a deleção desta região para que dessa forma pudéssemos obter uma enzima solúvel, o que possibilitaria sua caracterização bioquímica. Portanto, iniciamos a clonagem da CaMCA com a deleção de 115 aminoácidos da região N-terminal (CaMCA-ΔN115).

Para realizarmos a deleção do N-terminal e as mutações sítio-dirigidas no gene codificante da metacaspase de *C. albicans* (CaMCA), primeiro identificamos os

resíduos de interesse com base no alinhamento da sequência de aminoácidos da YCA1 de *S. cerevisiae* com a sequência de aminoácidos da CaMCA, uma vez que a YCA1 possui sua estrutura cristalográfica determinada (WONG, YAN SHI, 2012), além do fato de que ambas as enzimas são metacaspases do tipo I que apresentam a porção hidrofílica em seu N-terminal (WONG & YAN, SHI, 2012). Constatamos que a deleção dos aminoácidos da porção N-terminal da CaMCA não interfere na estrutura tridimensional da CaMCA (Figura 28 – alinhamento).

Observamos que após expressa a CaMCA-ΔN115 se processa de forma mais acelerada e sofre autodegradação após seu autoprocessamento. Essa observação segue uma tendência descrita em estudos anteriores, que também observaram fenômenos semelhantes em metacaspases e outras proteínas recombinantes. A literatura evidencia que certas proteínas podem ser suscetíveis a esses processos devido a mudanças conformacionais induzidas por manipulações experimentais ou ao estresse durante a expressão e purificação (MACHADO E OLIVEIRA, 2018).

A observação de auto processamento mais rápido e a presença de bandas com características de autodegradação na fração purificada da CaMCA-ΔN115 eluida com 200 mM de imidazol (Figura 31B – purificação CaMCA-ΔN115) sugerem que essa metacaspase pode estar sujeita a processos de degradação após o processamento inicial. Estudos anteriores relataram fenômenos semelhantes em outras metacaspases, como a TbMCA2, a GtMC2 e a YCA1 (MACHADO *et al.*, 2013; KLEMENCIC E FUNK, 2017; WONG, YAN & SHI, 2012). Essas metacaspases foram demonstradas capazes de se autodegradar após o auto processamento, destacando um mecanismo potencialmente conservado entre diferentes organismos e sistemas.

Uma hipótese adicional é que a metacaspase CaMCA-ΔN115 pode estar sendo ativada pela ação de outras enzimas presentes na *E. coli.* A fim de confirmar esta suposição, seria necessário conduzir ensaios específicos. Estudos recentes, como o de Bessette *et al.,* (2019), revelaram que a *E. coli* tem a capacidade de realizar modificações pós-traducionais em proteínas recombinantes, como adição de grupos fosfato, açúcares e lipídios. Em outro estudo, Lee *et al.,* (2019) identificaram uma enzima quinase específica da *E. coli* capaz de fosforilar proteínas recombinantes, indicando que modificações pós-traducionais também podem ocorrer em proteínas expressas neste sistema.

Devido a rápida ocorrência de autoprocessamento seguida de autodegradação observada na metacaspase CaMCA-ΔN115, uma nova abordagem foi adotada para a construção de uma forma truncada da proteína.

5.3 DELEÇÃO DO N-TERMINAL – CaMCA-ΔN86

A obtenção da CaMCA-ΔN86 foi baseada nos resultados obtidos para a CaMCA-ΔN115. Como mencionado anteriormente, a deleção do N-terminal da CaMCA íntegra foi baseada na composição do seu N-terminal, assim com a YCA1 e as metacaspases tipo I de *Arabidopsis thaliana* (Atmc e Atmc2), é rico em prolina e glutamina. Esse pró-domínio também está presente em caspases iniciadoras de mamíferos, podendo ser responsável por interações proteína-proteína entre metacaspases ou outros componentes oligomerizantes de diferentes complexos de sinalização, resultando na ativação da metacaspase de forma gradual e lenta (VERCAMMEN *et al.,* 2004), o que justificaria o fato de a ausência do N-terminal a CaMCA-ΔN115 se processar de forma mais rápida, resultando em autodegradação.

Uma das diferenças mais marcantes entre as metacaspases do tipo I e tipo II é a presença do pró-domínio N-terminal nas do tipo I, o qual está ausente nas do tipo II (TSIATSIANI *et al.,* 2011; UREN *et al.,* 2000). As metacaspases do tipo I de Arabidopsis, bem como a CaMCA e YCA1, são sintetizadas como zimogênios inativos e são ativadas por auto processamento. No entanto, as metacaspases tipo II de Arabidopsis possuem uma ativação semelhante as caspases efetoras de mamíferos (VERCAMMEN *et al.,* 2004; BOZHKOV *et al.,* 2005), diferente daquelas do tipo I (Atmc, Atmc2 e Atmc3), que possuem ativação semelhante as caspases iniciadoras. Provavelmente este fato se deve a presença do N-terminal (VERCAMMEN *et al.,* 2004).

Embora o método tradicional de clonagem usando a T4 ligase e enzimas de restrição ainda seja amplamente utilizado, durante nossas tentativas obtivemos baixa rendimento empregando este método para a obtenção da CaMCA-ΔN86. Com os avanços na área da biologia molecular a construção e modificação de genes usando a clonagem transfigurou-se mais corriqueira, implicando no desenvolvimento de métodos mais simples e econômicos (CHAO, YUAN & ZHAO, 2015). Atualmente métodos usando a montagens de fragmentos de DNA *in vivo* e *in vitro* empregando extremidades homólogas foram desenvolvidos (YONGZHEN *et al.,* 2019).

A estratégia de clonagem da CaMCA-ΔN86 foi utilizando o procedimento TEDA que usa apenas uma exonuclease 5'-3' (YONGZHEN *et al.,* 2019). Este método consiste na construção de um DNA recombinante usando apenas a T5 exonuclease. O método se baseia no fato que durante a incubação do inserto com o vetor, a T5 exonuclease cliva as extremidades homólogas para gerar pontas 3' que hibridizam umas às outras, posteriormente ocorre o reparo *in vivo* na célula hospedeira com a atividade da DNA polimerase para preencher as lacunas e a ligase promovendo a ligação covalente dos fragmentos (YONGZHEN et al., 2019) (Figura 32). Essa mesma técnica foi utilizada para a confecção dos mutantes.

O vetor pET28(a)+ foi amplificado por PCR usando *primers* específicos para o protocolo TEDA. A confirmação da amplificação se deu por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. Uma vez confirmada a amplificação, realizamos a digestão com a enzima DpnI para que ocorresse a degradação do DNA metilado, a fim de que restasse apenas o produto da PCR. No contexto biológico, a metilação é um mecanismo usado para proteger as bactérias contra a invasão de DNAs estranhos. Dessa forma, as bactérias marcam seu próprio DNA por metilação e degradam o DNA que não possui tal marcação (WILSON & MURRAY, 1991). A enzima DpnI reconhece os locais Gm6A↓TC e o plasmídeo extraído da bactéria *E. coli DH5α* contém metiladenosina no sítio de restrição da DpnI (GATC), tornando o plasmídeo susceptível a clivagem da enzima (DE LA CAMPA *et al.,* 1988).

O produto purificado foi submetido ao protocolo TEDA. Neste protocolo ocorre a recombinação entre duas moléculas lineares de DNA, um inserto e um vetor plasmidial flanqueado por duas regiões de sequência curta (homóloga ao inserto) (YONGZHEN *et al.,* 2019). A reação foi preparada na proporção 1:4 (vetor/inserto), usando 100 ng de vetor. A reação foi preparada passou pelo processo de transformação por choque térmico em cepas de *E. coli* DH5α.

Durante o choque térmico, as células são brevemente expostas a uma temperatura elevada, entre 42 °C e 45 °C. Este aumento de temperatura causa a formação de pequenas fissuras na membrana celular, permitindo que o DNA plasmidial presente no meio entre nas células com mais facilidade. Após o choque térmico as células são rapidamente resfriadas em gelo. Este resfriamento rápido é fundamental para o fechamento das fissuras na membrana celular evitando a perda de material celular e danos irreversíveis as células. Após a transformação as células transformadas são incubadas em meio de cultura apropriado. Durante este período

de incubação as células começam a expressar os genes contidos no plasmídeo transformado. Isso inclui genes de resistência a antibióticos que permitem a seleção das células transformadas em meio contendo o antibiótico apropriado (SHAW & MESSING, 1985; DOWER *et al.,* 1988; INOUE *et al.,* 1990; SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

A *E. coli* está entre os hospedeiros mais eficientes para produção de proteínas recombinantes. Por ser um microrganismo com manipulação genética é fácil e versátil, existem inúmeras cepas e plasmídeos disponíveis e as células podem ser cultivadas rapidamente em meios baratos com altas densidades celulares (JIA E JEON, 2016). Foi escolhido como vetor de expressão o pET28(a)+ (Novagen), plasmídeo frequentemente utilizado para produção de proteínas recombinantes em *E. coli* (STUDIER E MOFFATT, 1986). Este vetor permite a rápida produção de grandes quantidades da proteína de interesse, além disso, possui vários elementos importantes como: gene de resistência a canamicina o que possibilita a seleção de clones positivos; conta com uma zona de clonagem sob influência do promotor T7 regulado pelo repressor lac e induzido por lactose.

Já está descrito na literatura que a *E. coli* quando expressa uma proteína heteróloga a 37°C, tende a direcioná-las para corpo de inclusão, uma maneira de reduzir esta inserção é promover a diminuição da temperatura para posterior indução da expressão da proteína recombinante (GOPAL E KUMAR, 2013). Diante disso, realizamos a expressão a 20°C durante 16 horas usando 0,25 mM de IPTG. O IPTG é um análogo da lactose que, ao ser adicionado ao meio de cultura, induz a expressão dos genes inseridos no vetor por meio da ativação do *operon lac*. Este *operon* é controlado pelo promotor T7, que regula a transcrição do gene de interesse na presença da T7 RNA polimerase resultando na produção da proteína alvo. O promotor T7 é altamente eficiente e oferece vantagens significativas na expressão heteróloga de proteínas de interesse em sistemas de expressão bacteriana, como o sistema BL21(DE3)pLysS (STUDIER e MOFFATT, 1986; ROSENBERG *et al.,* 1987; SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

Ao contrário do que foi observado para a CaMCA-ΔN115, o perfil de bandas da CaMCA-ΔN86 não parece ser decorrente de autodegradação. A CaMCA-ΔN86 apresenta aproximadamente 43 KDa e sofre um autoprocessamento ainda durante o processo de purificação, gerando uma banda de ~33 KDa (Figura 39 – dessalting). Estes dados demonstram que a CaMCA-ΔN86 apresenta características estruturais

ou propriedades de processamento distintas em comparação a CaMCA-ΔN115, indicando que a primeira possui uma estabilidade estrutural diferente ou dispõe de um mecanismo de autoprocessamento alterado, logo, o truncamento do N-terminal pode ter um impacto significativo na estabilidade ou na regulação da enzima e a remoção dos 115 aminoácidos do N-terminal pode ter alterado significativamente as propriedades estruturais ou funcionais da metacaspase, apesar de não termos detectado tal fato no alinhamento com a YCA1.

O processamento é uma característica típica tanto das caspases quanto das metacaspases quando expressas em bactérias (VERCAMMEN *et al.,* 2004; POP & SALVESEN, 2009). As metacaspases do tipo I e II sofrem autoprocessamento (MASPONS *et al.,* 2014). Um estudo publicado por Eyssen & Coetzer (2019) descreveu que a TcoMCA5 de *Trypanosoma congolense* recombinante sofreu autoprocessamento quando expressa em *E. coli*, um processo semelhante às caspases de mamíferos, que executam o processamento para liberar o domínio catalítico ativo. Watanabe & Lam (2011) sugeriram que as metacaspases recombinantes podem exibir menor atividade catalítica e são capazes de iniciar uma cascata de processos peptidolíticos. Dessa forma, quando duas moléculas de pró-enzima estão próximas, uma pró-enzima levemente ativa é capaz de clivar uma segunda molécula.

Foi demonstrado na metacaspase 2 de *T. brucei* que, na verdade, o autoprocessamento é uma etapa essencial na qual o N-terminal é realocado estruturalmente expondo os resíduos catalíticos, favorecendo a ação da metacaspase sobre substratos proteicos e não somente sobre oligopeptídeos (GILIO *et al.,* 2017).

Analisamos a dependência do íon cálcio no processo de maturação e ativação da CaMCA-ΔN86 por meio da incubação da enzima em diferentes concentrações de CaCl2 (0 – 15 mM) em tampão TRIS 50 mM; NaCl 150 mM, pH 7,4, durante 72 horas em temperatura ambiente. Observamos que a atividade enzimática da CaMCA-ΔN86 variou significativamente em diferentes concentrações de cálcio.

A análise das incubações da CaMCA-ΔN86 em diferentes concentrações de $CaCl_2$ revelou um padrão de processamento dependente da concentração de Ca^{2+}. Inicialmente, observamos que a protease foi ativada em todas as concentrações de Ca^{2+}, evidenciando uma resposta direta à presença deste íon. Durante os estágios de expressão e purificação, a protease passou pelo primeiro processamento, resultando

na formação de fragmentos correspondentes às formas processadas (~33 KDa) e não processadas (~43 KDa).

A adição de Ca^{2+} induziu um segundo autoprocessamento, que foi mais evidente em concentrações mais altas de cálcio (10 e 15 mM), indicando uma correlação entre a velocidade de ativação da CaMCA-ΔN86 e a concentração de Ca^{2+}. Este segundo autoprocessamento resultou na formação de novas bandas não presentes nos controles. Após 24 horas de incubação, observamos uma evolução significativa na maturação e ativação da CaMCA-ΔN86, com a formação de um fragmento de ~30 KDa em todas as concentrações de Ca^{2+} testadas. No entanto, apenas na presença de 5 mM de $CaCl_2$, a protease demonstrou estar completamente processada indicando uma dependência específica da concentração de cálcio para uma maturação eficiente da protease. Em tempos posteriores de incubação (48 e 72 horas), notamos um terceiro autoprocessamento que culminou na formação de uma banda com cerca de 25 KDa, tal evento indica uma dependência específica da concentração de cálcio para uma maturação eficiente da protease.

A observação de diferentes estágios de autoprocessamento da CaMCA-ΔN86 em resposta a presença de Ca^{2+} indica um mecanismo de ativação intermolecular e dependente da concentração de íons Ca^{2+}. Estudos anteriores realizados em outras metacaspases, como a MCA4 de *Arabidopsis thaliana*, a YCA1, a metacaspase 2 de *T. brucei* e a metacaspase de *Candida glabrata*, fortalece a plausibilidade deste mecanismo intermolecular de ativação e processamento. Quando observado para a MCA4 de *Arabidopsis thaliana*, mesmo após o auto processamento ocorrido durante a expressão da proteína recombinante, esta sofreu posterior auto processamento quando incubada com 3 – 50 mM de cálcio (WATANABE & LAM, 2011), evento também observado para a YCA1 (WONG *et al.,* 2011), metacaspase 2 de *T. brucei* (MOSS *et al.,* 2007); Gonzales *et al.*, (2007) investigaram o papel do cálcio na ativação da metacaspase em *Leishmania major*. Seus resultados demonstraram a importância do cálcio na ativação da metacaspase e seu subsequente processamento

A observação de que a maturação da protease ocorreu mesmo na ausência de cálcio, durante o processo de purificação da CaMCA-ΔN86, levantou importantes questões sobre os possíveis mecanismos de ativação dessa enzima. A hipótese inicial é de que o cálcio pode se ligar parcialmente a protease durante a expressão, ou a presença de outros cátions divalentes em baixa concentração. Decidimos expandir nossa análise para além do cálcio e investigar o papel de outros cátions divalentes no

processo de maturação e ativação da enzima; como cobre, bário, zinco, manganês e magnésio.

A presença de íons como Ba^{2+} e Mn^{2+} induziu um comportamento semelhante ao observado na maturação da CaMCA-ΔN86 na presença de Ca^{2+}, embora o processamento ocorra de forma mais lenta. Essa diferença pode ser atribuída às propriedades físico-químicas dos íons, como o raio atômico. O raio atômico representa o tamanho médio do átomo e influencia a capacidade de um íon interagir com outras moléculas ou íons. Íons com um raio atômico maior tendem a ter uma distribuição eletrônica mais externa e podem formar ligações mais fracas ou menos específicas com as moléculas alvo (BRADY & HUMISTON, 2014). No caso do Ba^{2+}, seu raio atômico maior em comparação com o Ca^{2+} pode resultar em um complexo menos estável com a CaMCA-ΔN86, levando a um processo de maturação mais lento. Por outro lado, o Mn^{2+} que apresenta um raio atômico menor que o do Ca^{2+}, também pode influenciar na estabilidade do complexo formado com a protease, afetando o tempo de maturação.

Além disso, o bloqueio do processo de maturação na presença de Zn^{2+} sugere um possível papel inibidor desse íon na ativação da protease, mesmo após um longo período de incubação. Essa observação é coerente com as diferenças nos tamanhos dos íons e sua capacidade de interagir com a CaMCA-ΔN86, demonstrando a influência do raio atômico na ligação do íon e consequentemente no processo de maturação e ativação da enzima.

A eletronegatividade é uma medida da tendência de um átomo em atrair elétrons quando está ligado a outro átomo. Íons com maior eletronegatividade tendem a atrair mais fortemente elétrons, o que pode influenciar na natureza e na estabilidade das interações entre os íons e as moléculas alvo. No entanto, para os íons divalentes comumente envolvidos na ativação de enzimas como Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+} e Zn^{2+}, a eletronegatividade não é um fator determinante, uma vez que esses íons têm eletronegatividades relativamente baixas (BRADY & HUMISTON, 2014).

Os valores referentes ao raio atômico e eletronegatividade dos íons divalentes utilizados na ativação da CaMCA-ΔN86 estão descritos na tabela 7.

Tabela 07: Propriedades dos íons divalentes utilizados na ativação da CaMCA-ΔN86. O raio atômico do íon em picômetros (pm). A eletronegatividade é dada em Pauling

Íon	Raio Atômico (pm)	Eletronegatividade
Bário (Ba)	216	0,89
Cálcio (Ca^{2+})	197	1,00
Manganês (Mn^{2+})	139	1,55
Zinco (Zn^{2+})	142	1,65
Magnésio (Mg^{2+})	160	1,31
Cobre (Cu^{2+})	128	1,90

Inicialmente, confirmamos a integridade da proteína, evidenciada pela detecção da cauda de histidina no N-terminal da CaMCA-ΔN86 utilizando um anticorpo anti-6XHis (Figura 42A). No entanto, após 72 horas de incubação com 5 mM de $CaCl_2$, não foi mais possível detectar a proteína (Figura 42B). Essa observação indica que o primeiro processamento da CaMCA-ΔN86 ocorre no C-terminal, seguido por processamentos adicionais no N-terminal levando a produção de uma forma intermediária (~33 kDa) e, posteriormente a forma madura da protease (~30 kDa).

Essa ordem de processamento com a clivagem inicial no C-terminal seguida pela clivagem no N-terminal, é consistente com achados anteriores relatados na literatura para outras metacaspases. Estudos sobre a metacaspase AtMC1 de *Arabidopsis thaliana* e a metacaspase de *Leishmania major* indicaram que a clivagem do pró-domínio N-terminal é um evento inicial durante a ativação da enzima (BELENGHI *et al.,* 2007; ZALILA *et al.,* 2011).

Estudos adicionais realizados com outras metacaspases, como a YCA1 de *Saccharomyces cerevisiae* e a metacaspase de *Candida glabrata*, também confirmam a diversidade nos padrões de clivagem durante o processo de ativação. A metacaspase YCA1 foi relatada como sofrendo clivagem inicial no N-terminal e posteriormente no C-terminal (WONG *et al.,* 2012), enquanto para a metacaspase de *Candida glabrata*, a primeira clivagem ocorreu na porção C-terminal da proteína, seguida por clivagens subsequentes no N-terminal (CONCHOU *et al.,* 2022).

A fim de avaliar o período necessário para a CaMCA-ΔN86 realizar a clivagem do N-terminal quando incubada com 5 mM de $CaCl_2$, conduzimos uma nova análise por *Western blotting*, abrangendo tempos de incubação que variaram de 0 a 48 horas, com intervalos de leitura de 24 horas entre cada análise.

Os resultados do *Western blotting* revelaram que a presença de Ca^{2+} induziu o processamento imediato da CaMCA-ΔN86, com remoção do pró-domínio C-terminal e subsequente clivagem do N-terminal já no tempo zero de incubação. Esse efeito foi observado somente nas amostras tratadas com 5 mM de $CaCl_2$, onde houve uma diminuição significativa na intensidade da banda correspondente à forma não processada da proteína (43 KDa).

Ao longo do tempo de incubação, a detecção da banda de 43 KDa tornou-se progressivamente menos evidente nas amostras tratadas com Ca^{2+}, indicando que a CaMCA-ΔN86 foi completamente processada com remoção do pró-domínio N-terminal. Esse padrão de processamento com a clivagem inicial no C-terminal seguida pela clivagem no N-terminal, é consistente com achados anteriores relatados na literatura para outras metacaspases (WONG *et al.,* 2012). Estudos sobre metacaspases em diferentes organismos, como *Arabidopsis thaliana* e *Leishmania major*, também descreveram uma clivagem inicial no pró-domínio N-terminal durante o processo de ativação da enzima (BELENGHI *et al.,* 2007; ZALILA *et al.,* 2011).

Além disso, a análise por *Western blotting* revelou que o processamento da CaMCA-ΔN86 é específico para a presença de cálcio, pois não foram observadas mudanças significativas nos controles positivo (sem cálcio) e negativo (sem cálcio e com EGTA). Essa especificidade indica que o cálcio desempenha um papel crucial na regulação da atividade da metacaspase, possivelmente através da interação com resíduos específicos que determinam o fenômeno de processamento.

Avaliamos a influência do Ca^{2+} em desencadear alterações conformacionais na CaMCA-ΔN86 por meio da técnica de fluorescência intrínseca e os resultados da revelaram que a presença de Ca^{2+} desencadeia alterações conformacionais na CaMCA-ΔN86, demonstradas pela diminuição progressiva na intensidade da fluorescência à medida que a concentração de $CaCl_2$ aumenta. Além disso, foi determinada apenas um K_D de 4 mM. Essas mudanças indicam uma ligação específica entre o Ca^{2+} e a proteína, o que leva a proteína a sofrer reorganizações estruturais que afetam a exposição de resíduos, como o triptofano, ao tampão e ao ambiente circundante.

Ao compararmos esses resultados com os obtidos para a CaMCA íntegra, observamos diferenças significativas nos K_{DS}. Enquanto a CaMCA íntegra apresentou sítios de alta e baixa afinidade para o cálcio, resultando em duas contantes de dissociação, a CaMCA-ΔN86 mostrou apenas uma. Essa diferença pode ser atribuída

a remoção da porção N-terminal da proteína pela truncagem, uma vez que essa remoção pode ter influenciado diretamente a afinidade da proteína pelo cálcio, levando a variações nas constantes de dissociação observadas.

A remoção do N-terminal também pode afetar a exposição dos sítios de ligação do Ca^{2+}, alterando a disposição tridimensional dos resíduos de aminoácidos no sítio de ligação e, consequentemente, as interações com íons de cálcio. Além disso, a remoção do N-terminal pode afetar a capacidade da CaMCA-ΔN86 de sofrer mudanças em resposta a ligação de íons de Ca^{2+}, o que justifica as diferenças na reversão dos efeitos pelo EGTA entre a CaMCA íntegra e a CaMCA-ΔN86.

As constantes de dissociação são parâmetros cruciais para avaliar a interação entre a proteína e o cofator (LEHNINGER, NELSON & COX, 2019). Uma afinidade forte entre a proteína e o cofator é fundamental para manter uma interação estável e influenciar a estabilidade e a função da proteína. Nesse contexto, a diferença nos K_{DS} observados entre a CaMCA íntegra e a CaMCA-ΔN86 indica que a remoção do N-terminal da proteína pode ter ocasionado em mudanças significativas na interação da metacaspase com o Ca^{2+}.

Com base nos dados obtidos nas avaliações a respeito da interação do Ca^{2+} com CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86, supomos que o cálcio se liga a sítios específicos na estrutura da proteína. Estes sítios são provavelmente compostos por resíduos de aminoácidos altamente conservados, como aspartato, glutamato e outros resíduos carregados negativamente, que são capazes de coordenar íons de cálcio devido às suas propriedades químicas (LEHNINGER, NELSON & COX, 2019), e se tratando da metacaspase, sabemos que o sítio de ligação é coordenado por aspartatos, como observado para YCA1 (WONG *et al.,* 2012), TbMCA (McLUSKEY *et al.,* 2014) e CaMCA. Mutação sítio-dirigida, técnica em que os aminoácidos do sítio de ligação de Ca^{2+} são substituídos por outros aminoácidos, é uma ferramenta que proporciona a investigação dos efeitos das interações cálcio-CaMCA. Por exemplo, a substituição de um resíduo de aspartato por um resíduo neutro, como a alanina, pode potencialmente interromper a ligação de cálcio e, portanto, alterar as propriedades estruturais e funcionais da proteína.

5.4 MUTAÇÕES SÍTIO DIRIGIDAS

A análise comparativa entre a CaMCA-ΔN86 e a YCA1 revelou uma região conservada contendo resíduos de aspartato importantes para a interação com íons de Ca^{2+}. Esses resíduos mostraram ser cruciais para a atividade e função da YCA1, indicando desempenhar um papel semelhante na CaMCA. Com base nesses dados, foram desenhados *primers* para mutar os resíduos de aspartato na CaMCA empregando mutação sítio-dirigida, visando investigar seu impacto na capacidade de interação com íons de Ca^{2+}.

A mutação sítio-dirigida é uma ferramenta amplamente utilizada na biologia molecular para analisar a importância de resíduos específicos na função e estrutura de proteínas (ANTIKAINEN & MARTIN, 2005). Neste tipo de experimento, os *primers* carregam a mutação desejada, e a alteração é inserida na sequência de DNA por meio da técnica de PCR. Um dos métodos mais comuns é a abordagem QuicKChange (BRAMAN, PAPWORTH & GREENER, 1996). No entanto, essa técnica, juntamente com suas modificações posteriores, utiliza *primers* complementares na mesma reação de PCR, o que pode resultar na formação de "dímeros de *primers*" devido à hibridização entre si, reduzindo o rendimento (EDELHEIT, HANUKOGLU & HANUKOGLU, 2009). Para contornar esse problema, foram desenvolvidos protocolos alternativos (ZHENG, BAUMANN, & REYMOND, 2004).

Durante o desenvolvimento deste estudo de mutação em resíduos específicos do sítio de cálcio da CaMCA, não conseguimos produzir mutantes usando esta técnica. Para produzir os mutantes desejados, recorremos à técnica de "sobreposição de fragmentos", descrita por Ho *et al.,* (1989). Esta metodologia foi estabelecida para obtenção de mutantes por inserção ou deleção de sequências de DNA permitindo substituições, inserções ou deleções de pares de bases, e envolve a geração de produtos de PCR que se sobrepõem entre si (HO *et al.,* 1989; MIKAELIAN & SERGEAN, 1996). O processo aplicado no presente trabalho foi a mutação sítio-dirigida por substituição, que consiste na troca de pares de bases em duas etapas de PCR: uma PCR primária (na qual são realizadas duas PCRs independentes) e uma segunda PCR de ligação.

A técnica de extensão de sobreposição consiste em incorporar *primers* flanqueadores do gene (A e D), complementares a sequência alvo, juntamente com um *primer* interno contendo a mutação desejada, que se hibridizam com a região a

ser alterada (B e C). Como os *primers* B e C contêm o códon de mutação, os fragmentos resultantes da PCR I têm o códon original substituído pelo códon mutante e apresentam uma sequência complementar entre si, crucial para a próxima etapa da mutação. Na segunda PCR, ocorre a *annealing* por complementaridade, resultando em um único fragmento com a mutação desejada.

Os resultados obtidos na produção dos mutantes confirmaram a formação dos fragmentos desejados na PCR-II, indicando que as extremidades complementares localizadas na região de mutação se hibridizaram conforme o esperado. Esses mutantes são essenciais para investigar o papel dos resíduos Asp^{268}, Asp^{269}, Asp^{252}, Asp^{299} na interação com íons de Ca^{2+} e compreender os mecanismos subjacentes a regulação e atividade da CaMCA.

Confirmamos a presença dos plasmídeos contendo os mutantes nas colônias selecionadas, validamos a eficácia da transformação das células competentes de *E. coli* DH5α e BL21(DE3)pLysS através da PCR de colônia usando os *primers* T7. Os *primers* T7 são projetados para se ligarem especificamente a região do promotor T7, flanqueando a região de inserção do gene de interesse, logo amplificação por PCR produzirá um fragmento que inclui a sequência do promotor T7 e o gene de interesse (STUDIER & MOFFATT, 1986), como ocorreu em nossos experimentos.

A etapa de expressão dos mutantes da CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86 em BL21(DE3)pLysS foi realizada após a confirmação da clonagem, utilizando IPTG como indutor de expressão. A análise dos resultados obtidos por meio da análise dos dados da expressão revelou diferenças significativas entre os mutantes da CaMCA íntegra e da CaMCA-ΔN86 sob as condições de expressão utilizadas. Observamos que os mutantes da CaMCA íntegra apresentaram evidências de processamento antes mesmo de submetida ao processo de purificação, indicadas pela presença de bandas de peso molecular diferente, enquanto para os mutantes da CaMCA-ΔN86 ainda não foi afirmar com certeza se houve processamento.

Após a purificação, observamos que cada mutante demonstrou ter níveis de impacto distintos no processo de autoprocessamento da CaMCA. Os mutantes nos resíduos Asp^{268}, Asp^{299} e o duplo mutante $Asp^{268/269}$ da CaMCA íntegra apresentaram uma influência negativa na capacidade de ativação da CaMCA, evidenciada pela redução na capacidade da protease de se autoprocessar.

Apenas o mutante do Asp^{268} e o duplo mutante $Asp^{268/269}$ apresentaram um fragmento de ~14 KDa, não observado na íntegra, indicando uma possível mudança no padrão de clivagem ou autoprocessamento da CaMCA nesses mutantes.

O efeito das mutações no processo de ativação da CaMCA-ΔN86 foi ainda mais evidente. Os mutantes nos resíduos Asp^{268}, Asp^{252}, Asp^{299} e $Asp^{268/269}$ mostraram uma diminuição na capacidade da CaMCA-ΔN86 se autoprocessar, evidenciada pela redução da formação do fragmento correspondente a forma processada (~33 KDa), enquanto o mutante no Asp^{269} exibiu um perfil de processamento semelhante ao da CaMCA-ΔN86. Além disso, os mutantes Asp^{268}, Asp^{269}, Asp^{252} e Asp^{299} da CaMCA-ΔN86 também apresentaram um fragmento de baixo peso molecular (~14 KDa), sugerindo um possível processamento alternativo ou parcial.

O mutante no resíduo Asp^{268} e o duplo mutante D268/269A, mostraram ser cruciais para a ativação e autoprocessamento tanto na forma íntegra da (CaMCA) quanto na forma truncada (CaMCA-ΔN86). Acreditamos que sua importância reside não apenas na interação com outros componentes ou substratos envolvidos no processo de ativação, mas também na influência sobre o padrão de clivagem durante o autoprocessamento.

O mutante do resíduo Asp^{269} mostrou desempenhar um papel diferente para a forma íntegra e truncada da CaMCA. Enquanto a mutação não afetou a eficiência do autoprocessamento e não foi observado alteração significativa no padrão de clivagem para a CaMCA íntegra. Para a CaMCA-ΔN86 resultou em uma alteração tanto na eficiência quanto no padrão de autoprocessamento. Supomos que remoção do N-terminal pode ter causado a exposição ou ocultado sítios de clivagem, levando a um novo padrão de clivagem. Essa alteração no padrão de clivagem resultou na formação do fragmento de ~14 KDa não observado para a CaMCA-ΔN86.

Apesar da redução na eficiência do autoprocessamento dos mutantes Asp^{252} e Asp^{299}, apenas o mutante D252A mostrou um perfil de processamento semelhante ao da forma selvagem da CaMCA, indicando que a mutação no Asp^{252} não afetou os sítios de clivagem da proteína, mas sim sua capacidade de ser processada de maneira eficaz.

A mutação nos resíduos Asp^{252} e Asp^{299} para a CaMCA-ΔN86 resultou em uma diminuição significativa na capacidade da protease em sofrer autoprocessamento, juntamente com a geração de um fragmento de ~14 KDa, indicando que assim como

observado nos mutantes D268A e D269A, este mutante pode levar a uma alteração no padrão de clivagem da proteína.

Os resultados obtidos através da análise por *Western blotting*, evidenciaram que as mutações nos resíduos de aspartato afetaram de maneira distinta o primeiro autoprocessamento da CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86. Todos os mutantes tiveram tanto a fração processada quanto a não processada detectadas, o que indica que o autoprocessamento ocorreu no C-terminal. No entanto, o mutante CaMCA-ΔN86 D268A não apresentou a fração processada detectada. Isso sugere que o primeiro processamento nesse mutante ocorreu no N-terminal da proteína, uma vez que é possível visualizar o fragmento processado no gel pós purificação.

Examinamos o efeito do Ca^{2+} no processo de autoprocessamento e ativação da CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86. Na CaMCA selvagem, a presença de Ca^{2+} (5mM) durante 72 horas resultou na formação de um fragmento com peso molecular de ~30 KDa, indicando o processo de ativação e processamento da protease, confirmando a relação direta entre a presença de Ca^{2+} e a ativação da CaMCA. O mutante D252A inicialmente não respondeu ao Ca^{2+} durante o tempo inicial de incubação, mas após 96 horas, observou-se um processo de ativação, resultando em um fragmento menor (~30 KDa), semelhante ao observado para a CaMCA íntegra.

O tempo de resposta do mutante D252A ao Ca^{2+} pode ser em decorrência de mudança na estrutura ou função da proteína causada pela mutação. O Asp^{252} está provavelmente envolvido em interações significativas para a ligação ou ativação da proteína pelo íon de Ca^{2+}. Inicialmente, na presença da mutação a CaMCA íntegra pode não ser capaz de interagir eficazmente com o Ca^{2+}, resultando em falta de resposta durante o tempo de incubação inicial. No entanto, após um período prolongado, pode ocorrer uma reorganização na estrutura da CaMCA, permitindo uma forma de ativação que resulta na observação de um fragmento semelhante ao observado a CaMCA íntegra.

Os mutantes D268A, D299A e D268/269A não apresentaram processamento na presença de Ca^{2+}, indicando uma falha na ativação em resposta ao estímulo do Ca^{2+}. Isso indica que os resíduos de Asp^{268}, Asp^{299} e a interação entre Asp^{268} e Asp^{269} são críticos para a capacidade da CaMCA de responder ao Ca^{2+}. Acreditamos que os resíduos de Asp nas posições 268 e 299 estão localizados em regiões mais críticas para a ligação ou ativação pelo Ca^{2+}.

Os dados obtidos com a CaMCA-ΔN86 identificaram que o resíduo Asp^{268} junto com o Asp^{299}, são os resíduos mais importantes para a interação cálcio-CaMCA-ΔN86 e que a mutação no Asp^{269} altera a velocidade de processamento da protease, assim como a mutação do Asp^{252}. A mutação no resíduo Asp^{252} é importante para o primeiro processamento da CaMCA-ΔN86, e o Asp^{269} é importante para o segundo processamento, visto que seus mutantes apresentaram diferenças nestes processos quando comparados com a CaMCA-ΔN86. Verificamos que cada resíduo possui um papel chave no processo de maturação da CaMCA-ΔN86, uma vez que o perfil de processamento é diferente para todos os mutantes, de modo que a alteração em um único resíduo do sítio de ligação do cálcio influenciou na velocidade e no tempo de processamento da CaMCA íntegra e CaMCA-Δ86.

Primeiramente, observamos que tanto os mutantes individuais (D268A e D299A) quanto o duplo mutante (D268/299) mantiveram a integridade estrutural, como evidenciado pela detecção das formas processadas e não processadas das proteínas nos ensaios de *Western blotting*. No entanto, uma diferenciação significativa foi observada nos padrões de processamento das proteínas.

Enquanto os mutantes individuais não exibiram processamento adicional mesmo após 48 horas de incubação em várias concentrações de Ca^{2+}, o duplo mutante revelou um padrão de processamento complexo. Após 48 horas, observou-se um segundo processamento nas concentrações de 1, 2 e 5 mM de Ca^{2+}, seguido por um terceiro processamento específico apenas nessas concentrações. Este terceiro processamento resultou na formação de uma banda de aproximadamente 25 KDa, indicando uma modificação estrutural adicional não observada nos mutantes individuais.

Estes resultados indicam uma interação sinérgica entre os resíduos Asp^{268} e Asp^{299} na regulação do processamento da CaMCA. Embora os mutantes individuais mantenham a estabilidade estrutural, a mutação simultânea desses dois resíduos parece desencadear alterações conformacionais adicionais que podem influenciar o reconhecimento e a clivagem pela protease.

Além disso, a análise da resposta a concentração de Ca^{2+} revelou diferenças marcantes entre o duplo mutante e os mutantes individuais. Enquanto os mutantes individuais exibiram um único ponto de inflexão em suas curvas de fluorescência intrínseca, o duplo mutante mostrou dois pontos de inflexão distintos. Isso indica que a mutação simultânea dos resíduos Asp^{268} e Asp^{299} afeta a afinidade da CaMCA tanto

para a baixa quanto para a alta concentração de Ca^{2+}, resultando em uma resposta complexa e não linear.

A comparação entre os dados obtidos com os mutantes da CaMCA íntegra e CaMCA-ΔN86 evidencia o impacto da mutação no sítio de cálcio. A ausência ou alteração desse sítio comprometeu a capacidade da proteína em reconhecer e interagir eficazmente com o cálcio, resultando em modificações distintas no padrão de processamento. Isso indica que o sítio de cálcio desempenha um papel crucial na regulação do processamento da CaMCA, e qualquer mutação nesse local influencia significativamente as interações proteicas. Os resultados mostram a interdependência entre a presença de cálcio, o sítio de ligação do íon e o autoprocessamento da CaMCA.

Assim como fizemos para a forma selvagem da CaMCA-Δ86, decidimos investigar a influência de outros íons bivalentes no processo de maturação dos mutantes de aspartato. O experimento foi conduzido utilizando a mesma abordagem e condições que usamos para testar diferentes concentrações de Ca^{2+}. Esta análise foi fundamental para compreender a especificidade da interação entre a CaMCA-Δ86 e os diferentes íons bivalentes, bem como seu impacto no processo dos mutantes D268A, D269A, D252A, D299A e D268/269A.

O objetivo deste experimento foi investigar a influência de diferentes íons divalentes no processo de ativação e processamento de mutantes da proteína CaMCA-Δ86. A partir de mutações nos resíduos de aspartato, que mostramos serem importantes para a interação com o Ca^{2+}, nós avaliamos como outros íons divalentes, como Cu^{2+}, Ba^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+} e Mg^{2+}, afetam o processo de ativação e processamento da CaMCA-Δ86.

Os resultados revelaram que os mutantes D252A, D268A, D299A e D268/269A não foram ativados em resposta a nenhum dos íons divalentes testados. No entanto, observamos que o mutante D252A sofreu algum nível de processamento na presença de Ba^{2+} e Mg^{2+} após 72 horas de incubação, indicando uma ativação parcial. Por outro lado, o mutante D269A mostrou processamento precoce na presença de Ba^{2+}, mas o processamento não progrediu após 72 horas de incubação.

Esses resultados mostram a importância do sítio de ligação do Ca^{2+} no autoprocessamento e ativação da CaMCA-Δ86. Os íons divalentes testados parecem se ligar ao mesmo local que Ca^{2+}, influenciando diretamente o processo de ativação e processamento. A ausência de resposta nos mutantes dos resíduos de aspartato

indica que a presença desses resíduos específicos é crucial para a interação eficaz dos íons no sítio de ligação. Isso reforça a hipótese de que os resíduos Asp^{268}, Asp^{269}, Asp^{252} e Asp^{299} desempenham um papel fundamental na regulação da atividade proteolítica da CaMCA-Δ86, e que mutações nesses resíduos altera a capacidade da CaMCA-Δ86 de reconhecer e responder aos sinais de cálcio e outros íons divalentes.

A análise dos valores de K_D e do perfil de fluorescência intrínseca dos mutantes dos resíduos do sítio de ligação do Ca^{2+} da CaMCA íntegra corroborou com os dados iniciais a respeito da afinidade desses mutantes com o íon cálcio. Os mutantes D252A, D268A, D299A e D268/269A exibiram variações significativas nos valores de K_D em comparação com a CaMCA íntegra, evidenciando alterações na afinidade com o cálcio. Essas variações nos valores de K_D refletem mudanças na capacidade de ligação e reconhecimento do Ca^{2+} pelos mutantes.

O mutante D268A, apresentou uma diminuição seguida de um aumento gradual na fluorescência em resposta ao aumento da concentração de Ca^{2+}. Esse padrão contrasta com o observado na CaMCA íntegra, indicando uma alteração na dinâmica conformacional desse mutante. A diminuição inicial na fluorescência pode ser devido a uma mudança conformacional que expõe os resíduos de triptofano ao meio, resultando em uma diminuição na intensidade da fluorescência (SINDREWICZ *et al.,* 2019). O aumento gradual subsequente na fluorescência pode ocorrer devido a uma posterior reorganização conformacional da proteína em resposta à ligação do Ca^{2+}, levando a uma restauração parcial do ambiente ao redor dos resíduos de triptofano. nm (GHISAIDOOBE & CHUNG, 2014).

Por outro lado, mutantes como o D252A e o D299A não apresentaram mudanças significativas na fluorescência intrínseca, apesar de terem demonstrado processamento na presença de cálcio. No caso do mutante D252A, pode sofrer ativação e se autoprocessar na presença do Ca^{2+}, mas sua conformação pode não ser tão sensível às mudanças induzidas pelo íon. Isso pode ser devido a uma alteração na posição ou na acessibilidade dos resíduos de triptofano, o que pode afetar sua capacidade de responder à ligação do Ca^{2+}.

O aumento na fluorescência intrínseca observado para o mutante D299A em resposta a adição de Ca^{2+}, juntamente com o valor de K_D de 1,03 µM, indica uma interação de alta afinidade com o íon. Esse aumento na fluorescência é indicativo de possíveis mudanças conformacionais na proteína na presença de Ca^{2+}. É importante destacar que o valor de K_D obtido para o mutante D299A (1,03 µM) é

significativamente menor do que os valores de K_{D1} (7 µM) observado para a CaMCA íntegra. Isso indica que o mutante D299A, assim como o D268A, D252A e D269A, possui uma afinidade muito mais alta com o Ca^{2+} do que observado para a forma selvagem da CaMCA. Essa diferença pode ser atribuída a uma mudança conformacional na proteína que favorece uma interação mais forte com o Ca^{2+}.

A observação de que o mutante D268A/269A exibiu um padrão de fluorescência semelhante ao D268A, com um K_D de 2,35 µM, indica que a mutação em ambos os resíduos resultou em uma afinidade alterada com o Ca^{2+}, em comparação com a CaMCA íntegra. Isso é um indicativo de que as mutações nos resíduos de aspartato afetam a interação da proteína com o Ca^{2+} em ambos os sítios de ligação, tanto o de alta afinidade (K_{D1}) quanto o de baixa afinidade (K_{D2}).

A diminuição dos valores de K_{D1} (alta afinidade) em todos os mutantes indica que as mutações aumentaram a afinidade da proteína com o Ca^{2+} em comparação com a CaMCA íntegra. Isso pode ser resultado de mudanças conformacionais induzidas pelas mutações que tornam os sítios de ligação de Ca^{2+} mais acessíveis ou aumentam a afinidade da proteína com o íon.

Por outro lado, a perda dos valores de K_{D2} (baixa afinidade) indica que as mutações reduziram a capacidade da proteína de interagir com o Ca^{2+} em concentrações mais elevadas. Isso indica que as mutações nos resíduos de aspartato podem afetar negativamente a interação da proteína com o Ca^{2+} em seu sítio de ligação de baixa afinidade, possivelmente devido a alterações conformacionais que comprometem a eficácia dessa interação.

Esses resultados corroboram com os dados de processamento que destacaram a importância dos resíduos do sítio de ligação do Ca^{2+} na regulação da ativação e autoprocessamento da CaMCA. Mostramos que a alteração em um único resíduo desse sítio de ligação do afeta significativamente a capacidade da proteína de reconhecer e responder aos sinais de Ca^{2+}, diminuído sua capacidade de ativação de autoprocessamento.

Os resultados obtidos para os mutantes da CaMCA-ΔN86 quando comparado com os da CaMCA-ΔN86 selvagem revelam diferenças significativas nos padrões de fluorescência intrínseca em resposta a adição de Ca^{2+} e nos valores de K_D, o que indica que as mutações nos resíduos de aspartato afetaram a interação da proteína com o cálcio de maneira distinta.

Primeiramente, enquanto os mutantes D268A, D269A, D252A, D299A e D268/269A exibiram mudanças mais complexas na fluorescência intrínseca em resposta a adição de Ca^{2+}, a forma selvagem da CaMCA-ΔN86 mostrou uma diminuição progressiva na intensidade da fluorescência à medida que aumentava a concentração de $CaCl_2$. Isso indica que a presença de mutações no sítio de ligação do Ca^{2+} altera a dinâmica de interação da proteína com o cálcio, resultando em um padrão de fluorescência intrínseca diferente.

Também observamos que os mutantes D268A, D269A, D252A e D299A apresentaram somente K_{D1} (constante de dissociação para o sítio de alta afinidade) e não apresentam valores de K_{D2} (constante de dissociação para o sítio de baixa afinidade), enquanto a CaMCA-ΔN86 exibe o oposto, este fato evidencia diferenças importantes na dinâmica de interação da proteína com o Ca^{2+} na presença e ausência das mutações, indicando que essas mutações afetaram a afinidade da proteína com o Ca^{2+} no sítio de alta afinidade. Isso pode indicar uma alteração na conformação da proteína que favorece uma interação mais forte e específica com o Ca^{2+} nesse sítio, enquanto o sítio de baixa afinidade pode não ser tão acessível ou sensível a essas mudanças conformacionais.

O sítio de cálcio é fundamental para a atividade das metacaspases, que são uma família de proteases envolvidas na regulação da morte celular programada em organismos unicelulares (MADEO *et al.,* 2000; TSIATSIANE *et al.,* 2011). No que diz respeito a ativação enzimática, a ligação de íons de Ca^{2+} ao sítio específico na proteína pode induzir uma mudança conformacional que ativa a enzima, permitindo que ela desempenhe seu papel na cascata de eventos que leva à morte celular programada (MCLUSKEY *et al.,* 2012; WONG *et al.,* 2012; PISZCZEK *et al.,* 2012; CONCHOU *et al.,* 2022). Contudo, os resultados indicam que, apesar dos resíduos de Asp^{268}, Asp^{269}, Asp^{252} e Asp^{299} serem importantes para a ligação do Ca^{2+}, não são críticos para a maturação inicial do zimogênio, uma vez que ainda sofrem o primeiro processamento.

A identidade específica dos resíduos no sítio de Ca^{2+} é fundamental para a interação com o íon. Resíduos como ácidos carboxílicos (por exemplo, aspartato) geralmente desempenham papéis cruciais na coordenação dos íons de Ca^{2+}, formando ligações iônicas e contribuindo para a estabilidade do complexo. Modificações nestes resíduos podem ter induzido alterações estruturais na CaMCA. Essas mudanças estruturais podem ter afetado a acessibilidade do sítio ativo, a

interação com substratos e, consequentemente, a eficácia catalítica da protease (LEHNINGER, NELSON & COX, 2019).

A substituição do aspartato por alanina, pode resultar na perda da capacidade de coordenar o Ca^{2+} de maneira eficaz, impactando a estabilidade e a conformação do sítio de cálcio. A alanina é um aminoácido pequeno, enquanto o ácido aspártico é polar e carregado negativamente. Essa substituição pode causar mudanças significativas na estrutura local do sítio de cálcio, influenciando a forma como a CaMCA interage com o íon de cálcio (LEHNINGER, NELSON & COX, 2019).

As características bioquímicas distintas da alanina e aspartato, essas diferenças têm implicações importantes nas propriedades das proteínas e nas interações moleculares em que participam. A alanina é classificada como um aminoácido alifático não polar, enquanto o aspartato é classificado como um aminoácido ácido (LEHNINGER, NELSON & COX, 2019). Essa diferença na natureza química tem implicações diretas na carga elétrica e nas interações moleculares. Outro fator importante é que o grupo carboxilato do aspartato pode participar de ligações iônicas e de hidrogênio, permitindo interações específicas em proteínas, enquanto a alanina, não participa ativamente dessas interações específicas. Cabe ressaltar que o aspartato pode ser crítico em sítios de ligação de cofatores, como íons metálicos e a alanina, não forma interações específicas com íons metálicos e não desempenha um papel direto nesse contexto (LEHNINGER, NELSON & COX, 2019).

Nossos dados indicam que a substituição do aspartato (resíduo de aminoácido carregado negativamente devido ao seu grupo carboxila e sua carga negativa, o que facilita a interação e a coordenação com íons de cálcio, que possuem carga positiva) pela alanina (aminoácido apolar e não carregado, e por não ter carga, a alanina não é tão eficaz quanto o aspartato na coordenação direta de íons de cálcio por meio de ligações iônicas) (LEHNINGER, NELSON & COX, 2018) originou uma proteína com uma menor capacidade de formar o complexo enzima/substrato (ES), evidenciado pela diminuição na velocidade de processamento desses mutantes. Dado dos resultados de processamento e fluorescência intrínseca, é muito provável que a CaMCA tenha sofrido alteração em sua capacidade de interagir eficientemente com o Ca^{2+}, uma vez que essa substituição pode resultar em uma menor afinidade ou eficácia na coordenação de íons de cálcio.

A observação do autoprocessamento após a adição de Ca^{2+} em mutantes específicos (D252, D269A e D268/269A) indica que essas mutações não impedem

completamente a ativação da CaMCA. Pode-se inferir que o processamento é uma característica intrínseca e intermolecular da CaMCA, mesmo na presença de mutações nos sítios de ligação do Ca^{2+}.

No que diz respeito a atividade das metacaspases, a presença de Ca^{2+} no sítio ativo modula a atividade. A ausência ou presença de Ca^{2+} em condições diferentes das ideais pode inibir ou ativar as metacaspases, influenciando assim a resposta celular (MCLUSKEY *et al.,* 2012; WONG *et al.,* 2012; PISZCZEK *et al.,* 2012). Além disso, o sítio de Ca^{2+} também pode ser crucial para a interação das metacaspases com seus substratos específicos. A presença de Ca^{2+} pode facilitar a ligação da metacaspase aos substratos-alvo, promovendo a clivagem proteolítica e, assim, desencadeando a morte celular programada (MCLUSKEY *et al.,* 2012; WONG *et al.,* 2012; CONCHOU *et al.,* 2022).

A comparação entre a CaMCA-ΔN86, a qual o N-terminal foi removido, e a CaMCA íntegra em relação aos resíduos do sítio de ligação do Ca^{2+} revela diferenças significativas nos padrões de processamento e sensibilidade ao cálcio. A diferença na resposta ao cálcio entre a CaMCA-ΔN86 e a CaMCA íntegra indica a influência do N-terminal no processo de clivagem. A remoção do N-terminal na CaMCA-ΔN86 pode ter exposto sítios de clivagem relevantes ou modificado a conformação da proteína, resultando em uma resposta diferente a presença de cálcio.

6. CONCLUSÃO

As alterações na estrutura e função da metacaspase de *Candida albicans* (CaMCA), como a deleção do N-terminal e mutações nos aspartatos do sítio de cálcio, revelaram informações importantes sobre como a atividade enzimática e o processo de autoprocessamento da CaMCA são controlados.

Inicialmente, observamos que a CaMCA selvagem sofre autoprocessamento, gerando fragmentos de ~55 e ~45 KDa após a purificação. Esse primeiro processamento ocorreu no C-terminal e foi detectado apenas na forma processada por *Western blotting*. A presença de cálcio influencia significativamente no autoprocessamento, levando a formação de um fragmento adicional de ~30 KDa após 72 horas de incubação com 5 mM de $CaCl_2$. Além disso, a análise da fluorescência intrínseca revelou dois pontos de inflexão, indicando uma alta afinidade (7 µM) e uma baixa afinidade (9,3 mM) para o cálcio.

Ao investigarmos as deleções no N-terminal da CaMCA encontramos desafios de autodegradação após a purificação, o que inviabilizou a caracterização da forma truncada CaMCA-ΔN115. Contudo, uma construção subsequente com deleção de 86 aminoácidos (CaMCA-ΔN86) apresentou autoprocessamento, gerando fragmentos de 43 e 33 KDa e observamos a influência do cálcio, especialmente em concentrações elevadas, na maturação e ativação da enzima. A diferença na resposta ao cálcio entre a CaMCA-ΔN86 e a CaMCA íntegra indicou uma influência do N-terminal no processo de clivagem. A remoção do N-terminal na CaMCA-ΔN86 pode ter exposto sítios de clivagem relevantes ou modificado a conformação da proteína, resultando em uma resposta diferente a presença de cálcio

Os mutantes da CaMCA revelaram respostas distintas ao cálcio. O mutante D252A mostrou ativação após 96 horas de incubação, enquanto os mutantes D268A, D299A e D268/269A não demonstraram efeito do cálcio. Os mutantes da CaMCA-Δ86 também exibiram padrões diferentes de processamento em resposta ao cálcio. O mutante D252A demonstrou processamento imediato com 10 e 15 mM de cálcio e em todas as concentrações após 72 horas, enquanto o mutante D269A apresentou processamento inicial com 15 mM de cálcio, mantendo-se em todas as concentrações após 72 horas. Os mutantes D268A e D299A não mostraram processamento, enquanto o mutante D268/269A assemelhou-se ao D269A após 72 horas.

Além disso, íons bivalentes como bário, manganês e magnésio foram capazes de ativar a CaMCA de forma semelhante ao cálcio, embora menos eficientemente. A construção dos mutantes D268/299A, motivada por resultados anteriores, revelou processamento após 48 horas de incubação com cálcio.

Nossos resultados destacam a complexa regulação da CaMCA pela presença de cálcio e pela estrutura da proteína, incluindo o N-terminal e os sítios de ligação do cálcio. O autoprocessamento da CaMCA, influenciado pelo cálcio, é um processo chave que afeta sua atividade enzimática. Observamos respostas diferenciadas entre os mutantes, indicando uma interação entre os resíduos específicos e o cálcio. Além disso, a capacidade de íons bivalentes alternativos ativarem a CaMCA ressalta a complexidade da regulação dessa enzima.

REFERÊNCIAS

ACOSTA-MASPONS, A.; SEPÚLVEDA-GARCÍA, E.; SÁNCHEZ-BALDOQUÍN, L.; MARRERO-GUTIÉRREZ, J.; PONS, T.; ROCHA-SOSA, M.; GONZÁLEZ, L. Two aspartate residues at the putative p10 subunit of a type II metacaspase from Nicotiana tabacum L. may contribute to the substrate-binding pocKet. **Planta**, v. 239, p. 147-160, 2014.

ALBRECHT, A.; FELK, A.; PICHOVA, I.; NAGLIK, J. R.; SCHALLER, M.; DE GROOT, P.; MACCALLUM, D.; ODDS, F. C.; SCHÄFER, W.; KLIS, F.; MONOD, M.; HUBE, B. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 2, p. 688-694, 2006.

ALFOUZAN, W.; AHMAD, S.; DHAR, R.; ASADZADEH, M.; ALMERDASI, N.; ABDO, N. M.; JOSEPH, L.; DE GROOT, T.; ALALI, W. Q.; KHAN, Z.; MEIS, J. F.; AL-RASHIDI, M. R. Molecular Epidemiology of *Candida* Auris OutbreaK in a Major Secondary-Care Hospital in Kuwait, **Journal of Fungi (Basel)**, v. 6, n. 4, p. 307, 2020.

ALLEN, D.; WILSON, D.; DREW, R.; PERFECT, J. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 6, p. 787-798, 2015.

ALVES, R.; MOTA, S.; SILVA, S. F.; RODRIGUES, C. P. BROWN, A. J.; HENRIQUES, M.; CASAL, M.; PAIVA, S. The carboxylic acid transporters Jen1 and Jen2 affect the architecture and fluconazole susceptibility of *Candida albicans* biofilm in the presence of lactate. **Biofouling**, v. 33, n. 10, p. 943-954, 2017.

AMBIT, A.; FASEL, N.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. An essential role for the Leishmania major metacaspase in cell cycle progression. **Cell Death & Differentiation,** v. 15, n. 1, p. 113-122, 2008.

ANDERSON, T. M.; CLAY, M. C.; CIOFFI, A. G.; DIAZ, K. A.; HISAO, G. S.; TUTTLE, M. D.; NIEUWKOOP, A. J.; COMELLAS, G.; MARYUM, N.; WANG, S.; UNO, B. E.; WILDEMAN, E. L.; GONEN, T.; RIENSTRA, C. M.; BURKE, M. D. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 5, p. 400-406, 2014.

ANDES, D. R.; SAFDAR, N.; BADDLEY, J. W.; PLAYFORD, G.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; SOBEL, J. D.; PAPPAS, P. G.; KULLBERG, B. J. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials, **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 8, p. 1110–1122, 2012.

ANTIKAINEN, N. M.; MARTIN, S. F. Altering protein specificity: techniques and applications. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2701-2716, 2005.
ARAVIND, L.; KOONIN, E. V. Classification of the Caspase–Hemoglobinase Fold: Detection of New Families and Implications for the Origin of the EuKaryotic Separins. **Proteins**, v. 46, p. 355 – 367, 2002.

ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. **Journal of Infectious Diseases,** v. 216, n. supl. 3, p. S445-S451, 2017.

ARGILA, A. ClarK. Allostery, Caspase, and Conformational Selection. Chemical Reviews, v. 116, p. 6666-6706, 2016.

ARHEL, N.; KIRCHHOFF, F. Host proteins involved in HIV infection: new therapeutic targets. **Biochimica et Biophysica Acta,** v. 1802, n. 3, p. 313-321, 2010.

ARORA, V. Mucormycosis – the blacK fungus, **Journal of Cardiology and Cardiovascular Research**, v. 2, n. 2, p. 25, 2021.

ASANOV, A. N.; MCDONALD, H. M.; OLDHAM, P. B.; JEDRZEJAS, M. J.; WILSON, W. W. Intrinsic fluorescence as a potential rapid scoring tool for protein crystals. **Journal of Crystal Growth**, v. 232, n. 1-4, p. 603-609, 2001.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V. M. Death receptors: Signaling and modulation. **Science**, v. 281 n. 1, p. 1305–1308, 1998.

ATKINSON, H. J.; BABBITT, P. C.; SAJID, M. The global cysteine peptidase landscape in parasites. **Trends in Parasitology,** v. 25, n. 12, p. 573-581, 2009.
BALAKIREVA, A. V.; ZAMYATNIN, A.A. Cutting Out the Gaps Between Proteases and Programmed Cell Death. **Frontiers in Plant Science,** v. 10, n. 704, 2019.

BARCINSKI, M. A.; SCHECHTMAN, D.; QUINTAO, L. G.; COSTA, D.; SOARES, L. R., MOREIRA, M. E.; CHARLAB, R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the infectivity of Leishmania amazonensis by protecting promastigotes from heat-induced death. **Infection and immunity**, v. 60, p. 9, p. 3523–3527, 1992.

BARTH, H. G.; CHRISTIAN, J. B.; BOYES, B. E. Size Exclusion Chromatography. **Analytical Chemistry,** v. 66, n. 12, p. 595-620, 1994

BELENGHI, B.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; VERCAMMEN, D.; BRACKENIER, A.; INZÉ, D.; DELLEDONNE, M.; VAN BREUSEGEM, F. Metacaspase activity of Arabidopsis thaliana is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. **Journal of Biological Chemistry,** v. 282, n. 2, p. 1352-1358, 2007.

BELL, R. A. V.; MEGENEY, L. A. Evolution of caspase-mediated cell death and differentiation: twins separated at birth. **Cell Death & Differentiation**, v. 24, n. 8, p. 1359-1368, 2017.

BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology,** v. 18, n. 6, p. 319-331, 2020.

BESSETTE, P. H.; ÅSLUND, F.; BECKWITH, J.; GEORGIOU, G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 6, p. 2252-2257, 2019.

BONGOMIN F, GAGO S, OLADELE RO, DENNING DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **Journal of Fungi,** v. 3, n. 4, p. 57, 2017.
BORTNER, C. D.; OLDENBURG, N. B.; CIDLOWSKI, J. A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. **Trends Cell Biology**, v. 5, n. 1, p. 5-21, 1995.
BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall, **Bioessays**, v. 28, p. 799–808, 2006.

BOZHKOV, P. V.; SUAREZ, M. F.; FILONOVA, L. H.; DANIEL, G.; ZAMYATNIN, A. A.; JR, RODRIGUEZ-NIETO, S. Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 102, n. 40, p. 14463 – 14468, 2005.

BOZHKOV, P. V.; SUAREZ, M. F.; FILONOVA, L. H.; DANIEL, G.; ZAMYATNIN, A. A. JR.; RODRIGUEZ-NIETO, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; SMERTENKO, A. Cysteine protease mcII-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 102, n. 40, p. 14463-14468, 2005.

BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. QUÍMICA GERAL E INORGÂNICA. EDITORA LTC.; MACHADO, A. R.; SILVA, A. B.; OLIVEIRA, D. E. Autoprocessing and self-degradation of recombinant proteins during purification: a review, **Protein Science**, v. 27, n. 5, p. 845-856, 2018.

BRAMAN, J.; PAPWORTH, C.; GREENER, A. Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. **Methods in Molecular Biology,** v. 57, n. 1, p. 31-44, 1996.

BRATTON, D. L.; FADOK, V. A.; RICHTER, D. A.; KAILEY, J. M.; GUTHRIE, L. A.; HENSON, P. M. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. **Journal of Biological Chemistry,** v. 272, n. 42, p. 26159-26165, 1997.

BREUEL, K. F.; KOUGIAS, P.; RICE, P. J.; WEI, D.; DE PONTI, K.; WANG, J.; LAFFAN, J. J.; LI, C.; KALBFLEISCH, J.; WILLIAMS, D. L. Anterior pituitary cells express pattern recognition receptors for fungal glucans: implications for neuroendocrine immune involvement in response to fungal infections, **Neuroimmunomodulation**, v. 11, p. 1–9, 2004.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A.; LEVITZ SM, NETEA MG, WHITE TC. Hidden Killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13, 2012.

BÜTTNER, S.; EISENBERG, T.; HERKER, E.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; KROEMER, G.; MADEO, F. Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war. **The Journal of cell biology**, v. 175, n. 4, p. 521–525, 2006.

CAIRES, A. L.; COSTA, L.; FERNANDES, J. A close analysis of metal-enhanced fluorescence of tryptophan induced by silver nanoparticles: wavelength emission dependence. **Central European Journal of Chemistry,** v. 11, n. 1, p. 111-115, 2013.

CAO, Y. Y.; CAO, Y. B.; XU, Z.; YING, K.; LI, Y.; XIE, Y.; ZHU, Z. Y.; CHEN, W. S.; JIANG, Y. Y. cDNA microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 584–589, 2005.

CAO, Y.; HUANG, S.; DAI, B.; ZHU, Z.; LU, H.; DONG, L.; CAO, Y.; WANG, Y.; GAO, P.; CHAI, Y.; JIANG, Y. *Candida albicans* cells lacKing CaMCA1-encoded metacaspase show resistance to oxidative stress-induced death and change in energy metabolism. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, n. 2, p. 183-189, 2009.
CARMONA-GUTIERREZ, D.; FRÖHLICH, K-U.; KROEMER, G.; MADEO, F. Metacaspases are caspases. Doubt no more. Cell Death Diff 2010; 17: 377–378.

CASANOVA, M.; GONZALEZ, IJ.; SPRISSLER, C.; ZALILA, H.; DACHER, M.; BASMACIYAN, L.; SPÄTH, GF.; AZAS, N.; FASEL, N. "mplication of different domains of the Leishmania major metacaspase in cell death and autophagy, **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 12, p. e2030, 2015.

CHAO, R.; YUAN, Y.; ZHAO, H. Recent advances in DNA assembly technologies. **FEMS Yeast Research,** v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.

CHEN, H.; ZHOU, X.; REN, B.; CHENG, L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*, **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 337–348, 2020.

CHEN, X.; WU, J.; SUN, L.; NIE, J.; SU, S.; SUN, S. Antifungal Effects and Potential Mechanisms of Benserazide Hydrochloride Alone and in Combination with Fluconazole Against *Candida albicans*. **Drug Design, Development and Therapy,** v. 15, n. 1, p. 4701-4711, 2021.

CHENG, T. C.; HONG, C.; AKEY, I. V.; YUAN, S.; AKEY, C. W. A near atomic structure of the active human apoptosome. **eLife**, v. 5, e17755, 2016.

CHOI, J.; KIM, S.-H. A genome tree of life for the fungi Kingdom, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 35, p. 9391–9396, 2017.

CHOWDHARY, A.; PRAKASH, A.; SHARMA, C.; KORDALEWSKA, M.; KUMAR, A.; SARMA, S.; TARAI, B.; SINGH, A.; UPADHYAYA, G.; UPADHYAY, S.; YADAV, P.; SINGH, P. K.; KHILLAN, V.; SACHDEVA, N.; PERLIN, D. S.; MEIS, J. F. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida* auris isolates (2009-17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 73, n. 4. P. 81-899, 2018.

CITIULO, F.; JACOBSEN, I. D.; MIRAMÓN, P.; SCHILD, L.; BRUNKE, S.; ZIPFEL, P.; BROCK, M.; HUBE, B.; WILSON, D. *Candida albicans* scavenges host zinc via Pra1 during endothelial invasion. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 6, p. e1002777, 2012.

COLABARDINI, A. C.; DE CASTRO, P. A.; DE GOUVEA, P. F.; SAVOLDI, M.; MALAVAZI, I.; GOLDMAN, M. H.; GOLDMAN, G. H. Involvement of the Aspergillus nidulans protein Kinase C with farnesol tolerance is related to the unfolded protein response. **Molecular Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1259-79, 2010.

COLEMAN, J. J.; MYLONAKIS, E. Efflux in fungi: la pièce de résistance. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 6, p. e1000486, 2009.

COLL, N. S.; VERCAMMEN, D.; SMIDLER, A.; CLOVER, C. Van Breusegem, F.; Dangl, J.L.; Epple, P. Arabidopsis type I metacaspases control cell death. **Science**, v. 330, p. 1393-1397, 2010.

CONCHOU, L.; DOUMÈCHE, B.; GALISSON, F.; VIOLOT, S.; DUGELAY, C.; DIESIS, E.; PAGE, A.; BIENVENU, A.; PICOT, S.; AGHAJARI, N.; BALLUT, L. Structural and molecular determinants of *Candida glabrata* metacaspase maturation and activation by calcium. **Communications Biology**, v. 5, p. 1158, 2022.

CORNELY, O. A.; BASSETTI, M.; CALANDRA, T.; GARBINO, J.; KULLBERG, B. J.; LORTHOLARY, O.; MEERSSEMAN, W.; AKOVA, M.; ARENDRUP, M. C.; ARIKAN-AKDAGLI, S.; BILLE, J.; CASTAGNOLA, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DONNELLY, J. P.; GROLL, A. H.; HERBRECHT, R.; HOPE, W. W.; JENSEN, H. E.; LASS-FLÖRL, C.; PETRIKKOS, G.; RICHARDSON, M. D.; ROILIDES, E.; VERWEIJ, P. E.; VISCOLI, C.; ULLMANN, A. J.; ESCMID FUNGAL INFECTION STUDY GROUP. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p, 19-37, 2012.

COURTOIS-MOREAU, C. L.; PESQUET, E.; SJODIN, A.; MUNIZ, L.; BOLLHONER, B.; KANEDA, M. A unique program for cell death in xylem fibers of Populus stem. **The Plant Journal**, v. 58, n. 2, p. 260 – 274, 2009.

COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, drugs, and evolution: The role of cellular signaling in fungal drug resistance. **EuKaryotic Cell**, v. 7, n. 5, p. 747-764, 2008.

CRUZ, M. C.; GOLDSTEIN, A. L.; BLANKENSHIP, J. R.; DEL POETA, M.; DAVIS, D.; CARDENAS M. E. Perfect JR, McCusKer JH, Heitman J. Calcineurin is essential for survival during membrane stress in *Candida albicans*. **EMBO**, v. 21, n. 4, p. 546-549, 2002.

CUTLER, J. E. N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*, **Medical Mycology**, v. 39, **Supplement 1**, p. 75–86, 2001.

DAI, B. D.; CAO, Y. Y.; HUANG, S.; XU, Y. G.; GAO, P. H.; WANG, Y.; JIANG, Y. Y. Baicalein induces programmed cell death in *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology,** v. 19, n. 8, p. 803-809, 2009.

DAI, B.; WANG, Y.; LI, D.; XU, Y.; LIANG, R.; ZHAO, L. Hsp90 is involved in apoptosis of *Candida albicans* by regulating the calcineurin-caspase apoptotic pathway. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45109, 2012.

DAI, B.; WANG, Y.; LI, D.; XU, Y.; LIANG, R.; ZHAO, L.; CAO, Y.; JIA, J.; JIANG, Y. Hsp90 is involved in apoptosis of *Candida albicans* by regulating the calcineurin-caspase apoptotic pathway. **PLoS One,** v. 7, n. 9, p. e45109, 2012.

DALZOTO, L. A. M.; TRUJILHO, M. N. R.; SANTOS, T. D. R.; COSTA, J. P. M. S.; DUARTE, A. C. M.; JUDICE, W. A. S.; MARCONDES, M. F.; MACHADO, M. F. M. Metacaspase of *Saccharomyces cerevisiae* (ScMCA-Ia) presents different catalytic cysteine in a processed and non-processed form. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 687, p. 149185, 2023.

de GROOT, P. W.; BADER, O.; de BOER, A. D.; WEIG, M.; CHAUHAN, N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of sticK. **EuKaryotic Cell,** v. 12, n. 4, p. 480-481, 2013.

DE LA CAMPA, A. G.; SPRINGHORN, S. S.; KALE, P.; LACKS, S. A. Proteins encoded by the DpnI restriction gene cassette. Hyperproduction and characterization of the DpnI endonuclease. **Journal of Biological Chemistry,** v. 263, n. 29, p. 14696-14706, 1988.

D'ENFERT, C.; KAUNE, A. K.; ALABAN, L. R.; CHAKRABORTY, S.; COLE, N.; DELAVY, M.; KOSMALA, D.; MARSAUX, B.; FRÓIS-MARTINS, R.; MORELLI, M.; ROSATI, D.; VALENTINE, M.; XIE, Z.; EMRITLOLL, Y.; WARN, P. A.; BEQUET, F.; BOUGNOUX, M. E.; BORNES, S.; GRESNIGT, M. S.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D.; LEGRAND, M.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; MANICHANH, C.; MUNRO, C. A.; NETEA , M. G.; QUEIROZ, K.; ROGET, K.; THOMAS, V.; THORAL, C.; VAN DEN ABBEELE, P.; WALKER, A. W.; BROWN, A. J. P. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current Knowledge and new perspectives. **Federation of European Microbiological Societies,** v. 45, n. 3, p. fuaa060, 2021.

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet**, v. 362, n. 9390, p. 1142-1151, 2003.

DIEKEMA, D.; ARBEFEVILLE, S.; BOYKEN, L.; KROEGER, J.; PFALLER, M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease,** v. 73, n. 1, p. 45-48, 2012.

DONEHOWER LA, BRADLEY A. The tumor suppressor p53. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1155, n. 2, p. 181-205, 1993.

DOUGLAS, C. M. Fungal β (1,3)-D-glucan synthesis, **Medical Mycology**, v. 39, **Supplement 1**, p. 55–66, 2001.

DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation, **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 13, p. 6127-6145, 1988.

DUNKEL, N.; BLASS, J.; ROGERS, P. D.; MORSCHHÄUSER, J. Mutations in the multi-drug resistance regulator MRR1, followed by loss of heterozygosity, are the main cause of MDR1 overexpression in fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 827-840, 2008.

EDELHEIT, O.; HANUKOGLU, A.; HONUKOGLU, I. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. **BioMed Central Biotechnology**, n. 61, p. 1-8, 2009.

EFTINK, M. R. Intrinsic fluorescence of proteins. In: LaKowicz, J. R. (Ed.). Topics in Fluorescence Spectroscopy (Vol. 6, pp. 1-23). **Springer, Boston**, 2002.

ELIEH-ALI-KOMI, D.; HAMBLIN, M. R. Chitin, and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials, **International Journal of Advanced Research**, v. 4, n. 3, p. 411-427, 2016.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology,** v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ERHARDT, M.; WEGRZYN, R.; DEUERLING, E. Extra N-terminal residues have a profound effect on the aggregation properties of the potencial yeast prion protein Mca1. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9929, 2010.

EYSSEN, L. E. A.; COETZER, T. H. T. Expression, purification, and characterisation of Trypanosoma congolense metacaspase 5 (TcoMCA5) - a potential drug target for animal African trypanosomiasis. Protein **Expression and Purification**, v. 164, p. 105465, 2019.

EYSSEN, L. E-A.; COETZER, T. H. T. Expression, purification, and characterisation of Trypanosoma congolense metacaspase 5 (TcoMCA5) - a potential drug target for animal African trypanosomiasis. **Protein Expression and Purification**, v. 164, p. 105465, 2019.

FANG, W.; WU, J.; CHENG, M.; ZHU, X.; DU, M.; CHEN, C.; LIAO, W.; ZHI, K.; PAN, W. Diagnosis of invasive fungal infections: challenges and recent developments, **Journal of Biomedical Science**, v. 30, n. 1, p. 42, 2023.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLOS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.

FERNANDEZ, J.; LOPEZ, V.; KINCH, L.; PFEIFER, M. A.; GRAY, H.; GARCIA, N.; GRISHIN, N. V.; KHANG, C. H.; ORTH, K. Role of Two Metacaspases in Development and Pathogenicity of the Rice Blast Fungus Magnaporthe oryzae. **American Society for Microbiology,** v. 9, n. 12, p. e03471, 2021.

FILLER, S. G.; SWERDLOFF, J. N.; HOBBS, C.; LUCKETT, P. M. Penetration, and damage of endothelial cells by *Candida albicans*, **Infect Immun**, v. 63, n. 3, p. 976-983, 1995.

FINDLEY, K.; AH, J.; YANG, J.; CONLAN, S.; DEMING, C.; MEYER, J. A.; SCHOENFELD, D.; NOMICOS, E.; MORGAN, P.; KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human sKin. **Nature,** v. 498, n. 1, p. 367-370, 2013.
FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant, and ecosystem health. **Nature,** v. 484, n. 7393, p. 186-194, 2012.

FLEET, G. H. CELL WALLS. IN: ROSE, A. H.; HARRISON, F. D. The Yeasts, vol. 4, p. 199–277. **Academic Press**, New YorK, NY, 1991.

FOTHERGILL, A. W.; SUTTON, D. A.; MCCARTHY, D. I.; WIEDERHOLD, N. P. Impact of new antifungal breaKpoints on antifungal resistance in *Candida* species. Journal of Clinical Microbiology, v. 52, n. 3, p. 994-997, 2014.

FRADIN, C.; DE GROOT, P.; MACCALLUM, D.; SCHALLER, M.; KLIS, F.; ODDS, F. C.; HUBE, B. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology, and proliferation of *Candida albicans* in human blood, **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 397–415, 2005.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; TROJEL-HANSEN, C.; KROEMER, G. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. **Circulation Research**, v. 111, n. 10, p. 1198–1207, 2012.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; ABRAMS, J. M.; ADAM, D.; AGOSTINIS, P.; ALNEMRI, E. S.; ALTUCCI, L.; AMELIO, I.; ANDREWS, D. W.; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M.; ANTONOV, A. V.; ARAMA, E.; BAEHRECKE, E. H.; BARLEV, N. A.; BAZAN, N. G.; BERNASSOLA, F.; BERTRAND, M. J. M.; BIANCHI, K.; BLAGOSKLONNY, M. V.; BLOMGREN, K.; BORNER, C.; BOYA, P.; BRENNER, C.; CAMPANELLA, M.; CANDI, E.; CARMONA-GUTIERREZ, D.; CECCONI, F.; CHAN, F. K.; CHANDEL, N. S.; CHENG, E. H.; CHIPUK, J. E.; CIDLOWSKI, J. A.; CIECHANOVER, A.; COHEN, G. M.; CONRAD, M.; CUBILLOS-RUIZ, J. R.; CZABOTAR, P. E.; D'ANGIOLELLA, V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; DE LAURENZI, V.; DE MARIA, R.; DEBATIN, K. M.; DEBERARDINIS, R. J.; DESHMUKH, M.; DI DANIELE, N.; DI VIRGILIO, F.; DIXIT, V. M.; DIXON, S. J.; DUCKETT, C. S.; DYNLACHT, B. D.; EL-DEIRY, W. S.; ELROD, J. W.; FIMIA, G. M.; FULDA, .; GARCÍA-SÁEZ, A. J.; GARG, A. D.; GARRIDO, C.; GAVATHIOTIS, E.; GOLSTEIN, P.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; GREENE, L. A.; GRONEMEYER, H.; GROSS, A.; HAJNOCZKY, G.; HARDWICK, J. M.; HARRIS, I. S.; HENGARTNER, M. O.; HETZ, C.; ICHIJO, H.; JÄÄTTELÄ, M.; JOSEPH, B.; JOST, P. J.; JUIN, P. P.; KAISER, W. J.; KARIN, M.; KAUFMANN, T.; KEPP, O.; KIMCHI, A.; KITSIS, R. N.; KLIONSKY, D. J.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LEE, S. W.; LEMASTERS, J. J.; LEVINE, B.; LINKERMANN, A.; LIPTON, S. A.; LOCKSHIN, R. A.; LÓPEZ-OTÍN, C.; LOWE, S. W.; LUEDDE, T.; LUGLI, E.; MACFARLANE, M.; MADEO, F.; MALEWICZ, M.; MALORNI, W.; MANIC, G.; MARINE, J. C.; MARTIN, S. J.; MARTINOU, J. C.;

MEDEMA, J. P.; MEHLEN, P.; MEIER, P.; MELINO, S.; MIAO, E. A.; MOLKENTIN, J. D.; MOLL, U. M.; MUÑOZ-PINEDO, C.; NAGATA, S.; NUÑEZ, G.; OBERST, A.; OREN, M.; OVERHOLTZER, M.; PAGANO, M.; PANARETAKIS, T.; PASPARAKIS, M.; PENNINGER, J. M.; PEREIRA, D. M.; PERVAIZ, S.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; PINTON, P.; PREHN, J. H. M.; PUTHALAKATH, H.; RABINOVICH, G. A.; REHM, M.; RIZZUTO, R.; RODRIGUES, C. M. P.; RUBINSZTEIN, D. C.; RUDEL, T.; RYAN, K. M.; SAYAN, E.; SCORRANO, L.; SHAO, F.; SHI, Y.; SILKE, J.; SIMON, H. U.; SISTIGU, A.; STOCKWELL, B. R.; STRASSER, A.; SZABADKAI, G.; TAIT, S. W. G.; TANG, D.; TAVERNARAKIS, N.; THORBURN, A.; TSUJIMOTO, Y.; TURK, B.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P.; VANDER HEIDEN, M. G.; VILLUNGER, A.; VIRGIN, H. W.; VOUSDEN, K. H.; VUCIC, D.; WAGNER, E. F.; WALCZAK, H.; WALLACH, D.; WANG, Y.; WELLS, J. A.; WOOD, W.; YUAN, J.; ZAKERI, Z.; ZHIVOTOVSKY, B.; ZITVOGEL, L.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation,** v. 25, n. 3, p. 486 – 541, 2018.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLEIB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NÚÑEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.

GARCIA, M. C.; LEE, J. T.; RAMSOOK, C. B.; ALSTEENS, D.; DUFRÊNE, Y. F.; LIPKE, P. N. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17632, 2011.

GARCIA, N.; KALICHARAN, R. E.; KINCH, L.; FERNANDEZ, J. Regulating Death, and Disease: Exploring the Roles of Metacaspases in Plants and Fungi, **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 312, 2023.

GHISAIDOOBE, A. B.; CHUNG, S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 22518-22538, 2014.

GHISAIDOOBE, A. B.; CHUNG, S. J. Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 15, n. 12, p. 22518-22538, 2014.

GILIO, J. M.; MARCONDES, M. F.; FERRARI, D.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; OLIVEIRA, V.; MACHADO, M. F. Processing of metacaspase 2 from Trypanosoma brucei (TbMCA2) broadens its substrate specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alemanha, v. 1865, n. 4, p. 388-394, 2017.

GOKULSHANKAR, S.; BK, M. Covid-19 and blacK fungus, **Asian Journal of Medicine and Health Sciences**, v. 4, n. 1, p. 4, June 2021.

GONZALES, I. J.; DESPONDS, C.; SCHAFF, C.; MOTTRAM, J. C.; FASEL, N. Leishmania major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. **International Journal of Parasitology**, v. 37, p. 161–172, 2007.

GONZALEZ, I. J.; DESPONDS, C.; SCHAFF, C.; MOTTRAM, J. C.; FASEL, N. Leishmania major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. **International Journal for Parasitology,** v. 37, 2. 2, 9. 161-172, 2007.

GOPAL, J. G.; KUMAR, A. Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**, v. 32, p. 419-425, 2013.

GORTAT, A.; SANCHO, M.; MONDRAGÓN, L.; MESSEGUER, À.; PÉREZ-PAYÁ, E.; ORZÁEZ, M. Apaf1 inhibition promotes cell recovery from apoptosis. **Protein Cell,** v. 6, n. 12, p. 833–843, 2015.

GOW, N. A. R.; HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 406–412, 2012.

GOW, N. A. R.; LATGE, J. P.; MUNRO, C. A. The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. **Microbiology Spectrum,** v. 5, n. 3, 2017.

GREEN, D. R.; FITZGERALD, P. Just So Stories about the Evolution of Apoptosis. **Current Biology**, v. 26, n. 13, p. R620-R627, 2016.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, n. 5684, p. 626-629, 2004.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology,** v. 7, n. 12, p. a006080, 2015.

GREGORY, C. D.; DEVITT, A. The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? **Immunology,** v. 113, n. 1, p. 1-14, 2004.

GROENEVELD, M.; CATALÁN, N.; EINARSDOTTIR, K.; BRAVO, A. G.; KOTHAWALA, D. N. The influence of pH on dissolved organic matter fluorescence in inland waters, **Analytical Methods: Advancing Methods and Applications**, v. 14, n. 1, p. 312, 2022.

GUÉRIN, R.; BEAUREGARD, P. B.; LEROUX, A.; ROKEACH, L. A. Calnexin regulates apoptosis induced by inositol starvation in fission yeast. **PLoS ONE,** v. 4, n. 1, p. e6244, 2009.

HACKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research,** v. 301, n. 1, p. 5-17, 2000.

HAMANN, A.; BRUST, D.; OSIEWACZ, HD. Deletion of putative apoptosis factors leads to lifespan extension in the fungal ageing model Podospora anserina. **Molecular Microbiology,** v. 65, n. 4, p. 948-958, 2007.

HAMANN. A.; BRUST, D.; OSIEWACZ, H. D. Deletion of putative apoptosis factors leads to lifespan extension in the fungal ageing model Podospora anserina. **Molecular Microbiology,** v. 65, n. 4, p. 948-958, 2007.

HAN. J.; HOU, W.; GOLDSTEIN, L. A.; STOLZ, D. B.; WATKINS, S. C.; RABINOWICH, H. A complex between Atg7 and caspase-9A novel mechanism of cross-regulation between autophagy and apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n 10, p. 6485-6497, 2014.

HAO, B.; CHENG, S.; CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Caspofungin Kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 57, n. 1, p. 326-332, 2013.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited, **Mycological Research**, v. 105, p. 1422–1432, 2001.

HELMS, M. J.; AMBIT, A.; APPLETON, P.; TETLEY, L.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Bloodstream form Trypanosoma brucei depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes. **Journal of Cell Science,** v. 119, n. 6, p. 1105-1117, 2006.

HENGNARTER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HILL, S. M.; NYSTRÖ, M T. The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't Kill you maKes you stronger. **Bioessays,** v. 37, n. 5, p. 525–531, 2015.

HITOSHI, Y.; LORENS, J.; KITADA, SI.; FISHER, J.; LABARGE, M.; RING, H. Z.; FRANCKE, U.; REED, J. C.; KINOSHITA, S.; NOLAN, G. P. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. **Immunity**, v. 8, n. 1, p. 461–471, 1998.

HO, S. N.; HUNT, H. D; HORTON, R. M.; PULLEN, J. K.; PEASE, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene,** v. 77, n. 1, p. 51-59, 198.

HOBSON, R. P.; MUNRO, C. A.; BATES, S.; MACCALLUM, D. M.; CUTLER, J. E.; HEINSBROEK, S. E.; BROWN, G. D.; ODDS, F. C.; GOW, N. A. Loss of cell wall mannosylphosphate in *Candida albicans* does not influence macrophage recognition, **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 1, p. 39628–39635, 2004.

HOFFMANN, C.; DOLLIVE, S.; GRUNBERG, S.; CHEN, J.; LI, H.; WU, G. D.; LEWIS, J. D.; BUSHMAN, F. D. Archaea, and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. **PLoS One,** v. 8, n. 6, p. e6601, 2013.

HORISBERGER, M.; CLERC, M. F. Ultrastructural localization of anionic sites on the surface of yeast, hyphal and germ-tube forming cells of *Candida albicans*, **European Journal of Cell Biology**, v. 46, n. 1, p. 444–452, 1988.

HOYER, L. L.; COTA, E. *Candida albicans* Agglutinin-LiKe Sequence (Als) Family Vignettes: A Review of Als Protein Structure and Function. **Frontiers in Microbiology,** v. 7, n. 280, p. 1-16, 2016.

HWANG, C. S.; RHIE, G. E.; OH, J. H.; KIM, Y. H.; PARK, E. W.; KIM, D. H.; HA, S. C.; KANG, S. O. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. **Microbiology (Microbiol-Sgm)**, v. 148, p. 3705–3713, 2002.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer,** v. 2, p. 4, p. 277-288, 2002.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids, **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23-28, 1990.

IORIO, E.; TOROSANTUCCI, A.; BROMURO, C.; CHIANI, P.; FERRETTI, A.; GIANNINI, M.; CASSONE, A.; PODO, F. *Candida albicans* cell wall comprises a branched β-D-(1→6)-glucan, **Research in Microbiology**, v. 173, n. 3, 2022.

JABRA-RIZK, M. A.; KONG, E. F.; TSUI, C.; NGUYEN, M. H.; CLANCY, C. J.; FIDEL, P. L. J. R.; NOVERR, M. *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response FrameworK. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 10, p. 2724-2739 2016.

JACOBSN, I. D.; WILSON, D.; WÄCHTLER, B.; BRUNKE, S.; NAGLIK, J. R.; HUBE, B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Review of Anti-infective Therapy,** v. 10, n. 1, p. 85-93, 2012.

JENSEN RH, ASTVAD KM, SILVA LV, SANGLARD D, JØRGENSEN R, NIELSEN KF, MATHIASEN EG, DOROUDIAN G, PERLIN DS, ARENDRUP MC. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 70, n. 9, p. 2551-2555, 2015.

JENSEN-PERGAKES, K. L.; KENNEDY, M. A.; LEES, N. D.; BARBUCH, R.; KOEGEL, C.; BARD, M. Sequencing, disruption, and characterization of the *Candida albicans* sterol methyltransferase (ERG6) gene: drug susceptibility studies in erg6 mutants. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 5, p. 1160-1167, 1998.

JEONG, J. H.; LEE, S. E.; KIM, J. Mutational analysis of metacaspase CaMca1 and decapping activator Edc3 in the pathogenicity of *Candida albicans*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 97, p. 18-23, 2016.

JIA, B.; JEON, C.O. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. **Open Biology**, v. 6, n. 8, p. 1-17, 2016.

JIA, B.; JEON, C.O. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. **Open Biology**, v. 6, n. 8, p. 1-17, 2016.

JUVVADI, P. R.; LEE, S. C.; HEITMAN, J.; STEINBACH, W. J. Calcineurin in fungal virulence and drug resistance: Prospects for harnessing targeted inhibition of calcineurin for an antifungal therapeutic approach. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 186-197, 2017.

KACZANOWSKI, S.; SAJID, M.; REECE, S. E. Evolution of apoptosis-liKe programmed cell death in unicellular protozoan parasites. **Parasites & Vectors,** v. 4, n. 44, p. 1-8, 2011.

KANG, S. J.; WANG, S.; KUIDA, K.; YUAN, J. Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytoKine maturation during septic shocK response. **Cell Death Differentiation,** v. 9, n. 10, p. 1115-1125, 2002.

KANHAIYA, K.; CZEIZLER, E.; GRATIE, C.; PETRE, I. Controlling Directed Protein Interaction NetworKs in Cancer. **Scientific Reports,** v. 7, n. 1, p. 10327, 2017.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue Kinetics. **British Journal of Cancer,** v. 26, n. 4, p. 239-257. 1972.

KHAN, M. A.; CHOCK, P. B.; STADTMAN, E. R. KnocKout of caspase-liKe gene, YCA1, abrogates apoptosis and elevates oxidized proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 48, n. 104, p. 17326-17331, 2005.

KIM, S.; WOO, E. R.; LEE, D. G. Synergistic Antifungal Activity of Isoquercitrin: Apoptosis and Membrane Permeabilization Related to Reactive Oxygen Species in *Candida albicans*. **IUBMB Life,** v. 71, n. 2, p. 283-292, 2019.

KLEMENCIC, M.; FUNK, C. Type III metacaspases: calcium-dependent activity proposes new function for the p10 domain. **New Phytologist,** v. 218, n. 3, p. 1179–1191, 2017.

KLIS, F. M.; DE GROOT, P.; HELLINGWERF, K. Organização molecular da parede celular de *Candida albicans*, **Medical Mycology**, v. 39, **Supplement 1**, p. 1–8, 2001.

KOEHLER, P.; STECHER, M.; CORNELY, O. A.; KOEHLER, D.; VEHRESCHILD, M. J. G. T.; BOHLIUS, J.; WISPLINGHOFF, H.; VEHRESCHILD, J. J. Morbidity and mortality of *Candida*emia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection,** v. 25, n. 10, p. 1200-1212, 2019.

KÖHLER, J. R.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. The spectrum of fungi that infects humans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine,** v. 5, n. 1, p. a019273, 2014.

LADOKHIN, A. S.; JAYASINGHE, S.; WHITE, S. H. How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? **Analytical Biochemistry**, v. 285, n. 2, p. 235-245, 2000.

LAFAYETTE, S. L.; COLLINS, C.; ZAAS, A. K.; SCHELL, W. A.; BETANCOURT-QUIROZ, M.; GUNATILAKA, A. A.; PERFECT, J. R.; COWEN, L. E. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of MKc1, calcineurin, and Hsp90. **PLOS Pathogens,** v. 6, n. 8, p. e1001069, 2010.

LATGÉ, J. P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell, **Molecular Microbiology**, v. 66, p. 279–290, 2007.

LAVERRIÈRE, M.; CAZZULO, J. J.; ALVAREZ, V. E. Antagonic activities of Trypanosoma cruzi metacaspases affect the balance between cell proliferation, death, and differentiation. **Cell Death & Differentiation,** v. 19, n. 1, p. 1358-1369, 2012.

LEACH, M.D.; KLIPP, E.; COWEN, L.E.; SCHNEIDER, S.; KROM, B.P.; SANGLARD, D.; SCHÖCK, U.; MORSCHHÄUSER, J. Fungal Hsp90: a biological transistor that tunes cellular outputs to thermal inputs**. Nature Reviews Microbiology,** v. 10, n. 9, p. 693-704, 2012.

LEE, H.; HWANG, J. S.; LEE, D. G. Scolopendin, an antimicrobial peptide from centipede, attenuates mitochondrial functions and triggers apoptosis in *Candida albicans*, **Biochemical Journal**, v. 474, n. 5, p. 635-645, 2017.

LEE, J.; KIM, Y. G.; KIM, S.; LEE, Y. Phosphorylation of a recombinant protein in Escherichia coli mediated by bacterially expressed protein Kinase CK2α, **Journal of Biotechnology**, v. 300, p. 66-73, 2019.

LEE, J.; LEE, D. G. Novel antifungal mechanism of resveratrol: apoptosis inducer in *Candida albicans***. Current Microbiology,** v. 70, n. 3, p. 383-389, 2015.

LEE, N.; GANNAVARAM, S.; SELVAPANDIYAN, A.; DEBRABANT, A. Characterization of metacaspases with trypsin-liKe activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite Leishmania. **EuKaryot Cell**, v. 6, n. 61, p. 1745-57, 2007.

LEE, R. E. C.; BRUNETTE, S.; PUENTE, L. G.; MEGENEY, L. A. Metacaspase Yca1 is required for clearance of insoluble protein aggregates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 30, p. 13348-13353, 2010.

LEE, R. E.; PUENTE, L. G.; KAERN, M.; MEGENEY, L. A. A non-death role of the yeast metacaspase: Yca1p alters cell cycle dynamics. **PLoS One**, v. 3, p. e2956, 2008.

LEE, W.; LEE, D. G. Potential role of potassium and chloride channels in regulation of silymarin-induced apoptosis in *Candida albicans*, **IUBMB Life**, v. 70, n. 3, p. 197-206, 2018.

LEGER, T.; GARCIA, C.; OUNISSI, M.; LELANDAIS, G.; CAMADRO, J. M. The metacaspase (Mca1p) has a dual role in farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans*. **Molecular & Cellular Proteomics**. v. 14, n. 1, p. 93-108, 2015.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 8ª Edição, 2019. Ed. Artmed.

LIMBU, B.; SHAH, K.; WEINBERG, S. H.; DEO, M. Role of Cytosolic Calcium Diffusion in Murine Cardiac PurKinje Cells, **Clinical Medicine Insights: Cardiology**, v. 10, Suppl 1, p. 17-26, 2016.

LIU, Y.; FILLER, S. G. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. **EuKaryot Cell,** v. 10, n. 2, p. 168–173, 2011.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. TNF receptor superfamilies and TNF: integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 1, p. 487–501, 2001.
LOMONOSOVA, E.; CHINNADURAI, G. Bh3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. **Oncogene**, v. 27, n. S2, p. S2-S19, 2008.

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Patogênese e virulência de *Candida albicans*, **Virulência**, v. 13, n. 1, p. 89–121, 2022.

LORTHOLARY O, DESNOS-OLLIVIER M, SITBON K, FONTANET A, BRETAGNE S, DROMER F; FRENCH MYCOSIS STUDY GROUP. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 532-538, 2011.

LOW, C. P.; SHUI, G.; LIEW, L. P.; BUTTNER, S.; MADEO, F.; DAWES, I. W., WenK, M. R.; Yang, H. Caspase-dependent and –independent lipotoxic cell-death pathways in fission yeast. **Journal of Cell Science,** v. 121, n. 16, p. 2671-2684.

LU, H.; ZHU, Z.; DONG, L.; JIA, X.; SUN, X.; YAN, L.; CHAI, Y.; JIANG, Y.; CAO, Y. LacK of trehalose accelerates H2O2-induced *Candida albicans* apoptosis through regulating Ca2+ signaling pathway and caspase activity. **PLoS One,** v. 6, n. 1, p. e15808, 2011.

MACHADO, M. F.; MARCONDES, M. F.; JULIANO, M. A.; MCLUSKEY, K.; MOTTRAM, J. C.; MOSS, C. X.; JULIANO, L.; OLIVEIRA, V. Substrate specificity and the effect of calcium on Trypanosoma brucei metacaspase 2. **The FEBS Journal**, v. 280, n. 11, p. 2608-1621, 2013.

MACKENZIE, S.H; CLARK, A. C. Death by caspase dimerization. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 747, n. 54, p. 55-73, 2012.

MACKIE, J.; SZABO, E. K.; URGAST, D. S.; BALLOU, E. R.; CHILDERS, D. S.; MACCALLUM, D. M.; FELDMANN, J.; BROWN, A. J. Host-Imposed Copper Poisoning Impacts Fungal Micronutrient Acquisition during Systemic *Candida albicans* Infections. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0158683, 2016.

MACPHERSON S, AKACHE B, WEBER S, DE DEKEN X, RAYMOND M, TURCOTTE B. *Candida albicans* zinc cluster protein Upc2p confers resistance to antifungal drugs and is an activator of ergosterol biosynthetic genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v, 49, n. 5, p. 1745-1752, 2005.

MADEO, F.; FRÖHLICH, E.; FRÖHLICH, K. U. A yeast mutant showing diagnostic marKers of early and late apoptosis. **Journal of Cell Biology,** v. 139, n. 3, p. 729-734, 1997.

MADEO, F.; HERKER, E.; MALDENER, C.; WISSING, S.; LÄCHELT, S.; HERLAN, M.; FEHR, M.; LAUBER, K.; SIGRIST, S. J.; WESSELBORG, S.; FRÖHLICH, K. U. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. **Molecular Cell,** v. 9, n. 7, p. 911-917, 2002.

MAIDAN, M. M.; DE ROP, L.; SERNEELS, J.; EXLER, S.; RUPP, S.; TOURNU, H.; THEVELEIN, J. M.; VAN DIJCK, P. The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein Kinase A pathway to induce morphogenesis in *Candida albicans*. **Molecular Biology of the Cell,** v. 16, n. 4, p. 1971-1986, 2005.

MALCOLM, T. R.; CHIN-HONG, P. V. Micoses endêmicas em hospedeiros imunocomprometidos, **Current Infectious Disease Reports**, v. 15, n. 6, p. 536–543, 2013.

MASIÁ, C. M.; GUTIÉRREZ, R. F.; ORTIZ DE LA TABLA, D. V.; HERNÁNDEZ A. I.; MARTÍN, G. C.; SÁNCHEZ, S. A.; MARTÍN, H. A. Determinants for the development of oropharyngeal colonization or infection by fluconazole-resistant *Candida* strains in HIV-infected patients. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, v. 19, n. 8, p. 593-601, 2000.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence,** v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MCCALL, A. D.; PATHIRANA, R. U.; PRABHAKAR, A.; CULLEN, P. J.; EDGERTON M. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. **npj Biofilms Microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2019.

MCLUSKEY, K.; MOTTRAM, J. C. Comparative structural analysis of the caspase family with other clan cysteine peptidases. **Biochem Journal**, v. 476, n. pt 2, p. 219-232, 2015.

MCLUSKEY, K.; RUDOLF, J.; PROTO, W. R.; ISAACS, N. W.; COOMBS, G. H.; MOSS, C. X.; MOTTRAM, J. C. Crystal structure of a Trypanosoma brucei metacaspase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.109, n. 19, p. 7469-7474, 2012.

MENDONÇA, A.; SANTOS, H.; FRANCO-DUARTE, R.; SAMPAIO, P. Fungal infections diagnosis – Past, present, and future, **Research in Microbiology**, v. 173, n. 3, 2022.

MERENSTEIN, D.; HU, H.; WANG, C.; HAMILTON, P.; BLACKMON, M.; CHEN, H.; CALDERONE, R.; LI, D. Colonization by *Candida* species of the oral and vaginal mucosa in HIV-infected and noninfected women. **AIDS Research and Human Retroviruses,** v. 29, n. 1, p. 30-34, 2013.

MIKAELIAN I.; SERGEANT A. Modification of the overlap extension method for extensive mutagenesis on the same template. **Methods in Molecular Biology,** v. 193, n. 1, p. 193-202, 1996.

MILLE, C.; JANBON, G.; DELPLACE, F.; IBATA-OMBETTA, S.; GAILLARDIN, C.; STRECKER, G.; JOUAULT, T.; TRINEL, P. A.; POULAIN, D. Inactivation of camit1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan β-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein β-mannosylation, **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 47952–47960, 2004.

MIRANDA, I.; ROCHA, R.; SANTOS, M. C.; MATEUS, D. D., MOURA, G. R.; CARRETO, L.; SANTOS, M. A. A genetic code alteration is a phenotype diversity generator in the human pathogen *Candida albicans*. **PLoS One**, v. 2, n. 10, p. e996, 2007.

MOREIRA, M. E. C.; PORTILLO, H. A. D.; MILDER, R. V.; BALANCO, J. M. F.; BARCINSKI, M. A. Heat shocK induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism Leishmania (Leishmania) amazonensis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 167, n. 2, 1996.

MOSS, C. X.; WESTROP, G. D.; JULIANO, L.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Metacaspase 2 of Trypanosoma brucei is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. **FEBS Letters,** v. 581, n. 29, p.5635-5639, 2007.

MOTTRAM, J.; COOMBS, G.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. **Current Opinion in Microbiology,** v. 7, n. 4, p. 375-381, 2004.

MÓTYÁN, J. A.; TÓTH, F.; TŐZSÉR, J. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. **Biomolecules**, v. 3, n. 4, p.923–942, 2013.

MUKHERJEE, D.; GUPTA, S.; SARAN, N.; DATTA, R.; GHOSH, A. Induction of apoptosis-liKe cell death and clearance of stress-induced intracellular protein aggregates: dual roles for Ustilago maydis metacaspase Mca1. **Molecular Microbiology,** v. 106, n. 5, p. 815-831, 2017.

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; GHANNOUM, M A. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4333-4340, 2003.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology,** v. 155, n. 1, p. 335-350, 1987.

MUSKETT, H.; SHAHIN, J.; EYRES, G.; HARVEY, S.; ROWAN, K.; HARRISON, D. RisK factors for invasive fungal disease in critically ill adult patients: a systematic review. **Critical Care,** v. 15, n. 6, p. R287, 2011.

NELSON, N.; VAN NESS, K; GREENSTREET, T. A. Molecular cloning of the interleuKin-1 beta converting enzyme. **Science,** v. 256, n. 5053, p. 97 - 100, 1992.
NEMES, Z. J. R.; FRIIS, R. R.; AESCHLIMANN, D.; SAURER, S.; PAULSSON, M.; FÉSÜS, L. Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue. **European Journal of Cell Biology**, v. 70, n. 2, p. 125-133, 1996.

NEYROZ, P.; MENNA, C.; POLVERINI, E.; MASOTTI, L. Intrinsic fluorescence properties and structural analysis of p13 from Schizosaccharomyces pombe suc1. **Protein Chemistry and Structure**, v. 271, n. 44, p. 27249-27258, 1996.

NICHOLLS, S.; MACCALLUM, D. M.; KAFFARNIK, F. A.; SELWAY, L.; PECK, S. C.; BROWN, A. J. Activation of the heat shocK transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*, **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 297–305, 2011.

NISHIMOTO, A. T.; SHARMA, C.; ROGERS, P. D. Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 75, n. 2, p. 257-270, 2020.

NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **The Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 71-92, 2015.

NOBILE, C. J.; NETT, J. E.; ANDES, D. R.; MITCHELL, A. P. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. **EuKaryot Cell**, v. 5, n. 10, p. 1604–1610, 2006.

NOBILE, C. J.; SCHNEIDER, H. A.; NETT, J. E.; SHEPPARD, D. C.; FILLER, S. G.; ANDES, D. R.; MITCHELL, A. P. Complementary adhesin function in C. albicans biofilm formation. **Current Biology**, v. 18, n. 14, p. 1017-1024, 2008.

NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular responses to DNA damage. **The Annual Review of Pharmacology and Toxicology,** v. 41, n. 1, p. 367-401, 2001.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, 2003.

OLVERA-CARRILLO, Y.; VAN BEL, M.; VAN HAUTEGEM, T.; FENDRYCH, M.; HUYSMANS, M.; SIMASKOVA, M. A conserved core of programmed cell death indicator genes discriminates developmentally and environmentally induced programmed cell death in plants. **Plant Physiology**, v.169, p. 2684 - 2699, 2015.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; CASADEVALL, A.; GALGIANI, J. N.; ODDS, F. C.; REX, J. H. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 9, 71-727, 2010.

OXMAN, D. A.; CHOW, J. K.; FRENDL, G.; HADLEY, S.; HERSHKOVITZ, S.; IRELAND, P.; MCDERMOTT, L. A.; TSAI, K.; MARTY, F. M.; KONTOYIANNIS, D. P.; GOLAN, Y. *Candida*emia associated with decreased in vitro fluconazole susceptibility: is *Candida* speciation predictive of the susceptibility pattern? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** v. 65, n. 7, p. 1460-1465, 2010.
PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; SCHUSTER, M. G.; VAZQUEZ, J. A.; WALSH, T. J.; ZAOUTIS, T. E.; SOBEL, J. D. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases,** v. 62, n. 4, p. e1-50, 2016.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.
PHAN, Q. T.; MYERS, C. L.; FU, Y.; SHEPPARD, D. C.; YEAMAN, M. R.; WELCH, W. H.; IBRAHIM, A. S.; EDWARDS, J. E. JR.; FILLER, S. G. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. **PLOS Biology**, v. 5, n. 3, p. e64, 2007.

PHILLIPS, A. J.; CROWE, J. D.; RAMSDALE, M. Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 103, n. 3, p. 726-231, 2006.

PHILLIPS, A. J.; SUDBERY, I.; RAMSDALE, M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans***. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 100, n. 24, p. 14327-14332, 2003.

PISZCZEK, E.; DUDKIEWICZ, M.; MIELECKI, M. Biochemical and Bioinformatic Characterization of Type II Metacaspase Protein (TaeMCAII) from Wheat. **Plant Molecular Biology Report**, v. 30, n. 6, p. 1338-1347, 2012.

POP, C.; SALVESEN, G. S. Human caspases: activation, specificity, and regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 21777–21781, 2009.

RADUCANU, V. S.; ISAIOGLOU, I.; RADUCANU, D. V.; MERZABAN, J. S.; HAMDAN, S. M. Simplified detection of polyhistidine-tagged proteins in gels and membranes using a UV-excitable dye and a multiple chelator head pair. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 34, p. 12214-12223, 2020.

RAI, N. K.; TRIPATHI, K; SHARMA, D.; SHUKLA, V. K. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. **International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 4, n. 3, p. 138–144, 2005.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology,** v. 2012, n. 528521, p. 1-12, 2012.

RAMANAN, N.; WANG, Y. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. **Science,** v. 12, n. 288(5468), p. 1062–1064, 2000.

RANI, K.; RACHITA, R.; DATT, S. Review on latest overview of proteases**. International Journal of Current Life Sciences,** v. 2, n. 1, p. 12-18, 2012.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; THOMAS, P. D.; HUANG, X.; BATEMAN, A. & FINN, R. D. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates, and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic Acids Research**, 2018.

REDDY, G. K. K.; PADMAVATHI, A. R.; NANCHARAIAH, Y. V. Infecções fúngicas: patogênese, antifúngicos e abordagens alternativas de tratamento, **Cell Reports Microbiology**, v. 3, p. 100137, 2022.

REVIE, N. M.; IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms, and impact. Current Opinion in Microbiology, v. 45, n. 1, p. 70-76, 2018.

RICHIE, D. L.; MILEY, M. D.; BHABHRA, R.; ROBSON, G. D.; RHODES, J. C.; ASKEW, D. S. The Aspergillus fumigatus metacaspases CasA and CasB facilitate growth under conditions of endoplasmic reticulum stress. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 591-604, 2007.

RICHIE, D. L.; MILEY, M. D.; BHABHRA, R.; ROBSON, G. D.; RHODES, J. C.; ASKEW, D. S. The *Aspergillus fumigatus* metacaspases CasA and CasB facilitate growth under conditions of endoplasmic reticulum stress. **Molecular Microbiology,** v. 63, n. 2, p. 591-604, 2007.

ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L. E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annual Review of Microbiology**, v. 8. N. 71, p. 753-775, 2017.

ROBBINS, N.; LEACH, M. D.; COWEN, L. E. Lysine deacetylases Hda1 and Rpd3 regulate Hsp90 function thereby governing fungal drug resistance. **Cell Reports,** v. 2, n. 4, p. 878-888, 2012.

ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, 2016.

RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A waKe-up call to public health officials. **PLOS Neglected Tropical Diseases,** v. 14, n. 2, p. e0007964, 2020.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 5, p. a019703, 2014.

ROSATI, D.; BRUNO, M.; JAEGER, M.; TEN OEVER, J.; NETEA, M. G. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: An Immunological Perspective. **Microorganisms,** v. 8, n. 2, p. 144, 2020.

ROSENBERG, A. H.; LADE, B. N.; DAO-SHAN.; LIN, SHU-WHA.; DUNN. J.J.; STUDIER, F. W. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. **Gene,** v. 56, n. 1, p. 125-135, 1987.

RUBIO-MOSCARDO, F.; BLESA, D.; MESTRE, C.; SIEBERT, R.; BALASAS, T.; BENITO, A.; ROSENWALD, A.; CLIMENT, J.; MARTINEZ, J. I.; SCHILHABEL, M.; KARRAN, E. L.; GESK, S.; ESTELLER, M.; DELEEUW, R.; STAUDT, L. M.; FERNANDEZ-LUNA, J. L.; PINKEL, D.; DYER, M. J.; MARTINEZ-CLIMENT, J. A. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as *Candida*te dosage-dependent tumor suppressor genes. **Blood**, v. 106, n. 1, p. 3214–3222, 2005.

RUIZ-HERRERA, J.; RUIZ-MEDRANO, R. Chitin biosynthesis in fungi." In: Arora, P. K. **HandbooK of Fungal Biotechnology**. 2 Ed. Marcel DeKKer, New YorK, NY, 2004. p. 315–330.

RUIZ-HERRERA, M.; VICTORIA E. E.; EULOGIO, V.; RAFAEL S. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 1, p. 14–29, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning.** 3 editions. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New YorK, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vol. 3. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; MARCHETTI, O.; ENTENZA, J.; BILLE, J. Calcineurin A of *Candida albicans*: Involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. **Molecular Microbiology,** v. 48, n. 4, p. 959-976, 2003.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-83, 2002.

SAVILLE, S. P.; LAZZELL, A. L.; MONTEAGUDO, C.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection, **EuKaryot Cell**, v. 2, n. 5, p. 1053–60, 2003.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 27, n. 2, p. 157-162, 1967.

SCHOF, F. H.; BIEBL, M. M.; BUCHNER, J. The HSP90 chaperone machinery. **Nature Reviews Molecular Cell Biology,** v. 18, n. 1, p. 345-360, 2017.
SEVERIN, F. F.; HYMAN, A. A. Pheromone induces programmed cell death in S. cerevisiae. **Current Biology,** v. 12, n. 7, p. 233-235, 2002.

SHARMA, S.; GROVER, M.; BHARGAVA, S.; SAMDANI, S.; KATARIA, T. Post coronavirus disease mucormycosis: a deadly addition to the pandemic spectrum, **Journal of Laryngology and Otology**, v. 135, n. 5, p. 442-447, 2021.

SHAW, W. V.; MESSING, J. Transformation of *Escherichia coli* by electroporation, **Methods in Enzymology**, v. 118, p. 393-399, 1985.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis**. Molecular Cell,** v. 9, n. 3, p. 459-470, mar. 2002.

SHIRAZI, F.; KONTOYIANNIS, D. P. Micafungin triggers caspase-dependent apoptosis in *Candida albicans* and *Candida* parapsilosis biofilms, including caspofungin non-susceptible isolates. **Virulence,** v. 6, n. 4, p. 385-394, 2015.

SINDREWICZ, P.; LI, X.; YATES, E. A.; TURNBULL, J. E.; LIAN, L.-Y.; YU, L.-G. Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy reliably determines galectin-ligand interactions. **Scientific Reports**, v. 9, p. 11851, 2019.

SINGH, S. D.; ROBBINS, N.; ZAAS, A. K.; SCHELL, W. A.; PERFECT, J. R.; COWEN, L. E. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 7, p. e1000532, 2009.

SMITH, C. Cloning, and mutagenesis: tinKering with the order of things**. Nature Methods,** v. 4, n. 1, p. 455-461, 2007.

SOLL, D. R.; STASI, M.; BEDELL, G. The regulation of nuclear migration and division during pseudo-mycelium outgrowth in the dimorphic yeast *Candida albicans*, **Experimental Cell Research**, v. 116, n. 1, p. 207–215, 1978.

SPETTEL, K.; BAROUSCH, W.; MAKRISTATHIS, A.; ZELLER, I.; NEHR, M.; SELITSCH, B.; LACKNER, M.; RATH, P. M.; STEINMANN, J.; WILLINGER, B. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0210397, 2019.

ŠTRANCAR, V; van MIDDEN, Ka. P.; KRAHN, D.; MORIMOTO, K.; NOVINEC, M.; FUNK, C.; STAEL, S.; SCHOFIELD, C. J.; KLEMENČIČ, M.; van der HOORN, R. A. L. Activity-based probes trap early active intermediates during metacaspase activation. *iScience*, v. 25, n. 12, p. 105492, 2022.

STELLER H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Science,** v. 267, n. 5203, p. 1445-1449, 1995.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, **Journal of Molecular Biology**, v. 189, n. 1, p. 113-130, 1986.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Microbiology and Biotechnology,** v. 189, n. 1, p. 113-130, 1986.

SU, S.; SHI, X.; XU, W.; LI, Y.; CHEN, X.; JIA, S.; SUN, S. Antifungal Activity and Potential Mechanism of Panobinostat in Combination with Fluconazole Against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology,** v. 16, n. 11, p. 1584, 2020.

SUAREZ, M. F.; FILONOVA, L. H.; SMERTENKO, A.; SAVENKOV, E. I.; CLAPHAM, D. H.; VON ARNOLD, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; BOZHKOV, P. V. Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. **Current Biology**, v. 14, n. 9, p. 339-340, 2004.

SUDBERY, P. E. The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization, **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 19–31, 2001.
SUELDO, D. J.; HOORN, R. A. L. Plant life needs cell death, but does plant cell death need Cys proteases? **FEBS PRESS**, v. 284, n. 10, p. 1577-1585, 2017.

SUN, Y.; CAO, C.; JIA, W.; TAO, L.; GUAN, G.; HUANG, G. pH Regulates White-Opaque Switching and Sexual Mating in *Candida albicans*. **EuKaryotic Cell**, v. 14, n. 11, p. 1127-1134, 2015.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria, and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 9, p. 621–632, 2010.

TALAPKO, J.; JUZBAŠIĆ, M.; MATIJEVIĆ, T.; PUSTIJANAC, E.; BEKIĆ, S.; KOTRIS, I.; ŠKRLEC, I. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. **Journal of Fungi,** v. 7, n. 2, p. 79, 2021.

TAO, L.; DU, H.; GUAN, G.; DAI, Y.; NOBILE, C. J.; LIANG, W.; CAO, C.; ZHANG, Q.; ZHONG, J.; HUANG, G. Discovery of a "white-gray-opaque" TRIStable phenotypic switching system in *Candida albicans*: roles of non-genetic diversity in host adaptation. **PLOS Biology**, v. 12, n. 4, p. e1001830, 2014.

THEODOROPOULOS, N. M.; BOLSTORFF, B.; BOZORGZADEH, A.; BRANDEBURG, C.; CUMMING, M.; DALY, J. S.; ELLISON, R. T. 3RD; FORSBERG, K.; GADE, L.; GIBSON, L.; GREENOUGH, T.; LITVINTSEVA, A. P.; MACK, D. A.; MADOFF, L.; MARTINS, P. N.; MCHALE, E.; MELVIN, Z.; MOVAHEDI, B.; STILES, T.; VALLABHANENI, S.; LEVITZ, S. M. *Candida* auris outbreaK involving liver transplant recipients in a surgical intensive care unit, **American Journal of Transplantation**, v. 20, n. 12, p. 3673-3679, 2020.

THOMPSON, J. R.; DOUGLAS, C. M.; LI, W.; JUE, C. K.; PRAMANIK, B.; YUAN, X.; RUDE, T. H.; TOFFALETTI, D. L.; PERFECT, J. R.; KURTZ, M. A glucan synthase

FKS1 homolog in Cryptococcus neoformans is single copy and encodes an essential function, **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 444–453, 1999.

TIAN, J.; LU, Z.; WANG, Y.; ZHANG, M.; WANG, X.; TANG, X.; PENG, X.; ZENG, H. Nerol triggers mitochondrial dysfunction and disruption via elevation of Ca^{2+} and ROS in *Candida albicans*, **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, p. 114-122, 2017.

TRIPATHI, A.; LIVERANI, E.; TSYGANKOV, A.Y.; BERTINELLI, F.; CERIKIENE, R.; FAJARDO-SOMERA, R. A.; LEE, K. E.; MILLER, J. L.; SHAMMO, J. M.; SEVOIAN, M.; VON DER HAAR, T.; GACSER, A.; ARANA, D. M.; SEVAGAN, G.; YUN, C. W.; RAUCHER, D.; ENGLUND, K.; NIERMAN, W. C.; BROWN, A. J. P.; CORONADO, J. E.; PÉREZ, J. C.; SOLYAMAN, M.; ROBBINS, N.; SCHIERSCH, C.; MCGUINNESS, D.; DE JESÚS, E.; KOHN, E. M.; LUGONES, L. G.; ELKINGTON, P. T.; FIGUEIREDO, M. A.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Iron alters the cell wall composition and intracellular lactate to affect *Candida albicans* susceptibility to antifungals and host immune response. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 29, p. 10032–10044, 2020.

TSIATSIANI, L.; VAN BREUSEGEM, F.; GALLOIS, P.; ZAVIALOV, A.; LAM, E.; BOZHKOV, P. V. Metacaspases. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1279-1288, 2011.

UPPULURI, P.; ACOSTA ZALDÍVAR, M.; ANDERSON, M. Z.; DUNN, M. J.; BERMAN, J.; LOPEZ RIBOT, J. L.; KÖHLER, J. R. *Candida albicans* Dispersed Cells Are Developmentally Distinct from Biofilm and PlanKtonic Cells. **mBio,** v. 9, n. 4, p. e01338-18, 2018.

UREN, A. G.; O'ROURKE, K.; ARAVIND, L. A.; PISABARRO, M.T.; SESHAGIRI, S.; KOONIN, E.V.; DIXIT, V. M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-liKe proteins, one of which plays a Key role in MALT lymphoma. **Molecular Cell,** EUA, v. 6, n. 4, p. 961-967, 2000.

VÁCHOVÁ, L.; PALKOVÁ, Z. Physiological regulation of yeast cell death in multicellular colonies is triggered by ammonia. **The Journal of cell biology**, v. 169, n. 5, p. 711–717, 2005.

VANDANA, DIXIT, R.; TIWARI, R.; KATYAL, A.; PANDEY, KC. Metacaspases: Potential Drug Target Against Protozoan Parasites, **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 6, p. 1-12, 2019.

VERCAMMEN, D.; COTTE, B. C.; JAEGER, G.; EECKHOUT, D.; CASTEELS, P.; VANDEPOELE, K.; VANDENBERGHE, I.; BEEUMEN, J.; INZE, D.; BREUSEGEM, F, V. Type II Metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* Cleave Substrates after Arginine and Lysine. **Journal of Biological Chemistry,** v. 279, n. 44, p. 45329-45336, 2004.

VERCAMMEN, D.; VAN DE COTTE, B.; DE JAEGER, G.; EECKHOUT, D.; CASTEELS, P.; VANDEPOELE, K.; VANDENBERGHE, I.; BEEUMEN, J. V.; INZÉ, D. BREUSEGEM, F. V. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of Arabidopsis

thaliana cleave substrates after arginine and lysine. **Journal of Biological Chemistry,** v. 79, n. 44, p. 45329-45336, 2004.

VERCAMMEN, D.; VAN DE COTTE, B.; DE JAEGER, G.; EECKHOUT, D.; CASTEELS, P.; VANDEPOELE, K.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of Arabidopsis thaliana cleave substrates after arginine and lysine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45329-45336, 2004.

VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets, **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 107. p. 1-12, 2016.

VESELY, E. M.; WILLIAMS, R. B.; KONOPKA, J. B.; LORENZ, M. C. N-Acetylglucosamine Metabolism Promotes Survival of *Candida albicans* in the Phagosome. **mSphere**, v. 2, n. 5, p. e00357-17, 2017.

VILA, T.; SULTAN, A. S.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; JABRA-RIZK, M. A. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. Journal of Fungi, v. 6, n. 1, p. 15, 2020.
VIVIAN, J. T.; CALLIS, P. R. Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins. **Biophysical Journal**, v. 80, n. 5, p. 2093-2109, 2001.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. **Science**, v. 296, n. 1, p. 1635–1636, 2002.

WATANABE, N.; LAM, E. Calcium-dependent activation, and autolysis of Arabidopsis metacaspase 2d. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 12, p. 10027-40, 2011.

WATSON, P. F.; ROSE, M. E.; ELLIS, S. W.; ENGLAND, H.; KELLY, S. L. Defective sterol C5-6 desaturation and azole resistance: a new hypothesis for the mode of action of azole antifungals. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 164, n. 3. P. 1170-1175, 1989.

WELBURN, S. C.; BARCINSKI, M. A.; WILLIAMS, G. T. Programmed cell death in trypanosomatids. **Parasitol Today,** v. 13, n. 1, p. 22-26, 1997.

WEN, S.; MA, Q. M.; ZHANG, Y. L.; YANG, J. P.; ZHAO, G. H.; FU, D. Q.; LUO, Y. B.; QU, G. Q. Biochemical evidence of Key residues for the activation and autoprocessing of tomato type II metacaspase. **FEBS Letters**, v. 587, n. 16, p. 2517-2522, 2013.

WHALEY, S. G.; BERKOW, E. L.; RYBAK, J. M.; NISHIMOTO, A. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 2173.

WHEELER, R. T.; KOMBE, D.; AGARWALA, S. D.; KARDAKOV, N. Dynamic, morphotype-specific *Candida albicans* beta-glucan exposure during infection and drug treatment. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 12, p. e1000227, 2008.

WILKINS, M. R.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. **Methods in Molecular Biology**, v. 112, p. 531-552, 1999.

WILLIAMS, R. B.; LORENZ, M. C. Multiple alternative carbon pathways combine to promote *Candida albicans* stress resistance, immune interactions, and virulence. **mBio**, v. 11, n. 1, p. e00357–17, 2020.

WILSON, G. G.; MURRAY, N. E. Restriction, and modification systems. **Annual Review of Genetics,** v. 25, n. 1, p. 585-627, 1991.

WIRSCHING, S.; MICHEL, S.; MORSCHHÄUSER, J. Targeted gene disruption in *Candida albicans* wild-type strains: the role of the MDR1 gene in fluconazole resistance of clinical *Candida albicans* isolates. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 856-865, 2000.

WONG, A. H.; YAN, C.; SHI, Y. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 29251-29259, 2012.

XIA, Y.; LI, K.; LI, J.; WANG, T.; GU, L.; XUN, L. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 3, p. e15, 2019.

YAMMINE, A.; GAO, J.; KWAN, A. H. Tryptophan Fluorescence Quenching Assays for Measuring Protein-ligand Binding Affinities: Principles and a Practical Guide. **Bio Protocols**, v. 9, n. 11, p. e3253, 2019.

YAN, G.; ELBADAWI, M. EFFERTH, T. Multiple cell death modalities and their Key features (Review). **World Academy of Sciences Journal,** v. 2, n. 2, p. 38 – 48, 2020.

YONGZHEN, X.; KAI, L.; JINGJING, L.; TIANQI, W.; LICHUAN, G.; LUYING, X. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 3, p. e15, 2019.

YUAN, S.; AKEY, C. W. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. **Structure**, v. 21, p. 501–515, 2013.

YUN, J.; LEE, D. G. Cecropin A-induced apoptosis is regulated by ion balance and glutathione antioxidant system in *Candida albicans*. **IUBMB Life,** v. 68, n. 8, p. 652-662, 2016.

ZALILA, H.; GONZÁLEZ, I. J.; EL-FADILI, A. K.; DELGADO, M. B.; DESPONDS, C.; SCHAFF, C.; FASEL, N. Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in Leishmania major. **Molecular Microbiology**, v. 79, 2. 1, p. 222-239, 2011.

ZHAI, B. OLA, M., ROLLING, T.; TODINI, L. S.; JOSHOWITZ.; LITTMANN, E. R.; AMORETTI, L. A.; FONTANA, E.; WRIGTH, R. J.; MIRANDA, E.; VEELKEN, C. A.; MORJARIA, S. M.; PELED, J. U.; VAN DE BRINK, M. R. M.; BABADY, N. E.; BUTLER, G.; TAUR, Y.; HOHL, T. M. High-resolution mycobiota analysis reveals

dynamic intestinal translocation preceding invasive candidiasis. **Nature medicine,** v. 26, n. 1, p. 59-64, 2020.

ZHAN, P.; LIU, W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide, **Mycopathologia**, v. 182, p. 77–86, 2017.

ZHANG, J.; LIU, W.; TAN, J.; SUN, Y.; WAN, Z.; LI, R. Antifungal activity of geldanamycin alone or in combination with fluconazole against *Candida* species. **Mycopathologia,** v. 175, n. 3-4, p. 273-179, 2013.

ZHENG, L.; BAUMANN, U.; REYMOND, J. L. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 14, p. e115, 2004.

ZHU, J.; KROM, B. P.; SANGLARD, D.; INTAPA, C.; DAWSON, C. C.; PETERS, B. M.; SHIRTLIFF, M. E.; JABRA-RIZK. M. A. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. **PLoS One,** v. 6, n. 12, p. e28830, 2011.

ANEXO 1 - CYSTEINE PROTEASES AS POTENTIAL TARGETS FOR ANTI TRYPANOSOMATID DRUG DISCOVERY

Bioorg. Med. Chem. 46 (2021) 116365

Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Cysteine proteases as potential targets for anti-trypanosomatid drug discovery

Wagner A.S. Judice [a,*], Letícia Silva Ferraz [b], Rayssa de Mello Lopes [b], Luan dos Santos Vianna [a], Fábio da Silva Siqueira [a], Juliana F. Di Iorio [a], Laura de Azevedo Maffeis Dalzoto [a], Mariana Nascimento Romero Trujilho [a], Taiz dos Reis Santos [a], Maurício F.M. Machado [a,*], Tiago Rodrigues [b,*]

[a] Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB), Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), Mogi das Cruzes, SP, Brazil
[b] Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC (UFABC), Santo André, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Chagas disease
Chemotherapy
Cysteine proteases
Leishmaniasis
Neglected diseases

ABSTRACT

Leishmaniasis and trypanosomiasis are endemic neglected disease in South America and Africa and considered a significant public health problem, mainly in poor communities. The limitations of the current available therapeutic options, including the lack of specificity, relatively high toxicity, and the drug resistance acquiring, drive the constant search for new targets and therapeutic options. Advances in knowledge of parasite biology have revealed essential enzymes involved in the replication, survival, and pathogenicity of *Leishmania* and *Trypanosoma* species. In this scenario, cysteine proteases have drawn the attention of researchers and they are being proposed as promising targets for drug discovery of antiprotozoal drugs. In this systematic review, we will provide an update on drug discovery strategies targeting the cysteine proteases as potential targets for chemotherapy against protozoal neglected diseases.

1. Introduction

Neglected tropical diseases (NTDs) comprise a wide group of diseases with the highest prevalence in tropical and subtropical regions, specifically in underdeveloped or developing countries, since female vector flies use the decomposing organic materials and moist places for oviposition. NTDs affect over one billion people around the world with several social and economic impacts. The list of neglected diseases recognized by the World Health Organization (WHO) includes leishmaniasis - cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL), and visceral (VL)) and trypanosomiasis (Chagas disease and sleeping sickness), which are caused by the infectious agents *Leishmania* spp., and *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*, respectively [1,2]. Considering vaccines are not available yet for these diseases, preventive actions and pharmacological interventions are the current approaches to their treatment. However, the available drugs used to treat these diseases have several limitations, such as low efficacy, high toxicity, adverse reactions, long-course administration regimens, and also drug resistance [3]. Thus, several efforts have been made to discovery new therapeutic targets and novel drug candidates. In this review we discussed the potential of protozoal cysteine proteases as targets for the development new drugs for the treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis.

2. Leishmaniasis and trypanosomiasis

Leishmania genus belongs to the Trypanosomatidae family. Approximately 53 species have already been identified, of which 31 species are known to parasite mammals and 20 species are pathogenic for human beings, causing leishmaniasis [4,5]. These parasites are transmitted by phlebotomine females of sand flies from Phlebotomus and Lutzomyia genera [6]. In Europe, Africa and Asia, the main vectors are *Phlebotomus* sp., while *Lutzomyia* sp. are the vectors in Americas and Oceania. The highest prevalence is observed in tropical and subtropical regions, mainly in underdeveloped or developing countries, since the female vector flies use the decomposing organic materials and moist places for oviposition. Around 70 countries are considered as endemic regions for leishmaniasis, although more than 90% of cases occur in Afghanistan, Algeria, Brazil, Pakistan, Peru, Saudi Arabia, and Syria [7,8]. Leishmaniasis is a neglected tropical disease considered as a global public health problem, occurring in about 98 countries with 1.3 million

* Corresponding authors.
E-mail addresses: wagneras@umc.br (W.A.S. Judice), mauriciomachado@umc.br (M.F.M. Machado), tiago.rodrigues@ufabc.edu.br (T. Rodrigues).

https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116365
Received 27 May 2021; Received in revised form 2 August 2021; Accepted 4 August 2021
Available online 13 August 2021
0968-0896/© 2021 Elsevier Ltd. This article is made available under the Elsevier license (http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/).

cases per year and 350 million people at risk of infection [9]. It is important to differentiate Leishmania species due to the epidemiologic and clinical issues. Their classification was based on geographical factors, clinical presentations of diseases, epidemiology, sandflies vectors, and animals as reservoirs [10]. The high diversity among the species results in different clinical presentations of the disease and immune response [11,12].

Although parasites alter their morphology depending on the environmental conditions, promastigote and amastigote are the main forms during the life cycle of *Leishmania* spp. Promastigote is the flagellated extracellular form, while the oval-shaped, non-flagellated amastigote form lives intracellularly in the definitive host [13]. During the infection, the infective promastigote forms of Leishmania are regurgitated and inoculated by the infected female sandflies into the human host blood vessel, being phagocytized by neutrophils and/or macrophages that are quickly recruited to the bite region due to the secretion of proteophosphoglycans by the parasites [14,15]. After recognition, promastigote forms are internalized by lipid pockets composed of cholesterol-rich microdomains and stored in phagolysosomes[16]. Inside the mammalian cells, promastigote transforms into amastigote form, which replicates by simple division until macrophage lysis, releasing more amastigotes that will infect others mononuclear phagocyte cells or another hematophagous female sandfly[17]. Leishmania parasite has several molecules to protect it from the oxidative damage and the hydrolytic activity within the phagolysosome, including lipophosphoglycans (LPG), which modulate the immune response by modifying the levels of produced cytokines[18], LPG glycosylinositol phospholipids, proteophosphoglycans, acid phosphatases, zinc-dependent metalloprotease GP63, and cysteine proteases [19,20].

The clinical manifestations of leishmaniasis are divided in cutaneous, mucocutaneous, and visceral. The first report of CL was provided by Lewis & Cunningham in 1876, being caused by *L. tropica*. Currently, Afghanistan, Pakistan, Iran, and Iraq are the main endemic areas [21,22]. MCL is a rare complication of CL that might arise in less than 5% of cases after cure and the cases are concentrated in Brazil, Peru and Bolivia [9]. Many species of the Leishmania genus are etiologic agents of CL, including *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. infantum*, and *L. archibaldi* in Eurasia and Africa, and *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. chagasi*, *L. guyanensis*, and *L. peruviana* in South America. The infection might result in restricted primary skin lesions or parasitic metastasis to mucous membranes or reticuloendothelial system, depending on the genetic background of the host and the parasite specie [23]. It was reported that *L. donovani* caused mucosal damage, mainly in elderly and immunosuppressed people. Also, MCL often results in late destruction of mucosa and oronasopharyngeal cartilage, which is highly disfiguring and potentially fatal [24]. Moreover, VL, also known as kala-azar disease (black fever), is the most severe manifestation of leishmaniases, which can be fatal when not diagnosed in a timely manner and/or treated properly [24]. In eastern Africa and India this disease is caused by *L. donovani*, in Mediterranean by *L. infantum*, and in South America by *L. chagasi*, *L. amazonensis*, and *L. tropica* [25,26]. The parasites move by pleiotropism reaching the viscera and infecting Kupffer cells in the liver and reticular cells in the spleen, promoting hyperplasia of these organs (hepatosplenomegaly). They also might affect the bone marrow blocking the maturation of the granulocytic series and colonizing the hematopoietic system. The course of the infection depends on several factors related to the host immunity and the level of inflammatory response, determining the acute or chronic response [7].

Chagas disease (CD) is also considered a neglected and endemic disease with high prevalence in tropical and subtropical countries [27]. Regarding its morbidity and mortality, CD was considered one of the main public health problems in Latin America in the 90′s. CD is referred as a "disease of the poor", since the incidence is significant higher in regions with precarious houses, which are ideal for the development of the insect causative of the disease [28]. The life cycle of *T. cruzi* was described for the first time by Professor Carlos Chagas in 1909 [29]. The parasite is a kinetoplastid protozoan that infects vertebrate and invertebrate hosts during its life cycle [30,31]. The triatomine vector ingests the trypomastigote forms from the host during blood meals, which transforms in the epimastigotes in the medium intestine of the vector, differentiating into the infectious metacyclic trypomastigotes in the posterior intestine, being excreted in the feces of the triatomine. This form of the parasite enters through the bite wound or the mucosa of the mammalian host, invading different types of nucleated cells by a lysosomal-mediated mechanism [32], undergoing differentiation to the amastigote form in the cytoplasm, where it doubles every 12 h for 4 to 5 days. Subsequently, the trypomastigotes disrupt the cell membrane and reach the bloodstream and new cells, starting a new cycle or infecting other vectors during blood meal [33].

The symptoms depend on the phase of the disease, acute or chronic. Health system is focused on preventing the acute phase by controlling the vector. However, the complications occur in the chronic phase, and the organ damage led to the morbidity and mortality. During the chronic phase, the infection remains clinically silent in 60–70% of cases, characterizing the asymptomatic form of CD, also known as indeterminate [30]. Nevertheless, after 10–30 years, 30–40% of the asymptomatic patients develop clinical manifestations, such as neurological (rare), digestive (megacolon and megaesophagus syndromes), and cardiac or cardio digestive alerations [34]. The acute phase of CD is often ignored, since the symptoms might be confused with viruses and/or colds, including headache, muscle pain, apathy, and low and continuous fever [35]. The most prominent sign of the acute phase of the disease is the formation of a periorbital edema, popularly known as Romaña's sign, which consists of the ocular conjunctiva swelling, when the infection occurs through this route [36].

2.1. Current therapeutic options against leishmaniasis and trypanosomiasis

Many factors affect the treatment of leishmaniasis, including the parasite species, the form of the disease, the pre-existing comorbidities, among others. In the early 20th century, Gaspar Vianna showed that antimony and potassium tartrate could be effective against CL and VL. However, the use of these drugs was abandoned due to the severe side effects. In 1940, pentavalent antimonial (SbV) derivatives were developed and used in the treatment of leishmaniasis. Despite the relative lower toxicity of these pentavalent antimonial derivatives, some adverse effects were also described, including increased liver enzyme levels, heart toxicity, arthralgia, pancreatitis, joint stiffness, pancytopenia, and myalgia [37]. The proposed mechanism of action of antimonial is based on the inhibition of the trypanothione reductase (TR), a key enzyme to protect Leishmania from oxidative damage and consequently essential for its survival within the host [38]. Antimonial can only be administered by injectable form and adverse effects may vary from mild, as local allergic reaction, abdominal pain, gastrointestinal disturbances, edema, and headaches, to more severe effects, as pancreatitis and cardiac and renal toxicity, besides being more aggressive and lethal in HIV patients [39,40]. The arsenal of drugs available for VL treatment is limited to the antimonial sodium stibogluconate (SSG), meglumine antimoniate (MA), paromomycin (PM), oral miltefosine (MF), and amphotericin B in free deoxycholate form or lipid formulations (liposomal amphotericin B, LAB). Despite the variety of drugs, safer and innovative therapies with applicability in a large geographic area is still needed.

Besides the high toxicity, drug resistance is another major problem in the treatment of leishmaniasis. Several mechanisms of resistance have been described, such as increased intracellular thiol levels, overexpression of tryparedoxin peroxidase, decreased uptake of SbV by active form by amastigotes, changes in the thiol metabolism, and increased expression of drug efflux proteins (MRP1 and ABC transporters) [41–43]. For this reason, pentavalent antimonial drugs have become obsolete due to the loss of therapeutic efficacy [44] and

pentamidine (PMD) has been used instead. However, PMD was also abandoned due to high rate of resistance [45,46] and the severe side effects, such as irreversible diabetes mellitus [47]. Thereafter, amphotericin B (AmB) is currently the best therapeutic option for patients with antimonial-resistant leishmaniasis. Despite its efficacy, AmB also has high toxicity, such as acute nephrotoxicity, demanding the hospitalization of the patient, which can be a limiting factor in poor regions [48]. Also, reproductive toxicity was reported, thus AmB was contraindicated in pregnancy [49–52]. Moreover, AmB is a high-cost drug, since it must be inserted in a lipid-associated formulation to decrease its toxicity and extend the plasma half-life [53,54]. Despite the toxicity, both amphotericin B (AB) and the pharmaceutical liposomal formulation containing amphotericin B (LAB) showed high rates of definitive cure for leishmaniasis. LAB presented better tissue penetration, better efficacy at low doses, and lower toxicity [55–57].

Meanwhile, the search for new targets and drugs remains as the main approach to improve the treatment of leishmaniasis, with higher efficacy and lower toxicity. Several studies have been conducted to evaluate new potential targets for drug discovery, such as glycolytic pathway, polyamine biosynthesis, glyoxalase pathway, uptake and turnover of phospholipids/sphingolipids, microtubule biosynthesis, folate metabolism, and in these parasitic metabolic pathways the enzymes stand out [58–64]. Enzymes are crucial macromolecules that control the chemical reactions inside the cells, including the regulatory steps of the signaling and metabolic pathways. In this regard, several enzymes had already been studied as potential targets to chemotherapy, including nitric oxide synthase, DNA topoisomerase, trypanothione redutase, superoxide dismutase, hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase [58], heme oxygenase-1 [65], ribose 5-phosphate isomerase B [66], dihydroorotate dehydrogenase [67], ornitine decarboxylases [68], Abl family kinases and phosphoinositide 3-kinase γ [69], spermidine synthase [70], and serine, cysteine, aspartic, threonine, and metallopeptidases.

Regarding Chagas' disease, the pharmacological treatment was restricted to the use of benznidazole and nifurtimox, two nitroheterocyclic drugs introduced in the 60–70 s [27]. Such therapeutic scheme required long-term administration of the drugs that were relatively toxic for adult patients. As nifurtimox was not available in Brazil anymore [27], benznidazole has been the first choice for CD treatment. Benznidazole seems to be effective only in the initial acute phase of CD, although a large-scale, multicenter, international clinical trial (BENEFIT project) proposed its use also at chronic stages, especially for patients with cardiovascular complications [71]. However, other studies aiming to correlate the trypanocidal effect of benznidazole and the clinical course of the disease are still scarce and inconclusive [72–74], and further clarification is needed. It is noteworthy the need for improvement of the early diagnosis and the treatment of patients with chronic indeterminate CD [75]. In this regard, Vallejo et al (2016) shown that benznidazole induced changes in the adaptive immune response in patients with indeterminate chronic CD, decreasing the inflammatory condition [76]. Moreover, new therapeutic regimens employing benznidazole in combination with other drugs, e.g., E1224 [77] or fosravuconazole [78], were proposed for the treatment of adults with chronic indeterminate CD. Current *in vitro* and preclinical studies aiming to develop new drugs to combat the infection with *T. cruzi* are based on the search for inhibitors of ergosterol metabolism, trypanothione, pyrophosphate, protein and purine synthesis, lysophospholipid analogues (LPAs), and also cysteine proteases [79].

Thereby, the available drugs for the treatment of leishmaniasis or trypanosomiasis have several limitations, including low effectiveness, toxicity, and development of drug resistance. To overcome these challenges, it is essential to improve the understanding of the genetic, molecular, and biochemistry features of these parasites and the parasite-host interactions, in order to make feasible the search for new therapeutic targets, allowing the design of new drugs for theses neglected diseases. Due to the recent advances in this field, some opportunities have arisen. In this scenario, cysteine protease inhibitors have emerged as a new potential class of drugs to treat leishmaniasis and trypanosomiasis.

3. Protozoal cysteine proteases

Cysteine proteases (CP) comprise one of the classes of proteolytic enzymes expressed in different organisms, which are involved in several physiological and pathological processes [80]. The first described enzyme of this class was papain, isolated from *Carica papaya* in 1937. After this, its three-dimensional structure was elucidated in 1968 and the presence of a catalytic triad formed by the residues of Cys^{25}, His^{159} and Ans^{175} was described. A conserved asparagine residue (Asn^{175}) in the vicinity of the catalytic histidine (His^{159}), creates a Cys-His-Asn triad, which is considered similar to the Ser-His-Asp triad found in serine proteases [81]. The histidine residue in the Cys-His-Asn triad of CPs acts as proton acceptor, enhancing the nucleophilicity of the cysteine residue [83]. According to the current classification of MEROPS database, the cysteine-proteases are grouped into 14 different clans based on their tertiary structure. Within each clan, proteases are grouped into families based on their structural similarity [82].

It was shown that protozoans from the genus Leishmania express a wide range of CPs. They are considered putative virulence factors, since the knockout of this protease family in *L. mexicana* affected its virulence [84]. Due to this, protozoal CPs have drawn considerable attention of researchers as possible targets to the development of inhibitors [85]. However, the effectiveness of CPs inhibitors seems to depend on the parasite species and life stage. *L. major* exhibited higher sensitivity to the inhibitors in the promastigote and amastigote forms [86], while in *L. mexicana* the promastigote form presented low sensitivity [84].

The most widely studied CPs are CPA, CPB, CPC, cathepsin L-like, and cathepsin B-like (Table 1). The expression of CPs in the amastigote form is higher than in promastigotes, suggesting that these enzymes are involved in the host-parasite interaction [87]. CPA and CPC genes are organized in a single copy, while CPB genes are arranged in tandem sequences, with 19 copies in *L. mexicana*, 8 in *L. major*, and 5 in *L. chagasi* [88]. In *L. mexicana*, CPBs hinder the action of macrophages by decreasing the Th1 immune response, increasing the production of IFN-γ, and inhibiting the IL-12 release by JNK and ERK cleavage. Conversely, CPAs inhibit the antigen presentation through the degradation of MHC class II complex molecules and CPCs control the expression of proteins that regulate the cell cycle in Leishmania species [89]. In order to improve the structural knowledge about CPs from *L. mexicana*, a study was conducted to investigate the effects of inhibitors on the activity of the rCPB2.8 enzyme and in rCPB3.0 and rH84Y isoforms, whose differences in the amino acid constitution are depicted in Table 2. The rCPB2.8 enzyme has Asn^{60}, Asp^{61}, Asp^{64} residues in the α-helices that form the wall of the active site cleft. Few negative charge modifications are observed in the CPB isoenzymes rCPB3.0 and rH84Y, conferring an array of hydrolytic activities and providing to the parasites a possibility of adaptation to pH, salinity, and temperature changes [90].

Glycosaminoglycans (GAGs) are molecules covalently linked to a protein core forming a dense network of negative charges in the extracellular matrix (ECM) available for the interaction of extracellularly

Table 1
Cysteine protease expression in *Leishmania* spp.

Species	Enzymes
L. amazonensis	CPA
L. panamensis	CPB
L. tropicalis	CPB
L. baziliensis	CPA, CPB, CPC
L. mexicana	CPA, CPB, CPC
L. major	CPA, CPB, CPC
L. donovani	CPA, CPB, CPC
L. chagasi	CPA, CPB, CPC
L. infantum	CPA, CPB, CPC

Table 2
Variation of the amino acid composition in rCPB2.8 and its isoforms (rCPB3.0 and rH84Y) in *L. mexicana*.

Enzymes	Amino acid position				
	18	*60*	*61*	*64*	*84*
rCPB2.8	Asp	Asn	Asp	Asp	His
rCPB3.0	Asp	Asp	Asn	Ser	His
rH84Y	Asp	Asp	Asn	Ser	Tyr

released CPBs during the infection [91]. In this regard, it was shown that *Leishmania* spp. secrete CPBs that bind to the ECM of host cells, promoting the proteolysis of fibronectin and parasitic infection [92]. The variation of the pH, temperature, and salt concentration conditions revealed that CPs contained in amastigotes and promastigote lysates from Leishmania have different behavior and ability to adapt to several environmental conditions during the parasite life cycle. Besides, the hydrolysis of the fluorogenic substrate of CPs Z-FR-MCA in Leishmania amastigotes was higher after preincubation with thapsigargin, an inhibitor of the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA), which increases the cytosolic Ca^{2+} levels. This suggests that, at least part, the observed hydrolysis is related to Ca^{2+}-dependent cysteine peptidases, such as metacaspases [93]. Cysteine proteases from *T. cruzi* (cruzain) and *L. mexicana* (rCPB2.8) differ from other related mammalian peptidases because they are active over a broader pH range and both endo- and exopeptidase activities. These features probably drive the biological functions of these enzymes when exposed to different environmental conditions, depending on the location of the enzymes or the parasite development stage [94]. Thus, it highlights the potential of these enzymes as targets for drug development against these neglected diseases.

Around 2000′s, a new class of proteases, the metacaspases, was described as being a promising target for design for the anti-protozoa drugs. Belonging to caspase family, these enzymes are also cysteine proteases that, once activated, hydrolyze their substrates in order to activate a proteolytic cascade resulting in cell death [95]. Metacaspases belong to CD clan of C14 family and are homologous of caspases. Also found in plants, fungi, and protozoa, metacaspases cleave their substrates after basic residues at P_1 position and they are involved in the programed cell death (PCD) in these organisms [96–98]. After the discovery of this enzyme family, several efforts have been made to elucidate its roles in the apoptotic cell death program in mammals [99]. The first attempt to identify homologous caspases in fungi and protozoan eukaryotic cells were not successful, and then it was assumed that caspases were restricted to mammals [100]. Bioinformatic tools were used to identify a protease in lower eukaryotes with structural similarities compared to mammalian caspases. Such enzyme was named metacaspase and described in plants, fungi, and protozoa, but not in mammals [97]. Due to this, it was thought to be acquired by the lower eukaryotes through mitochondrial endosymbiosis [101]. As caspases, metacaspases present two domains called P_{10} and P_{20}; however, unlike caspases, metacaspases do not require dimerization to be activated. Additionally, caspases hydrolyze substrates after an aspartic acid residue at P_1 position, whereas metacaspases hydrolyze substrates after a basic residue (Arg or Lys) at P_1 position [102–104]. Moreover, metacaspases depend on Ca^{2+} for its activation [103,104]. Metacaspases exhibit some structural differences among them, being classified as type I, II, and III. Type I metacaspases have a *N*-terminal pro-domain containing a repeated sequence of proline, glutamine, and asparagine, besides a zinc finger motif. Type II metacaspases do not have the pro-domain but a linker between P_{10} and P_{20} subunits. At last, in contrast to type I and II, type III metacaspases have the P_{10} subunit before P_{20} [105,106].

Type I metacaspases are ubiquitously expressed in protozoa *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. In *T. brucei*, five metacaspases (TbMCA1 – TbMCA5) were found [107]. TbMCA2 and TbMCA3 exhibit a relatively high similarity in their amino acid sequence (89%). However, it is noteworthy the presence of a hydrophobic sequence in the *N*-terminal region of TbMCA3, whereas TbMCA5 has a characteristic central domain and an additional extension of C-terminal region. The other two metacaspases (TbMCA1 and TbMCA4) are expected to encode inactive enzymes, due to the presence of Ser and Tyr residues instead of His and Cys in the catalytic domain [108]. *T. cruzi* has two genes encoding metacaspases, TcMCA3 and TbMCA5, which are homologous to TbMCA2 and TbMCA5 of *T. brucei*, respectively. Such metacaspases, expressed during the parasite development, are thought to be implicated in the execution of PCD [109].

Two metacaspases are encoded in *L. donovani*, LdMC1 and LdMC2, which are involved in the oxidative stress-induced cell death. These metacaspases exhibit remarkable differences between them, e.g., LdMC1 has a higher rich proline domain in the C-terminal portion compared to LdMC2 [110]. The tridimensional structure of metacaspases from *Leishmania* spp. is similar to other metacaspases, with a P_{20} portion as central domain wherein the catalytic dyad (His-Cys) is found. Such dyad is conserved between both metacaspases from *L. donovani*. Also, a proline rich C-terminal domain is a common feature in type I metacaspases, as in TcMCA5 from *T. cruzi* and YCA1 from *S. cerevisiae* [111,112]. It was suggested that the *N*-terminal region of Leishmania metacaspases are cleaved independently of its autoprocessing activity [113]. Since their discovery, several evidences have suggested that metacaspases could act similarly to mammalian caspases in the PCD of unicellular eukaryotes. Particularly in Trypanosoma and Leishmania, metacaspases seem to be involved in stress-induced PCD [114,115]. However, unlike caspases that must be processed to exhibit catalytic activity, metacaspases do not need be processed by others to have catalytic activity, i.e., the autoprocessing allow them reaching maximal catalytic activity. Both catalytic and autoprocessing activities of metacaspases are strictly dependent on Ca^{2+} [102,116]. It was shown that, without autoprocessing, TbMCA2 is unable to exerted proteolytic activity [116]. Also, the overexpression of TbMCA4 on *Saccharomyces cerevisiae* inhibited the yeast growth and induced cell death, apparently due to the impairment of respiratory capacity. Nevertheless, it was proposed that TbMCA4 did not participate of the regulation of cell death in *T. brucei*, although its pseudo activity seems to be related to the production of virulence factors associated to the membrane [115]. Thus, *T. brucei* metacaspases (TbMCA2, −3, and −5) are involved in the cell cycle regulation and cell death program of this protozoa [115,117], as well as the metacaspase LmjMCA of *L. major* [118,119]. The LmjMCA expression is higher in the amastigote and procyclic promastigote forms and lower in metacyclic stages, regulating cell cycle progression and proliferation in *L. major* [118]. After autoprocessing, LmjMCA exhibited increased activity in *in vitro* assays [120].

3.1. Cysteine protease (CP) inhibitors as drug candidates

As mentioned before, CPs are involved in the life cycle and pathogenicity of several parasites, including Leishmania and Trypanosoma species. As these enzymes participates in the immune evasion, enzymatic activation, virulence, and tissue invasion, CPs are considered as potential targets to the development of new antileishmanial and trypanocidal drug candidates [121–124]. The antiparasitic effects of CP inhibitors from distinct chemical classes and with different targets in *Leishmania* and *Trypanosoma* have been reported, such as peptidomimetics (K11777, WRR-483, Cz007, Cz008), dipeptides (MDL28170), ketones (1,2,3-triazole-based tetrafluorophenoxymethyl ketone), benzophenones (1,2-substituted-1H-benzo[d]imidazole derivatives and benzophenone derivatives), quinolines (4-substituted quinoline HTI 15 and analogs of the 7-chloro-N-[3-(morpholin-4-yl)propyl]quinolin-4-amine compounds 1, 3 and 4), organic tellurium (RF07), aziridines (aziridine-2,3-dicarboxylate-Based compounds 13b and 13e), summarized in Table 3. Several efforts are ongoing to develop non-toxic and more specific inhibitors with improved biological half-lives and bioavailability [124]. In this regard, the oxalic acid-bis[[(2-hydroxy-1-naphthyl) methylene]hydrazide] derivatives (ZLIII43A and ZLIII115A) and

Table 3
Cysteine protease inhibitors with reported activity against *Leishmania* and *Trypanosoma* spp.

Compound class	Cysteine Protease Inhibitor	Target	Parasite
Peptidomimetic	K11777 or K777 [126]	Cruzain, Brucipain, LtCP	*T. cruzi*, *T. brucei*, *T. gambiense*, *L. tropica*
	WRR-483 [172]	Cruzain	*T. cruzi*
	Cz007, Cz008 [175]	Cruzipain	*T. cruzi*
Dipeptides	MDL28170 [177–179]	Calpain 1	*T. cruzi, L. amazonensis*
Ketones	1,2,3-triazole-based tetrafluorophenoxymethyl ketone [172]	Cruzain	*T. cruzi*
Benzophenones	1,2-substituted-1H-benzol [*d*]imidazole derivates (3aS, 4R, 4aR, 9bR, 9cR)-5-H; (9a-d) [132]	CPB 2.8ΔCTE	*L. mexicana*
	Benzophenone derivates (1c, 2c, 3a) [132]	Papain, rCPB2.8, rCPB 3.0, Cruzain	*L. amazonensis*, trypanosomatid *CP*
Quinolines	4-substituted quinoline (HTI 15)	Cathepsin B	*L. mexicana*
	Analogs of the 7-chloro-N0 [3-(*morpholin-4-yl*)*propyl*] quinoline-4-amine (Compounds 1, 3 and 4) [140]	Cruzain and rhodesain	*L. chagasi, L. amazonensis, T. cruzi*
Organic Tellurium	RF07 [139]	Cathepsin B	*L. chagasi*
Aziridines	Aziridine-2,3-Dicarboxylate-Based (13b and 13e) [169]	Cathepsin B and L, Rhodesain	*L. major, T. brucei*

pseudopeptide substrate analogue morpholine urea-phenylalanine-homophenylalanine-vinylsulfonyl-benzene (K11002) were assayed as reversible and irreversible CP inhibitors, respectively. They were able to kill Leishmania parasites *in vitro* at concentrations that did not affect mammalian host cells. The inhibition of Leishmania CP activity was accompanied by defects in the parasite's lysosomal/endosomal compartments, similar to those observed in lysosomal storage diseases [125]. *N*-methyl-piperazine-Phe-homoPhe-vinylsulfone phenyl 109 (K11777 or K777) is an orally bioavailable cruzain inhibitor with reasonable safety/toxicity profile included in pre-clinical studies for CD in mice [126], immunodeficient-mouse [127], and beagle dog models infected with *Trypanosoma cruzi* [128]. These drugs exhibited antiparasitic activity and decreased the size of the lesions in *L. tropica*-infected BALB/c mice by subcutaneous or intraperitoneal injections [129].

The search for CPs inhibitors in scientific databases revealed a wide range of compounds from different classes under evalutation. For example, eugenol ester derivatives, tested as leishmanicidal agents, inhibited the enzymatic activity of the cysteine protease rCPB2.8 from *L. mexicana*. The mechanism of inhibition involves the interaction of the glutamic acid residue (Glu^{205}) of the protein with the positively charged nitrogen group of the inhibitor [130]. Benzoxazole derivatives and their precursors inhibited *L. mexicana* CPs (rCPB2.8, and rCPB3.0) with relative lower toxicity when compared to standard drugs (pentamidine and amphotericin B) [129]. Also, benzophenone derivatives inhibited CPs from *L. mexicana* (CPBs) and *T. cruzi* (cruzain) and exhibited anti-leishmanial activity against the amastigote forms of *L. amazonensis* [131]. However, such effects were associated to cytotoxicity in murine macrophages. Alkylated benzophenone derivatives were also investigated and the 2-hydroxy-4-O-(3,3-dimethyl)-allylbenzophenone derivative inhibited rCPB 2.8, rCPB3.0, and cruzain, presenting IC_{50} values of 2.9, 4.3, and 1.6 μM, respectively. Although these compounds were less effective against amastigotes of *L. (L.) amazonensis* than amphotericin B, by comparing IC_{50} values, they exhibited lower toxicity than AmB. It was proposed that substitutions in the phenolic hydroxyl groups in benzophenone scaffold could modulate the toxicity and efficacy [132].

Natural bi-flavonoids isolated from *Garcinia brasilienses* and semi-synthetic derivatives exhibited potent activity against promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis* and low cytotoxicity in mammalian cells *in vitro*. Such effects correlated with the potent inhibitory activity of CPs of *L. (L.) mexicana* [133]. Also, the leishmanicidal and tripanocidal activity of cyclopalladated complexes has been also investigated [134,135]. Despite their antitumor activity associated with the inhibition of cathepsin B, these compounds inhibited CPs of Leishmania *in vitro* [125,136]. Another biphosphinic palladacycle complex [Pd(*C*2,N—S(-)DMPA)(DPPE)]Cl (DPPE 1:2) was active against *L. amazonensis in vitro* and *in vivo* at nontoxic concentrations to the host [137]. After 24 h incubation, the drug (75 and 150 nM) inhibited the parasite growth by 84 and 96 %, respectively, and about 100 % of promastigotes, after 48 and 72 h. After 72 h of incubation, DPPE 1:2 presented lower EC_{50} (higher efficacy) compared to AmB and glucantime [138]. Another class of compounds derived from chalcogens has been evaluated. Hypervalent tellurium derivative 4-phenyl methyl ether (RF07) was effective against the *L. chagasi*, decreasing the infection by 85, 92.4, and 95.7% after 3, 5, and 7 days of treatment, respectively. The RF07 concentration that had leishmanicidal activity against intracellular amastigotes was 10-fold lower than that needed to cause toxicity to macrophages [139]. Lastly, quinoline is an important chemical moiety frequently used for the design and synthesis of large spectra of chemotherapeutic derivatives. A variety of biological and pharmacological activities were described for quinoline derivatives, including antimalarial, antifungal, and antibacterial properties. A recent study with novel 4-substituted quinoline derivatives (named HTI 1 to HTI 24) shown that HTI 15 exhibited the most potent inhibitory activity against cysteine proteases type B of *L. mexicana*, with IC_{50} of 3.6, 5.78, and 12.44 μM for rCPB2.8, rCPB3.0 and rH84Y, respectively. These findings pointed to the therapeutic potential of 4-substituted quinolines as promising antileishmanial drugs [140].

The therapeutic arsenal available for the treatment of *T. cruzi* infection has high toxicity and low safety in long term administration. Thus, several studies have pointing to cysteine proteases from *T. cruzi* as potential targets to drug development. The parasite encodes genes from four clans of CPs (CA, CD, CE, and CF). Clan CA includes the most abundant protease of this parasite, cruzain (cruzipain or GP57/51), a papain-like cathepsin L-like member of family C1. Cruzain is expressed with a typical pro-sequence, a catalytic domain, and an unusual C-terminal extension containing 100–130 amino acids, similar to that of *T. brucei* [141,142] and Leishmania CPs [141,143,144]. Studies employing irreversible inhibitors showed that cruzain is fundamental for the parasite survival in the intracellular environment [88,145,146]. Cruzain is expressed in epimastigote and trypomastigote forms in the blood stream and it was identified as the main antigen in infected individuals. Thus, it is considered a strong candidate as epitope for the vaccine development [147,148]. This protease has crucial functions in differentiation, metabolism, immune response evasion, and the invasive capacity of host cells [149–151]. Cruzain activity is associated with the presence of a cysteine (Cys^{25}) and histidine (His^{172}) residues in its active site and the type of the chemical bond formed between the ligand and the active site establishes the type of inhibition. As example, vinyl sulphones and chalcones bind covalently to Cys^{25}, acting as irreversible inhibitors [152]. It was shown that cruzain inhibitors healed mice infected with *T. cruzi* [153], preventing the proliferation of the parasite in its extracellular epimastigote and intracellular amastigote forms [153,154]. Thus, several cruzain inhibitors were reported, such as thiosemicarbazones [155,156], fluoromethyl ketones [157], triazoles [158], chalcones [159], benzamidazoles [160], pyrimidines [161], ureas [162], carbazones, carboxyamides, carboxylic acids, vinylsulfones, hydrozones, and others [163,164].

Dipeptidyl enoate derivatives were also investigated as CP inhibitors using rhodesain, cruzain, and falcipain-2 as models and these compounds presented an irreversible inhibitory effect [165,166]. Another class of potent inhibitors of *Trypanosoma* CPs is the dipeptidyl nitroalkenes, which exhibited a reversible interaction and inhibited rhodesain and cruzain [167]. A structure-based design using optimized substitutions at

the triazine nitrile moiety for the S_1, S_2, and S_3 pockets produced inhibitors that interact with rhodesain at a nanomolar range [168]. Another series of compounds based on aziridine-2,3-dicarboxylate moiety were synthetized and assayed for the inhibitory activity of a papain-like CP expressed in *T. brucei*. Such compounds inhibited rhodesain at a micromolar range [169] and impaired Leishmania promastigote growth at mid-micromolar concentrations [170]. It was shown that carbamoyl imidazoles can act as cruzain inhibitors. The most potent derivative exhibited an inhibition constant (K_i) about 20 nM, presenting activity against *T. cruzi in vitro* and *in vivo* [171]. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketones also inhibited cruzain and CD in an *in vivo* mouse model, exhibiting a great potential as antitrypanosomal drug candidates [172]. Moreover, the vinyl sulfones derivatives represented by K11777 showed great inhibitory potency against cruzain, presenting antitrypanosomal activity also *in vivo*. WRR-483, a K11777 analogue, exhibited good inhibitory potency against cruzain *in vitro* and eradicated parasitic infection in a mouse model of acute Chagas' disease. However, it was 20-fold less effective than its analog K11777 and exhibited sensitivity to pH [173,174]. The reversible and orally bioavailable cruzain inhibitors Cz007 and Cz008 were also effective against *T cruzi* trypomastigotes (IC_{50} 1.1 and 1.8 nM, respectively) [175]. The dipeptide MDL 28170, a potent cell-permeable inhibitor of calpain I, II, and III, also exhibited antileishmanial effects against *L. amazonensis* (LD_{50} 23.3 μM) [176]. Regarding *T. cruzi*, MDL 28,170 inhibited the growth of epimastigote (IC_{50} 31.7 μM) and trypomastigote forms (IC_{50} 20.4 μM), and also diminished the adhesion of parasites to the insect guts [177–179].

The widespread expression of metacaspases in *Leishmania* and *Trypanosoma* spp., differences with mammalian caspases, as well as their crucial role in several physiological processes during all life stages in these parasites enable them as promising targets for drug development. Thus, many studies have been conducted along the last years to find or develop specific inhibitors for parasite CPs. In this regard, a set of specific inhibitors for the metacaspases TbMCA2 and TbMCA3 was designed, considering mimetic substitutions at P_1 and chemical modifications at P_2 positions, in order to obtain higher specificity and potency [180]. All synthetized compounds exhibited a competitive inhibitory activity in *in vitro* assays. The best inhibitor was also tested against human caspase 3 and it did not inhibit it, showing a selectivity for metacaspases. However, despite the selective and potent inhibitory effect against TbMCA2 and TbMCA3 *in vitro*, they showed only a slight antiparasitic activity *in vivo* [181]. Procaspase-activating compound 1 (PAC-1), a procaspase 3 activator, was assayed against TcMCA3 of *T. cruzi* and it decreased the viability of epimastigote forms (but not metacyclic trypomastigotes), with an IC_{50} around 14 μM. Such effect was accompanied by mitochondrial transmembrane potential dissipation and phosphatidylserine externalization, suggesting the triggering of the apoptotic program. Interestingly, PAC-1 also decreased the viability of mammalian cells but with a 3-fold higher IC_{50} value, indicating distinct mode of action/affinity of this compound with caspases and metacaspases [181]. Thus, although metacaspases have the potential to constitute an excellent target for a development of new compounds, the development of specific and selective inhibitors with both *in vitro* and *in vivo* activities still remains a challenge.

4. Final remarks

The current evidences point to the protozoal CPs as potential targets to the development of selective and effective inhibitors to be considered as new drugs against leishmaniasis and trypanosomiasis. Modern tools applied in medicinal chemistry and biochemical/pharmacological studies, such as drug library high throughput screening and *in silico* analyses, combined with the *in vivo* assays certainly will contribute to the development of CPs inhibitors in a near future to be added to the therapeutic arsenal available to treat neglected diseases.

Funding

This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2016/25112–4; 2018/25747–5; 2019/05936–0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 305672/2019–2; 312020/2019-8), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Financial code 001).

CRediT authorship contribution statement

Wagner A.S. Judice: Writing - original draft. **Letícia Silva Ferraz:** Investigation, Writing - original draft. **Rayssa de Mello Lopes:** . **Luan dos Santos Vianna:** Investigation. **Fábio da Silva Siqueira:** Investigation. **Juliana F. Di Iorio:** Investigation. **Laura de Azevedo Maffeis Dalzoto:** Investigation, Writing - original draft. **Mariana Nascimento Romero Trujilho:** Investigation. **Taiz dos Reis Santos:** Investigation, Writing - original draft. **Maurício F.M. Machado:** Writing - original draft. **Tiago Rodrigues:** Conceptualization, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1 Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999;354:1191–1199. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10178-2.
2 Book Review: Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. Perspect Public Health. 2012;132(4):192–2. http://doi.org/10.1177/1757913912449575.
3 Akinsolu FT, Nemieboka PO, Njuguna DW, Ahadji MN, Dezso D, Varga O. Emerging resistance of neglected tropical diseases: A scoping review of the literature. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16. https://doi.org/10.3390/ijerph16111925.
4 Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites Vectors*. 2017;10:1–10. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5.
5 Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349.
6 Killick-Kendrick R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*. 1999;17:279–289. https://doi.org/10.1016/S0738-081X(99)00046-2.
7 Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:581–596. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8.
8 World Helth Organization – Leishmaniasis: Vector control, 2018. - Pesquisa Google. Accessed March 23, 2021. https://www.google.com/search?q=World+Helth+Organization+–+Leishmaniasis%3A+Vector+control%2C+2018.&rlz=1C5CHFA_enBR824BR824&oq=World+Helth+Organization+–+Leishmaniasis%3A+Vector+control%2C+2018.&aqs=chrome..69i57.1161j0j9&sourceid=chrome&ie=UTF-8.
9 Burza S, Croft S, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018;392:951–970.
10 Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: The Leishmaniases in Biology and Medicine. Volume I. Biology and Epidemiology. ; 1987.
11 Arevalo J, Ramirez L, Adaui V, et al. Influence of Leishmania (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007;195:1846–1851. https://doi.org/10.1086/518041.
12 Andrade-Narváez FJ, Vargas-González A, Canto-Lara SB, Damián-Centeno AG. Clinical Picture of Cutaneous Leishmaniases Due to Leishmania (Leishmania) Mexicana in the Yucatan Peninsula Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96:163–167. https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000200005.
13 Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:1933–1938. https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.1933-1938.2000.
14 Rogers M, Kropf P, Choi BS, et al. Proteophosophoglycans regurgitated by Leishmania-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog*. 2009;5. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000555.
15 Rogers ME, Corware K, Müller I, Bates PA. Leishmania infantum proteophosphoglycans regurgitated by the bite of its natural sand fly vector, Lutzomyia longipalpis, promote parasite establishment in mouse skin and skin-distant tissues. *Microbes Infect*. 2010;12:875–879. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.05.014.

16 Rodríguez NE, Dixit UG, Allen L-AH, Wilson ME. Stage-Specific Pathways of Leishmania infantum chagasi Entry and Phagosome Maturation in Macrophages. Macrophages PLoS ONE. 2011;6(4):19000. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0019000.

17 Serafim TD, Coutinho-Abreu IV, Oliveira F, Meneses C, Kamhawi S, Valenzuela JG. Sequential blood meals promote Leishmania replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat Microbiol*. 2018;3:548–555. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0125-7.

18 Ramiro Assis R, Soares Noronha F, Turco SJ, et al. Molecular and Cellular Biochemistry Faculty Publications. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:44. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001543.

19 Moradin N, Descoteaux A. Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:121. https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00121.

20 Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. Leishmania virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect*. 2012;14:1377–1389. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.014.

21 Reithinger R, Mohsen M, Aadil K, Sidiqi M, Erasmus P, Coleman PG. Anthroponotic cutaneous leishmaniasis, Kabul Afghanistan. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:727–729. https://doi.org/10.3201/eid0906.030026.

22 Brooker S, Mohammed N, Adil K, et al. Leishmaniasis in refugee and local Pakistani populations. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:1681–1684. https://doi.org/10.3201/eid1009.040179.

23 Akilov OE, Khachemoune A. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis Clinical trials in CTCL View project Empiric Treatment for Serious Bacterial Infections View project. *Artic Int J Dermatology Published online*. 2007. https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2007.03154.x.

24 Kima PE. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *Int J Parasitol*. 2007;37:1087–1096. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.007.

25 Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27:305–318. https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004.

26 Guerin PJ, Olliaro P, Nosten F, et al. Malaria: Current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *Lancet Infect Dis*. 2002;2:564–573. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00372-9.

27 Sousa F das CA, Soares HVA, Lemos LEAS, Reis DM, Silva WC da, Rodrigues LA de S. Perfil epidemiológico de doenças negligenciadas de notificação compulsória no Brasil com análise dos investimentos governamentais nessa área. Res Soc Dev. 2020;9(1):e62911610. http://doi.org/10.33448/rsd-v9i1.1610.

28 Bilheiro AB, Da Rosa JA, De Oliveira J, et al. First report of natural infection with trypanosoma cruzi in rhodnius montenegrensis (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) in Western Amazon Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 2018;18:605–610. https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2266.

29 Chagas C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909;1:159–218. https://doi.org/10.1590/s0074-02761909000200008.

30 Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375:1388–1402. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X.

31 Tyler KM, Engman DM. The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited. In: International Journal for Parasitology. Vol. 2001:472–81. http://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9.

32 Burleigh BA, Andrews NW. The mechanisms of Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:175–200. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.001135.

33 Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. Trypanosoma cruzi and chagas' disease in the united states. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24:655–681. https://doi.org/10.1128/CMR.00005-11.

34 Vago AR, Andrade LO, Leite AA, et al. Genetic characterization of Trypanosoma cruzi directly from tissues of patients with chronic chagas disease: Differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 2000;156:1805–1809. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65052-3.

35 Barbosa-Ferreira JM, Guerra JA de O, Santana Filho FS de, Magalhães BML, Coelho LIARC, Barbosa M das GV. [Cardiac involvement in Acute Chagas' Disease cases in the Amazon region]. Arq Bras Cardiol. 2010;94(6). http://doi.org/10.1590/s0066-782x2010000600023.

36 Oliveira BG, Abreu MNS, Abreu CDG, da Costa Rocha MO, Ribeiro AL. Qualidade de vida relacionada à saúde na doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44:150–156. https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000002.

37 Berbert TRN, De Mello TFP, Wolf Nassif P, et al. Pentavalent antimonials combined with other therapeutic alternatives for the treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A systematic review. *Dermatol Res Pract*. 2018;2018. https://doi.org/10.1155/2018/9014726.

38 Turcano L, Torrente E, Missineo A, et al. Identification and binding mode of a novel Leishmania Trypanothione reductase inhibitor from high throughput screening. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006969.

39 Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop*. 2011;118:87–96. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007.

40 Gasser RA, Magill AJ, Oster CN, Franke ED, Grögl M, Berman JD. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 1994;18:83–90. https://doi.org/10.1093/clinids/18.1.83.

41 Maltezou HC. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010. https://doi.org/10.1155/2010/617521.

42 Singh N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of Leishmania donovani. Indian J Med Res. 2006;123(3):411-422. Accessed March 24, 2021. https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.490.4804&rep=rep1&type=pdf.

43 Singh N, Chatterjee M, Sundar S. The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India. *Parasites Vectors*. 2014;7. https://doi.org/10.1186/s13071-014-0596-1.

44 Sundar S, More DK, Singh MK, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: Report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis*. 2000;31:1104–1107. https://doi.org/10.1086/318121.

45 Coelho AC, Messier N, Ouellette M, Cotrim PC. Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in Leishmania amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:3030–3032. https://doi.org/10.1128/AAC.00404-07.

46 Baker N, Glover L, Munday JC, et al. Aquaglyceroporin 2 controls susceptibility to melarsoprol and pentamidine in African trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:10996–11001. https://doi.org/10.1073/pnas.1202885109.

47 Jha TK. Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment of resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983;77:167–170. https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90058-5.

48 Moen MD, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ. Liposomal amphotericin B: A review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs*. 2009;69:361–392. https://doi.org/10.2165/00003495-200969030-00010.

49 Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against Leishmania donovani. *Biochem Pharmacol*. 1987;36:2633–2636. https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90543-0.

50 Kuhlencord A, Maniera T, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine: Oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:1630–1634. https://doi.org/10.1128/AAC.36.8.1630.

51 Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, et al. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet*. 1998;352:1821–1823. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04367-0.

52 Jha TK, Sundar S, Thakur CP, et al. Miltefosine, an Oral Agent, for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. *N Engl J Med*. 1999;341:1795–1800. https://doi.org/10.1056/nejm199912093412403.

53 Sundar S, Jaya J. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: Dose and response. *J Glob Infect Dis*. 2010;2:159. https://doi.org/10.4103/0974-777x.62886.

54 Wijnant GJ, Van Bocxlaer K, Yardley V, et al. Comparative efficacy, toxicity and biodistribution of the liposomal amphotericin B formulations Fungisome® and Am Bisome® in murine cutaneous leishmaniasis. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2018;8:223–228. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.04.001.

55 Adler-Moore J, Proffitt RT. Effect of tissue penetration on AmBisome efficacy. Curr Opin Investig Drugs. 2003;4(2):179-185. Accessed March 25, 2021. https://www.researchgate.net/publication/10828143.

56 Adler-Moore J, Proffitt RT. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. J Antimicrob Chemother. 2002;49(suppl_1):21-30. Accessed March 25, 2021. https://academic.oup.com/jac/article-abstract/49/suppl_1/21/2473432.

57 Sundar S, Mehta H, Suresh AV, Singh SP, Rai M, Murray HW. Amphotericin B Treatment for Indian Visceral Leishmaniasis: Conventional versus Lipid Formulations. *Clin Infect Dis*. 2004;38:377–383. https://doi.org/10.1086/380971.

58 Melos JLR, Echevarria A. Trypanosomatids metabolic systems as potential chemotherapeutic targets. *Rev Virtual Quim*. 2012;4:374–392. https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120029.

59 Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim Nova*. 2009;32:2444–2457. https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000900038.

60 Roberts SC. Genetic Manipulation of Leishmania Parasites Facilitates the Exploration of the Polyamine Biosynthetic Pathway as a Potential Therapeutic Target. Adv Genet Reseach. 2013;10:29-54. Accessed March 25, 2021. http://commons.pacificu.edu/phrmfac.

61 Sousa Silva M, Gomes RA, Ferreira AEN, Ponces Freire A, Cordeiro C. The glyoxalase pathway: The first hundred years... and beyond. *Biochem J*. 2013;453:1–15. https://doi.org/10.1042/BJ20121743.

62 Zhang K, Beverley SM. Phospholipid and sphingolipid metabolism in Leishmania. *Mol Biochem Parasitol*. 2010;170:55–64. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.12.004.

63 Abu-Mejdad N. Evaluation of therapeutic effects of vicine against leishmania donovani. in vitro. J Am Sci. 2013;9(5):115-20. Accessed March 25, 2021. http://www.jof.

64 Gangjee A, Jain H, Kurup S. Recent Advances in Classical and Non-Classical Antifolates as Antitumor and Antiopportunistic Infection Agents: Part II. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008;8:205–231. https://doi.org/10.2174/187152008783497064.

65 Luz NF, Andrade BB, Feijó DF, et al. Heme Oxygenase-1 Promotes the Persistence of Leishmania chagasi Infection. *J Immunol*. 2012;188:4460–4467. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103072.

66 Kaur PK, Dinesh N, Soumya N, Kishore Babu N, Singh S. Identification and characterization of a novel Ribose 5-phosphate isomerase B from Leishmania donovani. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;421:51–56. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.107.

67 Cordeiro AT, Feliciano PR, Pinheiro MP, Nonato MC. Crystal structure of dihydroorotate dehydrogenase from Leishmania major. *Biochimie*. 2012;94:1739–1748. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.003.

68 Silva AM, Tavares J, Silvestre R, Ouaissi A, Coombs GH, Cordeiro-da-Silva A. Characterization of Leishmania infantum thiol-dependent reductase 1 and evaluation of its potential to induce immune protection. *Parasite Immunol*. 2012;34: 345–350. https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01361.x.

69 Rotella DP. Recent results in protein kinase inhibition for tropical diseases. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2012;22:6788–6793. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.09.044.

70 Grover A, Katiyar SP, Singh SK, Dubey VK, Sundar D. A leishmaniasis study: Structure-based screening and molecular dynamics mechanistic analysis for discovering potent inhibitors of spermidine synthase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 1824;2012:1476–1483. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.05.016.

71 Antonio Marin-Neto J, Rassi A, Avezum A, Mattos AC, Rassi A. The Benefit trial: Testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:319–324. https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900042.

72 Urbina JA. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: Advances, challenges and perspectives. *J Eukaryot Microbiol*. 2015;62. https://doi.org/10.1111/jeu.12184.

73 Canavaci AMC, Bustamante JM, Padilla AM, et al. In Vitro and In Vivo High-throughput assays for the testing of Anti-trypanosoma cruzi compounds. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000740.

74 Moraes CB, Giardini MA, Kim H, et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against Trypanosoma cruzi: Implications for Chagas disease drug discovery and development. Sci Rep. 2014;4. http://doi.org/10.1038/srep04703.

75 Urbina JA, Gascon J, Ribeiro I. Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2016;374:188–190. https://doi.org/10.1056/nejmc1514453.

76 Vallejo A, Monge-Maillo B, Gutiérrez C, Norman FF, López-Vélez R, Pérez-Molina JA. Changes in the immune response after treatment with benznidazole versus no treatment in patients with chronic indeterminate Chagas disease. *Acta Trop*. 2016;164. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.010.

77 Torrico F, Gascon J, Ortiz L, et al. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018;18. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30538-8.

78 Torrico F, Gascón J, Barreira F, et al. New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. *Lancet Infect Dis Published online*. 2021. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30844-6.

79 Apt W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Des Devel Ther*. 2010;4:243–253. https://doi.org/10.2147/DDDT.S8338.

80 Berti PJ, Storer AC. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J Mol Biol*. 1995;246. https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0083.

81 Verma S, Dixit R, Pandey KC. Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Front Pharmacol*. 2016;7. https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107.

82 Coulombe R, Grochulski P, Sivaraman J, Ménard R, Mort JS, Cygler M. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J*. 1996;15. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00934.x.

83 Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, et al. and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res Published online*. 2017;2018. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1134.

84 Mottram JC, Souza AE, Hutchison JE, Carter R, Frame MJ, Coombs GH. Evidence from disruption of the lmcpb gene array of Leishmania mexicana that cysteine proteinases are virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93. https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.6008.

85 Matlashewski G. Leishmania infection and virulence. *Med Microbiol Immunol*. 2001; 190. https://doi.org/10.1007/s004300100076.

86 Selzer PM, Pingel S, Hsieh I, et al. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: Lessons from a parasite target. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96. https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11015.

87 North MJ, Coombs GH. Proteinases of Leishmania mexicana amastigotes and promastigotes: Analysis by gel electrophoresis. *Mol Biochem Parasitol*. 1981;3. https://doi.org/10.1016/0166-6851(81)90003-7.

88 Siqueira-Neto JL, Debnath A, McCall LI, et al. Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006512.

89 De Souza Leao S, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC. Intracellular Leishmania amazonensis amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci*. 1995;108.

90 Judice WAS, Mottram JC, Coombs GH, Juliano MA, Juliano L. Specific negative charges in cysteine protease isoforms of Leishmania mexicana are highly influential on the substrate binding and hydrolysis. *Mol Biochem Parasitol*. 2005;144. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.07.004.

91 Judice WAS, Manfredi MA, Souza GP, et al. Heparin modulates the endopeptidase activity of Leishmania mexicana cysteine protease cathepsin L-like rCPB2.8. *PLoS ONE*. 2013;8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080153.

92 Kulkarni MM, Jones EA, McMaster WR, McGwire BS. Fibronectin binding and proteolytic degradation by Leishmania and effects on macrophage activation. *Infect Immun*. 2008;76. https://doi.org/10.1128/IAI.01274-07.

93 Caroselli EE, Assis DM, Barbiéri CL, et al. Leishmania (L.) amazonensis peptidase activities inside the living cells and in their lysates. *Mol Biochem Parasitol*. 2012; 184. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.04.012.

94 Judice WAS, Puzer L, Cotrin SS, et al. Carboxydipeptidase activities of recombinant cysteine peptidases Cruzain of Trypanosoma cruzi and CPB of Leishmania mexicana. *Eur J Biochem*. 2004;271. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04008.x.

95 Di Dai B, Wang Y, Li DD, et al. Hsp90 Is Involved in Apoptosis of Candida albicans by Regulating the Calcineurin-Caspase Apoptotic Pathway. *PLoS ONE*. 2012;7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045109.

96 Klemenčič M, Funk C. Evolution and structural diversity of metacaspases. *J Exp Bot Published online*. 2019. https://doi.org/10.1093/jxb/erz082.

97 Uren AG, O'Rourke K, Aravind L, et al. Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell Published online*. 2000. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00094-0.

98 Sundström JF, Vaculova A, Smertenko AP, et al. Tudor staphylococcal nuclease is an evolutionarily conserved component of the programmed cell death degradome. *Nat Cell Biol Published online*. 2009. https://doi.org/10.1038/ncb1979.

99 Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, et al. Molecular cloning of the interleukin-1β converting enzyme. *Science (80-)*. 1992;256. https://doi.org/10.1126/science.1373520.

100 Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science (80-)*. 2004;305. https://doi.org/10.1126/science.1099320.

101 Aravind L, Koonin EV. Classification of the caspase-hemoglobinase fold: Detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins. *Proteins Struct Funct Genet*. 2002;46. https://doi.org/10.1002/prot.10060.

102 Machado MFM, Marcondes MF, Juliano MA, et al. Substrate specificity and the effect of calcium on Trypanosoma brucei metacaspase 2. *FEBS J*. 2013;280. https://doi.org/10.1111/febs.12248.

103 Vercammen D, De Cotte B Van, De Jaeger G, et al. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of Arabidopsis thaliana cleave substrates after arginine and lysine. J Biol Chem. Published online 2004. http://doi.org/10.1074/jbc.M406329200.

104 Moss CX, Westrop GD, Juliano L, Coombs GH, Mottram JC. Metacaspase 2 of Trypanosoma brucei is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. *FEBS Lett*. 2007;581:5635–5639. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.009.

105 Tsiatsiani L, Van Breusegem F, Gallois P, Zavialov A, Lam E, Bozhkov PV. *Metacaspases Cell Death Differ Published online*. 2011. https://doi.org/10.1038/cdd.2011.66.

106 Minina EA, Staal J, Alvarez VE, et al. Classification and Nomenclature of Metacaspases and Paracaspases: No More Confusion with Caspases. *Mol Cell Published online*. 2020. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.020.

107 Mottram JC, Helms MJ, Coombs GH, Sajid M. Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. *Trends Parasitol Published online*. 2003. https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00038-2.

108 Kosec G, Alvarez VE, Agüero F, et al. Metacaspases of Trypanosoma cruzi: Possible candidates for programmed cell death mediators. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;145. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.09.001.

109 Lee N, Gannavaram S, Selvapandiyan A, Debrabant A. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite Leishmania. *Eukaryot Cell Published online*. 2007. https://doi.org/10.1128/EC.00123-07.

110 Vercammen D, Belenghi B, van de Cotte B, et al. Serpin1 of Arabidopsis thaliana is a Suicide Inhibitor for Metacaspase 9. *J Mol Biol Published online*. 2006. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.010.

111 McLuskey K, Rudolf J, Proto WR, et al. Crystal structure of a Trypanosoma brucei metacaspase. *Proc Natl Acad Sci USA Published online*. 2012. https://doi.org/10.1073/pnas.1200885109.

112 Wong AHH, Yan C, Shi Y. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. *J Biol Chem Published online*. 2012. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381806.

113 Khademvatan S, Gharavi MJ, Saki J. Miltefosine induces metacaspase and PARP genes expression in Leishmania infantum. *Brazilian J Infect Dis Published online*. 2011. https://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70225-2.

114 Proto WR, Castanys-Munoz E, Black A, et al. Trypanosoma brucei metacaspase 4 is a pseudopeptidase and a virulence factor. *J Biol Chem Published online*. 2011. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.292334.

115 Helms MJ, Ambit A, Appleton P, Tetley L, Coombs GH, Mottram JC. Bloodstream form Trypanosoma brucei depend upon multiple metacaspases associated with RAB11-positive endosomes. *J Cell Sci Published online*. 2006. https://doi.org/10.1242/jcs.02809.

116 Gilio JM, Marcondes MF, Ferrari D, et al. Processing of metacaspase 2 from Trypanosoma brucei (TbMCA2) broadens its substrate specificity. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics Published online*. 2017. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.01.002.

117 Debrabant A, Lee N, Bertholet S, Duncan R, Nakhasi HL. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *Int J Parasitol*. 2003;33. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00008-0.

118 Ambit A, Fasel N, Coombs GH, Mottram JC. An essential role for the Leishmania major metacaspase in cell cycle progression. *Cell Death Differ Published online*. 2008. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402232.

119 Casanova M, Gonzalez IJ, Sprissler C, et al. Implication of different domains of the Leishmania major metacaspase in cell death and autophagy. *Cell Death Dis Published online*. 2015. https://doi.org/10.1038/cddis.2015.288.

120 González IJ, Desponds C, Schaff C, Mottram JC, Fasel N. Leishmania major metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. *Int J Parasitol Published online*. 2007. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.10.004.

121 McKerrow JH, Engel JC, Caffrey CR. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorganic. Med Chem.* 1999;7. https://doi.org/10.1016/S0968-0896(99)00008-5.

122 McKerrow JH. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: Insights on safety, target validation, and mechanism of action. In: International Journal for Parasitology. Vol 29. ; 1999. http://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00044-2.

123 Freitas PG, Castilho TE, De Almeida L, et al. An in silico study of benzophenone derivatives as potential non-competitive inhibitors of trypanosoma cruzi and Leishmania amazonensis cysteine proteinases. *J Braz Chem Soc*. 2018;29. https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170164.

124 Caffrey C, Scory S, Steverding D. Cysteine Proteinases of Trypanosome Parasites Novel Targets for Chemotherapy. *Curr Drug Targets*. 2005;1. https://doi.org/10.2174/1389450003349290.

125 Matsuo AL, Silva LS, Torrecilhas AC, et al. In vitro and in vivo trypanocidal effects of the cyclopalladated compound 7a, a drug candidate for treatment of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54. https://doi.org/10.1128/AAC.00323-10.

126 Engel JC, Doyle PS, Hsieh I, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors cure an experimental Trypanosoma cruzi infection. *J Exp Med*. 1998;188. https://doi.org/10.1084/jem.188.4.725.

127 Doyle PS, Zhou YM, Engel JC, McKerrow JH. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51. https://doi.org/10.1128/AAC.00436-07.

128 Barr SC, Warner KL, Kornreic BG, et al. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by Trypanosoma cruzi. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49. https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.5160-5161.2005.

129 Mahmoudzadeh-Niknam H, McKerrow JH. Leishmania tropica: Cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. *Exp Parasitol*. 2004;106. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.03.005.

130 Sajid M, Robertson SA, Brinen LS, Cruzain McKerrow JH. The path from target validation to the clinic. *Adv Exp Med Biol*. 2011;712. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8414-2_7.

131 Coelho CM, Dos Santos T, Freitas PG, et al. Design, synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of novel eugenol esters as leishmanicidal agents. *J Braz Chem Soc Published online*. 2018. https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170192.

132 Folquitto LRS, Nogueira PF, Espuri PF, et al. Synthesis, protease inhibition, and antileishmanial activity of new benzoxazoles derived from acetophenone or benzophenone and synthetic precursors. *Med Chem Res*. 2017;26. https://doi.org/10.1007/s00044-017-1824-y.

133 de Almeida L, Alves KF, Maciel-Rezende CM, et al. Benzophenone derivatives as cysteine protease inhibitors and biological activity against Leishmania(L.) amazonensis amastigotes. *Biomed Pharmacother*. 2015;75. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.08.030.

134 Gontijo VS, Judice WAS, Codonho B, et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural biflavonoids isolated from Garcinia brasiliensis and their semisynthetic derivatives. *Eur J Med Chem*. 2012;58. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.021.

135 Fricker SP, Mosi RM, Cameron BR, et al. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. *J Inorg Biochem*. 2008;102. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.05.010.

136 Navarro M, Betancourt A, Hernández C, Marchán E. Palladium polypyridyl complexes: Synthesis, characterization, DNA interaction and biological activity on Leishmania (L.) mexicana. *J Braz Chem Soc*. 2008;19. https://doi.org/10.1590/S0103-50532008000700018.

137 Bincoletto C, Tersariol ILS, Oliveira CR, et al. Chiral cyclopalladated complexes derived from N, N-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis (diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity and as antitumoral agents. *Bioorganic MedChem*. 2005;13. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.01.057.

138 de Paladi CS, Pimentel IAS, Katz S, et al. In vitro and in vivo activity of a palladacycle complex on Leishmania (Leishmania) amazonensis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001626.

139 Pimentel IAS, Paladi C de S, Katz S, Júdice WA de S, Cunha RLOR, Barbiéri CL. In Vitro and In Vivo Activity of an Organic Tellurium Compound on Leishmania (Leishmania) chagasi. PLoS One. 2012;7(11). http://doi.org/10.1371/journal.pone.0048780.

140 Costa CA, Lopes RM, Ferraz LS, et al. Cytotoxicity of 4-substituted quinoline derivatives: Anticancer and antileishmanial potential. *Bioorganic Med Chem*. 2020;28. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115511.

141 Mottram JC, North MJ, Barry JD, Coombs GH. A cysteine proteinase cDNA from Trypanosoma brucei predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension. *FEBS Lett*. 1989;258. https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81655-2.

142 Pamer EG, Davis CE, Eakin A, So M. Cloning and sequencing of the cysteine protease cDNA from Trypanosoma brucei rhodesiense. *Nucleic Acids Res*. 1990;18. https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6141.

143 Souza AE, Waugh S, Coombs GH, Mottram JC. Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of Leishmania mexicana. *FEBS Lett*. 1992;311. https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)81382-V.

144 Traub-Cseko YM, Duboise M, Boukai LK, McMahon-Pratt D. Identification of two distinct cysteine proteinase genes of Leishmania pifanoi axenic amastigotes using the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;57. https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90248-V.

145 Murta ACM, Persechini PM, Padron T de S, de Souza W, Guimarães JA, Scharfstein J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of Trypanosoma cruzi as a cysteine proteinase. Mol Biochem Parasitol. 1990;43(1). http://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90127-8.

146 Campetella O, Henriksson J, Åslund U, Frasch ACC, Pettersson U, Cazzulo JJ. The major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;50. https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90219-A.

147 Scharfstein J, Schechter M, Senna M, Peralta JM, Mendonça-Previato L, Miles MA. Trypanosoma cruzi: Characterization and isolation of A 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J Immunol*. 1986;137.

148 Duschak V, Couto A. Cruzipain, the Major Cysteine Protease of Trypanosoma cruzi: A Sulfated Glycoprotein Antigen as Relevant Candidate for Vaccine Development and Drug Target. A Review. *Curr Med Chem*. 2009;16. https://doi.org/10.2174/092986709788802971.

149 Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite Trypanosoma cruzi. *Biol Chem*. 1997;378. https://doi.org/10.1515/bchm.1997.378.1.1.

150 Franke de Cazzulo BM, Martínez J, North MJ, Coombs GH, Cazzulo JJ. Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of Trypanosoma cruzi. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;124. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07265.x.

151 Meirelles MNL, Juliano L, Carmona E, et al. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of Trypanosoma cruzi in vitro. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;52. https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90050-T.

152 Herrera-Mayorga V, Lara-Ramírez EE, Chacón-Vargas KF, et al. Structure-based virtual screening and in vitro evaluation of new trypanosoma cruzi cruzain inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2019;20. https://doi.org/10.3390/ijms20071742.

153 Gea S, Guiñazu N, Pellegrini A, et al. Cruzipain, a major Trypanosoma cruzi cystein protease in the host-parasite interplay. *Inmunologia*. 2006;25.

154 Ashall F, Angliker H, Shaw E. Lysis of trypanosomes by peptidyl fluoromethyl ketones. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;170. https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)92179-4.

155 Andricopulo A, Guido R, Oliva G. Virtual Screening and Its Integration with Modern Drug Design Technologies. *Curr Med Chem*. 2008;15. https://doi.org/10.2174/092986708783330683.

156 Fujii N, Mallari JP, Hansell EJ, et al. Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2005;15. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.10.023.

157 Gillmor SA, Craik CS, Fletterick RJ. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. *Protein Sci*. 1997;6. https://doi.org/10.1002/pro.5560060801.

158 Brak K, Doyle PS, McKerrow JH, Ellman JA. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. *J Am Chem Soc*. 2008;130. https://doi.org/10.1021/ja710254m.

159 Borchhardt DM, Mascarello A, Chiaradia LD, et al. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from trypanosoma cruzi. *J Braz Chem Soc*. 2010;21. https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000100021.

160 Ferreira RS, Simeonov A, Jadhav A, et al. Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. *J Med Chem*. 2010;53. https://doi.org/10.1021/jm100488w.

161 Espíndola JWP, De Oliveira Cardoso MV, De Oliveira Filho GB, et al. Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting Trypanosoma cruzi cruzain. *Eur J Med Chem*. 2015;101. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.048.

162 Du X, Hansell E, Engel JC, Caffrey CR, Cohen FE, McKerrow JH. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. *Chem Biol*. 2000;7. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00018-1.

163 Roush WR, Hernandez AA, McKerrow JH, Selzer PM, Hansell E, Engel JC. Design, synthesis and evaluation of D-Homophenylalanyl epoxysuccinate inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. In: Tetrahedron. Vol 56. ; 2000. http://doi.org/10.1016/S0040-4020(00)00882-6.

164 Beaulieu C, Isabel E, Fortier A, et al. Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2010;20. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.10.015.

165 Royo S, Schirmeister T, Kaiser M, et al. Antiprotozoal and cysteine proteases inhibitory activity of dipeptidyl enoates. *Bioorganic Med Chem*. 2018;26:4624–4634. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.07.015.

166 Royo S, Rodríguez S, Schirmeister T, Kesselring J, Kaiser M, González FV. Dipeptidyl Enoates As Potent Rhodesain Inhibitors That Display a Dual Mode of Action. *Chem Med Chem*. 2015;10. https://doi.org/10.1002/cmdc.201500204.

167 Latorre A, Schirmeister T, Kesselring J, et al. Dipeptidyl Nitroalkenes as Potent Reversible Inhibitors of Cysteine Proteases Rhodesain and Cruzain. *ACS Med Chem Lett*. 2016;7. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00276.

168 Ehmke V, Winkler E, Banner DW, et al. Optimization of Triazine Nitriles as Rhodesain Inhibitors: Structure-Activity Relationships, Bioisosteric Imidazopyridine Nitriles, and X-ray Crystal Structure Analysis with Human CathepsinL. *Chem Med Chem*. 2013;8. https://doi.org/10.1002/cmdc.201300112.

169 Vicik R, Hoerr V, Glaser M, et al. Aziridine-2,3-dicarboxylate inhibitors targeting the major cysteine protease of Trypanosoma brucei as lead trypanocidal agents. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2006;16. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.02.026.

170 Ponte-Sucre A, Vicik R, Schultheis M, Schirmeister T, Moll H. Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50. https://doi.org/10.1128/AAC.01430-05.

171 De Souza ML, De Oliveira Rezende Junior C, Ferreira RS, et al. Discovery of Potent, Reversible, and Competitive Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity: A Structure-Based Drug Design Approach. J Chem Inf Model. 2020;60(2). http://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00802.

172 Brak K, Kerr ID, Barrett KT, et al. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for chagas disease chemotherapy. *J Med Chem*. 2010;53. https://doi.org/10.1021/jm901633v.

173 Chen YT, Brinen LS, Kerr ID, et al. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against Trypanosoma cruzi. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000825.

174 Jones BD, Tochowicz A, Tang Y, et al. Synthesis and Evaluation of Oxyguanidine Analogues of the Cysteine Protease Inhibitor WRR-483 against Cruzain. *ACS Med Chem Lett*. 2016;7. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00336.

175 Ndao M, Beaulieu C, Black WC, et al. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a chagas disease cure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58. https://doi.org/10.1128/AAC.01855-13.

176 d'Avila-Levy CM, Marinho FA, Santos LO, Martins JL, Santos ALS, Branquinha MH. Antileishmanial activity of MDL 28170, a potent calpain inhibitor. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;28. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.03.021.

177 Sangenito LS, Ennes-Vidal V, Marinho FA, et al. Arrested growth of Trypanosoma cruzi by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms. *Parasitology*. 2009;136. https://doi.org/10.1017/S0031182009005629.

178 Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RFS, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of Trypanosoma cruzi in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65. https://doi.org/10.1093/jac/dkq154.

179 Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RFS, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. MDL28170, a calpain inhibitor, affects Trypanosoma cruzi metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to Rhodnius prolixus midgut. *PLoS ONE*. 2011;6. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018371.

180 Berg M, Van der Veken P, Joossens J, et al. Design and evaluation of Trypanosoma brucei metacaspase inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett Published online*. 2010. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.01.099.

181 de Castro E, Reus TL, de Aguiar AM, Ávila AR, de Arruda Campos Brasil de Souza T. Procaspase-activating compound-1 induces apoptosis in Trypanosoma cruzi. Apoptosis. 2017;22(12). http://doi.org/10.1007/s10495-017-1428-5.

ANEXO 2 - METACASPASE OF *Saccharomyces cerevisiae* (ScMCA-Ia) PRESENTS DIFFERENT CATALYTIC CYSTEINE IN A PROCESSED AND NON-PROCESSED FORM

Biochemical and Biophysical Research Communications 687 (2023) 149185

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Metacaspase of *Saccharomyces cerevisiae* (ScMCA-Ia) presents different catalytic cysteine in a processed and non-processed form

Laura de Azevedo Maffeis Dalzoto [a,1], Mariana Nascimento Romero Trujilho [a,1], Taiz dos Reis Santos [a], João Pedro Martins Silva Costa [a], Ane Caroline Moreira Duarte [b], Wagner Alves de Souza Judice [a], Marcelo Ferreira Marcondes [c], Maurício Ferreira Marcondes Machado [a,b,*]

[a] *Interdisciplinary Center for Biochemical Research, University of Mogi das Cruzes, Av Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza, 200, 08780-991, Mogi das Cruzes, Brazil*
[b] *Technological Research Center, University of Mogi das Cruzes, Av Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza, 200, 08780-991, Mogi das Cruzes, Brazil*
[c] *Department of Biophysics, São Paulo Federal University, Rua Pedro de Toledo, 669, 7° floor, 04039-032, São Paulo, Brazil*

ARTICLE INFO

Keywords:
Metacaspase
Catalytic cysteine
Mutants
Autoprocessing

ABSTRACT

Metacaspases are cysteine proteases belonging to the CD clan of the C14 family. They possess important characteristics, such as specificity for cleavage after basic residues (Arg/Lys) and dependence on calcium ions to exert their catalytic activity. They are defined by the presence of a large subunit (p20) and a small subunit (p10) and are classified into types I, II, and III. Type I metacaspases have a characteristic pro-domain at the N-terminal of the enzyme, preceding a region rich in glutamine and asparagine. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a type I metacaspase is found. This organism encodes a single metacaspase that participates in the process of programmed cell death by apoptosis. The study focuses on cloning, expressing, and mutating Saccharomyces cerevisiae metacaspase (ScMCA-Ia). Mutations in Cys^{155} and Cys^{276} were introduced to investigate autoprocessing mechanisms. Results revealed that Cys^{155} plays a crucial role in autoprocessing, initiating a conformational change that activates ScMCA-Ia. Comparative analysis with TbMCA-IIa highlighted the significance of the N-terminal region in substrate access to the active site. The study proposes a two-step processing mechanism for type I metacaspases, where an initial processing step generates the active form, followed by a distinct intermolecular processing step. This provides new insights into ScMCA-Ia's activation and function. The findings hold potential implications for understanding cellular processes regulated by metacaspases. Overall, this research significantly advances knowledge in metacaspase biology.

1. Introduction

Metacaspases belong to the CD clan of the C14 protease family and share structural similarities with mammalian caspases [1]. Caspases are aspartate-specific proteases that cleave substrate containing aspartic acid at the P_1 position. Most proteins in the C14 family are expressed in a zymogen form and become activated through proteolysis, forming an active dimer [2,3]. Metacaspases are present in plant, fungi, and protozoa, but absent in metazoans [2,4].

Metacaspases are cysteine proteases that were discovered in a simple eukaryotic cell, which shows structural similarity with a mammal's caspase, known as metacaspase [1]. Three types of metacaspases have been described: type I metacaspase, which contains an N-terminal pro-domain rich in proline, asparagine, and glutamine; type II metacaspase, which lacks an N-terminal pro-domain; and type III metacaspase, which presents the p10 subunit before the p20 [3,5,6].

While metacaspases share structural similarities with caspase, they exhibit biochemical differences. Metacaspases have a P_1 specifity for basic residues (Arg or Lys) [7] and are expressed as active monomers, requiring an autoprocessing event for activation and substrate selection

Abreviations: ScMCA-Ia, *Saccharomyces cerevisiae* metacaspase; TbMCA-IIa, *Trypanosoma brucei* metacaspase 2.

* Corresponding author. Interdisciplinary Center for Biochemical Research, University of Mogi das Cruzes, Av. Dr. Cândido Xavier de Almeida e Souza, 200, 08780-991, Mogi das Cruzes, Brazil.
E-mail address: mauriciomachado@umc.br (M.F.M. Machado).

[1] Both authors contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.149185
Received 19 October 2023; Accepted 29 October 2023
Available online 31 October 2023
0006-291X/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

[2,4,8]. The activity of *Trypanosoma brucei* metacaspase 2 (TbMCA-IIa) is calcium-dependen, and autoprocessing occurs at two sites: one at the N-terminal after the Lys55 residue, and another at the C-terminal after the Lys288 residue, resulting in a three-peptide chain that remains associated [9]. The three-dimensional structure of TbMCA-IIa was obtained using inactive mutants (C213 A/G) to prevent autoprocessing of the active full-length recombinant enzyme. This was crucial because even the non-processed form of TbMCA-IIa could undergo non-specific autoproccessing/degradation [2].

Autoprocessing and activity od metacaspases are intrinsically correlated with Ca2+ concentration and have two dissociation constants. One with higher affinity as important for the autoprocessing event, while another with lower affinity is crucial for substrate specificity [4].

Saccharomyces cerevisiae is a yeast that encodes only one metacaspase, known as Yeast Caspase-1 (ScMCA-Ia) [10]. ScMCA-Ia is a type I metacaspase directly associated with programmed cell death, cell cycle regulation and elimination of a protein aggregates [10–13]. The crystallographic structure of ScMCA-Ia reveals that this enzyme consists of a large subunit (P_{20}) and a small subunit (P_{10}), and the autoprocessing occurs after the residues Lys^{331} and/or Lys^{334} [14].

When compared with TbMCA-IIa, the structure of ScMCA-Ia reveals some similarities, such as the arrangement of calcium binding site residues, the catalytic dyad, and the lysine where autoprocessing occurs at C-terminal [2,14]. Interestingly, the structure of ScMCA-Ia was elucidated with a truncated enzyme, ScMCA-Ia was treated with V8 protease which removes 86 amino acids from the N-terminal [14].

The crystallographic structure of TbMCA-IIa has been resolved with its N-terminal region, revealing that it surrounds the protein, obstructing access to the Cys/His catalytic dyad [2,4]. It has been suggested that another cysteine may act as a catalytic residue in a non-processed form of TbMCA-IIa [2]. Some data indicate that the autoprocessing event is crucial to relocating the N-terminal region, exposing residues at the catalytic site, and thereby enhancing the proteolytic activity of TbMCA-IIa [8].

The N-terminal amino acids of ScMCA-Ia, rich in glutamine and asparagine, have a capacity to promote the precipitation of this enzyme. Consequently, biochemical assays with ScMCA-Ia are very challenging due to protein aggregation; the N-terminal of ScMCA-Ia act as a modulator, causing the protein to become insoluble [14,15]. In this study, we produced both forms of ScMCA-Ia: the complete form and a form without 86 amino acids residues from the N-terminal (truncated ScMCA-Ia – t-ScMCA-Ia).

In this work, we produced both forms of ScMCA-Ia forms (complete and truncated) each containing a site direct mutagenesis in a catalytic cysteine (Cys^{276}) [14]. The aim was to analyze the effect of calcium in ScMCA-Ia. However, curiously, mutation of this Cys by Ala (C276A) could not halt the autoprocessing event of ScMCA-Ia in either form. To further evaluate whether ScMCA-Ia possesses a second cysteine involved in its autoprocessing event, we aligned sequences of TbMCA-IIa and ScMCA-Ia, and subsequently generated a mutant in Cys^{155}, ScMCA-Ia C155A mutant does not present autoprocessing event,

These findings demonstrate that this enzyme possesses two catalytic cysteines, and the autoprocessing event induces a conformational change that alters the configuration of the catalytic domain.

2. Experimental procedures

2.1. Cloning of ScMCA-Ia complete and truncated form

From *S. cerevisiae* strain BY4742 plated on YPD medium (1 % yeast extract, 2 % dextrose, 2 % peptone and 2 % agar), PCR was performed using a Pfu polymerase (Thermo). For the complete ScMCA-Ia (ScMCA-Ia), the forward primer (5′-GGTGGTGGATCCATGTATCCAGGTAGTG-GACGTTAC-3′) and reverse primer (5′-ACCACCCTCGAGTTACATAA-TAAATTGCAGATTTACGTC-3′) were utilized. The amplified sequence was inserted into the BamHI and XhoI sites of pET28(a)+ (Novagen).

For truncated form of ScMCA-Ia (t-ScMCA-IA), PCR was performed using a Pfu polymerase (Thermo) with ScMCA-Ia as a template. The forward primer (5′–ATTTGCTAGCCCCCCTATGGCTTATAA–3′) and reverse primer (5′–ATCTGCAATTTATTATGTAGGAATTCGCGC–3′) were used. The amplified sequence was inserted in to the NheI and EcorRI sites of pET28(a)+ (Novagen). Both ScMCA-Ia and t-ScMCA-Ia enzymes are encoding with N-terminal His-tag (6X-His).

2.2. Site direct mutagenesis of ScMCA-Ia

To introduce site-direct mutagenesis in ScMCA-Ia and t-ScMCA-Ia (Table 1), we followed a protocol developed by Ho et al. (1989) with modifications [16]. All PCRs were carried out using Pfu polymerase (Thermo) with a specific primers. The PCR products of insert and pet28 (a)+ were treated with 10 U/mL of T5 exonuclease in a buffer containing 500 mM Tris, 50 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT, 0,25 g/mL PEG 800, at pH 7.0. The vector/insert proportion was 1:4 [17], and the reaction was incubated at 37 °C for 3 h. The resulting reactions were then transformed into BL21(DE3) pLysS *Escherichia coli*.

2.3. Expression of ScMCA-Ia WT and Mutants

Bacteria containing ScMCA-Ia wild type (WT) and mutants, as well as t-ScMCA-Ia WT, were initially grown in 10 mL Luria broth medium supplemented with kanamycin (50 μg/mL) and incubated at 37 °C overnight (approximately 16 h) with shaking at 150 rpm. The overnight cultures were then transferred to 1 L of LB medium at 37 °C and grown until the culture density reached an A_{600} of 0.4. The temperature was them reduced to 20 °C until the cell density reached an A_{600} of 0.6–0.7. Isopropyl-b-D-1-thiogalactopyranoside was added to a final concentration of 0.5 mM, and the cells were incubated at 20 °C for 14–16 h before being harvested by centrifugation at 4000×*g* for 10 min at 4 °C. The pellet was subsequently stored at −70 °C until needed.

The cell pellet was resuspended in 20 mL of 50 mM sodium phosphate pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mg/mL lysozyme. It was then incubated on ice for 30 min before the addition of 5 μg/mL RNase, 5 μg/mL DNase and 0.02 % Triton X-100. The solution was further incubated for 30 min on ice before being centrifuged at 26,000×*g* for 20 min at 4 °C and the supernatant was recovered. Lysates were centrifuged and filtered through in 0.45 μM membrane.

2.4. Purification of ScMCA-Ia WT and Mutants

The cell pellet was resuspended in 20 mL of solution containing 50 mM sodium phosphate at pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, and 1 mg/mL lysozyme. This mixture was incubated on ice for 30 min before the addition of 5 μg/mL RNase, 5 μg/mL DNase and 0.02 % Triton X-100. After an additional 30-min incubation on ice, the solution was centrifuged at 26,000×*g* for 20 min at 4 °C, and the supernatant was collected. Lysates were then centrifuged and filtered through a 0.45 μM membrane.

The resulting material was loaded onto a HisTrap Ni^{2+} Sepharose column (GE Healthcare) connected to an AKTA-Start chromatograph (GE Healthcare). The column had been previously equilibrated with a binding buffer consisting of 50 mM Tris at pH 7.5 and 100 mM NaCl,

Table 1
Primers to produced ScMCA-Ia and t-ScMCA-Ia mutants.

Mutant		Primer
C155A	Forward	5′ AAATCAACTGCGTGGT**GCT**ATCAATGATGCTC 3′
	Reverse	5′ GAGCATCATTGAT**AGC**ACCACGCAGTTGATTT 3′
C276A	Forward	5′ ACAGCATTGTTTGACTCT**GCT**CATTCGGGTACAGTGTTG 3′
	Reverse	5′ CAACACTGTACCCGAATG**AGC**AGAGTCAAACAATGCTGT 3′

with a flow rate of 1.0 mL/min. The column was washed with 5 mL of binding buffer, and recombinant ScMCA-Ia WT and mutants were purified and eluted using a step gradient of imidazole concentrations (50, 100, 200, 300 and 500 mM) in the same buffer. The recombinant ScMCA-Ia WT and mutants were found to elute between 200 and 300 mM imidazole (as confirmed by SDS/PAGE analysis), and the protein were combined.

To desalt the pooled protein, it was loaded onto a HiTrap 26/10 Desalting size-exclusion column, 5 mL (GE Healthcare) and equilibrated in a buffer containing 50 mM Tris at pH 7.4 and 100 mM NaCl (NaCl/Tris buffer). Elution fractions were analyzed using SDS/PAGE, and the fractions containing pure recombinant ScMCA-Ia were collected. These fractions were stored in NaCl/Tris buffer containing 30 % glycerol at −20 °C. To avoid any decrease in ScMCA-Ia activity, repeated freeze-thaw cycles were consequently avoided.

2.5. Western blotting of ScMCA-Ia WT and Mutants

To confirm the presence of ScMCA-Ia in both processed and non-processed forms, a western blotting assay was conducted using a 6x-His-tag antibody (MA1-21315-HRP – Thermo). The SDS-PAGE gel was the transferred onto a PVDF membrane (Bio-Rad) for 5 min a Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions.

The PVDF membrane was subsequently washed with a PBS buffer (10 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl – pH 7.4) with the addiction of 5 % BSA and 0.01 % Tween 20 and left to incubate for 1 h with agitation at room temperature. Following this, mebrane was washed three times with PBS, and then incubated with 6x-His-tag antibody (Thermo), which was diluted to ratio of 1:30,000 in PBS with 5 % BSA and 0.01 % Tween 20. This incubation took place for 18 h at 4 °C with constant agitation.

After the antibody incubation, the membrane was washed with PBS and subsequently developed SuperSignal-West Pico (Thermo) in a photodocumentator ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

3. Results and discussion

SDS-PAGE analysis reveals that ScMCA-Ia WT, after the desalination process, exhibits a lower concentration of protein (Fig. 1A). This is because after its autoprocessing event, this enzyme can self-degrade very rapidly, resulting in the observation of a small fragment of around 14 kDa. A similar effect has been observed with other metacaspases [2,18]. Interestingly, western blotting shows that ScMCA-Ia WT exhibits a small concentration of the non-processed form (Fig. 1B).

Analysis of ScMCA-Ia C276A reveal the presence of two fragments around 43 kDa (Fig. 1). These fragments are described to correspond to the processed form of ScMCA-Ia. Interestingly Cys^{276} serve as the catalytic cysteine for this enzyme [14]. It has been suggested that other metacaspases like TbMCA-IIa of *T.brucei* and metacaspase 9 of *A. thaliana*, may have a second cysteine could play role in the activation of these enzymes [2,19].

TbMCA-IIa possesses a cysteine at position 92, which is located in the N-terminal region. Interestingly, ScMCA-Ia also contains a conserved cysteine in the same region (Cys^{155}), although it is not present in the N-terminal of this enzyme. When we examined the three-dimensional structure of ScMCA-Ia (PDB 4F6O), we found that the distance of Cys^{276} and the catalytic histidine (His^{220}) is 9.6 Å, whereas Cys^{155} has just 7.2 Å (Fig. 2) [14].

With the knowledge that the crystal-defined structure of ScMCA-Ia lacks the first 86 N-terminal amino acids, we aimed to assess how these amino acids might interact with the enzyme's catalytic site. For this purpose, we overlaid the ctructures of ScMCA-Ia (PDB: 4F6O) and TbMCA-IIa (PDB: 4AFR), which was crystallized using an inactive mutant, allowing for the visualization on the N-terminal region encompassing 70 amino acids. In Fig. 3, ScMCA-Ia structure is depicted in gray, while TbMCA-IIa structure is shown in brown, with its N-terminal segment highlighted in purple.

This generated image reveals an intriguing feature of TbMCA-IIa N-terminal region it envelops the entire protein and extends through the active site of the enzyme. This positioning obstructs the interaction necessary for catalysis between the cysteine and histidine of the catalytic dyad.

To assess whether Cys^{155} participates in autoprocessing event of ScMCA-Ia, we created a C155A mutant. Indeed SDS-PAGE analysis demonstrate that this mutant does not undergo an autoprocessed event, providing further support for our hypothesis that this cysteine is crucial for the initial processing of ScMCA-Ia.

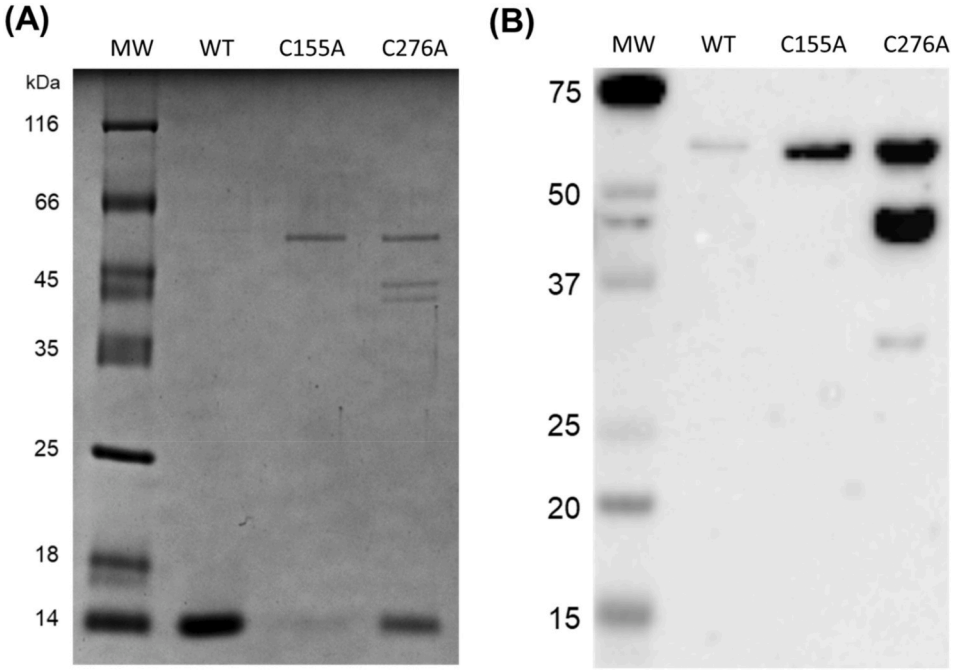


Fig. 1. Analyses of ScMCA-Ia. (A) SDS-PAGE of ScMCA-Ia WT, ScMCA C155A and ScMCA-Ia C276A and (B) Western blotting with 6X-His-tag antibody of ScMCA-Ia WT, ScMCA C155A and ScMCA-Ia C276A.

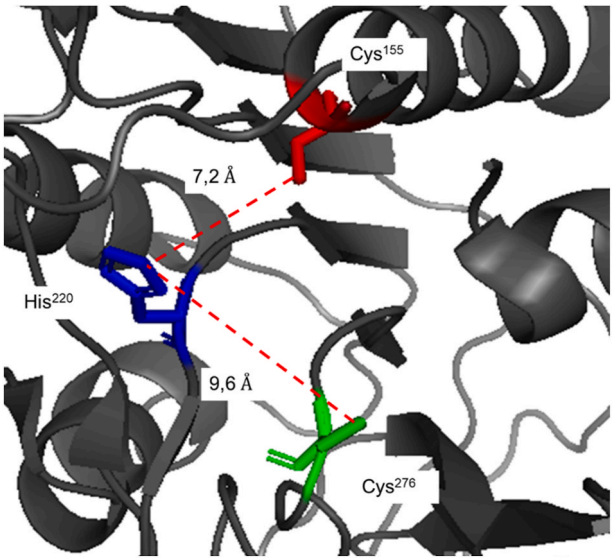


Fig. 2. Three-dimensional structure of ScMCA-Ia showing the catalytic site. Three-dimensional structure of ScMCA-Ia approaching the catalytic site, highlighting the amino acids that compose it and the distance in angstrom (Å) between them. In red, cysteine 155; in blue histidine 220; and in green cysteine 276. The distance between Cys^{155} and His^{220} is established as 7.2 Å, and the distance between Cys^{276} and His^{220} is established as 9.6 Å. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

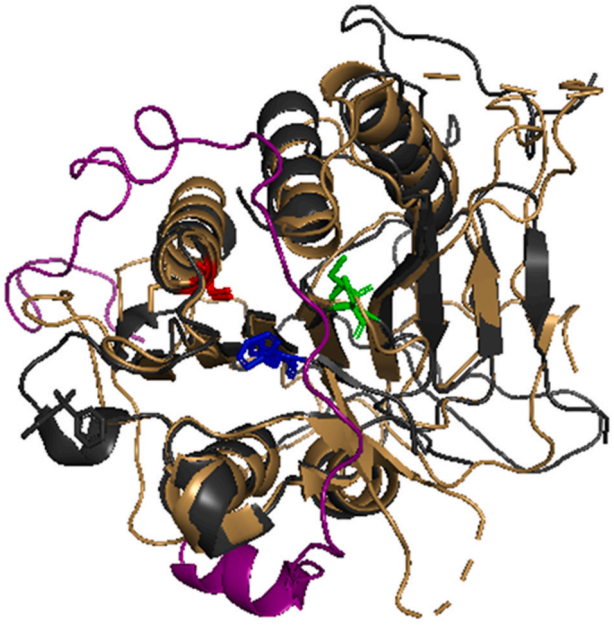


Fig. 3. Three-dimensional structure of ScMCA-Ia and TbMCA-IIa, superimposed, highlighting the catalytic sites. Three-dimensional structures of ScMCA-Ia (PDB: 4F6O [14]), in gray, and TbMCA-IIa (PDB 4AFR [2]), in brown, superimposed. In TbMCA-IIa, the N-terminal is highlighted, in purple, consisting of 70 amino acids. For both, the amino acids that make up the catalytic site stand out. In ScMCA-Ia, in red is Cys^{155}, in blue is His^{220}, and in green is Cys^{276}. For TbMCA-IIa, in red is Cys^{92}, in blue is His^{158}, and in green is Cys^{213}. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

The ScMCA-Ia in its complete form has been described above to undergo a self-degradation process. It has been noted that this form also undergoes precipitation (data do not show), likely due to the presence of an N-terminal region rich in glutamine and asparagine, rendering it hydrophobic [14,15]. To generate a soluble ScMCA-Ia, we expressed a truncated form with deletion of 86 amino acids from the N-terminal (t-ScMCA-Ia), building upon prior work by Wong et al. (2012) who treated ScMCA-Ia with V8 protease [14] (See Fig. 2).

Unlike ScMCA-Ia, t-ScMCA-Ia does not undergo a self-degradation process and cannot precipitated (Fig. 4). This enhances the stability of the enzyme significantly, t-ScMCA-Ia presents same molecular weight of processed ScMCA-Ia (43 kDa). It is noteworthy that this enzyme continues to undergo autoprocessing, although it was described that the initial processing of ScMCA-Ia occurs after Arg^{72} and Lys^{86} residues, both of which have been deleted in truncated form [14].

However, both cysteine mutants t-ScMCA-Ia C276A and t-ScMCA-Ia C155A continue to undergo processing, but in the C-terminal region. Studies on others metacaspases have shown that in *T.brucei*, TbMCA-IIIa is capable of processing TbMCA-IVa, providing evidence of proteolytic activation similar to caspases [3,20].

Western blotting data reveals that the ScMCA-Ia C276A mutant does not undergo self-degradation, corroborating that this residue acts as a catalytic. After autoprocessing coordinated by Cys^{155}, a third fragment around 33 kDa was noted. This is the same size as the processing observed with t-ScMCA-Ia. Since our antibody recognizes the histidine tail present at the N-terminal, this second processing occurs in C-terminal. As described for metacaspase of *Candida glabrata*, autoprocessing occurs, and the processed enzyme can process another metacaspase, which is a time-consuming event [21].

These data demonstrate that once autoprocessed, ScMCA-Ia is capable of performing intermolecular processing of other ScMCA-Ia molecules, generating an active form of this enzyme.

4. Conclusions

The investigation into ScMCA-Ia has provided significant insights into its autoprocessing and activation mechanisms. The desalination process revealed a lower concentration of ScMCA-Ia WT due to its rapid self-degradation following autoprocessing. Interestingly, traces of the

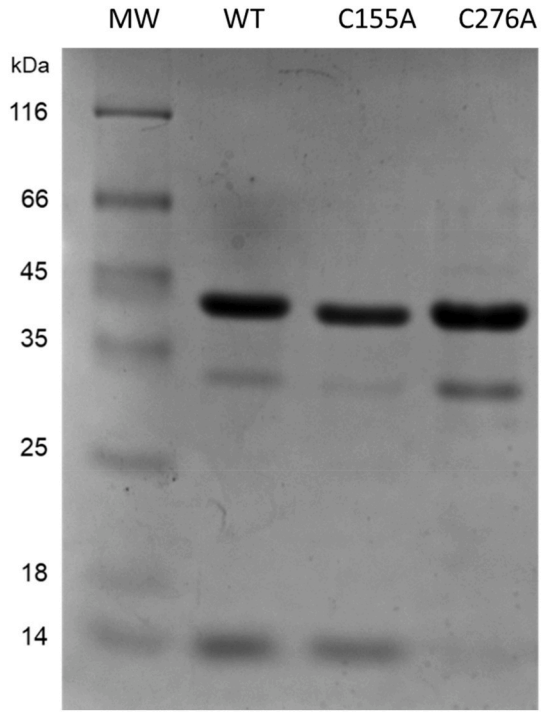


Fig. 4. Analyses of t-ScMCA-Ia WT and mutants. SDS-PAGE of ScMCA-Ia WT, ScMCA C155A and ScMCA-Ia C276A and.

non-processed form were detected through western blotting.

The analysis of the C276A mutant showcased two fragments around 43 kDa, indicating the processed form of ScMCA-Ia, reinforcing the pivotal role of Cys276 as the catalytic cysteine. This aligns with suggestions that second cysteines may play a role in activating similar enzymes.

Obtaining the mutants was important for us to elucidate and deepen the knowledge surrounding the activation of ScMCA-Ia, that surfers processing steps to release its active form, capable of cleaving protein substrates. The mutation in the Cys^{155} residue demonstrated the presence of a second catalytic cysteine in the structure of ScMCA-Ia, which is crucial in the enzyme's autoprocessing. Proposing that initially the action of Cys^{155} directly impacts the action of catalytic cysteine (Cys^{276}), since the first autoprocessing must occur to generate the active form of ScMCA-Ia, where the active site composed of the catalytic dyad (Cys^{276} and His^{220}) is free for interaction with the substrate.

Interestingly, t-ScMCA-Ia exhibited stability and molecular weight similar to the processed ScMCA-Ia. Both cysteine mutants, t-ScMCA-Ia C276A and t-ScMCA-Ia C155A, demonstrated processing in the C-terminal region. This aligns with studies on other metacaspases, indicating proteolytic activation akin to caspases.

Comparative analysis of the structure of ScMCA-Ia showed that in theory, the N-terminal is like that of TbMCA-IIa, located around the enzyme and directly influencing the access of the substrate to the active site. Confirming our hypothesis that Cys^{155} interacts primarily with His^{220}, carrying out autoprocessing so that a conformational change occurs at the N-terminal and the release of the enzyme's active site, that is, its active form.

Our data provided a different perspective on the autoprocessing that occurs in type I metacaspases, such as ScMCA-Ia. Pointing out that a first processing occurs generating the active form of ScMCA-Ia, which will subsequently undergo a second processing, however this is not autoprocessing, but rather intermolecular processing between metacaspases.

These findings underscore the ability of autoprocessed ScMCA-Ia to intermolecularly process other ScMCA-Ia molecules, generating an active enzyme form. This study enhances our understanding of the intricate regulatory pathways governing programmed cell death and cellular homeostasis.

CRediT authorship contribution statement

Laura de Azevedo Maffeis Dalzoto: Formal analysis, Investigation, Resources. **Mariana Nascimento Romero Trujilho:** Formal analysis, Investigation, Methodology. **Taiz dos Reis Santos:** Investigation, Methodology. **João Pedro Martins Silva Costa:** Investigation, Methodology, Resources. **Ane Caroline Moreira Duarte:** Investigation, Methodology. **Wagner Alves de Souza Judice:** Data curation, Writing – original draft. **Marcelo Ferreira Marcondes:** Resources, Validation, Visualization, Writing – original draft. **Maurício Ferreira Marcondes Machado:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP grant 2022/06394-0 to MFMM, FAPESP grant 2019/27813-8 to MFM and FAPESP grant 2021/01503-2 to WASJ.

References

[1] A.G. Uren, K. O'Rourke, L. Aravind, M.T. Pisabarro, S. Seshagiri, E.V. Koonin, V. M. Dixit, Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma, Mol. Cell (2000), https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00094-0.

[2] K. McLuskey, J. Rudolf, W.R. Proto, N.W. Isaacs, G.H. Coombs, C.X. Moss, J. C. Mottram, Crystal Structure of a Trypanosoma Brucei Metacaspase, Proc Natl Acad Sci U S A., 2012, https://doi.org/10.1073/pnas.1200885109.

[3] E.A. Minina, N.S. Coll, H. Tuominen, P.V. Bozhkov, Metacaspases versus caspases in development and cell fate regulation, Cell Death Differ. (2017), https://doi.org/10.1038/cdd.2017.18.

[4] M.F.M. Machado, M.F. Marcondes, M.A. Juliano, K. McLuskey, J.C. Mottram, C. X. Moss, L. Juliano, V. Oliveira, Substrate specificity and the effect of calcium on Trypanosoma brucei metacaspase 2, FEBS J. (2013), https://doi.org/10.1111/febs.12248.

[5] M. Klemenčič, C. Funk, Evolution and structural diversity of metacaspases, J. Exp. Bot. (2019), https://doi.org/10.1093/jxb/erz082.

[6] E.A. Minina, J. Staal, V.E. Alvarez, J.A. Berges, I. Berman-Frank, R. Beyaert, K. D. Bidle, F. Bornancin, M. Casanova, J.J. Cazzulo, C.J. Choi, N.S. Coll, V.M. Dixit, M. Dolinar, N. Fasel, C. Funk, P. Gallois, K. Gevaert, E. Gutierrez-Beltran, S. Hailfinger, M. Klemenčič, E.V. Koonin, D. Krappmann, A. Linusson, M.F. M. Machado, F. Madeo, L.A. Megeney, P.N. Moschou, J.C. Mottram, T. Nyström, H. D. Osiewacz, C.M. Overall, K.C. Pandey, J. Ruland, G.S. Salvesen, Y. Shi, A. Smertenko, S. Stael, J. Ståhlberg, M.F. Suárez, M. Thome, H. Tuominen, F. Van Breusegem, R.A.L. van der Hoorn, A. Vardi, B. Zhivotovsky, E. Lam, P.V. Bozhkov, Classification and nomenclature of metacaspases and paracaspases: No more confusion with caspases, Mol. Cell (2020), https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.12.020.

[7] S.M. Hill, T. Nyström, The dual role of a yeast metacaspase: what doesn't kill you makes you stronger, Bioessays (2015), https://doi.org/10.1002/bies.201400208.

[8] J.M. Gilio, M.F. Marcondes, D. Ferrari, M.A. Juliano, L. Juliano, V. Oliveira, M.F. M. Machado, Processing of metacaspase 2 from Trypanosoma brucei (TbMCA2) broadens its substrate specificity, Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics 1865 (2017), https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.01.002.

[9] C.X. Moss, G.D. Westrop, L. Juliano, G.H. Coombs, J.C. Mottram, Metacaspase 2 of Trypanosoma brucei is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing, FEBS Lett. (2007), https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.009.

[10] A. Shrestha, S. Brunette, W.L. Stanford, L.A. Megeney, The metacaspase Yca1 maintains proteostasis through multiple interactions with the ubiquitin system, Cell Discov (2019), https://doi.org/10.1038/s41421-018-0071-9.

[11] F. Madeo, E. Herker, C. Maldener, S. Wissing, S. Lächelt, M. Herlan, M. Fehr, K. Lauber, S.J. Sigrist, S. Wesselborg, K.U. Fröhlich, A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast, Mol. Cell (2002), https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00501-4.

[12] L. Tsiatsiani, F. Van Breusegem, P. Gallois, A. Zavialov, E. Lam, P.V. Bozhkov, Metacaspases, Cell Death Differ. (2011), https://doi.org/10.1038/cdd.2011.66.

[13] R.E.C. Lee, L.G. Puente, M. Kærn, L.A. Megeney, A non-death role of the yeast metacaspase: yca1p alters cell cycle dynamics, PLoS One (2008), https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002956.

[14] A.H.H. Wong, C. Yan, Y. Shi, Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1, J. Biol. Chem. (2012), https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381806.

[15] M. Erhardt, R.D. Wegrzyn, E. Deuerling, Extra N-terminal residues have a profound effect on the aggregation properties of the potential yeast prion protein Mca1, PLoS One (2010), https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009929.

[16] S.N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen, L.R. Pease, Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, Gene 77 (1989) 51–59, https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2.

[17] Y. Xia, K. Li, J. Li, T. Wang, L. Gu, L. Xun, T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis, Nucleic Acids Res. 47 (2019), https://doi.org/10.1093/nar/gky1169.

[18] M. Klemenčič, C. Funk, Type III metacaspases: calcium-dependent activity proposes new function for the p10 domain, New Phytol. (2018), https://doi.org/10.1111/nph.14660.

[19] B. Belenghi, M.C. Romero-Puertas, D. Vercammen, A. Brackenier, D. Inzé, M. Delledonne, F. Van Breusegem, Metacaspase activity of Arabidopsis thaliana is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue, J. Biol. Chem. (2007), https://doi.org/10.1074/jbc.M608931200.

[20] W.R. Proto, E. Castanys-Munoz, A. Black, L. Tetley, C.X. Moss, L. Juliano, G. H. Coombs, J.C. Mottram, Trypanosoma brucei metacaspase 4 is a pseudopeptidase and a virulence factor, J. Biol. Chem. (2011), https://doi.org/10.1074/jbc.M111.292334.

[21] L. Conchou, B. Doumèche, F. Galisson, S. Violot, C. Dugelay, E. Diesis, A. Page, A. L. Bienvenu, S. Picot, N. Aghajari, L. Ballut, Structural and molecular determinants of Candida glabrata metacaspase maturation and activation by calcium, Commun. Biol. 5 (2022), https://doi.org/10.1038/S42003-022-04091-4.

ANEXO 3 - MUTAÇÕES SÍTIO-DIRIGIDAS NA METACASPASE DE *S. cerevisiae:* UMA ABORDAGEM, METODOLÓGICA AVANÇADA PARA ESTUDOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS

1º SUMMIT UMC
PESQUISA, INOVAÇÃO E EXTENSÃO

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

Mutações sítio-dirigidas na metacaspase de *S. cerevisiae*: Uma abordagem, metodológica avançada para estudos estruturais e funcionais

Site-directed mutations in *S. cerevisiae* metacaspase: An advanced methodological approach for structural and functional studies

Mutaciones dirigidas en el sitio de la metacaspase de *S. cerevisiae*: Un enfoque metodológico avanzado para estudios estructurales y funcionales.

Mariana Nascimento Romero Trujilho [1]
Laura de Azevedo Maffeis Dalzoto[1]
Taiz dos Reis Santos[1]
Laura Helena Araújo[1]
João Pedro Martins Silva Costa[1]
Ane Caroline Moreira Duarte[2]
Tatiane Faustino de Moraes[1]
Wagner Alves de Souza Judice[1]
Marcelo Ferreira Marcondes Machado[3]
Maurício Ferreira Marcondes Machado[1,2]

Tipo de Publicação: Artigo Completo
Área do Conhecimento: Área Biológicas

1 Laboratório de Morte em Unicelulares (LabMUn), Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB), Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.
2 Núcleo de Pesquisas Tecnológicas (NPT), Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, SP, Brasil.
3 Departamento de Biofísica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

SUBMETIDO EM: 11/2023 | **ACEITO EM: 12/2023** | **PUBLICADO EM: 12/2023**

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

RESUMO

Objetivo: As metacaspases são cisteína-proteases que requerem cálcio para atividade e se ativam por autoprocessamento, diferentemente das caspases. As metacaspases são categorizadas em tipos I, II e III, como a ScMCA-IA em *Saccharomyces cerevisiae,* associada à apoptose. O estudo buscou clonar um ScMCA-IA recombinante, com mutações específicas nos resíduos Cys^{155} e Cys^{276}, expressando e purificando essas proteínas. Os mutantes foram obtidos com sucesso usando sobreposição de fragmentos e método TEDA de clonagem, expressos em *E. coli* e purificados por cromatografia de camada e exclusão molecular. A identificação da importância da cisteína Cys^{155} no autoprocessamento da ScMCA-IA e a sugestão de um segundo processamento intermolecular entre metacaspases ativas, semelhante à ativação das caspases, foram resultados notáveis. Mostrou-se que os processamentos levam à forma ativa da enzima no C-terminal, diferente do descrito anteriormente. Concluindo, a presença de uma segunda cisteína catalítica na ScMCA-IA foi evidenciada, trazendo uma nova perspectiva sobre sua ativação, com processamentos antes não descritos, tanto autoprocessamento quanto intermolecular.

Palavras-chave: Metacaspase, *Saccharomyces cerevisiae*, Mutação, Cisteína

ABSTRACT

Objective: Metacaspases are cysteine proteases that require calcium for activity and are activated through autoprocessing, unlike caspases. Metacaspases are categorized into types I, II, and III, such as SCMCA-IA in *Saccharomyces cerevisiae*, associated with apoptosis. The study aimed to clone a recombinant SCMCA-IA, with specific mutations in residues Cys^{155} and Cys^{276}, expressing and purifying these proteins. Mutants were successfully obtained using fragment overlap and the TEDA cloning method, expressed in *E. coli*, and purified through layer chromatography and molecular exclusion. The identification of the significance of cysteine Cys^{155} in SCMCA-IA autoprocessing and the suggestion of a second intermolecular processing between active metacaspases, akin to caspase activation, were significant findings. It was shown that the processing led to the enzyme's active form in the C-terminal, contrary to previous descriptions. In conclusion, the presence of a second catalytic cysteine in SCMCA-IA was demonstrated, presenting a new perspective on its activation, involving previously undescribed processes—both autoprocessing and intermolecular processing.

Key words: Metacaspase, *Saccharomyces cerevisiae*, Mutation, Cysteine

RESUMEN

Objetivo: Las metacaspasas son cisteína-proteasas que requieren calcio para su actividad y se activan a través del auto procesamiento, a diferencia de las caspasas. Las metacaspasas se clasifican en tipos I, II y III, como la SCMCA-IA en *Saccharomyces cerevisiae*, asociada a la apoptosis. El estudio tuvo como objetivo clonar una SCMCA-IA recombinante, con mutaciones específicas en los residuos Cys^{155} y Cys^{276}, expresando y purificando estas proteínas. Los mutantes se obtuvieron con éxito mediante la superposición de fragmentos y el método de clonación TEDA, expresados en *E. coli* y purificados mediante cromatografía en capa y exclusión molecular. La identificación de la importancia de la cisteína Cys^{155} en el autoprocesamiento de la SCMCA-IA y la sugerencia de un segundo procesamiento intermolecular entre metacaspasas activas, similar a la activación de las caspasas, fueron hallazgos significativos. Se demostró que los procesos conducen a la forma activa de la enzima en el extremo C-terminal, en contraste con lo descrito anteriormente. En conclusión, se evidenció la presencia de una segunda cisteína catalítica en la SCMCA-IA, aportando una nueva perspectiva sobre su activación, con procesos antes no descritos, tanto autoprocesamiento como intermolecular.

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

Palabras clave: Metacaspase, *Saccharomyces cerevisiae*, Mutación, Cisteína

1. INTRODUÇÃO

Uma cisteíno-protease com similaridade estrutural às caspases de mamíferos foi identificada em células eucariotas simples por Uren et al. (2000) utilizando-se de ferramentas de bioinformática. A metacaspase, como passou a ser chamada, foi então identificada em plantas, fungos e protozoários, mas notou-se sua ausência em mamíferos [1].

As caspases são sintetizadas como zimogênios e possuem uma díade catalítica His/Cys (H e C), assim como as metacaspases. São compostas por um pró-domínio que antecede as duas subunidades p20 (grande) e p10 (pequena), e tornam-se enzimaticamente ativas após sofrerem uma clivagem proteolítica após dois resíduos de ácido aspártico (D). Após essa clivagem, ocorre a dimerização das duas subunidades tanto p20 quanto p10, resultando na chamada caspase efetora [1–3].

As metacaspases, diferentemente das caspases, podem ter a presença ou não de um pró-domínio rico em prolina e/ou de uma região rica em glutaminas e asparaginas, não sendo necessário passar pelo processo de dimerização para estarem ativas, pois são ativas na forma monomérica, entretanto carecem da presença do íon cálcio, que possui papel de cofator, para o desempenho de sua atividade [2,3]. Diferente das caspases que clivam substratos após um resíduo de ácido aspártico, as metacaspases clivam seus substratos após resíduos básicos de arginina ou lisina na posição P_1 [4,5].

A metacaspase do tipo I contém um pró-domínio N-terminal rico em prolina e motivo dedo de zinco. A metacaspase tipo II não possui pró-domínio, porém, possui um domínio vinculador com vários resíduos de aminoácidos que separam a subunidade p20 catalítica e p10 reguladora. Já a metacaspase tipo III sofre um rearranjo diferente, a subunidade p10 antecede a subunidade p20 encontrando-se localizada no N-terminal [3,6,7].

O estresse celular leva a liberação de sinais de morte que induzem a ativação da metacaspase e resulta em um autoprocessamento [8]. Esse autoprocessamento ocorre após a interação do cálcio com a metacaspase, porém, esse não é um pré-requisito para sua atividade enzimática [9]. Apesar de não ser um fator determinante para a atividade da metacaspase, o seu autoprocessamento está diretamente relacionado com o aumento da sua atividade catalítica, influenciada pelos níveis de cálcio [5]. Em estudos utilizando a metacaspase tipo 2 de *Trypanosoma brucei*, verificou-se que a etapa de autoprocessamento é essencial para a realocação do N-terminal a fim de expor os resíduos do sítio catalítico e permitir assim a ação da enzima sobre substratos proteicos grandes e não apenas em oligopeptídeos [10].

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura que codifica uma única metacaspase, denominada como Yeast Caspase 1 (ScMCA-IA) [11]. A SCMCA-IA é uma metacaspase do tipo I e diversos estudos demonstram que sua expressão está relacionada diretamente a morte celular (apoptose) induzida por estresse oxidativo e senescência celular, regulação do ciclo celular e a eliminação de agregados de proteínas na levedura S. cerevisiae [8,11,12]. Foi demonstrado que a ScMCA-IA regula ativamente o ciclo celular da levedura, atuando precisamente na transição da fase G1 para a fase S e, quando é inibida a atividade da

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

enzima ou na ausência do gene nota-se uma transição de G1 para S tardia em estudos de comparação entre cepas nocautes (ΔScMCA-Ia) e selvagens (BY4741) [13]. Com o intuito de demonstrar o autoprocessamento dessa metacaspase, foram realizados ensaios utilizando a enzima pura na presença do íon Ca^{2+} e demonstraram que esse processamento ocorre no C-terminal e no N-terminal, sendo que no primeiro é liberado um fragmento menor quando realizado uma análise eletroforética em gel de SDS-PAGE, evidenciando uma banda abaixo de 14 kDa chamado de subunidade pequena, e o segundo liberando um fragmento com banda em torno de 45 kDa chamada de subunidade grande [14].

Quando comparada a estrutura da SCMCA-IA com a estrutura da metacaspase 2 de *Trypanosoma brucei* (TbMCA2), verifica-se que ambas possuem semelhanças como a presença dos resíduos de ligação do cálcio, a díade catalítica e os resíduos de lisina onde ocorre o autoprocessamento. Entretanto, algumas características únicas podem ser destacadas, como a estrutura do N-terminal na TbMCA2, caracterizado por um N-terminal alongado que circunda toda a proteína, influenciando diretamente no acesso ao seu sítio ativo, diferentemente do que se encontra na ScMCA-IA. Quando sobrepostas as estruturas tridimensionais dessas proteínas, é possível observar que os aminoácidos de ligação ao cálcio, dado por quatro ácidos aspárticos, ocupam posições quase idênticas, o que sugere que a região de ligação do cálcio é conservada entre as metacaspases [5,14,15].

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Mutação Sítio Dirigida

Para amplificação do material foram desenhados primers baseados na sequência completa do gene da metacaspase SCMCA-IA localizada no site UniProt. Wong, Yan & Shi (2012) elucidaram a estrutura cristalográfica da SCMCA-IA e com isso foi possível observar a localização de duas cisteínas catalíticas, assim, foram desenhados primers foward (5-3') e reverse (3'-5') que induziram a substituição das cisteínas por uma alanina (Tabela 1).

Tabela 1 – *Primers* utilizados na amplificação do gene da SCMCA-IA para inserção da mutação pontual (em **negrito** o novo códon para troca do aminoácido e produção da mutação)

Primer	Sequência
C155A *Forward*	5' AAATCAACTGCGTGGT**GCT**ATCAATGATGCTC 3'
C155A *Reverse*	5' GAGCATCATTGAT**AGC**ACCACGCAGTTGATTT 3'
C276A *Forward*	5' ACAGCATTGTTTGACTCT**GCT**CATTCGGGTACAGTGTTG 3'
C276A *Reverse*	5' CAACACTGTACCCGAATG**AGC**AGAGTCAAACAATGCTGT 3'

Também foram desenhados primers, chamados de primers TEDA, que amplificaram o gene da SCMCA-IA já com a mutação realizada + o plasmídeo Pet28(a). Na Tabela 2 encontra-se a lista dos *primers* projetados.

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

Tabela 2 – *Primers* projetados para amplificação do gene da SCMCA-IA utilizados na reação TEDA

Primer	Sequência
SCMCA-IA *Forward*	5’ CTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGTATCCAGGTAGTGGACGT 3’
SCMCA-IA *Reverse*	5’ GTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGCTACATAATAAATTGCAGATTTAC 3’

Na Tabela 3 é apresentado a sequência dos *primers* utilizados para a amplificação do vetor pET28(a)+.

Tabela 3 – *Primers* projetados para amplificação do vetor pET28(a)+ utilizados na reação TEDA

Primer	Sequência
pET28 *Forward*	5’ CTCGAGCACCACCACCACCACCACT 3’
pET28 *Reverse*	5’ CATATGGCTGCCGCGCGGCAC 3’

Os *primers* amplificadores da região T7 (Tabela 4) foram projetados para a primeira etapa da reação da PCR da mutação, tanto quanto para as amplificações por PCR para confirmação, como a PCR de colônia.

Tabela 4 – *Primers* utilizados para amplificação da região T7 (promotora e terminadora) que flanqueia o gene da SCMCA-IA

Primer	Sequência
T7 *Forward*	5’ TAATACGACTCACTATAGGG 3’
T7 *Reverse*	5’ TAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3’

Para realizarmos as mutações pontuais através dessa amplificação nos baseamos no protocolo de Ho *et al.* (1989) com modificações. A técnica de sobreposição de fragmentos consiste em amplificar o gene em duas etapas, gerando fragmentos que irão ser complementares, usando *primers* flanqueadores do gene (A e D) complementares a sequência alvo, que são os *primers* TEDA, e *primers* internos contendo a mutação desejada (B e C), que são os *primers* da mutação (Tabela 5), separadamente de forma que se hibridizem posteriormente.

Realizamos as reações em tubos distintos, uma para o sentido *forward* e outro para o *reverse*, denominadas como PCR-I *Forward*, na qual utilizou-se o *primer forward* da mutação e o *primer reverse* T7, e PCR-I *Reverse,* na qual utilizou-se o *primer reverse* da mutação e o *primer forward* T7, criando assim os fragmentos AC e DB, respectivamente. A reação foi realizada utilizando PCR Bio (PCR Biosystems), seguindo as orientações do fabricante, e foi realizada em um termociclador T100 *Thermal Cycler* (Bio-Rad) nas seguintes condições: (1) 1 ciclo a 98º C por 1 minuto (desnaturação inicial), (2) repetições de 30 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 98º C por 30 segundos (desnaturação), 55º C por 30 segundos (anelamento) e 72º C por 45 segundos (extensão), e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72º C (extensão final).

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

Tabela 5 – Descrição dos *primers* usados na primeira etapa para inserção da mutação

Primer	**Função**	**Descrição**
C155A *Forward*	Inserir a mutação	B
C155A *Reverse*	Inserir a mutação	C
C276A *Forward*	Inserir a mutação	B
C276A *Reverse*	Inserir a mutação	C
T7 *FW*	Flanqueador do gene	A
T7 *Reverse*	Flanqueador do gene	D

O produto da amplificação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose preparado a 1% (m/v) contendo 0,75 µg/mL de brometo de etídio em tampão TAE (TRIS 80 mM; Ácido Acético glacial 40 mM; EDTA 2,5 mM, em pH 8,3). Em seguida foi submetido a uma tensão de 80 V durante 30 minutos em cuba horizontal. Após migração, o gel foi analisado sob luz UV no fotodocumentador ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad).

Após a confirmação da amplificação dos fragmentos da primeira etapa, seguimos para a segunda etapa da reação. Para a PCR II foram utilizados 10 ng de cada produto da reação anterior e os *primers* desenhados para a reação do TEDA, usando SCMCA-IA *forward* e SCMCA-IA *reverse)*. As extremidades complementares formadas na região de ligação dos *primers*, B e C, se hibridizam (Figura 1) neste segundo PCR para criar o produto final contendo a sequência mutada. As condições da reação foram alteradas para: (1) 1 ciclo a 98º C por 30 segundos (desnaturação inicial), (2) repetições de 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 98º C por 10 segundos (desnaturação), 62º C por 15 segundos (anelamento) e 72º C por 30 segundos (extensão), e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72º C (extensão final). A análise foi realizada da mesma forma descrita anteriormente.

Para a amplificação do pET28(a)+ foram desenhados *primers* específicos (Tabela 3) para a realização da reação do TEDA, esses *primers* inserem em torno de 15 bases nitrogenadas que formam as extremidades homólogas entre inserto e vetor. A reação foi construída utilizando 60 ng de DNA molde e 25 pmol de cada *primer forward* e *reverse* TEDA. A reação foi catalisada pelo PCR BIO (PCR Biosystems), seguindo as orientações do fabricante. As condições da amplificação compreenderam as seguintes etapas: (1) 1 ciclo a 98º C por 30 segundos (desnaturação inicial), (2) repetições de 35 ciclos de variações consecutivas de temperatura, 98º C por 20 segundos (desnaturação), 72º C por 2 minutos (anelamento e extensão), e (3) 1 ciclo extra de 10 minutos a 72º C (extensão final). A análise foi realizada da mesma forma descrita anteriormente.

Para a realização do procedimento de montagem de DNA com T5 exonuclease, em inglês T5 exonuclease DNA assembly (TEDA), nos baseamos no trabalho descrito por Xia *et al.* (2019). Este trabalho descreve um método que combina a ação da T5 exonuclease e os mecanismos de reparo da *E. coli*. Trata-se de um método eficiente e de baixo custo que pode ser utilizado para protocolos de clonagem e mutação sítio dirigida. A metodologia baseia-se na montagem de fragmentos de DNA com extremidades homólogas

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

utilizando exclusivamente a ação da T5 exonoclease capaz de remover as bases nitrogenadas apenas na direção 5´- 3´ (XIA *et al.*, 2019).

A primeira etapa para realização do TEDA, foi a preparação da solução estoque 5X (0,5 M TRIS; 50 mM $MgCl_2$; 50 mM DTT; PEG 8000 0,25 g/mL^{-1}, em pH 7,5 ajustado com HCl). A solução foi armazenada em alíquotas de 1 mL no freezer a -80° C. Para o preparado da solução 5X TEDA + T5 exonuclease, acrescentou-se 10 unidades da T5 exonuclease (ThermoFisher) em uma alíquota de 1 mL e preparamos alíquotas de 100 µL. A reação foi preparada seguindo as orientações descritas por Xia *et al.* (2019) quanto as condições ótimas para a reação TEDA. A proporção da reação foi 1:4 (vetor/inserto). Utilizamos 100 ng do vetor pET28(a)+ linearizado, e para calcularmos a concentração do inserto, utilizamos a Equação 1 (Eq. 1) abaixo.

$$ng\ Inserto = \frac{ng\ Vetor\ x\ pb\ Inserto}{pb\ Vetor} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

O vetor linearizado e os insertos foram obtidos por amplificação via PCR e as extremidades homólogas foram introduzidas na reação usando os *primers* específicos do TEDA. Ambos, vetor e inserto, foram purificados utilizando kit de purificação *Easypure PCR Purification* (Transgen Biotech). O vetor, posteriormente a purificação, foi tratado com a enzima de restrição DpnI, a fim de clivar o material molde, sob condições em termociclador: (1) 37º C por 3h e (2) 80º C por 20 minutos para inativação da enzima.

Para cada reação TEDA foi utilizado 4 µL da solução 5X TEDA + T5 exonuclease, na qual adicionou-se a solução à mistura dos fragmentos do inserto e vetor linearizado e completou a reação com água ultrapura para o volume final de 20 µL, a mistura preparada foi então homogeneizada e incubada a 30° C durante 40 minutos.

Procedemos com o protocolo de transformação através de choque térmico utilizando 7 µL da solução reacional para uma alíquota de 100 µL de células competentes *E. coli* DH5α. As células foram incubadas por 30 minutos em gelo, submetidas a choque térmico a 42° C por 90 segundos e depois transferidos para gelo durante 2 minutos, em seguida acrescentou-se 800 µL de meio LB. A suspensão foi incubada em um agitador a 37 °C durante 60 minutos. Após o tempo de incubação, o material foi centrifugado, descartou-se 700 µL do sobrenadante e o *pellet* formado foi ressuspendido nos 100 µL restantes. As alíquotas de 100 µL obtidas foram espalhadas em placas de LB contendo canamicina (50 µg/mL). As placas foram incubadas *overnight* a 37 °C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As mutações sítio dirigidas realizadas neste trabalho foram baseadas na sequência do gene codificante da metacaspase de S. cerevisiae (ScMCA-Ia) quando alinhada a sequência de aminoácidos da TbMCA-IIa de Trypanosoma brucei e em resíduos essenciais identificados na estrutura cristalográfica dessa enzima [14,15].

Como observado para todas as metacaspases, a cisteína catalítica é conservada, compondo o sítio ativo da enzima junto a um resíduo de histidina, sendo a cisteína 276 o resíduo conservado na ScMCA-Ia

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

(Cys^{276}). Foi observado na estrutura da TbMCAIIa que está enzima apresenta uma segunda cisteína que está ligada ao seu autoprocessamento, identificada como resíduos Cys^{92} (2), quando avaliamos as duas sequências dessas metacaspases, observamos que a ScMCA-Ia apresenta uma cisteína conservada na mesma posição a Cys^{155}. A partir dessas informações e alinhamentos, identificamos os resíduos de interesse para esse estudo, e projetamos os primers para realizarmos as mutações da segunda cisteína (Cys^{155}) e da cisteína catalítica (Cys^{276}).

Existem diversas técnicas desenvolvidas ao longo dos anos para a realização das mutações sítio dirigidas empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e que foram aprimoradas com o passar dos anos. A primeira estratégia traçada para realizar a mutação neste trabalho foi através da técnica mais conhecida e utilizada, a *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis System* (Stratagene), que consiste em utilizar em uma mesma reação de PCR pares de *primers* complementares contendo a troca do códon para a mutação, a fim de amplificar totalmente o plasmídeo realizando a mutação pontual no gene, entretanto, o uso dessa metodologia foi ineficiente durante os nossos experimentos, uma vez que a amplificação do plasmídeo total não foi eficaz (dados não mostrados). Acredita-se que isso pode ocorrer devido a hibridização dos *primers* que, por serem complementares, pode levar ao alinhamento e formação de "dímeros", reduzindo o rendimento da reação [16].

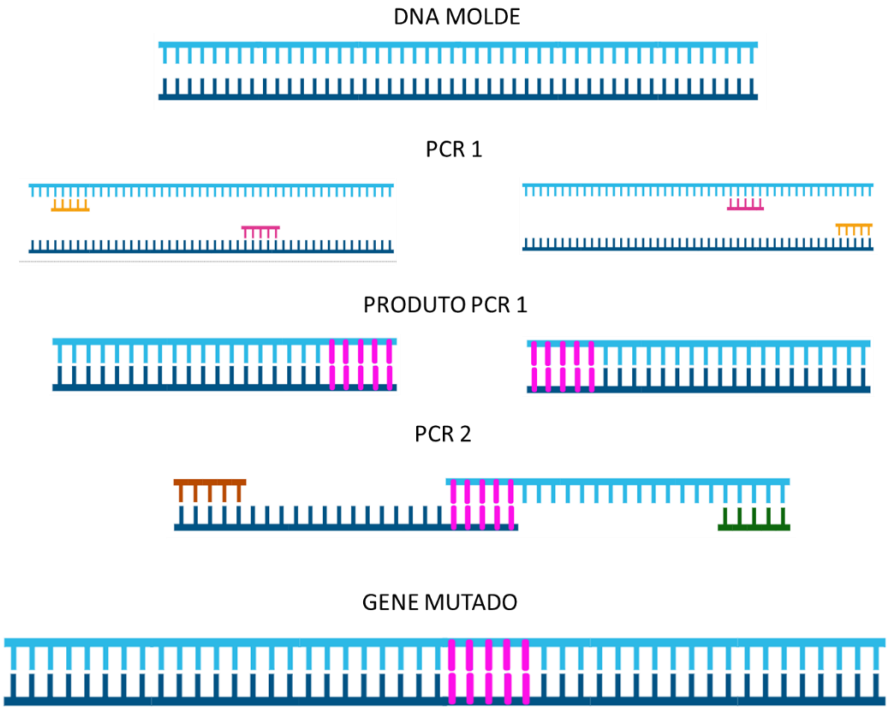
Com o intuito de evitar esse problema, utilizamos uma técnica alternativa para a obtenção dos mutantes da ScMCA-Ia, que consiste na metodologia de sobreposição de fragmentos [17]. A estratégia se baseia na realização de reações de PCR utilizando os *primers forward* e *reverse* separadamente. Assim, essa metodologia permite que sejam realizadas mutações de inserção, deleção e/ou substituição. O tipo de mutação sítio dirigida escolhida para esse trabalho foi a de substituição, nesse sentido, realizamos a troca de pares de bases que codificam um aminoácido importante na estrutura da proteína por outro, no caso para as mutações foi escolhido a troca por uma alanina. A escolha do aminoácido alanina ocorreu devido a sua estrutura simples e comum em proteínas, além da sua cadeia lateral curta, características que não impõem modificações e perturbações na estrutura secundária e terciária da proteína [18].

A metodologia de amplificação através da sobreposição de fragmentos é realizada em duas etapas de PCR. Na primeira etapa (PCR I) ocorre a amplificação de fragmentos que serão complementares, entre eles, utilizando *primers* flanqueadores do gene (verde e lilás – Figura 1) e *primers* internos contendo a mutação desejada (amarelo – Figura 1), conforme demonstrado na Figura 1.

Os *primers* internos são responsáveis por realizar a troca do códon original pelo mutado, já que carregam essa alteração na sua sequência. Nessa primeira etapa, os fragmentos gerados desses mutantes são complementares entre si, um fator importante na segunda etapa dessa metodologia.

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

Figura 1. Técnica de sobreposição de fragmentos para a obtenção de proteínas recombinantes com mutação sítio-dirigida.



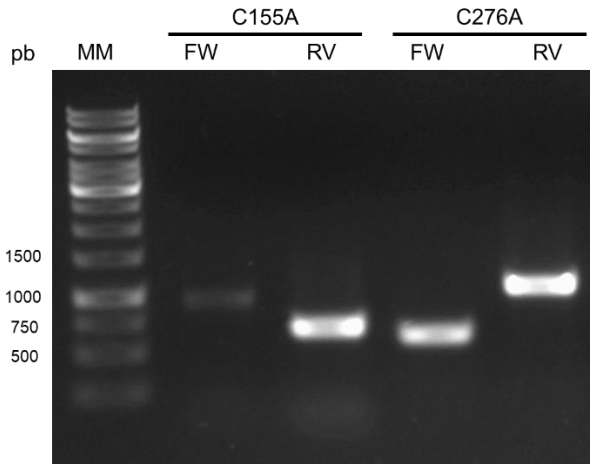
Fonte: Ho *et al.* (1989, p. 54 – com adaptação)
Em azul claro fita 5´-3´do DNA molde, em azul escuro fita 3´-5´do DNA molde, em amarelo primers *forward* e *reverse* de clonagem, em rosa primers de mutação. Em laranja e verde primers *foward* e *reverse* de clonagem.

Como visto na Figura 1 as reações são realizadas usando os *primers* separadamente, criando assim dois fragmentos. Para essas reações de PCR, foram utilizados os *primers* da região T7, que flanqueiam o gene no plasmídeo pET28(a)+ (plasmídeo de escolha para clonagem), por esse detalhe somam-se as regiões amplificadas os pares de bases correspondentes a região T7, em torno de aproximadamente 150 pb. Na Figura 2 observamos as amplificações realizadas nessa primeira etapa para a mutação dos resíduos Cys^{155} e Cys^{276}.

Com os fragmentos gerados na primeira etapa (PCR I), prosseguimos para a segunda etapa de PCR (PCRII). Nessa reação ocorre a sobreposição das regiões complementares amplificadas através dos *primers* da mutação. Para a PCR II utilizamos *primers* específicos para amplificação do gene da ScMCA-Ia. Nas reações, foram usados na mesma proporção os fragmentos obtidos anteriormente no PCR I. Os *primers* foram projetados visando a posterior reação do TEDA, acrescentando uma pequena sequência de pares de base para reconhecimento e clivagem pela T5 exonuclease – uma enzima com função de clivar o DNA no sentido 5'-3' – e que são complementares as extremidades da amplificação do plasmídeo pET28(a)+ na mesma região.

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

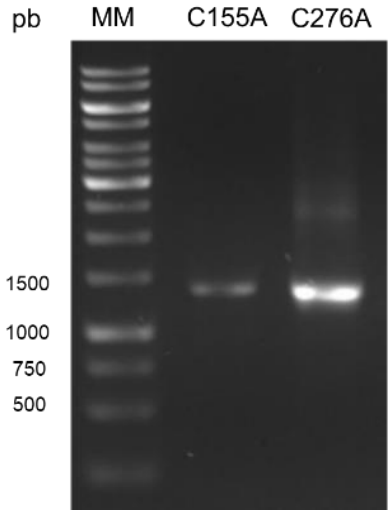
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação gerado na primeira etapa da reação de sobreposição de fragmentos.



Linhas: (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; Produtos da amplificação da PCR I-FW e PCR I-RV do mutante C155A, apresentando 1001 pb e 659 pb, respectivamente; Produtos da amplificação da PCR I-FW e PCR I-RV do mutante C276A, apresentando 633 pb e 1027 pb, respectivamente.

Como demonstrado na Figura 1, os fragmentos se hibridizam na região da mutação nessa PCR e formam o molde para que os *primers* TEDA amplifiquem o gene contendo a mutação, gerando como produto um único fragmento. A Figura 3 demonstra os fragmentos obtidos na amplificação mutantes da ScMCA-Ia.

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação da segunda etapa da reação de sobreposição de fragmentos.



Linhas: (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; (A) PCR II dos mutantes íntegros, SCMCA-IA C155A e SCMCA-IA C276A.

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

Através da análise das bandas obtidas confirmamos que a reação da PCR II ocorreu como esperado. Os fragmentos se hibridizaram e geraram os produtos finais no tamanho de ~1299 pb para os mutantes da ScMCA-Ia.

O uso dos *primers* específicos do TEDA na segunda etapa de amplificação foi utilizado baseando-se na montagem do DNA através da reação com a enzima T5 exonuclease. O primeiro método desenvolvido para a realização de clonagens foi através da digestão com enzimas de restrição e posterior ligação dos fragmentos complementares com DNA ligase [19]. Embora ainda seja o método mais utilizado, ao tentarmos aplicar não obtivemos eficiência no desenvolver do trabalho e optamos por seguir com técnicas mais recentes.

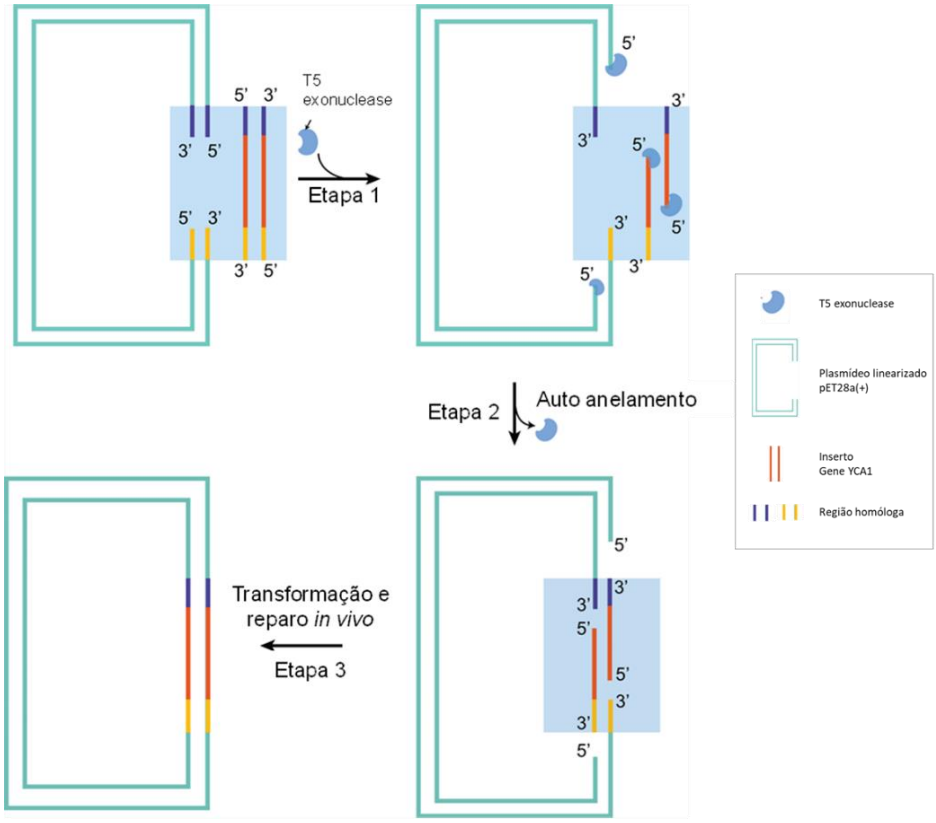
Diferentes métodos de clonagem foram desenvolvidos na última década, visando a melhoraria na eficiência e geração de protocolos mais rápidos, simples e econômicos. Métodos foram desenvolvidos aprimorando a técnica mais convencional, que geram fragmentos com extremidades coesivas, e outros foram projetados de modo a obter os produtos com princípios diferentes, como ocorre nas técnicas *in vivo* e *in vitro* que utilizam de sequências homólogas [20].

As técnicas voltadas à montagem de DNA *in vitro* em geral são métodos fáceis e confiáveis, entretanto com custos altos por conta do uso de várias enzimas, como ocorre no método de Gibson no qual utilizam-se três enzimas; a T5 exonuclease, Phusion DNA polimerase e a Taq DNA ligase [20,21].

O método T5 exonuclease DNA assembly (TEDA), foi projetado baseando-se na clonagem através de fragmentos de DNA com extremidades homólogas utilizando apenas uma enzima, a T5 exonuclease, que é capaz de clivar o DNA na direção 5'-3'. Assim, a T5 degrada a extremidade 5' e gera fragmentos na extremidade 3', passando de pontas cegas a pontas coesivas, que se hibridizam umas as outras. Portanto, quando o produto dessa incubação é transformado em células hospedeiras, ocorre o reparo *in vivo* das lacunas pela ação das enzimas DNA polimerase e ligase, como demonstrado na Figura 4, onde a polimerase preenche os pares de base nas lacunas entre as fitas complementares e ligase faz a ligação fosfodiéster entre os fragmentos formados [21].

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

Figura 4. Método T5 exonuclease DNA assembly (TEDA).

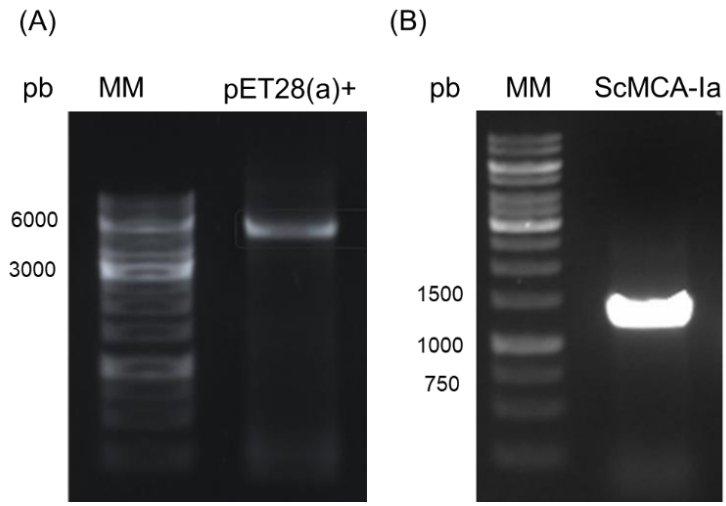


Fonte: Xia *et al.* (2019, p. 2 – com adaptação)

Representação da ação da T5 exonuclease na reação do TEDA. O retângulo de linha dupla com uma lacuna representa um plasmídeo linearizado. As linhas verticais duplas representam o inserto. Linhas com a mesma cor indicam a região homóloga. Na primeira etapa 1: a exonuclease T5 corta as extremidades 5' do plasmídeo linearizado e do inserto para gerar as extremidades complementares. Etapa 2: Os fragmentos se anelam por complementariedade e se ligam uns aos outros. Etapa 3: O DNA é transformado em células *E. coli* DH5α e as lacunas são reparadas *in vivo*.

Para realizar a clonagem através do TEDA é necessário obter o vetor linearizado no qual o gene será inserido, e para nosso trabalho utilizamos o pET28(a)+, que foi amplificado utilizando os *primers* do TEDA. Na Figura 5A observamos o resultado dessa amplificação e por meio do tamanho do fragmento gerado, confirmamos a obtenção do plasmídeo linearizado.

Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação do vetor e da ScMCA-Ia com os primers TEDA.



Linhas: **A:** (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; PCR de amplificação do vetor pET28(a)+ linearizado. **B:** (MM) marcador molecular *GeneRuler* 1kb; PCR de amplificação da ScMCA-Ia.

O DNA utilizado como molde para a reação de amplificação do vetor é proveniente de *E. coli,* obtido através de extração por lise alcalina, e por esse motivo é metilado. A metilação do DNA é um processo realizado pelas bactérias afim de marcar e proteger seu próprio material genético contra a degradação quando, por exemplo, ocorre a invasão da célula por vírus. Assim, ocorre a distinção do DNA bacteriano comparado com o DNA viral com a marcação de um grupamento metil, portanto o material genético não marcado do vírus é degradado por enzimas de restrição de outras classes [22,23]. Com base nisso, realizamos a etapa de digestão do produto da amplificação com a enzima de restrição DpnI, uma endonuclease utilizada para clivar o DNA metilado, com a finalidade de degradar o material molde utilizado na reação de amplificação e assim evitar que na próxima etapa esse plasmídeo não esteja presente nas nossas bactérias.

Após a digestão com DpnI, prosseguirmos com a reação de clonagem, realizando a purificação dos produtos amplificados. Com os produtos da PCRII realizamos a amplificação do gene da ScMCA-Ia contendo as mutações pontuais, usando os *primers* TEDA, ScMCA-Ia *forward* e ScMCA-Ia *reverse*. Confirmamos a amplificação em gel de agarose (Figura 5 B). Como resultado, obtivemos bandas representando ScMCA-Ia com aproximadamente 1299 pb.

As amostras obtidas após purificação foram quantificadas em nanodrop. Os valores obtidos foram utilizados no cálculo de proporção para a reação do TEDA, que foram preparadas na proporção 1:4 de vetor/inserto. Prosseguimos com a incubação e após submetemos o produto a etapa de transformação através de choque térmico em cepas de *E. coli* DH5α, a escolha dessa cepa foi baseada na sua capacidade em estabilizar e amplificar o DNA inserido [24].

Os clones foram selecionados através do crescimento em meio de cultura com antibiótico canamicina, uma vez que o pET28(a)+ confere resistência a este antibiótico. Escolhemos aleatoriamente

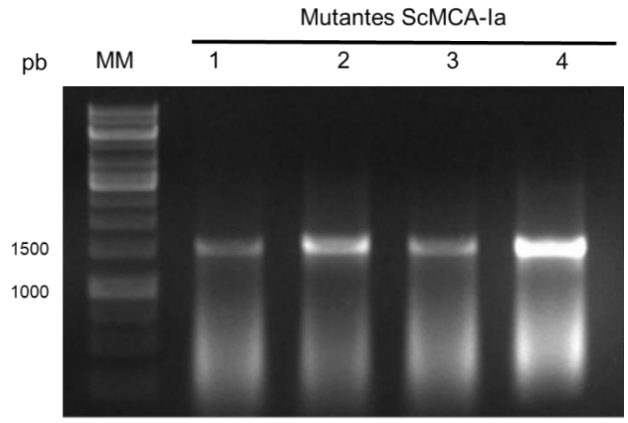
Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

algumas colônias para realizarmos uma PCR confirmatória e posteriormente selecionamos uma dessas colônias de cada para realizar a extração do plasmídeo através da lise alcalina.

Dentre os clones positivos, selecionou-se uma colônia de cada mutante para o preparo do pré-inóculo a fim de realizar a extração do DNA plasmidial por lise alcalina, obtido utilizando o kit comercial. Após a extração, o material adquirido foi submetido a uma amplificação utilizando os *primers* da região T7, assim como foi realizado anteriormente, para confirmamos a integridade dos plasmídeos.

Com a confirmação da clonagem, prosseguimos para submeter o produto da lise alcalina a etapa de transformação do produto em cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS com o objetivo de prepararmos os ensaios para a expressão das proteínas. A transformação foi feita por choque térmico e após a obtenção das colônias, confirmamos através da amplificação com os *primers* da região T7 a obtenção dos clones dos mutantes nas cepas de expressão, assim como foi realizado anteriormente (Figura 6).

Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da amplificação dos plasmídeos obtidos em colônias de *E. coli* BL21(DE3)pLysS.



Linhas: (MM) marcador molecular GeneRuler 1kb; PCR de colônia da SCMCA-IA íntegra mutante, na imagem como exemplo 4 colônias do mutante C276A.

O material oriundo da lise alcalina foi submetido a sequenciamento pela empresa Ludwig (dados não mostrados). Os resultados mostraram que nossos mutantes foram obtidos com êxito.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve um processo meticuloso de mutação sítio-dirigida do gene codificante da metacaspase de *S. cerevisiae* (ScMCA-Ia), utilizando como base a sequência de aminoácidos da TbMCA-IIa de *Trypanosoma brucei*, e levando em consideração os resíduos essenciais identificados na estrutura cristalográfica dessa enzima.

A análise revelou a conservação da cisteína catalítica, em particular a Cys^{276} na ScMCA-Ia, que constitui o sítio ativo da enzima, juntamente com um resíduo de histidina. Adicionalmente, a TbMCA-IIa

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

apresentou uma segunda cisteína (Cys^{92}) associada ao processo de autoprocessamento, o que implicou na mutação correspondente da Cys^{155} na ScMCA-Ia.

Iniciamos com a estratégia *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis System*, amplamente utilizada, porém demonstrou ineficiência devido à hibridização dos primers, presumivelmente causando formação de dímeros e redução do rendimento da reação. Como alternativa, adotamos a técnica de sobreposição de fragmentos, permitindo mutações de substituição. Optamos pela alanina devido à sua estrutura e cadeia lateral simples, evitando perturbações na estrutura da proteína.

A amplificação por sobreposição de fragmentos foi realizada em duas etapas (PCR I e PCR II), gerando fragmentos complementares que serviram como matriz para a clonagem. A metodologia T5 *exonuclease DNA assembly* (TEDA) foi empregada, utilizando exclusivamente a T5 exonuclease para clivar o DNA na direção 5'-3', transformando extremidades coesivas em pontas cegas que se hibridizaram. O reparo *in vivo* das lacunas foi executado pela DNA polimerase e ligase da própria bactéria.

A digestão com DpnI foi crucial para degradar o DNA metilado empregado como molde na reação de amplificação, antes da clonagem no vetor linearizado pET28(a)+. A seleção dos clones foi conduzida com base na resistência à canamicina conferida pelo plasmídeo. A confirmação da clonagem foi realizada por PCR e subsequente sequenciamento.

Em seguida, procedeu-se com a transformação do produto em cepas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS para a preparação dos ensaios de expressão das proteínas mutantes. O sequenciamento final atestou o sucesso na obtenção dos mutantes. O presente estudo apresenta uma abordagem metodológica robusta para a realização de mutações sítio-dirigidas em genes, com aplicabilidade potencial em investigações futuras sobre metacaspases.

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

REFERÊNCIAS

1. Uren AG, O'Rourke K, Aravind L, et al. Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. Mol Cell 2000;

2. Hill SM, Nyström T. The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger. BioEssays 2015;

3. Klemenčič M, Funk C. Evolution and structural diversity of metacaspases. J Exp Bot. 2019;

4. Vercammen D, Cotte B Van De, Jaeger G De, et al. Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of Arabidopsis thaliana cleave substrates after arginine and lysine. Journal of Biological Chemistry 2004;

5. Machado MFM, Marcondes MF, Juliano MA, et al. Substrate specificity and the effect of calcium on Trypanosoma brucei metacaspase 2. FEBS Journal 2013;280(11).

6. Minina EA, Coll NS, Tuominen H, Bozhkov P V. Metacaspases versus caspases in development and cell fate regulation. Cell Death Differ. 2017;

7. Minina EA, Staal J, Alvarez VE, et al. Classification and Nomenclature of Metacaspases and Paracaspases: No More Confusion with Caspases. Mol Cell. 2020;

8. Tsiatsiani L, Breusegem F Van, Gallois P, Zavialov A, Lam E, Bozhkov P V. Metacaspases. Cell Death Differ. 2011;

9. Moss CX, Westrop GD, Juliano L, Coombs GH, Mottram JC. Metacaspase 2 of Trypanosoma brucei is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. FEBS Lett 2007;

10. Gilio JM, Marcondes MF, Ferrari D, et al. Processing of metacaspase 2 from Trypanosoma brucei (TbMCA2) broadens its substrate specificity. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom 2017;1865(4).

11. Shrestha A, Megeney LA. The non-death role of metacaspase proteases. Front Oncol. 2012;

12. Madeo F, Engelhardt S, Herker E, et al. Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. Curr Genet [homepage on the Internet] 2002 [cited 2023 Jan 31];41(4):208–216. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12172961/

13. Lee REC, Puente LG, Kærn M, Megeney LA. A non-death role of the yeast metacaspase: Yca1p alters cell cycle dynamics. PLoS One 2008;

14. Wong AHH, Yan C, Shi Y. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. Journal of Biological Chemistry 2012;

15. McLuskey K, Rudolf J, Proto WR, et al. Crystal structure of a Trypanosoma brucei metacaspase. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;

16. Edelheit O, Hanukoglu A, Hanukoglu I. Simple and efficient site-directed mutagenesis using two single-primer reactions in parallel to generate mutants for protein structure-function studies. 2009;Available from: http://www.biomedcentral.com/1472-6750/9/61

17. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene [homepage on the Internet] 1989 [cited 2023 Oct 16];77(1):51–59. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2744487/

18. Gibbs CS, Zoller MJ. Identification of electrostatic interactions that determine the phosphorylation site specificity of the cAMP-dependent protein kinase. Biochemistry [homepage on the Internet] 1991 [cited 2023 Oct 30];30(22):5329–5334. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2036400/

Revista Científica UMC | RCUMC | ISSN: 2525-5150
DOI:

19. Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A [homepage on the Internet] 1973 [cited 2023 Jan 17];70(11):3240–3244. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4594039/

20. Chao R, Yuan Y, Zhao H. Recent advances in DNA assembly technologies. FEMS Yeast Res [homepage on the Internet] 2015 [cited 2023 Jan 17];15(1). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24903193/

21. Xia Y, Li K, Li J, Wang T, Gu L, Xun L. T5 exonuclease-dependent assembly offers a low-cost method for efficient cloning and site-directed mutagenesis. Nucleic Acids Res 2019;47(3).

22. Lu L, Patel H, Bissler JJ. Optimizing DpnI digestion conditions to detect replicated DNA. Biotechniques [homepage on the Internet] 2002 [cited 2023 Jan 17];33(2):316–318. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12188183/

23. Mierzejewska K, Siwek W, Czapinska H, et al. Structural basis of the methylation specificity of R.DpnI. Nucleic Acids Res [homepage on the Internet] 2014 [cited 2023 Jan 17];42(13):8745–8754. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24966351/

24. Kostylev M, Otwell AE, Richardson RE, Suzuki Y. Cloning Should Be Simple: Escherichia coli DH5α-Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. PLoS One [homepage on the Internet] 2015 [cited 2023 Jan 17];10(9). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26348330/