UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
JOÃO PEDRO MARTINS SILVA COSTA

OBTENÇÃO DA METACASPASE RECOMBINANTE DE *Leishmania major*

MOGI DAS CRUZES, SP
2025

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

JOÃO PEDRO MARTINS SILVA COSTA

OBTENÇÃO DA METACASPASE RECOMBINANTE DE *Leishmania major*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.
Área de concentração: Biotecnologia aplicada a saúde humana, animal e ambiental

Orientador: Prof. Dr. Maurício Ferreira Marcondes Machado

MOGI DAS CRUZES, SP

2025

FINANCIAMENTO







Ficha catalográfica
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

C838o

Costa, João Pedro Martins Silva
Obtenção da metacaspase recombinante de Leishmania major / João Pedro Martins Silva Costa. -- Mogi das Cruzes, SP: Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -- Universidade de Mogi das Cruzes, 2025.
Orientação: Prof. Dr. Mauricio Ferreira Marcondes Machado.

1. Leishmania major 2. Proteínas recombinantes 3. Metacaspase I. Machado, Maurício Ferreira Marcondes II. Universidade de Mogi das Cruzes III. Título

CDD 616.9364

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

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas do dia vinte e oito de fevereiro de dois mil e vinte e cinco, pela Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação intitulada: "OBTENÇÃO DA METACASPASE RECOMBINANTE DE LEISHMANIA MAJOR", para obtenção do grau de mestre pelo(a) candidato(a) **João Pedro Martins Silva Costa**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de mestre. A comissão examinadora estava constituída dos senhores professores doutores: Maurício Ferreira Marcondes Machado e Wagner Alves de Souza Judice, da Universidade de Mogi das Cruzes, e Marcelo Ferreira Marcondes Machado, da Universidade Federal de São Paulo. Sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A sessão pública da defesa da dissertação foi aberta pelo senhor presidente da comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, 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)

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

Mogi das Cruzes, 28 de fevereiro de 2025.

Comissão Examinadora	Julgamento
Prof. Dr. Wagner Alves de Souza Judice	Aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))
Prof Dr. Marcelo Ferreira Marcondes Machado	APROVADO (aprovado(a) / reprovado(a))
Prof. Dr Maurício Ferreira Marcondes Machado	Aprovado (aprovado(a) / reprovado(a))

gov.br Documento assinado digitalmente
MARCELO FERREIRA MARCONDES MACHADO
Data: 28/02/2025 09:15:49-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por sempre me apoiar e me auxiliar nos meus objetivos. Por me guiarem nos momentos em que me senti perdido e me suportarem nos momentos de estresse. Em especial à minha avó Lea, a quem serei eternamente grato, pois se hoje sou farmacêutico, e estou completando mais um passo do meu sonho, isso só é possível por conta dela.

Ao meu orientador e mentor, Prof. Dr. Mauricio Ferreira Marcondes Machado, por me abrir as portas nesse mundo da pesquisa, desde a época de graduação onde pude realizar uma iniciação cientifica e desenvolver meu TCC no LABMUN, dentro do CIIB. Agradeço pela paciência, pelo auxílio constante e pelas discussões enriquecedoras, que me ensinaram técnicas e incentivaram minha busca por conhecimento. Obrigado por não me deixar desistir quando as forças pareciam se esgotar.

Aos amigos que fiz no CIIB, minha segunda família, meu sincero agradecimento. À Vitória Rios, minha amiga e irmã de antes, durante e depois do CIIB, que sempre implicava comigo, e eu adorava implicar com ela, obrigado por sua amizade genuína, pelos conselhos, mas acima de tudo pela alegria que era estar com você, uma irmã que levarei para a vida. À Taíz Reis, Mariana Trujilho e Laura Maffeis, grandes amigas que tive o privilégio de conhecer no CIIB, agradeço imensamente pelos ensinamentos, mas acima de tudo, pela amizade, apoio, conversas, por sempre estarem dispostas a me ouvir e por todos os conselhos sejam do laboratório ou da vida. À Ane Duarte, iniciamos juntos a iniciação cientifica e finalizamos agora mais uma etapa juntos, obrigado por todos os momentos, pelo companheirismo, pelas saídas pós faculdade, conversas e pelos desafios superados juntos. Ao Robson Massaria, pela amizade, conversas, risadas e pelos açaís e milkshakes tomados juntos.

Talvez as palavras não expressem plenamente minha gratidão, mas saibam que cada um de vocês foi essencial nesta trajetória. Mesmo distantes hoje, levo comigo uma parte de cada um e tudo o que vivemos juntos, e espero que também levem uma parte de mim.

Agradeço também aos professores que contribuíram para meu desenvolvimento, especialmente aos da Pós-Graduação em Biotecnologia, pelo conhecimento compartilhado ao longo dessa caminhada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida (processo nº 88887.821267/2023-00). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo nº 22/06394-0), pelo suporte financeiro. À Universidade de Mogi das Cruzes (UMC), pelo suporte e pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

RESUMO

A *Leishmania major* é um protozoário parasita de elevada relevância clínica, sendo um grande problema de saúde pública. Devido a vários mecanismos de patogenicidade, fatores de virulência e aos mecanismos de resistência da *L. major*, além dos tratamentos atuais apresentarem limitações e potenciais efeitos adversos, é necessária a busca de novos alvos terapêuticos e novos tratamentos para infecções causadas por este agente infeccioso. A *L. major* apresenta uma única metacaspase (LmMCA-Ia), enzima envolvida na regulação de diversos mecanismos celulares e principalmente no processo de morte celular programada. Neste trabalho, buscamos clonar, expressar e purificar a LmMCA-Ia. No entanto, diversas tentativas de expressão da forma íntegra da proteína não resultaram na detecção da enzima. Como alternativa, foi produzida uma forma truncada da enzima, com deleção da região C-terminal hidrofóbica (LmMCA-Ia-δC-term), visando minimizar eventos de agregação e *misfolding*. Embora a LmMCA-Ia-δC-term tenha sido expressa com sucesso, análises por SDS-PAGE e *western blotting* indicaram que a proteína recombinante foi direcionada para corpos de inclusão, permanecendo insolúvel após a lise bacteriana. Estratégias de otimização da expressão, incluindo variações de temperatura, tempo de indução, concentração de IPTG, pH e adição de glicose não resultaram em solubilização da enzima. Diante disso, discutimos abordagens de *refolding in vitro* a partir de proteínas insolúveis, bem como a utilização de sistemas eucarióticos alternativos, como *Pichia pastoris*, para favorecer o enovelamento adequado da proteína. Este estudo destaca os desafios na produção de proteínas recombinantes de protozoários e propõe caminhos alternativos para obtenção da LmMCA-Ia funcional.

Palavras-chave: *Leishmania major;* metacaspase; clonagem; proteína recombinante.

ABSTRACT

Leishmania major is a parasitic protozoan of high clinical relevance and represents a major public health concern. Due to its multiple pathogenic mechanisms, virulence factors, and resistance strategies—as well as the limitations and potential adverse effects of current treatments—there is a pressing need to identify new therapeutic targets and develop novel treatment options for infections caused by this pathogen. *L. major* encodes a single metacaspase (LmMCA-Ia), an enzyme involved in the regulation of several cellular processes, most notably programmed cell death. In this study, we aimed to clone, express, and purify LmMCA-Ia. However, several attempts to express the full-length form of the protein failed to produce detectable levels of the enzyme. As an alternative approach, a truncated version of the protein was generated, lacking the hydrophobic C-terminal region (LmMCA-Ia-δC-term), in order to minimize aggregation and misfolding events. Although LmMCA-Ia-δC-term was successfully expressed, SDS-PAGE and western blot analyses indicated that the recombinant protein was directed to inclusion bodies and remained insoluble following bacterial lysis. Efforts to optimize expression conditions—including variations in temperature, induction time, IPTG concentration, pH, and glucose supplementation—did not lead to enzyme solubilization. In light of these results, we discuss potential *in vitro* refolding strategies using insoluble protein fractions, as well as the application of alternative eukaryotic expression systems, such as *Pichia pastoris*, to promote proper protein folding. This study underscores the challenges associated with recombinant protein production in protozoan systems and proposes alternative strategies for obtaining functional LmMCA-Ia.

Keywords: *Leishmania major*; metacaspase; cloning; recombinant protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do parasita 16
Figura 2 - Representação simplificada do conceito de endopeptidases e exopeptidases 21
Figura 3 – Regiões de clivagem dos substratos pelas exopeptidases 22
Figura 4 – Regiões de clivagem dos substratos pelas endopeptidases 23
Figura 5 – Representação da interação dos sub-sítios de uma protease com os aminoácidos do seu substrato 24
Figura 6 – Representação estrutural da papaína evidenciando os resíduos do seu sítio ativo (em marrom) constituído por Cys^{25}, His^{159} e Asn^{175} 26
Figura 7 – Classificação das císteino-proteases em famílias e clãs 27
Figura 8 – Mecanismo de ativação proposto para as caspases (D: resíduo de ácido aspártico / Pro: prodomínio / H e C: díade catalítica His-Cys localizada na subunidade P_{20}) 28
Figura 9 – Mecanismo de ativação proposto para as metacaspases – todos os três tipos de metacaspase são compostas pelas subunidades P_{20} onde está localizada a díade catalítica His-Cys (H e C) e P_{10}, possuem uma região rica em glutamina e asparagina (Q/N), a metacaspase I possuem a presença de um pró-domínio (pro) . 29
Figura 10 – Comparação das caspases e metacaspases – composição dos domínios e características bioquímicas 30
Figura 11 - Sequência completa do gene codificador da metacaspase de Leishmania major (LmMCA-Ia) 35
Figura 12 – Sequência do gene sintetizado pela Thermo Fisher Scientific 36
Figura 13 - Comparação entre a proteína obtida pela tradução do gene codificante da metacaspase de Leishmania major e pela tradução do gene sintético sintetizado pela Thermo Fisher Scientific 46
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da triagem de temperatura de anelamento dos *primers* para amplificação do gene da LmMCA-Ia. 47
Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da triagem de temperatura de anelamento dos *primers* para amplificação do gene da LmMCA-Ia-δC-term. 48
Figura 16 - Amplificação dos genes codificantes da LmMCA-Ia e da LmMCA-Ia-δC-term. 49

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1% indicando a amplificação do pET28(a) por PCR usando os *primers* do procedimento TEDA 50
Figura 18 - Esquema do método TEDA..... 51
Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose a 1% exibindo a amplificação de colônias de DH5α transformadas com o plasmídeo recombinante que carrega o gene da LmMCA-Ia Íntegra (A) e LmMCA-Ia-δC-term (B)..... 54
Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose a 1% exibindo a amplificação de colônias de BL21 (DE3) plysS transformadas com o plasmídeo recombinante que carrega o gene da LmMCA-Ia Íntegra (A) e LmMCA-Ia-δC-term (B)..... 55
Figura 21 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% mostrando a expressão da LmMCA-Ia-δC-term do sedimento bacteriano 58
Figura 22 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% do material obtido da lise bacteriana..... 60
Figura 23 - Western blotting do material obtido da lise bacteriana 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos *primers* empregados na amplificação do gene. As regiões destacadas em amarelo correspondem às complementares ao vetor pET28(a), enquanto as marcadas em vermelho indicam as regiões específicas do gene. 36
Tabela 2 – Sequência dos *primers* utilizados na amplificação do vetor pET28(a). ...37
Tabela 3 – Sequência dos *primers* T7 utilizados para amplificação. 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AtMCA	Metacaspase de *Arabidopsis thaliana*
ATP	Trifosfato de Adenosina
$CaCl_2$	Cloreto de Cálcio
CaMCA	Metacaspase de *Candida albicans*
CARD	Domínios de Recrutamento de Caspase
Ca^{2+}	Íon Cálcio
C-Terminal	Carboxi-terminal
DISC	Sinalização Indutor de Morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
E. coli	*Escherichia coli*
FRET	*Fluorescence Resonance Energy Transfer*
HCl	Ácido Clorídrico
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactosidase
KCl	Cloreto de Potássio
LB	Meio de cultura Luria Broth
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Disseminada
L. donovani	*Leishmania donovani*
LdMCA	Metacaspase de *Leishmania donovani*
L. major	*Leishmania major*
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LmMCA	Metacaspase de *Leishmania major*
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MCA	Metacaspase
MCR	Morte Celular Regulada
MCS	Múltiplo Sítio de Clonagem
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
Mg^{2+}	Íon Magnésio
$MnCl_2$	Cloreto de Manganês

NaCl	Cloreto de Sódio
Na_2HPO_4	Fosfato de sódio
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
N-terminal	Amino-terminal
PARP	Poli ADP-Ribose Polimerase
PbMCA	Metacaspase de *Plasmodium berghei*
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PfMCA	Metacaspase de *Plasmodium falciparum*
ScMCA	Metacaspase de *Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TbMCA	Metacaspase de *Trypanosoma brucei*
T. brucei	*Trypanosoma brucei*
TEDA	*T5 Exonuclease Dependent Assembly*
TNF	Fator de Necrose Tumoral

ABREVIATURA 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 15

1.1 LEISHMANIOSES 15

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE 15

1.3 TRATAMENTOS 17

1.4 MORTE CELULAR 17

1.4.1 Apoptose 19

1.5 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS 21

1.5.1 Classificação das proteases 24

1.5.2 Cisteíno proteases 25

1.6 METACASPASES 28

1.6.1 Metacaspase de *Leishmania major* 32

2 OBJETIVO 34

2.1 OBJETIVO GERAL 34

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 34

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS 35

3.1 IDENTIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DO GENE 35

3.2 SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* 36

3.3 AMPLIFICAÇAO DO GENE E DO VETOR 37

3.4 MONTAGEM DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE 38

3.5 PREPARO DAS BACTÉRIAS *E. coli* DH5α E BL21 (DE3) PLYSS COMPETENTES PARA TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO 39

3.6 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* DH5A 40

3.7 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* BL21 (DE3) PLYSS COM O PRODUTO DA LISE ALCALINA 41

3.8 EXPRESSÃO DA METACASPASE RECOMBINANTE DE *Leishmania major* EM SISTEMA HETERÓLOGO *E. coli* BL21 (DE3) PLYSS 41

3.9 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DA METACASPASE DE *Leishmania major* RECOMBINANTE ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) 42

3.10 LISE CELULAR 42

3.11 PURIFICAÇÃO DA METACASPASE RECOMBINANTE DE *Leishmania major* COM DELEÇÃO DO C-TERMINAL 43
3.12 *WESTERN BLOTTING* 43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 45
4.1 CLONAGEM DA LMMCA-IA 45
4.2 EXPRESSÃO DA LMMCA-IA 55
5 CONCLUSÕES 64
REFERÊNCIAS 65

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses englobam um grupo de doenças com diversas apresentações clínicas, causadas por parasitas da família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania*. Estas enfermidades estão presentes em mais de 70 países, afetando anualmente cerca de 2 milhões de indivíduos, dos quais 1,5 milhão apresentam leishmaniose tegumentar e 500 mil, leishmaniose visceral. Além disso, estima-se que aproximadamente 200 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção (VAN GRIENSVEN; DIRO, 2019).

Com base nas manifestações clínicas, as leishmanioses são classificadas em dois principais tipos: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A LT compromete o tegumento do hospedeiro, enquanto a LV afeta órgãos internos, como baço, fígado e medula óssea. Essas formas clínicas são causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania* (DAVID; CRAFT, 2009).

A leishmaniose tegumentar apresenta subtipos clínicos específicos, incluindo a leishmaniose cutânea (LC), que pode manifestar-se com ou sem ulceração; a leishmaniose mucocutânea (LMC), caracterizada por lesões nas mucosas oral, nasal e faríngea; e a leishmaniose cutânea disseminada (LCD), que se distingue por múltiplas lesões papulares com aparência acneiforme, frequentemente observada em indivíduos imunossuprimidos (ASHFORD, 2000).

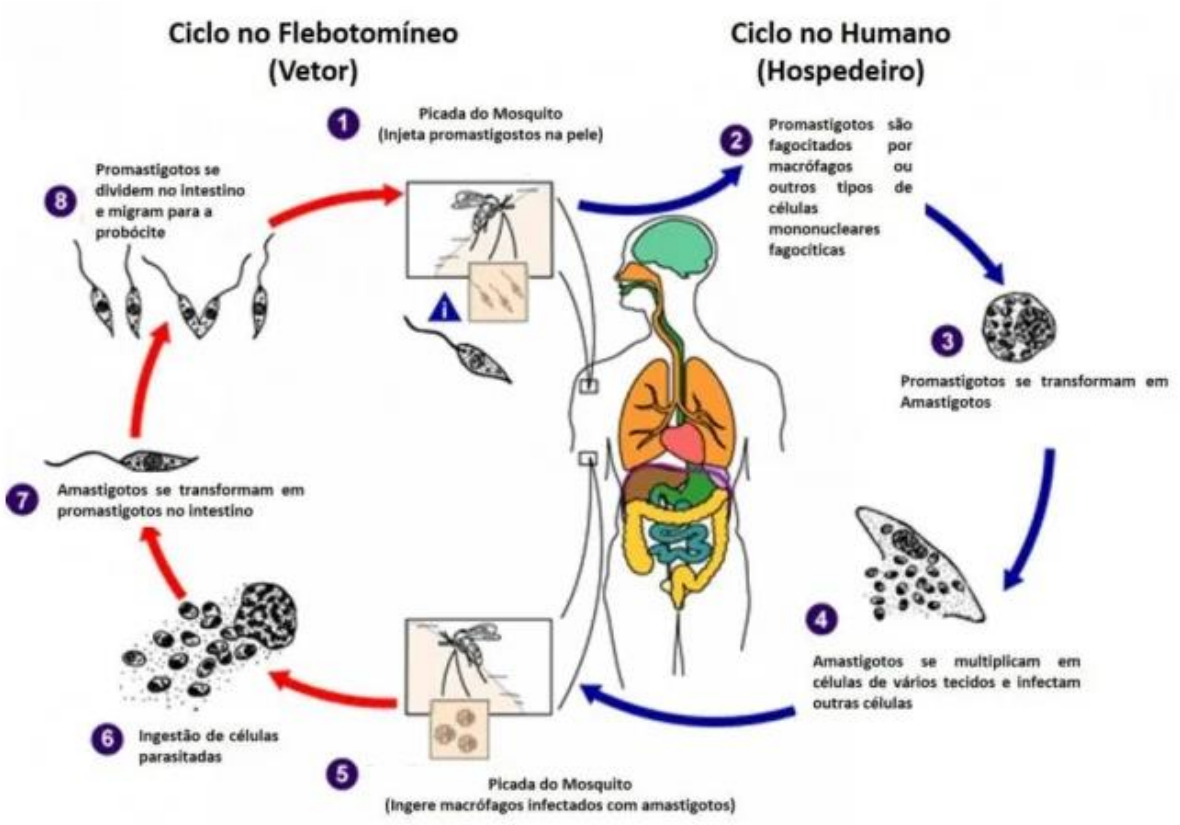
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE

A leishmaniose tegumentar (LT) apresenta uma distribuição geográfica concentrada, com 90% dos casos reportados em sete países: Afeganistão, Brasil, Paquistão, Argélia, Peru, Arábia Saudita e Síria (HEPBURN, 2000).

A transmissão das leishmanioses ocorre pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Esses insetos pertencem à ordem *Díptera* e possuem desenvolvimento holometábolo, sendo encontrados em habitats sombreados e úmidos. Diferentemente de outros insetos vetores, como os da família *Culicidae*, sua oviposição ocorre em solos ricos em matéria orgânica de origem vegetal em decomposição, o que dificulta a identificação de locais de postura e consequentemente seu controle. Embora existam mais de 500 espécies de

flebotomíneos, apenas 30 já foram identificadas como vetores das leishmanioses (KILLICK-KENDRICK, 1990). O ciclo de vida das várias espécies do gênero *Leishmania* (Figura 1) tem início quando uma fêmea de flebotomíneo não infectada, ao realizar o repasto sanguíneo, ingere amastigotas de *Leishmania* do sangue ou tecidos do hospedeiro. Ao atingir o intestino médio do inseto, as amastigotas sofrem uma rápida diferenciação em promastigotas, que são capazes de deixar a matriz peritrófica, evitando que sejam eliminadas com as fezes. Após sair da matriz peritrófica, as formas promastigotas se ligam ao epitélio do intestino e posteriormente migram para a válvula do estomodeu e lá colonizam e se diferenciam em promastigotas metacíclicas, que são infectantes para o hospedeiro mamífero (KILLICK-KENDRICK, 1990).

Figura 1 - Ciclo de vida do parasita



Fonte: Adaptado de Tovar; Trujillo & Rohana (2017)

1.3 TRATAMENTOS

A leishmaniose, em suas diversas formas clínicas, representa um desafio terapêutico devido à complexidade do parasita, à variabilidade geográfica das espécies de *Leishmania* e aos efeitos adversos associados aos fármacos disponíveis. Os principais tratamentos incluem os antimoniais pentavalentes, que atuam inibindo a fosfofrutoquinase do parasita e interferindo na produção de ATP. Exemplos desses fármacos são o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina, amplamente utilizados como primeira linha para a leishmaniose visceral e cutânea em diversas regiões endêmicas. No entanto, esses compostos apresentam limitações significativas, como toxicidade cardíaca, hepática e pancreática, além do surgimento de resistência (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Outro fármaco convencionalmente utilizado é a anfotericina B, que se liga ao ergosterol da membrana do parasita, causando ruptura celular. A formulação lipossomal é preferida por apresentar menor nefrotoxicidade e ser indicada para casos refratários aos antimoniais ou em pacientes imunossuprimidos. Contudo, seu alto custo e a necessidade de administração intravenosa são desafios para sua ampla adoção (SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021).

A miltefosina é o único fármaco oral disponível para a leishmaniose visceral e atua perturbando a síntese de fosfolipídios e a sinalização celular do parasita. Apesar dessa vantagem, apresenta limitações importantes, como teratogenicidade, resistência emergente e efeitos gastrointestinais (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021).

1.4 MORTE CELULAR

O ciclo celular é determinado basicamente pelos processos de divisão, diferenciação e morte celular. Várias vias de sinalização molecular que levam a morte celular têm sido descritas (OKADA; MAENO; MORI, 2005 ; SPERANDIO; DE BELLE; BREDESEN, 2000).

Células que morrem em resposta a um dano que provoque uma mudança morfológica – vazamento e/ou lise – acabam liberando o conteúdo interno na vizinhança através do processo de necrose, um evento que geralmente leva a

inflamação (GOODSELL, 2000). Autofagia é uma via metabólica provocada por alguma condição de estresse, como falta de nutrientes, na qual componentes do citoplasma, incluindo organelas e patógenos intracelulares, são sequestradas em um “autofagossomo” (vacúolo que possui uma dupla membrana) e que são enviados para os lisossomos para degradação (MARINO *et al.*, 2014). A apoptose é um mecanismo de morte controlado, muito importante na manutenção de organismos saudáveis, pois é uma forma silenciosa de eliminação de células envelhecidas ou anormais (GOODSELL, 2000). Portanto, autofagia e apoptose controlam a reciclagem de organelas e proteínas dentro das células e de células em organismos vivos, respectivamente.

Condições de estresse podem levar uma mesma célula a autofagia seguida de apoptose. Geralmente a autofagia bloqueia a indução da apoptose, enquanto o processo de apoptose associada a ativação de caspases desliga o processo autofágico. Porém, em alguns casos, a própria autofagia ou proteínas importantes no processo autofágico ajudam na indução da apoptose ou da necrose, a degradação pela autofagia torna-se “excessiva” levando a uma morte celular autofágica (MARINO *et al.*, 2014).

É simples entender a importância da morte celular programada num organismo multicelular. A eliminação de uma célula anormal ou envelhecida com o menor dano possível para as células de sua vizinhança é fundamental para a manutenção do tecido/organismo saudável. Porém, não é tão óbvio entender o porquê organismos unicelulares também apresentam morte celular programada (BARCINSKI, 1997). De toda maneira, após os trabalhos pioneiros do Dr. Marcello Barcinski, várias evidências da existência de morte celular programada em organismos unicelulares se acumularam e confirmaram seus achados (WELBURN; BARCINSKI; WILLIAMS, 1997). Várias teorias e estudos existem tentando entender a necessidade e/ou porque a morte celular programada é uma vantagem adaptativa nos organismos unicelulares (ENGELBRECHT; DURAND; COETZER, 2012; NEDELCU *et al*., 2011).

Certamente parte desse entendimento passa pelo estudo dos mecanismos moleculares de morte celular programada de organismos unicelulares. Esses organismos não apresentam caspases, porém enzimas estruturalmente similares denominadas metacaspases. O papel das metacaspases na morte celular programada, ou mesmo em outros processos não relacionados a morte celular em organismos unicelulares ainda é pouco entendida. É exatamente nesse ponto que a

presente dissertação se insere, pois estudamos aspectos bioquímicos da metacaspase de *Leishmania major*.

1.4.1 Apoptose

Apesar do conceito de apoptose ter sido descrito 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 morte celular regulada (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 (DONEHOWER; BRADLEY, 1993; ELMORE, 2007).

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; OLDENBURG; CIDLOWSKI, 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; OLDENBURG; CIDLOWSKI, 1995).

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 e 10), efetoras (caspase-3, 6 e 7) e inflamatórias (caspase-1, 4 e 5) (KANG *et al.*, 2002). 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 (IGNEY; KRAMMER, 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 (MAIDAN *et al.*, 2005).

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 a Pró-caspase-3 e a 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 (GORTAT *et al*., 2015; YUAN; AKEY, 2013).

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.*, 2018). A via extrínseca da apoptose é então ativada por interações entre receptores transmembrana da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF). 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 (ELMORE, 2007; RUBIO-MOSCARDO, 2005).

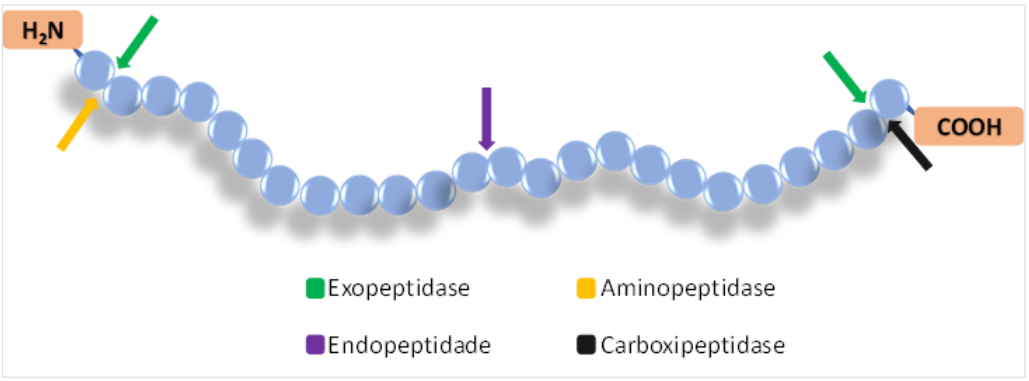
Na fase extrínseca da apoptose, exemplificada pelos modelos FasL/FasR e TNF-α/TNFR1, os receptores se ligam aos ligantes homólogos, formando o Complexo de Sinalização Indutor de Morte (DISC). Após a formação do DISC, a caspase-8 é ativada desencadeando a ativação subsequente de outras caspases, como a caspase-3 (ELMORE, 2007; RUBIO-MOSCARDO, 2005).

1.5 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

As proteases são classificadas tendo como base o seu mecanismo catalítico (natureza do resíduo no sítio ativo, que podem se aspartato, glutâmico, cisteína, serina e treonina proteases, metalo-proteases e asparagina liases), local de clivagem e por sua similaridade estrutural (RAWLINGS *et al.*, 2018).

No que se refere ao local de clivagem pelas proteases, estas podem ser classificadas em: endopeptidases e as exopeptidases, assumido como base o local de clivagem no substrato (Figura 2) (RAWLINGS *et al.*, 2018).

Figura 2 - Representação simplificada do conceito de endopeptidases e exopeptidases

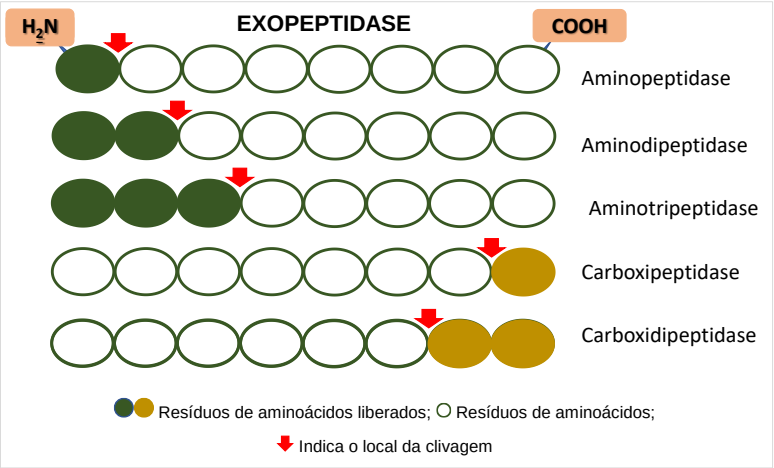


Fonte: Adaptado de Ceuleers *et al*. (2016)

As exopeptidases clivam seu substrato a partir da hidrólise nas extremidades do polipeptídeo próximo aos terminais amino (N-terminal) e carboxi (C-terminal) e são denominadas como aminopeptidase e carboxipeptidase, respectivamente de acordo com o local de ação (RAWLINGS *et al.*, 2018).

As aminopeptidases atuam no N-terminal liberando após a hidrólise um resíduo de aminoácido (aminopeptidase), um dipeptídeo (aminodipeptidase), ou um tripeptídeo (aminotripeptidase). Já as carboxipeptidases agem no C-terminal e liberam após a hidrólise um único resíduo de aminoácido (carboxipeptidase) ou um dipeptídeo (carboxidipeptidase) (Figura 3), podendo ainda serem classificadas de acordo com o resíduo presente no sítio ativo da enzima sendo divididas em serina-carboxipeptidases, metalo-carboxipeptidase e cisteíno-carboxipeptidase (NELSON; COX, 2018; RAWLINGS *et al*., 2018).

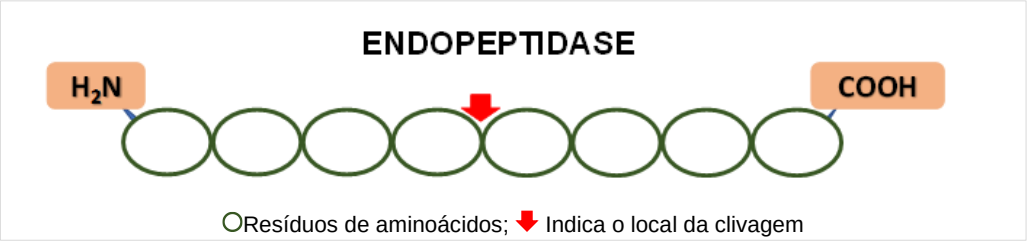
Figura 3 – Regiões de clivagem dos substratos pelas exopeptidases



Fonte: Adaptado de Mahajan & Badgujar (2010)

As endopeptidases são as proteases que atuam clivando as ligações peptídicas nas regiões internas da cadeia do polipeptídeo, afastadas das extremidades terminais (Figura 4), essas são divididas em subgrupos de acordo com seu mecanismo (NELSON; COX, 2018; RAWLINGS *et al*., 2018). Ainda nos subgrupos de endopeptidases temos as oligopeptidases que se encaixam nessa classificação, e agem sobre a clivagem de pequenos substratos menores que proteínas (RAWLINGS *et al.*, 2018).

Figura 4 – Regiões de clivagem dos substratos pelas endopeptidases



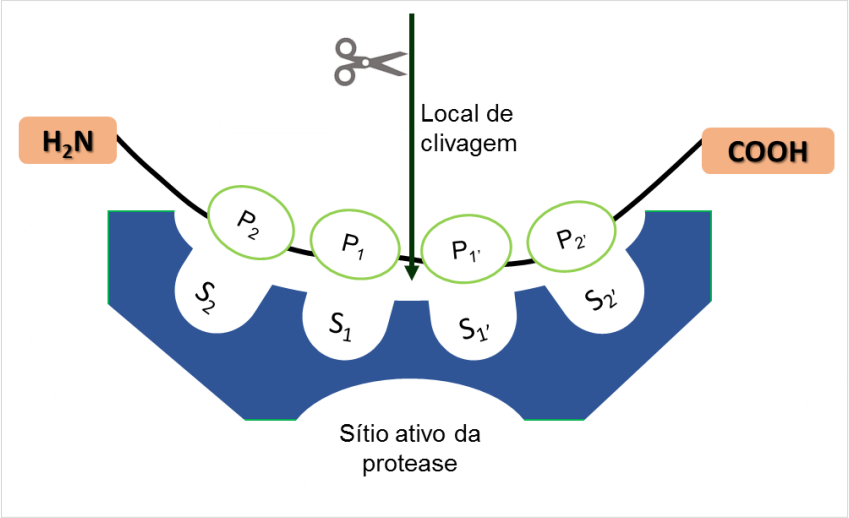
Fonte: Adaptado de Mahajan & Badgujar (2010)

Observando-se a necessidade de classificar as proteases de uma forma mais detalhada, Rawlings e Barrett (1993) criaram um sistema para classificação dessas enzimas em famílias e clãs de acordo com sua atividade catalítica (RAWLINGS *et al.*, 2018).

O sítio ativo ou sítio catalítico da protease é o local na estrutura tridimensional da proteína, área que o substrato se ligará para que ocorra a hidrólise. Essa região pode ser dividida em diferentes sub-sítios com alto grau de especificidade para resíduos de aminoácidos presentes nos substratos que se encontram em posições diferentes. Foi proposto por Schechter; Berger (1967) uma nomenclatura afim de classificar os sub-sítios das proteases de acordo com o local de clivagem e das extremidades separadas, sendo assim denotou-se P (de peptídeo) para os resíduos de aminoácidos do substrato e S para o sub-sítio do sítio catalítico da protease (HOOPER, 2002).

A numeração é determinada de dentro para fora, os aminoácidos hidrolisados a partir do sítio catalítico em direção ao N-terminal são denominados como P_1, P_2, P_3 etc., e os sub-sítios que interagem com esses resíduos de aminoácidos são nomeados como S_1, S_2, S_3 etc. Já os aminoácidos hidrolisados a partir do sítio catalítico em direção ao C-terminal são denominados como P_1', P_2', P_3' etc., e os sub-sítios que interagem com esses resíduos de aminoácidos são nomeados como S_1', S_2', S_3', etc (Figura 5) (CHAKRABARTY *et al.*, 2019; HOOPER, 2002; SCHECHTER; BERGER, 1967).

Figura 5 – Representação da interação dos sub-sítios de uma protease com os aminoácidos do seu substrato



Fonte: Adaptado de Schechter e Berger (1967)

A hidrolise da ligação peptídica ocorre entre P_1 e P_1', e essa pode ser denominada como ligação cindível. Para que ocorra a hidrólise da ligação peptídica é necessário que o sub-sítio tenha interação com substrato, entretanto esses sub-sítios interagem de formas diferentes com os aminoácidos do substrato, fazendo assim com que tenham uma particularidade para realizar a clivagem (HOOPER, 2002).

De acordo com o banco de dados MEROPS, as proteases são classificadas através do resíduo presente no sítio catalítico que realiza o ataque nucleofílico, responsável pela primeira parte da reação de proteólise. Com base nisso, existem diversas classes de proteases: cisteíno-proteases, serino-proteases, treonil-proteases, aspartil-proteases, metalo-proteases, glutamato-proteases, entre outras que possuem o sítio catalítico desconhecido e ou que possui mais de um sítio (CHAKRABARTY *et al.*, 2019; RAWLINGS *et al.*, 2018). Este trabalho terá como foco principal o grupo das císteino-proteases, pois as metacaspases são pertencentes a essa classe das proteases.

1.5.1 Classificação das proteases

Proteases que possuem sequências de aminoácidos conservadas entre si apresentam semelhanças em suas "unidades funcionais" que é o local responsável pela atividade enzimática, sendo assim, são consideradas da mesma família

evolucionária (RAWLINGS *et al.*, 2018). Quando contém dobras proteicas (estrutura terciária da proteína) conservadas em suas famílias, mantendo sua similaridade estrutural, são pertencentes ao mesmo clã (MININA *et al.*, 2017; RAWLINGS *et al.*, 2018).

As proteases também são classificadas com base no mecanismo catalítico, de acordo com os diferentes resíduos de aminoácidos presentes em seu sítio ativo, podendo ser classificados como sete classes principais: serino proteases, metalo proteases, cisteíno proteases, treonil proteases, aspartil proteases, glutamil proteases e proteases de mecanismo catalítico desconhecido (HOOPER, 2002; RAWLINGS *et al.*, 2018).

As serino proteases possuem um resíduo de serina envolvido diretamente no processo catalítico, as cisteíno proteases têm um resíduo de cisteína, as aspartil proteases dependem de dois resíduos de ácido aspártico para a catálise, as treonil proteases dependem de um resíduo de treonina, as glutamil proteases dependem de um resíduo de ácido glutâmico e as metalo proteases contêm um íon metálico no sítio ativo indispensável ao seu mecanismo catalítico (HOOPER, 2002; RAWLINGS *et al.*, 2018).

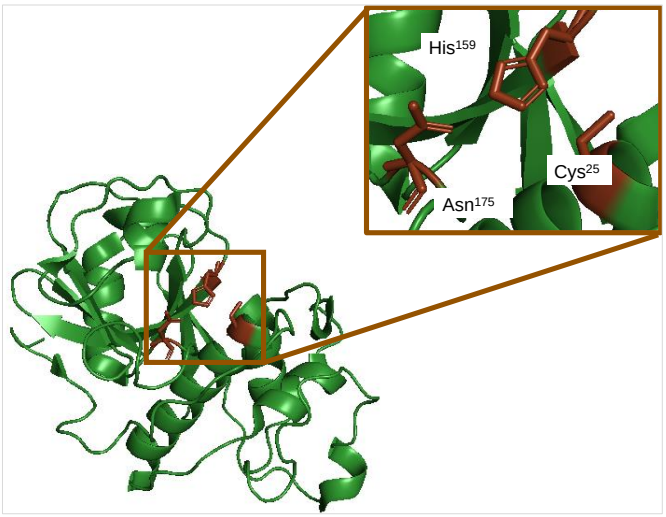
As serino, cisteíno e treonino proteases possuem aminoácidos fortemente nucleofílicos em seu sítio catalítico. O mecanismo de ação destas enzimas se dá a partir da catálise covalente que envolve a formação de um intermediário covalente entre a enzima e o substrato. Já na catálise das aspartil, glutamil e metalo proteases não ocorre o ataque nucleofílico por um grupo funcional da enzima, sendo o nucleófilo, nesse caso, uma molécula de água, não havendo portanto a formação de um intermediário covalente. Neste tipo de catalise, um resíduo de ácido aspártico ou glutâmico e/ou um íon metálico atuam como intermediários catalíticos (HOOPER, 2002; RAWLINGS *et al.*, 2018).

1.5.2 Cisteíno proteases

As cisteíno proteases são muito importantes para estudos na área farmacêutica, visando a descoberta de moléculas com potencial farmacológico, como para o tratamento de doenças antifúngicas, antiparasitárias e câncer. Essas enzimas são encontradas em todos os organismos vivos, tanto em eucariotos quanto em procariotos, sendo ainda evidenciadas em vários tipos de vírus (HOOPER, 2002).

A papaína foi a primeira císteino protease identificada, extraída da *Carica papaya* (mamão) e caracterizada em 1937 (VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016), após anos sua estrutura tridimensional foi elucidada por Drenth *et al*. (1971) e a partir disso foi possível observar os resíduos presentes no seu sítio ativo constituído por Cisteína-Histidina-Asparagina (Cys-His-Asn) e que juntos formam uma tríade catalítica (Figura 6).

Figura 6 – Representação estrutural da papaína evidenciando os resíduos do seu sítio ativo (em marrom) constituído por Cys^{25}, His^{159} e Asn^{175}



Fonte: Adaptado de Verma, Dixit e Pandey (2016)

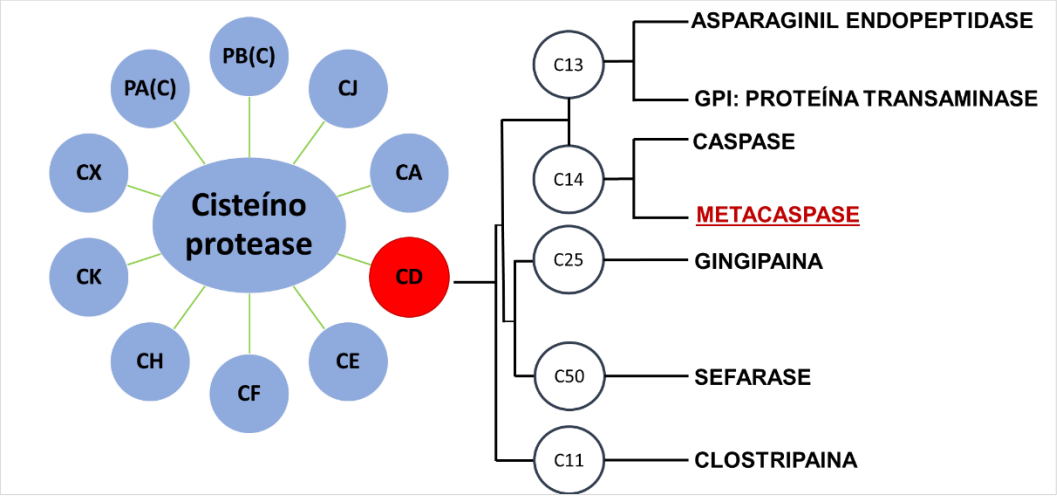
A papaína serviu como modelo para estudo bioquímicos e moleculares da classe das cisteíno-proteases, sendo a enzima mais conhecida dentre todas (VERMA, DIXIT; PANDEY, 2016). A atividade de todas as cisteíno proteases é dependente de uma díade catalítica formada por histidina e cisteína (His-Cys), a variação da presença ou ausência de um terceiro aminoácido conflita para auxiliar no direcionamento e estabilização do anel imidazólico da histidina no momento da hidrólise, resultando assim na formação de uma tríade catalítica como demonstrado no exemplo pela presença do resíduo de asparagina no sítio ativo da papaína (OTTO; SCHIRMEISTER, 1997).

A reação de hidrólise é mediada por um ataque nucleofílico realizado pela cisteína catalítica na carbonila da ligação peptídica do substrato. O anel imidazólico do resíduo de histidina é importante nesse ataque, pois atua aumentando a nucleofilicidade do resíduo de cisteína através da doação de prótons. É formado o primeiro intermediário tetraédrico tioéster após o ataque nucleofílico da cisteína ao

carbono reativo, liberando como fragmento o N-terminal do substrato, a estabilização desse intermediário é feita por ligações de hidrogênio entre o substrato e um resíduo de glutamina altamente conservado. Após estabilização a ligação tioéster é hidrolisada para a liberação de um ácido carboxílico a partir do substrato restante (DE CASTRO *et al.*, 2011; OTTO; SCHIRMEISTER, 1997; VERMA; DIXIT; PANDEY, 2016).

Com base na classificação atual do banco de dados MEROPS existem mais de 10 clãs na classe das císteino-proteases que são divididos com base na estrutura terciária das famílias que os compõem, e mais de 50 famílias divididas entre esses, classificadas com base na sua similaridade estrutural (Figura 7) (RAWLINGS *et al.*, 2018).

Figura 7 – Classificação das císteino-proteases em famílias e clãs



Fonte: Adaptado de Mottram, Coombs e Alexander (2004)

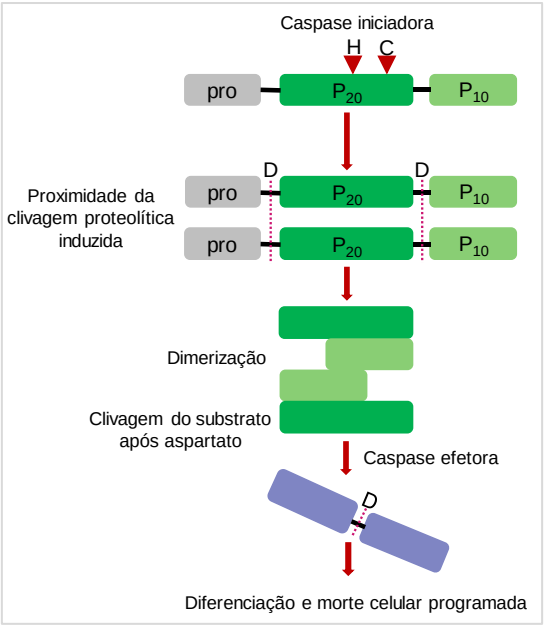
A família C14 do clã CD das cisteíno proteases reúne um determinado grupo de enzimas de grande interesse por sua relação na morte celular programada, as caspases, metacaspases e paracaspases (MININA *et al.*, 2017). O clã CD envolve as proteases dependente de cisteína com uma única dobra nas folhas α e β, que consiste em uma subunidade grande (P_{20}) contendo a díade catalítica de Histidina/Cisteína (His/Cys) e a subunidade pequena (P_{10}). As proteases da família C14, como as metacaspases, vem sendo estudadas intensamente por sua relação no controle de funções celulares como o ciclo celular e o controle de envelhecimento (MININA *et al.*, 2017; TSIATSIANI *et al.*, 2011).

1.6 METACASPASES

Uma cisteíno-protease com similaridade estrutural as 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 (UREN *et al.*, 2000).

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 P_{20} (grande) e P_{10} (pequena), e para se tornarem enzimaticamente ativas necessitam passar por uma clivagem proteolítica após dois resíduos de ácido aspártico (D), ocorrendo assim a dimerização das duas unidades tanto P_{20} quanto P_{10}, resultando na caspase efetora (Figura 8) (HILL; NYSTRÖM, 2015; UREN *et al*., 2000).

Figura 8 – Mecanismo de ativação proposto para as caspases (D: resíduo de ácido aspártico / Pro: prodomínio / H e C: díade catalítica His-Cys localizada na subunidade P_{20})

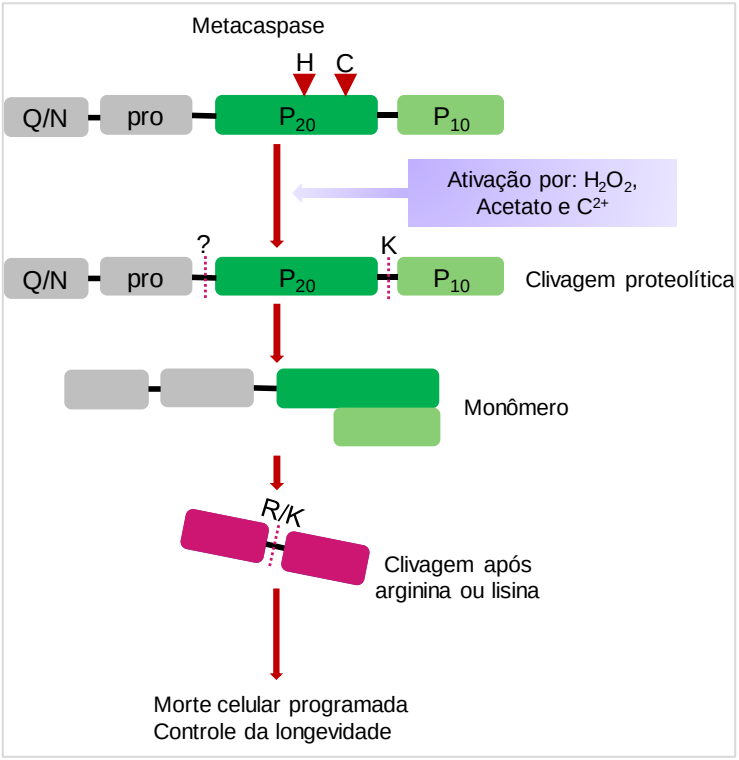


Fonte: Adaptado de Hill e Nyström (2015)

As metacaspases diferentemente das caspases podem ter a presença ou não de um pró-domínio rico em prolina e de uma região rica em glutamina e/ ou asparagina (Q/N), e não necessitam passar pelo processo de dimerização para estarem ativas, pois agem como monômeros. Entretanto, necessitam da presença do íon cálcio que

possui papel de cofator para o desempenho de sua atividade (HILL; NYSTRÖM, 2015; VERCAMMEN *et al*., 2004). Diferente das caspases que clivam seu substrato após um resíduo de ácido aspártico, as metacaspases clivam seus substratos após resíduos básicos de arginina (R) e/ou lisina (K) como demonstrado na Figura 9 (MACHADO *et al.*, 2013; VERCAMMEN *et al.*, 2004).

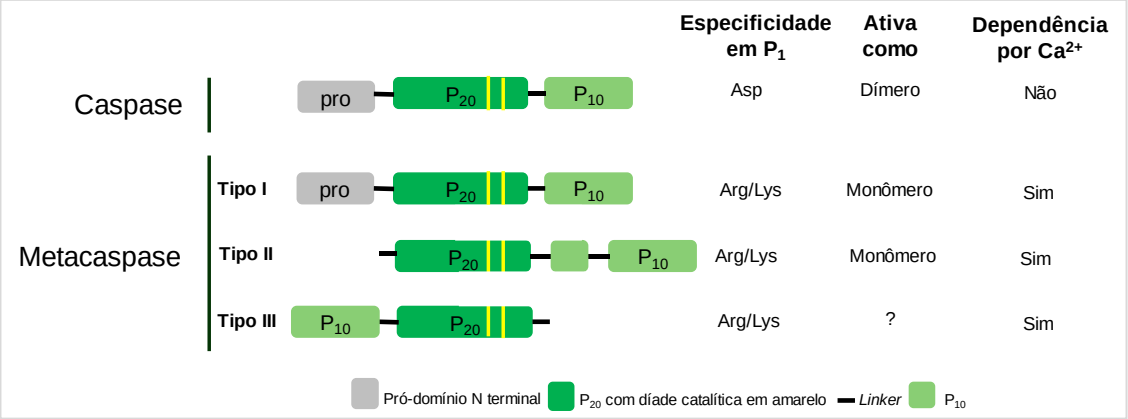
Figura 9 – Mecanismo de ativação proposto para as metacaspases – todos os três tipos de metacaspase são compostas pelas subunidades P_{20} onde está localizada a díade catalítica His-Cys (H e C) e P_{10}, possuem uma região rica em glutamina e asparagina (Q/N), a metacaspase I possuem a presença de um pró-domínio (pro)



Fonte: Adaptado de Hill e Nyström (2015)

Dentre as metacaspases temos uma subdivisão em tipos baseada nas diferenças estruturais. A metacaspase tipo I contém um pro-domínio N-terminal rico em prolina, a metacaspase tipo II não possui pró-domínio porém possui um domínio vinculador com vários resíduos de aminoácidos que separam a subunidade P_{20} catalítica e P_{10} reguladora, já a metacaspase tipo III sofre um rearranjo diferente, a subunidade P_{10} antecede a subunidade P_{20} encontrando-se localizada no N-terminal (KLEMENČIČ; FUNK, 2018; MININA *et al*., 2017, 2020). A diferença entre as caspases e os diferentes tipos de metacaspases é demonstrado na Figura 10.

Figura 10 – Comparação das caspases e metacaspases – composição dos domínios e características bioquímicas



Fonte: Adaptado de Klemenčič & Funk (2019)

A nomenclatura das metacaspases pode ser estabelecida com base no tipo, no organismo ao qual pertencem, e na identificação específica dentro desse organismo. A designação segue um padrão que inclui as iniciais do nome do organismo, seguidas pela sigla MCA (indicando metacaspase), um algarismo romano representando o tipo, e uma letra minúscula para diferenciar isoformas dentro do mesmo grupo. Por exemplo, a metacaspase 1 do tipo I de *Arabidopsis thaliana* é referida como AtMCA-Ia, em que “At” corresponde às iniciais do organismo, “MCA” à identificação como metacaspase, “I” ao tipo e “a” à especificação da isoforma correspondente à metacaspase 1 (MININA *et al.*, 2020).

O estresse celular leva a sinais de morte que induzem a ativação da metacaspase e resultam no seu autoprocessamento (TSIATSIANI *et al.*, 2011). Esse autoprocessamento pode ocorrer também quando há interação do cálcio com a metacaspase, porém esse não é um pré-requisito para sua atividade enzimática (MOSS *et al*., 2007). 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, e que essa é influenciada pelos níveis de cálcio circulantes (MACHADO *et al.*, 2013). Foi demonstrando ainda em estudos utilizando a metacaspase-2 de *Trypanosoma brucei* (TbMCA-Ib) que a etapa de autoprocessamento é essencial para a realocação do N-terminal afim de expor os resíduos do sítio catalitico e permitir assim a ação da enzima sob substratos proteicos grandes e não apenas em oligopeptídeos (GILIO *et al.*, 2017).

Recentemente, as estruturas tridimensionais das metacaspases de *Trypanosoma brucei* (TbMCA-Ib) e de *Saccharomyces cerevisiae* (ScMCA-Ia) foram solucionadas (MCLUSKEY *et al*., 2012; WONG; YAN; SHI, 2012), e ambas as estruturas apresentam características similares às encontradas nas caspases, porém ambas proteases são ativas em suas formas monoméricas. A análise do estudo cristalográfico para resolver a estrutura da TbMCA-Ib, revelou que esta peptidase apresenta uma porção N-terminal que forma um "*loop*". Estudos mais detalhados mostraram que esta região pode estar envolvida no acesso do substrato ao centro ativo e que a movimentação deste "*loop*" é dependente da ligação de íons cálcio, e que, portanto, é responsável por regular a entrada do substrato no sítio ativo. Por fim, a estrutura da TbMCA-Ib é muito similar a estrutura das caspases, apesar de não formar dímeros para tornar-se ativa, isso sugere que ambas surgiram de um mesmo ancestral.

Estudos de especificidade baseado em uma biblioteca de peptídeos FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) derivados da sequência ‑KARSSAQ‑ permitiram observar que a TbMCA-Ib possui uma preferência por resíduos básicos na porção não linha nas posições P1, P2 e P3. Por outro lado, a protease apresenta preferência por resíduos apolares na porção linha nas posições P1´, P2´ e P3´ (MACHADO *et al.*, 2013). Além disso, verificamos que o íon cálcio é essencial para a ativação da TbMCA-Ib e é capaz de interferir na seletividade de aminoácidos presentes na posição P2 do substrato. Estudos preliminares de nosso grupo mostram que o autoprocessamento da TbMCA-Ib estimulado por Ca^{2+} leva ao reposicionamento do *loop* e consequentemente modificação estrutural da proteína. Dessa forma, a nova reestruturação molecular assumida pela TbMCA-Ib favorece a clivagem de proteínas inteiras atuando como uma tripsina-símile.

Somando-se a isso, a reestruturação acarreta modificações nas condições experimentais comparativamente à protease não processada, inclusive alterando grupos ionizáveis envolvidos na catalise de substratos pela TbMCA-Ib (GILIO *et al*., 2017). Essas informações sugerem que a protease desempenha dois papéis distintos, inicialmente na forma não processada atuando como uma oligopeptidase-símile possivelmente envolvida no controle do ciclo celular do *T. brucei* e na forma autoprocessada com reposicionamento do N-terminal passando a atuar como uma

tripsina-símile exercendo a função de degradação proteica durante a morte celular programada.

A metacaspase de *Plasmodium falciparum* (PfMCA-Ia) possui algumas características similares as caspases humanas, ela se autoprocessa e apresenta um domínio de recrutamento conhecido como CARD (domínios de recrutamento de caspase), em sua porção amino-terminal (MESLIN *et al.*, 2007, 2011a). Por outro lado, a metacaspase de *Plasmodium berghei* (PbMCA-Ia) é expressa em gametófitos femininos em estágios pre-eritrociticos e está relacionada com a virulência deste parasita (LE CHAT; SINDEN; DESSENS, 2007).

Até o momento, foram descritas três metacaspases em *Leishmania* spp., a metacaspase de *L. major* (LmMCA-Ia) e as metacaspases de *L. donovani* (LdMCA-Ia e LdMCA-Ib). As metacaspases de *L. donovani* (LdMCA-Ia e LdMCA-Ib) são expressas em ambas as formas do parasita (promastigotas e amastigotas), no entanto, apresentam níveis mais elevados de expressão e atividade catalítica na forma de amastigota, que corresponde ao estágio infectante do parasita. Esse perfil de expressão sugere um papel mais relevante das metacaspases na adaptação e sobrevivência do parasita durante a infecção. (LEE *et al*., 2007).

1.6.1 Metacaspase de *Leishmania major*

O protozoário *Leishmania major* codifica uma única metacaspase, a LmMCA-Ia, classificada como uma metacaspase do tipo I e envolvida em processos cruciais para a sobrevivência do parasita. González *et al*. (2007) utilizaram um modelo de *Saccharomyces cerevisiae* nocaute para a metacaspase (*Δyca1*) para expressar a LmMCA-Ia e induziram a morte celular por estresse oxidativo. Os resultados demonstraram que a LmMCA-Ia participa de um processo de morte celular semelhante ao mediado pela metacaspase de *S. cerevisiae* (ScMCA-Ia), sendo essa função dependente de sua atividade catalítica e de seu autoprocessamento, um mecanismo análogo ao observado nas caspases. No entanto, sua especificidade enzimática assemelha-se à metacaspase de *Arabidopsis thaliana*, apresentando preferência por resíduos de arginina na posição P1 do substrato.

Ambit *et al*. (2008) observaram que a LmMCA-Ia é mais expressa na forma promastigota metacíclica, fase caracterizada por intensa divisão celular, sugerindo uma função essencial nesse estágio do ciclo de vida. Além disso, a superexpressão

da LmMCA-Ia resultou em um comprometimento severo da divisão celular, afetando diretamente a progressão do ciclo celular. A obtenção de mutantes nocaute para *LmMCA-Ia* em *L. major* não foi possível, sendo viáveis apenas as células nas quais o gene foi reintroduzido e expresso em níveis fisiológicos. Esses achados indicam que tanto a expressão quanto a atividade da LmMCA-Ia são altamente reguladas e desempenham um papel crucial na adaptação e sobrevivência do parasita.

Zalila *et al*. (2011) corroboraram os achados de González *et al*. (2007), monstrando que a LmMCA-Ia apresenta atividade relacionada à MCR e que essa função é dependente de seu autoprocessamento, desta vez por meio de estudos conduzidos diretamente em células de *L. major*.

As metacaspases de protozoários têm sido recentemente alvo de muitos estudos, e o simples fato das metacaspases não estarem presentes em humanos e desempenharem funções importantes nas tripanossomíases humanas, tornam as metacaspases atrativas para possíveis alvos de drogas (AMBIT *et al.*, 2008; BERG *et al.*, 2010; GONZÁLEZ *et al.*, 2007; MESLIN *et al.*, 2011b; ZALILA *et al.*, 2011)

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção da metacaspase recombinante de *Leishmania major* (LmMCA-Ia).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Neste trabalho propomos obter metacaspase de *L.major* de forma recombinante. Para isso foi necessário:

- Realizar a amplificação do gene da LmMCA-Ia contendo inserções para clonagem pela metodologia TEDA (T5 *exonuclease dependent assembly)*;
- Submeter o produto da amplificação a reação com a enzima T5 exonuclease e clonar em células de *Escherichia coli* DH5α;
- Extrair o DNA mutado e transformar em células de *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS;
- Expressar, purificar as proteínas obtidas e confirmar por *western blotting*;

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 IDENTIFICAÇÃO E OBTENÇÃO DO GENE

A sequência do gene codificante da metacaspase de *Leishmania major* foi obtida através do banco de dados genômico *GeneBank*, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sob o código de acesso FJ169621.1 (Figura 11). O gene posteriormente foi sintetizado pela *Thermo Fisher Scientific,* com otimização de códons para melhor expressão em *Escherichia coli* (Figura 12).

Figura 11 - Sequência completa do gene codificador da metacaspase de *Leishmania major* (LmMCA-Ia)

5` ATGGCAGACCTTTTTGATATTTGGGGGATAGGGGCCGTCGCCAGTCTGATCCCGATGCTCGCGAACG
GTCTTCTTTTGGTTGACCGGCCCAAACGGGTCGACATTAATGCCGGAAGGCGGCTCATTCACACAGTGCG
GCCCATCATTCCTTACCGTGCCCCGGTGCCGTACACCGGCGGCCGTGTCCGTGCGCTTTTCATCGGAATC
AACTACACGGGTATGCGCAACGCACTGCGTGGCTGCGTCAACGATGTTAGCTCGATGCTGGGCACGCTGC
AGCAGATCTCCTTCCCGATTAGCGAGTGCTGCATCCTCGTCGACGACCCGTCGTTCCCCGGCTTCTGCGG
CATGCCCACCCGCGACAACATCATCAAGCACATGCTGTGGCTGACCGGCGACGTACGCCCCGGTGATGTG
CTTTTTTTCCACTTCTCCGGCCACGGCGGACAAGCCAAGGCAACCCGAGACTCGGAAGAGAAGTACGACC
AGTGTCTCATCCCACTCGACCACGTGAAGAACGGCAGCATTCTCGACGATGATCTCTTCCTCATGCTCGT
AGCCCCGCTGCCGTCTGGGGTGCGCATGACGTGCGTCTTTGACTGCTGTCACTCAGCCAGCATGCTGGAT
CTGCCCTTCAGCTACGTGGCACCGAGAGTAGGCGGCGGCGGGGCATGCGAGTACATGCAACAGGTACGCC
GCGGCAACTTCTCGAACGGCGACGTTGTCATGTTCAGCGGGTGCACGGATAGAGGCACCAGCGCAGATGT
GCAGAACGGCGGCCACGCAAACGGTGCCGCCACTCTCGCCTTCACGTGGTCTCTTCTGAACACGCATGGG
CTCTCCTACCTTAATATCCTTCTCAAGACACGAGAGGAGCTGCGCAAAAAAGGTCGGGTGCAGGTGCCGC
AGCTCACCAGCTCGAAGCCGATCGATCTGTACAAGCCCTTCTCCCTCTTCGGCATGATTACGGTAAACGC
GTCCATGATGCATTGCGTGCCGCAGCAGTACCAGCAACGTCCGCAGAGCCTCCCGCCGCAGGTGATGCCG
CCTGCAACGGGTTACCCAGTCCACGTACCGCCGCCGCCGCAAGGCTACTACCCTCCACCACAGAGTCCAG
GTTGGGGACTTGGCTACCCGGTGCAAGGGATACCGGTGCAGCAGGCAACTCTTGGCGTGTCGCGGTGTCC
TCCATCGCAGTACTTACCTGCGCCTCCGCCAGCAGTGTATGCGCCACCTCCACCCGGGCAGCGCGGGCCA
CCGCAGCCCCCTCCAGCCCAGTACACGTTCAGCCCACTCCCGCCTGGCTAA 3`

Figura 12 – Sequência do gene sintetizado pela *Thermo Fisher Scientific*

5`ATGGCAGACCTGTTTGATATTTGGGGTATTGGTGCAGTTGCAAGCCTGATTCCGATGCTGGCAAATGGT
CTGCTGCTGGTTGATCGTCCGAAACGTGTTGATATTAATGCAGGTCGTCGTCTGATTCATACCGTTCGTCC
GATTATTCCGTATCGTGCACCGGTTCCGTATACCGGTGGTCGTGTTCGTGCACTGTTTATTGGTATTAACT
ATACCGGCATGCGTAATGCACTGCGTGGTTGTGTTAATGATGTTAGCAGTATGCTGGGCACCCTGCAGCAG
ATTAGCTTTCCGATTAGCGAATGTTGTATTCTGGTTGATGATCCGAGCTTTCCGGGTTTTTGTGGTATGCC
GACACGTGATAATATCATCAAACACATGCTGTGGCTGACCGGTGATGTTCGTCCGGGTGATGTGCTGTTTT
TCCATTTTAGCGGTCATGGTGGTCAGGCAAAAGCAACCCGTGATAGCGAAGAAAAATATGATCAGTGTCTG
ATTCCGCTGGATCATGTTAAAAATGGTAGCATCCTGGATGATGACCTGTTTCTGATGCTGGTAGCACCGCT
GCCGAGCGGTGTTCGTATGACCTGTGTTTTTGATTGTTGTCATAGCGCAAGCATGCTGGATCTGCCGTTTA
GCTATGTTGCACCGCGTGTTGGTGGTGGTGGCGCATGTGAATACATGCAGCAGGTTCGTCGTGGTAATTTT
TCAAATGGTGATGTGGTTATGTTTAGCGGTTGTACCGATCGTGGCACCAGCGCAGATGTTCAGAATGGTGG
CCATGCAAATGGTGCAGCAACCCTGGCATTTACCTGGTCACTGCTGAATACCCATGGTCTGAGCTATCTGA
ATATTCTGCTGAAAACCCGTGAAGAACTGCGTAAAAAGGGTCGTGTGCAGGTTCCGCAGCTGACCAGCAGT
AAACCGATTGATCTGTATAAACCGTTTAGCCTGTTTGGCATGATTACCGTTAATGCAAGCATGATGCATTG
TGTGCCGCAGCAGTATCAGCAGCGTCCGCAGAGCCTGCCTCCGCAGGTTATGCCTCCGGCAACCGGTTATC
CGGTTCATGTTCCGCCTCCGCCTCAGGGTTATTATCCGCCACCGCAGAGTCCTGGTTGGGGTCTGGGCTAT
CCGGTGCAGGGTATTCCGGTTCAGCAGGCGACCCTGGGTGTTAGCCGTTGTCCGCCTAGCCAGTATCTGCC
TGCACCGCCACCGGCAGTTTATGCACCGCCTCCTCCGGGTCAGCGTGGTCCTCCTCAACCTCCGCCTGCAC
AGTATACCTTTAGTCCGCTGCCTCCGGGTTAA3`

O gene sintético foi clonado no vetor pMA-RQ (AmpR), que confere resistência à ampicilina aos clones transformados O DNA plasmidial foi extraído a partir dos clones recombinantes e quantificado por espectrofotometria UV-Vis. Esse DNA foi então utilizado como molde para a amplificação do inserto, visando sua subsequente clonagem no vetor de expressão pET-28a(+).

3.2 SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS*

Foram projetados *primers* específicos para amplificar tanto a sequência completa do gene quanto uma variante truncada, na qual os últimos 321 pares de bases, correspondentes aos 106 aminoácidos da região C-terminal, foram deletados. Além disso, os *primers* contêm sequências complementares ao vetor pET-28a(+), facilitando a montagem do plasmídeo recombinante (Tabela 1). A síntese dos *primers* foi realizada pela *Thermo Fisher Scientific*.

Tabela 1 - Sequências dos *primers* empregados na amplificação do gene. As regiões destacadas em amarelo correspondem às complementares ao vetor pET28(a), enquanto as marcadas em vermelho indicam as regiões específicas do gene.

Primer forward	5' CTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGCAGACCTGTTTGATATTTGGG 3'
Primer reverse	5' GTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTAACCCGGAGGCAGCGGACTAAAG 3'
Primer reverse – C-term	5' GTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTTACATCATGCTTGCATTAACGGTAATC 3'
Primer reverse C-term S/Stop	5' GTGGTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGCATCATGCTTGCATTAACGGTAATC 3'

Os *primers* utilizados para a amplificação do vetor (Tabela 2) foram projetados para promover sua linearização, a remoção do múltiplo sítio de clonagem (MCS) e a geração de extremidades compatíveis para a subsequente montagem com o gene de interesse.

Tabela 2 – Sequência dos *primers* utilizados na amplificação do vetor pET28(a).

pET-28a(+) *forward*	5' CTCGAGCACCACCACCACCACCACT 3'
pET-28a(+) *reverse*	5' CATATGGCTGCCGCGCGGCAC 3'

3.3 AMPLIFICAÇAO DO GENE E DO VETOR

A amplificação do gene foi realizada por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando o termociclador *SimpliAmp*™ (*Applied Biosystems*). As condições da reação incluíram uma temperatura de desnaturação de 98 ºC e de extensão de 72 ºC, com temperaturas específicas de anelamento ajustadas para os *primers* empregados. O protocolo consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 98 ºC por 5 minutos, seguida de 35 ciclos compostos por 30 segundos de desnaturação, 45 segundos de anelamento dos *primers* e 1 minuto de extensão, finalizando com uma etapa de extensão a 72 ºC por 10 minutos.

Inicialmente, foi realizada uma triagem de temperaturas de anelamento para determinar a condição ideal, garantindo a especificidade e eficiência da amplificação. Para esse ensaio, foi utilizada a enzima HS *Taq* DNA *Polymerase* (Sinapse), e a reação foi conduzida com 1 ng de DNA molde, 0,2 μM de cada primer, 0,2 μM de dNTPs, 0,04 U de *Taq* DNA Polymerase, PCR Buffer 1× (Tris-HCl 10 mM, pH 8,8; KCl 50 mM; Triton-X-100 0,1%; $MgCl_2$ 1,6 mM) e água ultrapura, totalizando 25 μL de volume reacional. As temperaturas de anelamento testadas variaram entre 60 ºC e 70 ºC (60 ºC, 61,8 ºC, 63,6 ºC, 66,4 ºC, 68,2 ºC e 70 ºC).

Após a determinação da temperatura de anelamento ideal, a amplificação foi realizada utilizando a enzima *VeriFi® Polymerase* (*PCR BIOSYSTEMS*). A reação continha *VeriFi® Mix* 1× (*VeriFi™ Polymerase*, $MgCl_2$ 3 mM e dNTPs 1 mM), 1 ng de DNA molde, 0,2 μM de cada *primer* (*forward e reverse*) e água ultrapura, ajustando o volume final para 25 μL.

A amplificação do vetor foi conduzida de maneira similar, utilizando 2,5 ng de DNA molde e um protocolo de *two-step* PCR, no qual a temperatura de anelamento coincide com a de extensão. O ciclo térmico incluiu uma etapa inicial de desnaturação a 98 ºC por 5 minutos, seguida de 35 ciclos compostos por 30 segundos de desnaturação a 98 ºC e 2 minutos de anelamento/extensão a 72 ºC, finalizando com uma etapa de extensão a 72 ºC por 10 minutos.

Após a amplificação do vetor, o produto foi tratado com a enzima de restrição DpnI para a remoção do DNA plasmidial metilado proveniente da bactéria hospedeira. A digestão foi realizada em uma reação contendo *Tango Buffer*™ 1× (Tris-acetato 33 mM, pH 7,9; $Mg(C_2H_3O_2)_2$ 10 mM; $C_2H_3KO_2$ 66 mM; BSA 0,1 mg/mL) (*Thermo Fisher Scientific*), 1 U de DpnI (*Thermo Fisher Scientific*) e 1 μg/μL de DNA, incubada a 37 ºC por 3 horas, seguida de inativação enzimática a 80 ºC.

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 μg/mL), utilizando uma cuba eletroforética horizontal com tampão TAE (Tris 40 mM; ácido acético glacial 20 mM; EDTA 1 mM; pH 8,3). A corrida eletroforética foi realizada sob tensão de 75 V por 45 minutos, com *1 kb Ladder* (Sinapse) como marcador molecular. A visualização dos fragmentos foi realizada no fotodocumentador *ChemiDoc™ MP Imaging System* (*Bio-Rad*), e as imagens foram adquiridas e processadas pelo *programa ImageLab* v.4.0 (*Bio-Rad*).

Após a confirmação da amplificação, os produtos foram submetidos à purificação utilizando o *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega*), conforme as instruções do fabricante. A eficiência da purificação foi avaliada por eletroforese, e a quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria no *NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific*).

3.4 MONTAGEM DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE

A construção do plasmídeo recombinante foi realizada utilizando a metodologia T5 *Exonuclease Dependent Assembly* (TEDA), conforme descrito por Xia *et al*., (2019). Esse método baseia-se na geração de extremidades coesivas 3’ tanto no gene de interesse quanto no vetor, por meio da ação da enzima *T5* exonuclease,

que cliva seletivamente as extremidades 5’. A posterior recombinação e reparo ocorrem *in vivo*.

A reação de montagem foi preparada utilizando 4 μL de um tampão contendo 0,5 M de Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM de $MgCl_2$, 50 mM de DTT, 0,25 g de PEG 8000 e 0,01 U de *T5* exonuclease (*New England Biolabs*). A esse tampão, foram adicionados 16 μL de uma mistura contendo 100 ng do vetor linearizado e uma quantidade de inserto suficiente para alcançar uma proporção molar vetor:inserto de 1:4.

A reação foi incubada a 30 ºC por 40 minutos, otimizando a atividade da *T5* exonuclease. Em seguida, a reação foi interrompida por incubação em gelo por 10 minutos, garantindo a estabilização das moléculas recombinantes antes da etapa de transformação.

3.5 PREPARO DAS BACTÉRIAS *E. coli* DH5A E BL21 (DE3) PLYSS COMPETENTES PARA TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

Foram empregadas duas linhagens de bactérias hospedeiras: *E. coli* DH5α e *E. coli* BL21 (DE3) plysS. Uma colônia isolada de cada linhagem foi inoculada em tubos cônicos de 50 mL contendo 10 mL de meio Luria Broth (LB), composto por 1% de bacto triptona (p/v), 0,5% de extrato de levedura (p/v) e 170 mM de NaCl. As culturas foram incubadas a 37°C com agitação de 200 RPM por 18 horas. No dia seguinte, o pré-inóculo foi transferido para dois erlenmeyers de 600 mL, cada um contendo 150 mL de meio LB estéril, nas seguintes proporções:

1º Utilizando 1,0 mL do pré-inóculo
2º Utilizando 2,0 mL do pré-inóculo

Os cultivos foram incubados em agitador orbital a 18 °C e 200 RPM por 18 horas. Após esse período, a densidade óptica a 600 nm (DO600) foi monitorada em espectrofotômetro (*FEMPTO*) até atingir valores entre 0,35 e 0,45, adequados para as etapas subsequentes.

As células foram incubadas em gelo por 1 hora e, em seguida, submetidas à centrifugação a 2000 × g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado celular foi ressuspenso em um terço do volume original (150 mL reduzidos

para 50 mL) utilizando solução FSB resfriada (KCl 0,1 M; $CaCl_2$ 15 mM; $C_2H_3KO_2$ 10 mM; $MnCl_2$ 45 mM; glicerol 10% (p/v); pH 6,2). Após nova incubação, a suspensão foi centrifugada novamente sob as mesmas condições, seguida pelo descarte do sobrenadante e ressuspensão do precipitado em 1/12,5 do volume original (150 mL reduzidos para 12 mL) em solução FSB gelada.

Posteriormente, foram adicionados 720 μL de dimetilsulfóxido (DMSO), e a mistura foi cuidadosamente homogeneizada. As células competentes foram então aliquotadas em volumes de 50 μL em tubos cônicos estéreis e armazenadas a -80 °C para uso futuro.

3.6 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* DH5A

Transferiram-se 7 μL da reação TEDA para 50 μL de células competentes de *E. coli* DH5α, as quais foram incubadas no gelo por 30 minutos. Seguiu-se um choque térmico de 90 segundos a 42ºC, após o qual a mistura foi novamente incubada no gelo por 2 minutos. Após essa etapa, adicionaram-se 800 μL de meio Luria Broth (LB) e a incubação prosseguiu por 1 hora e 30 minutos a 37ºC com agitação constante de 180 RPM. O material foi então centrifugado, concentrado e plaqueado em meio LB-agar contendo 50 μg/mL de canamicina, sendo incubado a 37ºC por 18 horas.

Para a seleção de colônias, foram escolhidas aleatoriamente algumas para a triagem por PCR, utilizando-se os *primers* T7 *promoter* e T7 *terminator*. Esse processo visou confirmar as colônias positivas, dado que o vetor pET-28a(+) contém essas regiões flanqueando o gene de interesse.

Tabela 3 – Sequência dos *primers* T7 utilizados para amplificação.

Primer T7 *forward*	5’ TAATACGACTCACTATAGGG 3’
Primer T7 *reverse*	5’ TAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3’

As condições do PCR consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 94 ºC por 10 minutos, seguida de 35 ciclos, cada um incluindo 30 segundos de desnaturação, 45 segundos de anelamento a 49 ºC e 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72 ºC. Uma extensão final foi realizada por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1% (p/v), e a visualização foi realizada utilizando o fotodocumentador *ChemiDoc™ MP Imaging*

System (*Bio-Rad*), com as imagens sendo capturadas por meio do programa *ImageLab* v.4.0 (*Bio-Rad*), conforme descrito anteriormente.

Após a confirmação dos clones positivos, procedeu-se à extração de DNA plasmidial por lise alcalina utilizando o *Kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification Systems* (*Promega*). As amostras com resultados positivos foram amplificadas utilizando os *primers* do promotor T7 e terminador T7 e, em seguida, encaminhadas para sequenciamento para confirmar a sequência do gene obtido. Isso garantiu que o plasmídeo recombinante estivesse íntegro e livre de mutações, evitando a expressão de uma proteína não desejada.

3.7 TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* BL21 (DE3) PLYSS COM O PRODUTO DA LISE ALCALINA

O DNA recombinante extraído após a lise alcalina foi então transformado por choque térmico em células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. Para isso, 50 ng do DNA recombinante foi transformado em 50 μL de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Em seguida, foi realizada uma nova reação de PCR para confirmação das colônias, utilizando os *primers* T7. A reação foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), conforme descrito anteriormente. Após a confirmação dos clones positivos, prosseguiu-se para os ensaios de expressão proteica.

3.8 EXPRESSÃO DA METACASPASE RECOMBINANTE DE *Leishmania major* EM SISTEMA HETERÓLOGO *E. coli* BL21 (DE3) PLYSS

A expressão proteica foi iniciada a partir de uma cultura celular de 10 mL, cultivada em meio Luria Broth (LB) contendo 50 μg/mL de canamicina e 1% de glicose, incubada a 37ºC com agitação constante por 16 horas. Em seguida, 2 mL dessa cultura foram transferidos para um erlenmeyer contendo 600 mL de meio LB, mantendo-se as condições iniciais. A densidade óptica foi monitorada até atingir valores entre 0,6 e 0,8.

As células foram então centrifugadas a 10.000 rpm, e o sedimento foi ressuspendido em outro erlenmeyer contendo 600 mL de meio LB com 50 μg/mL de

canamicina, mas sem glicose. Para induzir a expressão proteica, utilizou-se isopropil-β-D-tiogalactosidase (IPTG) (*Thermo Fisher Scientific*) na concentração de 0,25 mM, reduzindo-se a temperatura para 20ºC por 18 horas.

Adicionalmente, foram realizados ensaios de expressão sem a adição de glicose, variando o pH (7,0 e 5,5), a concentração de IPTG (0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM; 1 mM e 10 mM), o tempo de indução (1 hora) e a temperatura (37ºC).

3.9 CONFIRMAÇÃO DA EXPRESSÃO DA METACASPASE DE *Leishmania major* RECOMBINANTE ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada para análise da expressão proteica. As amostras foram preparadas em tampão de amostra (Tris-HCl 60 mM; SDS 2% (p/v); glicerol 6% (v/v); azul de bromofenol 10% (p/v); β-mercaptoetanol 3% (v/v); pH 6,8) e aquecidas a 100°C por 10 minutos em banho seco.

O gel de corrida foi preparado com 15% de acrilamida, utilizando placas de vidro com espaçadores de 1,5 mm. A solução de acrilamida 30% (30% acrilamida, 0,8% bis-acrilamida (p/v)) foi combinada com SDS 10% (p/v), TEMED 0,12%, persulfato de amônio 100 mg/mL (p/v) e tampão Tris-HCl 1 M (pH 8,8). O gel de empilhamento foi preparado com 4% de acrilamida, utilizando composição similar, mas com tampão Tris-HCl 1 M (pH 6,8).

A corrida eletroforética foi realizada em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM; glicina 192 mM; SDS 1%; pH 8,3) sob uma tensão de 100 V, empregando um marcador de peso molecular de 14,4 kDa a 116 kDa (*Thermo Fisher Scientific*). Após a eletroforese, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 (*Vetec*), e as imagens foram capturadas utilizando o fotodocumentador *ChemiDoc™ MP Imaging System* (*Bio-Rad*) e processadas no *programa ImageLab* v.4.0 (*Bio-Rad*).

3.10 LISE CELULAR

Para a análise dos resultados, as células foram centrifugadas a 10.000 rpm, o sobrenadante descartado, e o sedimento armazenado *overnight* a -20 ºC em tampão de lise (Tris 50 mM; NaCl 50 mM; glicerol 5% (v/v); Triton X-100 0,01%; pH 8,0).

Posteriormente, o material foi submetido à lise mecânica por sonicação, em 10 ciclos de 30 segundos a 60 Hz. Em seguida, realizou-se uma incubação com 2 mg/mL de lisozima (*Sigma*) por 1 hora a 4 ºC. Para a degradação de ácidos nucleicos, adicionaram-se 1 U/mL de DNAse e 1 mM de $MgCl_2$, com incubação por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Após esse processo, o material foi novamente centrifugado e o sobrenadante filtrado através de um filtro de 0,45 µm.

Os ensaios de lise também foram conduzidos sob diferentes condições experimentais, incluindo ciclos de choque térmico (-80 ºC a 25 ºC, 10 ciclos), ausência de lisozima e tampões com diferentes pHs (8,0 e 5,5).

3.11 PURIFICAÇÃO DA METACASPASE RECOMBINANTE DE *Leishmania major* COM DELEÇÃO DO C-TERMINAL

A purificação da proteína foi realizada por cromatografia de afinidade, um método que permite a separação de proteínas com base em sua afinidade por um ligante específico. O sobrenadante obtido durante a etapa de lise (descrita no item 3.10) foi injetado em uma coluna *HisTrap™ HP* (*GE Healthcare*) contendo resina Ni-NTA, previamente equilibrada com tampão de partida (Tris 50 mM; NaCl 150 mM; imidazol 20 mM; pH 7,4). A eluição foi realizada por etapas (*stepwise elution*) com tampões contendo concentrações crescentes de imidazol (50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM e 500 mM).

A purificação foi conduzida no sistema *AKTA-Start* (*GE Healthcare*) sob fluxo de 1 mL/min, e a eluição das proteínas foi monitorada por espectrofotometria a 280 nm. As frações eluidas foram coletadas em alíquotas de 1 mL. O grau de pureza das proteínas foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 15% (conforme descrito no item 3.9).

Além disso, ensaios de purificação foram realizados utilizando um tampão de partida alternativo (Na_2HPO_4 20 mM; NaCl 150 mM; imidazol 20 mM; pH 5,5), permitindo a avaliação das condições ideais para a obtenção da proteína de interesse.

3.12 *WESTERN BLOTTING*

Os ensaios de imunoblotting foram realizados utilizando amostras da expressão, o marcador molecular *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™* (*Bio-Rad*)

e o anticorpo *6x-His Tag Antibody* (*Thermo Fisher Scientific*). Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, o gel foi transferido para uma membrana de PVDF (*Bio-Rad*) por eletrotransferência, utilizando o sistema *Trans-Blot Turbo Transfer System* (*Bio-Rad*).

A membrana foi então lavada com solução bloqueadora de PBS (Na_2HPO_4 10 mM; NaCl 150 mM; 5% de albumina; 0,1% de Tween 20; pH 7,4) e mantida sob agitação constante por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foi incubada na mesma solução bloqueadora contendo o anticorpo 6x-His na concentração de 100 ng/mL, a 4ºC, sob agitação constante por 18 horas. Após a incubação, a membrana foi submetida a lavagens sucessivas com tampão de lavagem PBS (Na_2HPO_4 10 mM; NaCl 150 mM; 0,1% de Tween 20; pH 7,4) por 10 minutos.

A detecção da proteína foi realizada pelo método de quimioluminescência, utilizando o *Kit SuperSignal™ West Pico* (*Thermo Fisher Scientific*), com soluções contendo substrato *SuperSignal™ West Pico Stable Peroxide Solution* e solução reveladora *Luminol Enhancer Solution*, na proporção de 1:1. A membrana foi então analisada no fotodocumentador *ChemiDoc™ MP Imaging System* (*Bio-Rad*) e as imagens foram processadas pelo *programa ImageLab* v.4.0 (*Bio-Rad*).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 de *Candida albicans* (CaMCA-Ia) e de *Saccharomyces cerevisiae* (ScMCA-Ia), são sintetizadas como zimogênios inativos e são ativadas por auto processamento. No entanto as metacaspases tipo II de *Arabidopsis* possuem uma ativação semelhante às caspases efetoras de mamíferos (BOZHKOV *et al.*, 2005; VERCAMMEN *et al.*, 2004) diferente das do tipo I (AtMCA-Ia, AtMCA-Ib e AtMCA-Ic), que possuem ativação semelhante as caspases iniciadoras, possivelmente devido à presença do N-terminal (VERCAMMEN *et al.*, 2004).

Curiosamente, ao contrário de outras metacaspases descritas na literatura, que apresentam um domínio N-terminal altamente hidrofóbico (ERHARDT, WEGRZYN; DEUERLING, 2010; MOSS *et al*., 2007; WONG, YAN; SHI, 2012), as metacaspases do gênero *Leishmania spp*., incluindo a metacaspase de *Leishmania major* (LmMCA-Ia), possuem essa característica na região C-terminal. Essa particularidade as torna únicas, apesar das semelhanças estruturais com metacaspases de outros gêneros (GONZÁLEZ *et al*., 2007; LEE *et al*., 2007; RAWLINGS *et al*., 2018).

Esta porção rica em prolina e glutamina, devido às suas propriedades hidrofóbicas, favorece a formação de agregados proteicos e precipitação, dificultando a sua obtenção de forma recombinante e posterior caracterização bioquímica (ERHARDT; WEGRZYN; DEUERLING, 2010; WONG, YAN; SHI, 2012). Diante disto, adotamos uma estratégia para remover esta região e facilitar a obtenção da proteína de forma solúvel. Realizamos a deleção, através da reação em cadeia da polimerase (PCR), de 318 pares de base que codificam 106 aminoácidos da região C-terminal, removendo assim a porção altamente hidrofóbica da proteína. Esta proteína, a qual deletamos o C-terminal, chamaremos de LmMCA-Ia-δC-term.

4.1 CLONAGEM DA LmMCA-IA

Inicialmente, utilizamos a ferramenta *Translate* (https://web.expasy.org/translate/), que permite prever a tradução de uma sequência

de DNA ou RNA, para comparar a sequência da proteína obtida a partir da tradução do gene codificador da metacaspase de *Leishmania major* com aquela derivada da tradução do gene sintético. A análise comparativa foi realizada por meio do alinhamento de sequências utilizando a ferramenta *Clustal Omega* (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo).

Figura 13 - Comparação entre a proteína obtida pela tradução do gene codificante da metacaspase de *Leishmania major* e pela tradução do gene sintético sintetizado pela *Thermo Fisher Scientific*

```
Codificante     MADLFDIWGIGAVASLIPMLANGLLLVDRPKRVDINAGRRLIHTVRPIIPYRAPVPYTGG   60
Sintetizado     MADLFDIWGIGAVASLIPMLANGLLLVDRPKRVDINAGRRLIHTVRPIIPYRAPVPYTGG   60
                ************************************************************

Codificante     RVRALFIGINYTGMRNALRGCVNDVSSMLGTLQQISFPISECCILVDDPSFPGFCGMPTR   120
Sintetizado     RVRALFIGINYTGMRNALRGCVNDVSSMLGTLQQISFPISECCILVDDPSFPGFCGMPTR   120
                ************************************************************

Codificante     DNIIKHMLWLTGDVRPGDVLFFHFSGHGGQAKATRDSEEKYDQCLIPLDHVKNGSILDDD   180
Sintetizado     DNIIKHMLWLTGDVRPGDVLFFHFSGHGGQAKATRDSEEKYDQCLIPLDHVKNGSILDDD   180
                ************************************************************

Codificante     LFLMLVAPLPSGVRMTCVFDCCHSASMLDLPFSYVAPRVGGGGACEYMQQVRRGNFSNGD   240
Sintetizado     LFLMLVAPLPSGVRMTCVFDCCHSASMLDLPFSYVAPRVGGGGACEYMQQVRRGNFSNGD   240
                ************************************************************

Codificante     VVMFSGCTDRGTSADVQNGGHANGAATLAFTWSLLNTHGLSYLNILLKTREELRKKGRVQ   300
Sintetizado     VVMFSGCTDRGTSADVQNGGHANGAATLAFTWSLLNTHGLSYLNILLKTREELRKKGRVQ   300
                ************************************************************

Codificante     VPQLTSSKPIDLYKPFSLFGMITVNASMMHCVPQQYQQRPQSLPPQVMPPATGYPVHVPP   360
Sintetizado     VPQLTSSKPIDLYKPFSLFGMITVNASMMHCVPQQYQQRPQSLPPQVMPPATGYPVHVPP   360
                ************************************************************

Codificante     PPQGYYPPPQSPGWGLGYPVQGIPVQQATLGVSRCPPSQYLPAPPPAVYAPPPPGQRGPP   420
Sintetizado     PPQGYYPPPQSPGWGLGYPVQGIPVQQATLGVSRCPPSQYLPAPPPAVYAPPPPGQRGPP   420
                ************************************************************

Codificante     QPPPAQYTFSPLPPG        435
Sintetizado     QPPPAQYTFSPLPPG        435
                ***************
```

A legenda “codificante” se refere à tradução do gene codificante da metacaspase de *Leishmania major* obtido no banco de dados genômico *GeneBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e “sintético” se refere a tradução do gene sintetizado pela *Thermo Fisher Scientific* com otimização de códons para expressão em *E. coli*.

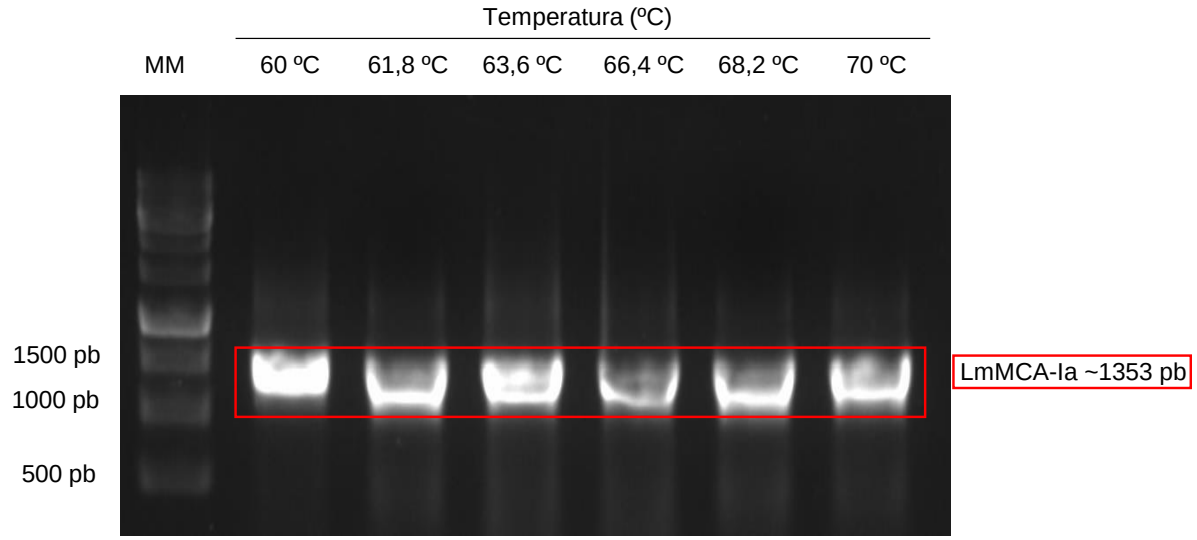
Podemos observar que ambas as proteínas possuem o mesmo tamanho. Além disso, os asteriscos indicam identidade entre os aminoácidos da proteína

produzida a partir do gene codificante e do gene sintético, demonstrando que toda a sequência primária da proteína foi preservada.

Com a confirmação de que o gene sintético era capaz de produzir a proteína de interesse, prosseguimos para as etapas de amplificação do inserto. Inicialmente, realizamos uma curva de temperatura de anelamento dos *primers*, uma vez que esse é um dos fatores que mais impactam a eficiência da PCR (ROUX, 2009). Para isso, conduzimos reações de PCR em diferentes temperaturas de anelamento (60 ºC; 61,8 ºC; 63,6 ºC; 66,4 ºC; 68,2 ºC e 70 ºC) e avaliamos a intensidade e uniformidade das bandas, bem como a formação de bandas inespecíficas, por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), conforme descrito no item 3.3.

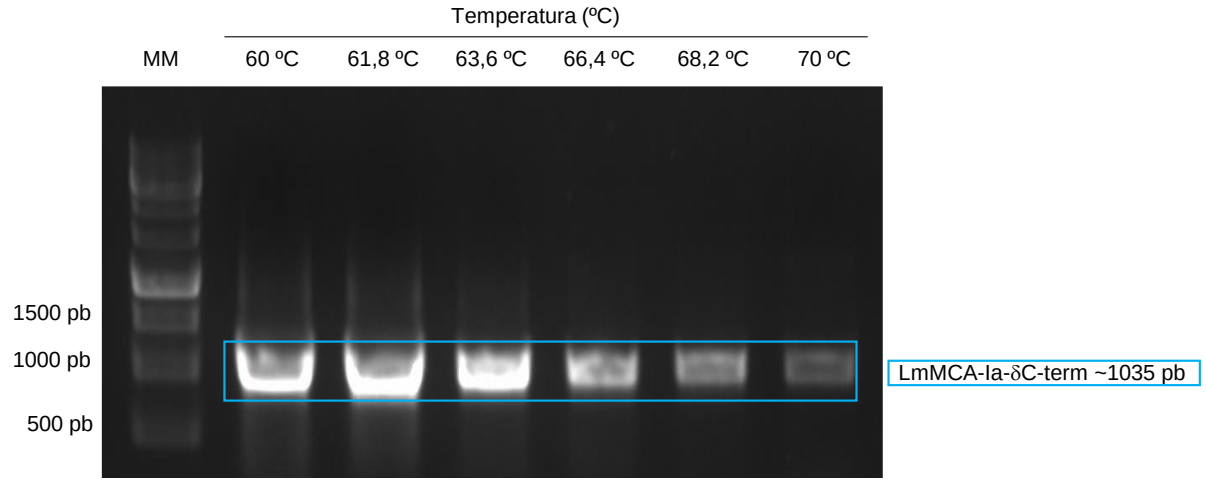
A partir dessa triagem, identificamos a melhor temperatura de anelamento para a amplificação do gene da metacaspase íntegra de *Leishmania major* (LmMCA-Ia) como sendo 60 ºC (Figura 14), e 63,6 ºC para a versão com deleção do C-terminal (LmMCA-Ia-δC-term) (Figura 15). As bandas apresentaram intensidade e uniformidade, indicando alta eficiência na amplificação, e não foram observadas bandas inespecíficas, sugerindo especificidade na ligação dos *primers* à região de interesse.

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da triagem de temperatura de anelamento dos *primers* para amplificação do gene da LmMCA-Ia.



Na coluna à esquerda, Marcador Molecular *1 kb Ladder* (MM); sequencialmente à direita, as colunas correspondem às temperaturas empregadas na amplificação (60 ºC; 61,8 ºC; 63,6 ºC; 66,4 ºC; 68,2 ºC e 70 ºC)

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da triagem de temperatura de anelamento dos *primers* para amplificação do gene da LmMCA-Ia-δC-term.

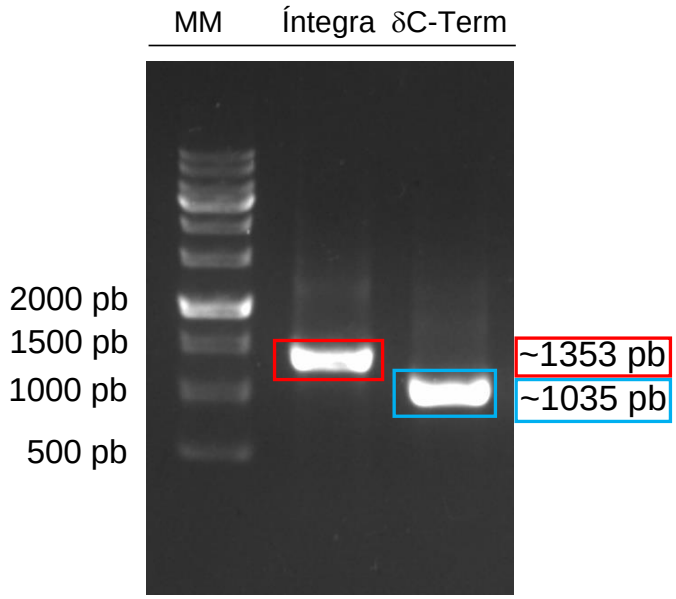


Na coluna à esquerda, Marcador Molecular *1 kb Ladder* (MM); sequencialmente à direita, as colunas correspondem às temperaturas empregadas na amplificação (60 ºC; 61,8 ºC; 63,6 ºC; 66,4 ºC; 68,2 ºC e 70 ºC)

Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram compatíveis com os valores esperados, aproximadamente 1353 pb para a amplificação do gene LmMCA-Ia e 1035 pb para LmMCA-Ia-δC-term. Esses tamanhos correspondem ao gene (1308 pb e 990 pb, respectivamente) somado à região complementar ao vetor pET-28a(+) (~45 pb), que é inserida ao inserto por meio dos *primers* para posterior montagem do plasmídeo recombinante.

Após a etapa de triagem, a reprodutibilidade da amplificação dos genes foi confirmada, com a realização das reações sob as condições ideais. Novamente, os produtos amplificados apresentaram os tamanhos esperados, sem a presença de bandas inespecíficas intensas, reforçando a alta especificidade dos *primers* utilizados (Figura 16).

Figura 16 - Amplificação dos genes codificantes da LmMCA-Ia e da LmMCA-Ia-δC-term.



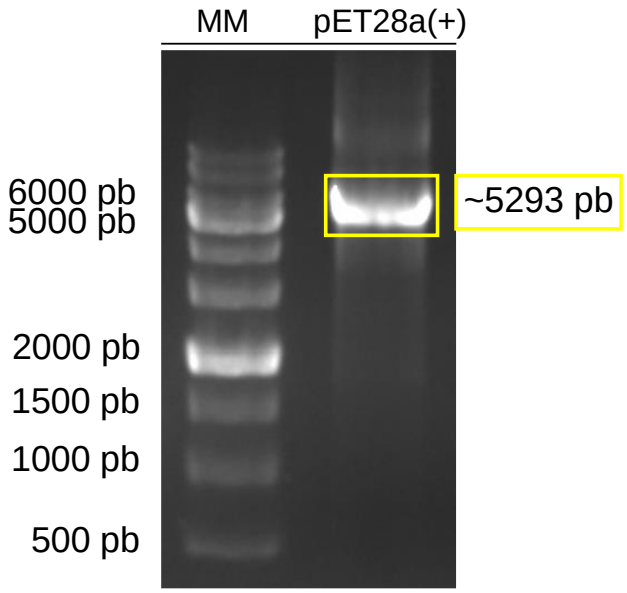
Na coluna à esquerda, Marcador Molecular *1 kb Ladder* (MM); sequencialmente à direita amplificação do gene codificante da LmMCA-Ia e amplificação do gene codificante da LmMCA-Ia-δC-term

Após a confirmação da amplificação dos insertos de interesse, procedemos com a amplificação do vetor. O vetor utilizado neste estudo foi o pET-28a(+), um plasmídeo amplamente empregado na produção de proteínas recombinantes devido ao seu alto nível de expressão proteica em curto período (GAY *et al.*, 2014; HULEANI *et al.*, 2022). Além disso, esse vetor apresenta elementos essenciais para a clonagem, como o gene de resistência à canamicina, permitindo a seleção de colônias transformadas; o *operon lac* e o gene *LacI*, que codifica o repressor do operador e regula a expressão gênica no vetor; o promotor de expressão T7, um dos mais fortes promotores conhecidos, modulado pela T7 RNA polimerase; e uma região de poli-histidina (6×His) na extremidade da proteína recombinante, facilitando seu processo de purificação, sendo considerado a primeira escolha para a produção de proteínas recombinantes (GOPAL; KUMAR, 2013; HULEANI *et al*., 2022; JIA; JEON, 2016; LI *et al*., 2022; SHILLING *et al*., 2020).

A amplificação do vetor foi realizada utilizando *primers* específicos para o protocolo TEDA, descrito adiante. Esses *primers* foram projetados para amplificar o vetor sem incluir a região do múltiplo sítio de clonagem (MCS, ~76 pb), garantindo que as extremidades do fragmento amplificado sejam complementares ao inserto de interesse, permitindo a formação do plasmídeo recombinante. A reação de amplificação foi conduzida sob as condições descritas no item 3.3, e o produto

amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). O fragmento obtido apresentou o tamanho esperado, com uma única banda intensa, evidenciando a alta eficiência da amplificação (Figura 17).

Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 1% indicando a amplificação do pET28(a) por PCR usando os *primers* do procedimento TEDA



Na coluna 1 está indicado o marcador molecular *1 kb Ladder* (MM); na coluna 2 a reação de amplificação do pET-28a(+).

O DNA molde utilizado para a amplificação do vetor foi extraído de uma colônia de *E. coli* por lise alcalina, sendo, portanto, um DNA metilado. A metilação do DNA é um mecanismo bacteriano que protege o material genético contra degradação, permitindo a distinção entre o DNA próprio (metilado) e o DNA exógeno, como o de fagos, que pode ser degradado por enzimas de restrição da célula hospedeira (BICKLE; KRÜGER, 1993; GAO *et al*., 2023; LEES; GLADSTONE, 2015; WILSON, 1991).

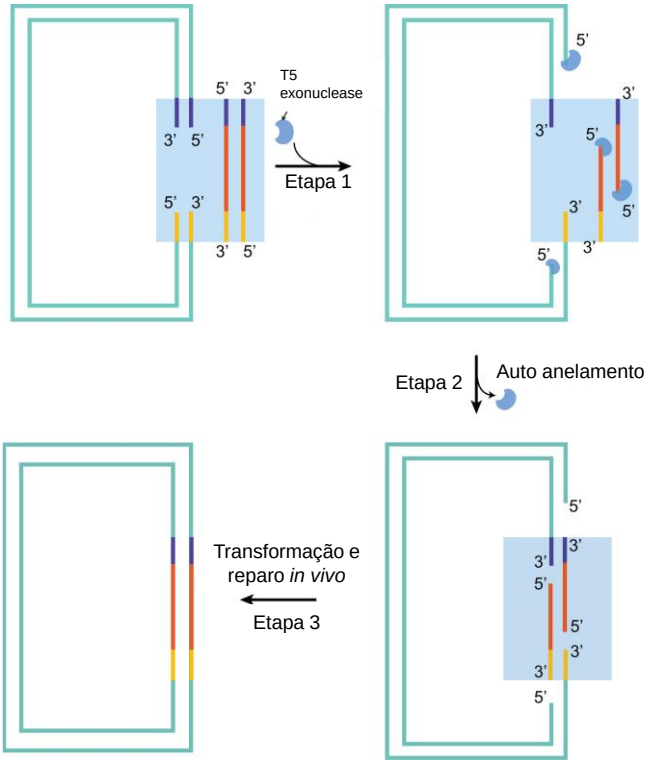
Com base nisto, realizamos a digestão do produto de amplificação com a enzima de restrição DpnI, uma endonuclease capaz de clivar DNA metilado, com a finalidade de degradar o DNA molde utilizado na reação de amplificação, e garantir que nas etapas subsequentes esse plasmídeo utilizado como molde não esteja presente, para evitar falsos positivos na transformação (LU; PATEL; BISSLER, 2002; MIERZEJEWSKA *et al*., 2014).

Embora o método tradicional de clonagem usando a DNA ligase e enzimas de restrição (COHEN *et al.*, 1973) ainda seja amplamente empregado, nossas tentativas

iniciais resultaram em baixa eficiência na clonagem das metacaspases recombinantes. Com os avanços em biologia molecular, novas abordagens mais rápidas, simples, eficientes e econômicas foram desenvolvidas para a construção e modificação de genes (CHAO; YUAN; ZHAO, 2015).

Neste trabalho, adotamos a estratégia de clonagem baseada no método *T5 exonuclease dependent assembly* (TEDA), que requer apenas uma exonuclease 5'-3' (XIA *et al*., 2019). O método se baseia na geração de extremidades homólogas, através da T5 exonuclease que cliva o DNA no sentido 5'-3', gerando pontas 3' complementares no inserto e no vetor, que se hibridizam umas às outras. Posteriormente após a transformação, ocorre o reparo *in* vivo na célula hospedeira com atividade da DNA polimerase para preencher as lacunas com os pares de bases complementares, e a DNA ligase ligando covalentemente os fragmentos e restaurando o plasmídeo recombinante (Figura 18).

Figura 18 - 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 representam a região homóloga. Etapa 1: durante a incubação a 30 °C a T5 exonuclease corta 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.*

Para a reação TEDA, são necessários apenas o inserto e o vetor linearizado, desde que possuam extremidades homólogas para permitir a hibridização das pontas geradas. Além disso, a T5 exonuclease é essencial para degradar as extremidades 5’ e expor sequências complementares que facilitam a montagem do plasmídeo recombinante. O vetor linearizado foi obtido por amplificação, enquanto as extremidades homólogas foram incorporadas ao inserto por meio de *primers* específicos, permitindo a complementaridade com o vetor utilizado.

Os fragmentos de DNA amplificados dos insertos e do vetor foram purificados utilizando o *Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (*Promega*) e quantificados por espectrofotometria (*NanoDrop – Thermo Fisher Scientific*). Em seguida, a reação foi preparada com uma proporção molar de 1:4 (vetor:inserto), utilizando 100 ng de vetor, condição descrita como mais eficiente por Xia *et al* (2019). A montagem foi realizada conforme os protocolos descritos no item 3.4.

Para determinar a quantidade de inserto a ser utilizada, aplicamos a fórmula (Equação 1), que considera a molaridade do vetor e do inserto.

Equação 1 - Equação de proporção molar entre inserto e vetor.

$$\frac{m\ Inserto}{MM\ Inserto} = \frac{m\ Vetor}{MM\ Vetor}$$

Equação de proporção molar entre inserto e vetor. Sendo m = massa, e MM = massa molar.

A variável a ser determinada na equação é a massa do inserto, enquanto a massa do vetor foi fixada em 100 ng. As massas molares do inserto e do vetor podem ser calculadas. Para calcularmos a massa molar de cada um deles, podemos multiplicar a quantidade de pares de base de cada um por 660, pois a massa molar média de um par de base é 660 g/mol. Desta forma simplificada, o que realmente é variável são os tamanhos do inserto e do vetor, pois o fator massa molar é comum aos dois, o que acaba se anulando. Por isso é comum ver esta equação da forma demonstrada na equação 2.

Equação 2 - Equação simplificada de proporção molar entre inserto e vetor.

$$\frac{m\ Inserto}{pb\ Inserto} = \frac{m\ Vetor}{pb\ Vetor}$$

Equação simplificada de proporção molar entre inserto e vetor, onde (m) correspondem às massas, e (pb) se referem aos pares de base.

Também é possível a utilização de ferramentas e *softwares* para calcular a massa molar, como a ferramenta *DNA Molecular Weight* (https://www.bioinformatics.org/sms2/dna_mw.html), que calcula a massa molar de DNAs sejam eles fita simples ou duplas, lineares ou circulares, com base na sequência e no peso molar de cada nucleotídeo. Neste trabalho foi-se utilizada esta ferramenta (STOTHARD, 2000), para calcular a massa molar dos insertos e do vetor pET-28a(+). A massa molar encontrada para o inserto da LmMCA-Ia foi 836.079,67 g/mol, para o gene da LmMCA-Ia-δC-term foi 639.548,27 g/mol e para o vetor pET-28a(+) foi 3.317.686,61 g/mol. Desta forma a equação resultante utilizada foi a demonstrada na equação 3.

Equação 3 - Equação utilizada para os calcúlos do protocolo TEDA.

$$m\ Inserto = 4 \times \left(\frac{100 \times MM\ Inserto}{3.317.686{,}61}\right)$$

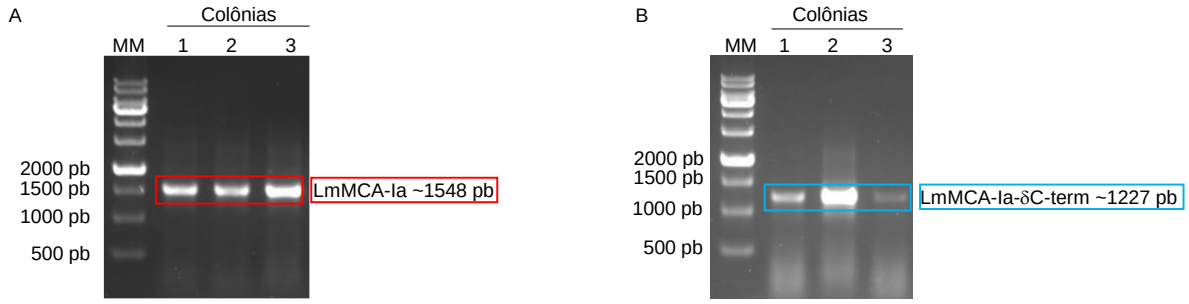
Equação utilizada para os calcúlos do protocolo TEDA, sendo 100 a massa do vetor (100 ng), 3.317.686,61 a massa molar do vetor pET-28a(+) linearizado, MM inserto a massa molar dos insertos, e 4 o fator de multiplicação para proporção molar de 1:4 (vetor:inserto).

Após a reação, a solução foi submetida ao processo de transformação por choque térmico em células competentes de *E. coli* DH5α, conforme descrito no item 3.6. O sucesso da transformação foi confirmado por meio da triagem das colônias transformadas através de PCR. Para a reação foram utilizados os *primers* específicos do promotor e do terminador T7, uma vez que estas regiões flanqueiam o gene exógeno no vetor pET-28a(+). A presença de um *amplicon* de aproximadamente 200 pb indica que o vetor foi transformado sem o inserto de interesse ou que ocorreu uma inserção em uma região não desejada. Por outro lado, quando a amplificação resulta em um fragmento com tamanho correspondente à soma dos ~200 pb do promotor e terminador T7 mais o número de pares de base do inserto, confirma-se a presença do gene de interesse na construção recombinante, bem como sua inserção na região esperada do vetor.

Os produtos da PCR apresentaram um tamanho compatível, exibindo um incremento de aproximadamente 200 pb em relação à amplificação do gene original, correspondente às sequências do promotor e terminador T7. A confirmação foi

realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), conforme demonstrado na Figura 19.

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose a 1% exibindo a amplificação de colônias de DH5α transformadas com o plasmídeo recombinante que carrega o gene da LmMCA-Ia Íntegra (A) e LmMCA-Ia-δC-term (B).

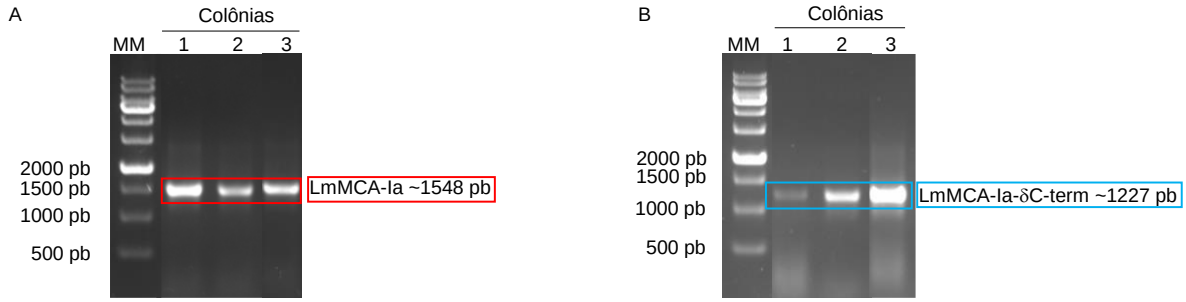


À esquerda, Marcador Molecular 1kb Ladder (MM); sequencialmente à direita, as colunas correspondem às colônias numeradas 1, 2, e 3.

A presença do inserto e o tamanho dos fragmentos amplificados confirmaram o sucesso das etapas de clonagem e transformação em *E. coli* DH5α. A partir de uma colônia positiva, procedeu-se à extração do DNA plasmidial por *miniprep*, utilizando o *Kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System* (*Promega*). Esse método baseia-se na lise alcalina das células bacterianas, seguida da neutralização do pH, promovendo a precipitação de proteínas e DNA cromossômico, enquanto o DNA plasmidial permanece solubilizado (CLEMSON; KELLY, 2003; EHRT; SCHNAPPINGER, 2003; GREEN; SAMBROOK, 2016).

Os plasmídeos recombinantes obtidos foram submetidos à transformação em células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS conforme descrito no item 3.7. Após a transformação, os clones foram selecionados em meio contendo canamicina e então realizou-se uma PCR de colônia para confirmação, seguindo mesmos parâmetros da triagem anterior. Os produtos amplificados apresentaram bandas de tamanho similar à PCR de colônia da transformação em *E. coli* DH5α (Figura 20), confirmando a correta inserção do gene de interesse e a montagem adequada do plasmídeo recombinante. Com a confirmação dos clones transformados, prosseguimos para a etapa de expressão proteica.

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose a 1% exibindo a amplificação de colônias de BL21 (DE3) plysS transformadas com o plasmídeo recombinante que carrega o gene da LmMCA-Ia Íntegra (A) e LmMCA-Ia-δC-term (B).



À esquerda, Marcador Molecular 1kb Ladder (MM); sequencialmente à direita, as colunas correspondem às colônias numeradas 1, 2, e 3.

4.2 EXPRESSÃO DA LMMCA-IA

Para os ensaios de expressão, foram utilizadas células de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. A combinação entre o vetor pET-28a(+) e cepas da linhagem BL21 constitui um sistema amplamente empregado para a produção de proteínas recombinantes (CASTIÑEIRAS *et al*., 2018; GUPTA; SHUKLA, 2016; LI *et al*., 2022).

As cepas BL21 apresentam diversas vantagens para expressão heteróloga, como mutações nos genes que codificam as proteases Lon e OmpT, responsáveis pela degradação de proteínas exógenas, baixos níveis de acetato intracelular e controle eficiente da expressão basal, que pode ser suprimida pela adição de 1% de glicose ao meio de cultivo. A cepa BL21 (DE3) contém um gene que codifica a T7 RNA polimerase, sob controle do promotor *lacUV5*, regulado pelo repressor *LacI*. Na ausência de lactose ou na presença de glicose, o repressor se liga ao promotor, inibindo a transcrição da T7 RNA polimerase. Em contrapartida, quando lactose ou seu análogo IPTG está presente, o repressor se dissocia, permitindo a transcrição da T7 RNA polimerase, e consequentemente do gene de interesse (CHOI *et al.*, 2010; HULEANI *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022).

A cepa BL21 (DE3) pLysS, empregada neste trabalho, possui todas essas características, com o acréscimo de um plasmídeo que expressa a lisozima T7. Essa enzima inibe a T7 RNA polimerase em condições não indutivas, reduzindo ainda mais a expressão basal, característica especialmente vantajosa para a produção de proteínas citotóxicas. A expressão não controlada de tais proteínas pode comprometer a viabilidade da célula hospedeira, reduzindo a eficiência do sistema de expressão (GOPAL; KUMAR, 2013; JIA; JEON, 2016; ROSANO; MORALES; CECCARELLI,

2019; ZHANG *et al*., 1989).

A expressão da LmMCA-Ia foi conduzida a 20 °C por 16 horas, sendo induzida com 0,25 mM de isopropil-β-D-tiogalactosídeo (IPTG). O IPTG, um análogo da lactose, promove uma indução estável e eficiente, uma vez que não é metabolizado pelas células. No sistema de expressão baseado no vetor pET-28a(+), a transcrição do gene de interesse é controlada pelo *operon lac* e pelo repressor *LacI*. Na ausência de lactose ou de seu análogo, o repressor se liga ao *operon lac*, impedindo que a T7 RNA polimerase reconheça o promotor T7 e inicie a transcrição. A adição de IPTG promove a dissociação do repressor, permitindo a ativação do promotor T7 e a subsequente transcrição do gene inserido no vetor pET-28a(+) (CHOI *et al*., 2010; GAY *et al*., 2014; HULEANI *et al*., 2022; JIA; JEON, 2016; LI *et al*., 2022; SHILLING *et al*., 2020).

Inicialmente, realizamos a clonagem da LmMCA-Ia em sua forma selvagem. Contudo, os ensaios de expressão não revelaram nenhuma banda correspondente à proteína no gel de eletroforese (dados não apresentados). Diante disso, testamos diferentes concentrações de IPTG (0,1 a 1 mM), uma vez que a concentração do indutor é um parâmetro crítico para a expressão de proteínas recombinantes (LI *et al.*, 2022; RIBEIRO *et al.*, 2019, 2020).

Concentrações muito baixas podem não induzir eficientemente a expressão, enquanto concentrações elevadas podem ser tóxicas às células, comprometendo sua viabilidade (CHOI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2022; RIBEIRO *et al.*, 2019, 2020). De acordo com a literatura, concentrações de IPTG na faixa de 0 a 1 mM são consideradas seguras para o crescimento de *E. coli*, razão pela qual utilizamos esse intervalo no trabalho (HULEANI *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022).

Embora concentrações menores de IPTG tenham se mostrado seguras para as células, o mesmo ainda promove uma forte indução da expressão em sistemas baseados no vetor pET, tornando desafiador modular baixos níveis de expressão, especialmente para proteínas citotóxicas (HULEANI *et al*., 2022; ROSANO; MORALES; CECCARELLI, 2019). Estudos prévios demonstraram a citotoxicidade da metacaspase recombinante de *Trypanosoma brucei* (TbMCA-Ib) para *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (ARAUJO, 2024), o que poderia estar impactando a expressão da LmMCA-Ia, alvo deste estudo.

Diante desse cenário, e visando reduzir ainda mais a expressão basal, adicionamos 1% de glicose ao meio de cultivo, estratégia destinada a suprimir a

transcrição da T7 RNA polimerase antes da indução e minimizar os possíveis efeitos citotóxicos da proteína recombinante (ARAUJO, 2024; CHOI *et al.*, 2010; HULEANI *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2022).

Além da concentração de IPTG, a temperatura e o tempo de indução são fatores críticos na expressão de proteínas recombinantes (RIBEIRO *et al.*, 2019). Altas temperaturas favorecem a formação de acetato, gerando estresse celular, além de induzir a formação de corpos de inclusão e instabilidade plasmidial (GUPTA; SHUKLA, 2016; LI *et al*., 2022; ROSANO; MORALES; CECCARELLI, 2019). Por outro lado, temperaturas mais baixas podem desacelerar o crescimento celular e reduzir os níveis de expressão, mas favorecem o dobramento correto e a solubilidade da proteína (GUPTA; SHUKLA, 2016; HULEANI *et al*., 2022; LI *et al*., 2022).

Diante disso, testamos um protocolo de expressão de curto tempo, utilizando uma alta concentração de IPTG (1 mM), a 37 ºC, por um período de 4 horas, conforme descrito para a expressão da metacaspase recombinante de *Leishmania amazonensis* (LaMCA-Ia) (PENÃ *et al.*, 2017), buscando maximizar a expressão e minimizar a toxicidade associada à indução prolongada.

Entretanto, nenhum dos testes realizados, seja variando a concentração do indutor ou ajustando a temperatura e o tempo de indução, resultou na detecção da expressão da LmMCA-Ia. Com base nesses resultados, levantamos a hipótese de que a enzima poderia estar ativa durante o processo de expressão, iniciando uma cascata de reações semelhantes às caspases, que levaria à sua autodegradação, o que explicaria a ausência da proteína nos materiais analisados após a indução.

Conchou *et al*. (2022) demonstraram que a metacaspase de *Candida glabrata* (CgMCA-Ia) é capaz de ativar outras metacaspases por mecanismos intermoleculares. Fenômenos similares foram descritos para as metacaspases de *Saccharomyces cerevisiae* e *T. brucei* (DALZOTO *et al.*, 2023; PROTO *et al.*, 2011).

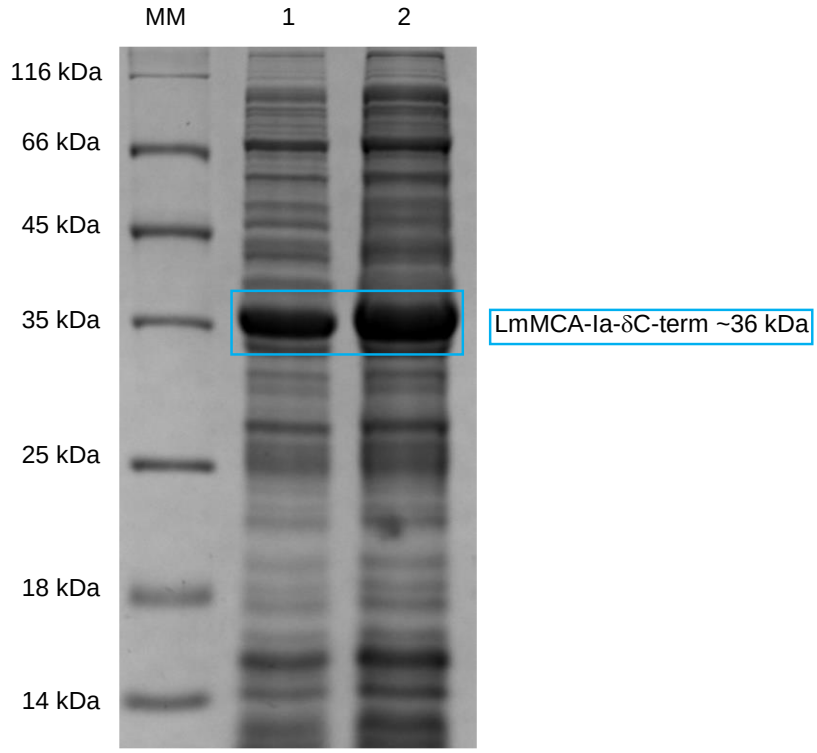
Com base nisso, e em estudos anteriores do grupo que demonstram a atividade catalítica de outras metacaspases, ajustamos o pH do meio para 5,5, visando inibir a possível atividade da LmMCA-Ia. A escolha foi baseada em estudos *in vitro* que mostram maior atividade catalítica das metacaspases em pHs alcalinos (GONZÁLEZ *et al*., 2007; LEE *et al*., 2007; MACHADO *et al*., 2013). Ainda assim, a expressão da proteína não foi detectada.

Como discutido anteriormente, a LmMCA-Ia possui uma região C-terminal rica em prolina e glutamina, conferindo à proteína características altamente hidrofóbicas

(GONZÁLEZ *et al*., 2007; LEE *et al*., 2007; RAWLINGS *et al*., 2018), o que pode favorecer a formação de agregados proteicos e o *misfolding* da enzima, prejudicando sua expressão em *E. coli* (DALZOTO *et al*., 2023; ERHARDT; WEGRZYN; DEUERLING, 2010; PRADO *et al*., 2019; SANTOS, 2020). Diante disso, optamos por realizar a clonagem de uma variante truncada da LmMCA-Ia, removendo a região C-terminal (LmMCA-Ia-δC-term), seguida de ensaios para avaliar sua expressão e solubilidade.

Realizamos a expressão da LmMCA-Ia com deleção da região C-terminal (LmMCA-Ia-δC-term) a 20 °C, durante 16 horas, com indução com 0,25 mM de IPTG. Na Figura 21, observa-se a expressão da LmMCA-Ia-δC-term, evidenciada por uma banda proteica de aproximadamente 36 kDa, valor condizente com o tamanho estimado para essa forma truncada da metacaspase de *Leishmania major*.

Figura 21 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% mostrando a expressão da LmMCA-Ia-δC-term do sedimento bacteriano



Da esquerda para a direita, as colunas são: Marcador Molecular (MM), LmMCA-Ia-δC-term (1 e 2).

A análise do perfil eletroforético evidencia que a remoção da região C-terminal favoreceu a estabilidade e expressão da metacaspase. A intensidade da banda sugere uma expressão forte, o que contrasta com os resultados obtidos anteriormente

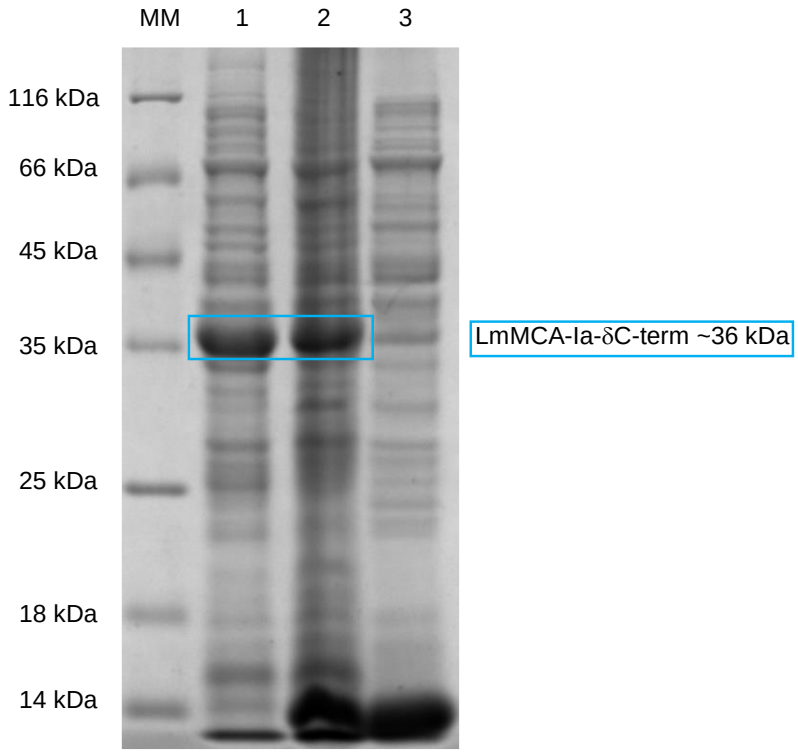
com a forma íntegra da LmMCA-Ia, onde não foi possível detectar nenhuma banda correspondente à proteína recombinante. A ausência de bandas adicionais também sugere que a forma truncada não sofre degradação significativa durante o processo de expressão.

Esse resultado reforça a hipótese de que a região C-terminal, rica em resíduos hidrofóbicos, estava contribuindo para a instabilidade estrutural, interferindo na expressão adequada da forma completa da proteína. Portanto, os dados apresentados na Figura 21 confirmam que a estratégia de deleção do C-terminal foi eficaz para obtenção da expressão da LmMCA-Ia, representando um avanço significativo na produção da metacaspase recombinante em sistema bacteriano.

Após a expressão da LmMCA-Ia-δC-term, iniciamos a preparação para a purificação com a lise bacteriana para extrair a proteína recombinante. O clone produzido possui uma sequência de seis histidinas na porção N-terminal, inserida pelo vetor pET-28a(+), o que permite a interação específica com resinas de níquel (Ni^{2+}), facilitando o processo de purificação por cromatografia de afinidade.

No entanto, diferentemente do observado com outras metacaspases previamente expressas pelo nosso grupo, verificamos que, após os processos de lise celular, tanto por métodos químicos quanto por métodos mecânicos, a LmMCA-Ia-δC-term permanecia majoritariamente no sedimento. Isso indica que a proteína está sendo expressa predominantemente em forma insolúvel, sendo direcionada para corpos de inclusão (Figura 22), impedindo sua recuperação em formas solúveis para purificação direta.

Figura 22 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% do material obtido da lise bacteriana



Da esquerda para a direita, as colunas são: Marcador Molecular (MM), (1) Expressão da LmMCA-Ia-δC-term, (2) Sedimento da lise bacteriana e (3) Sobrenadante da lise bacteriana.

Diante disto, traçamos estratégias de otimização da expressão com o objetivo de favorecer o enovelamento adequado da proteína e minimizar a formação de agregados insolúveis. Para isso, repetimos os mesmos ensaios previamente realizados com a forma selvagem da LmMCA-Ia, agora aplicados à variante truncada LmMCA-Ia-δC-term, buscando sua obtenção em forma solúvel.

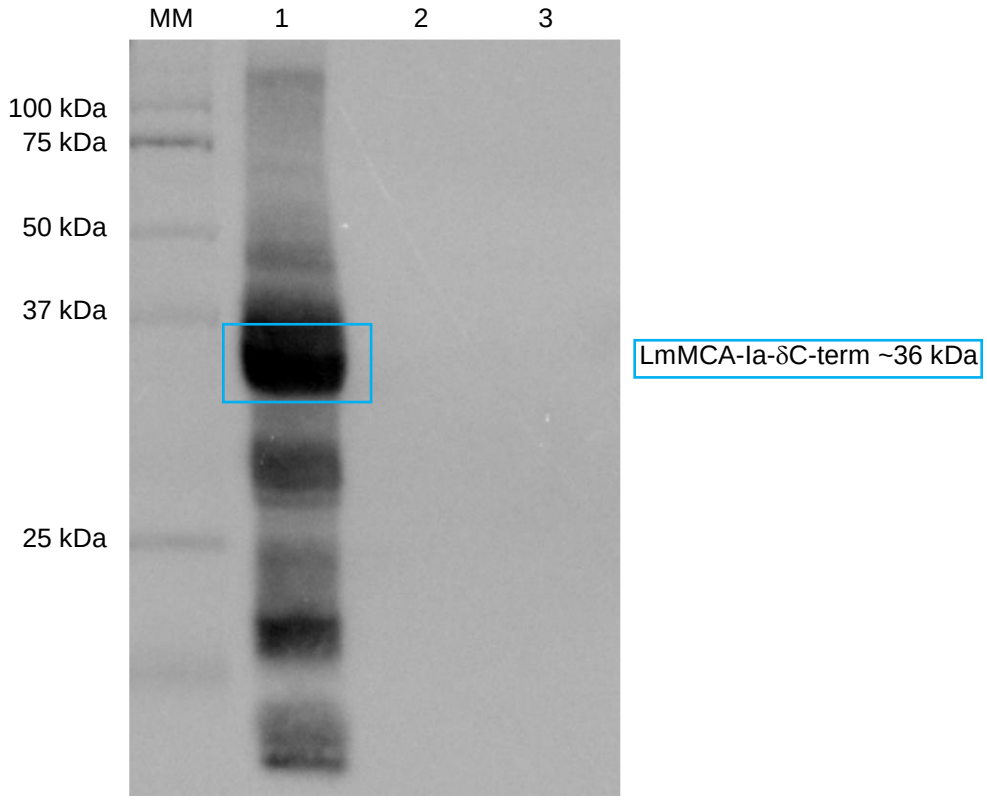
Foram testadas diferentes concentrações de IPTG (0,1 a 1 mM), tempos de indução (de 4 e 20 horas) e temperaturas de cultivo (37 °C e 20 °C), além da adição de glicose (1%) ao meio de cultura, com o intuito de reprimir a expressão basal da T7 RNA polimerase e do gene de interesse. Também avaliamos a modulação do pH do meio de expressão, com foco em valores mais ácidos, visando potencialmente inibir a atividade catalítica da proteína durante sua síntese, conforme sugerido em experimentos anteriores.

Apesar das diferentes abordagens, nenhum dos protocolos testados resultou na expressão da LmMCA-Ia-δC-term em forma solúvel. A proteína continuou a ser direcionada para corpos de inclusão, mesmo sob condições menos agressivas para o metabolismo celular e para o enovelamento proteico. Esse resultado reforça a

complexidade estrutural e o elevado potencial de agregação da metacaspase de *Leishmania major*, mesmo na ausência da região C-terminal, sugerindo a necessidade de abordagens alternativas para sua solubilização e purificação.

Para confirmar a expressão da LmMCA-Ia-δC-term recombinante e verificar sua localização no sedimento do lisado bacteriano, realizamos um *western blotting* utilizando um anticorpo anti-6×His, que reconhece a cauda de histidina presente no N-terminal da proteína recombinante. Os dados obtidos confirmaram que a LmMCA-Ia-δC-term está sendo expressa, mas permanece no sedimento após a lise celular, mesmo quando o material foi tratado com beads de Ni-sepharose para tentativa de captura (Figura 23).

Figura 23 - *Western blotting* do material obtido da lise bacteriana



Da esquerda para a direita, as colunas são: Marcador Molecular (MM), (1) Sedimento da lise, (2) Sobrenadante da lise e (3) Material ligado a *beads* de Ni-sepharose

Na Figura 23, é possível observar uma banda principal com aproximadamente 36 kDa, compatível com o peso molecular esperado da LmMCA-Ia-δC-term. Entretanto, também foram detectadas bandas adicionais com pesos moleculares superiores e inferiores. A presença dessas bandas pode estar relacionada à ausência

de uma etapa prévia de purificação, o que permite a detecção de proteínas inespecíficas presentes no sedimento. Como o anticorpo utilizado reconhece sequências de histidina, é possível que essas bandas correspondam a proteínas bacterianas endógenas com regiões ricas em histidina ou a fragmentos degradados da proteína recombinante.

Esses resultados indicam que a LmMCA-Ia-δC-term está sendo expressa, mas continua a apresentar baixa solubilidade, o que dificulta sua extração e purificação. Essa dificuldade é comum em proteínas de protozoários da família *Trypanosomatidae*, como a *Leishmania major*. Diversos estudos relatam que, quando expressas em sistemas procarióticos como *E. coli*, essas proteínas são frequentemente direcionadas para corpos de inclusão. Um exemplo é a cruzaína de *Trypanosoma cruzi*, cuja expressão resulta predominantemente na formação de agregados proteicos (DOS REIS *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2001). A recuperação dessas proteínas requer o uso de agentes desnaturantes, como ureia ou guanidina-HCl. No entanto, nem todas as proteínas conseguem retomar sua estrutura funcional após a desnaturação (HULEANI *et al*., 2022; HWANG; PAN; SYKES, 2014; KHOW; SUNTRARACHUN, 2012).

Frente a esse cenário, estratégias de *refolding in vitro* têm sido empregadas como alternativa para recuperar a atividade biológica de proteínas obtidas a partir de corpos de inclusão. Dentre essas estratégias, destaca-se a diluição da proteína desnaturada em tampões contendo aditivos estabilizantes, como arginina, que auxiliam na prevenção de novas interações hidrofóbicas (TSUMOTO *et al.*, 2003). Outras abordagens incluem ajustes de pH e temperatura, ultrafiltração, e o uso de detergentes suaves ou co-solventes para favorecer o enovelamento adequado da proteína (KAZLAUSKAS; HAEFFNER; NORIN, 2002; SINGH; PANDA, 2005). Ainda que úteis, essas metodologias nem sempre resultam em proteínas funcionalmente ativas, especialmente quando envolvem regiões altamente hidrofóbicas (HULEANI *et al*., 2022; HWANG; PAN; SYKES, 2014; KHOW; SUNTRARACHUN, 2012).

Como alternativa, a utilização de sistemas de expressão eucarióticos, como *Pichia pastoris*, tem sido considerada uma estratégia mais eficiente. Esse sistema é capaz de realizar modificações pós-traducionais e oferece um ambiente intracelular mais apropriado ao enovelamento de proteínas eucarióticas (AHMAD *et al*., 2014; KARBALAEI; REZAEE; FARSIANI, 2020; MACAULEY-PATRICK *et al*., 2005; MASTROPIETRO; AW; POLIZZI, 2021). Estudos prévios demonstraram sucesso na

expressão de proteínas recombinantes de *Leishmania donovani*, *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi* em sistemas de expressão em *Pichia pastoris* (BEN AYED *et al.*, 2018; HUDSPETH *et al.*, 2016; VANDERSALL-NAIRN *et al.*, 1998).

Portanto, a adoção do sistema *Pichia pastoris* se apresenta como uma alternativa para a produção da LmMCA-Ia de forma solúvel, superando as limitações observadas na expressão em *E. coli* e reduzindo a dependência de métodos de *refolding in vitro*, que muitas vezes apresentam rendimento limitado.

5 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo a expressão heteróloga da metacaspase de *Leishmania major* (LmMCA-Ia) em *Escherichia coli*, com foco na obtenção da proteína e sua caracterização bioquímica. Inicialmente, a expressão da enzima em sua forma completa não resultou na detecção de bandas compatíveis com o peso molecular esperado, sugerindo dificuldades relacionadas à tradução, estabilidade ou enovelamento proteico.

A LmMCA-Ia possui uma região C-terminal rica em prolina e glutamina, característica que contribui para o comportamento hidrofóbico da proteína e formação de agregados proteicos. Com base nisso, foi realizada a clonagem de uma versão truncada da enzima, com deleção da região C-terminal (LmMCA-Ia-δC-term). Essa estratégia resultou na detecção de uma banda de aproximadamente 36 kDa, compatível com o tamanho da forma truncada da proteína. No entanto, mesmo com a modificação, a LmMCA-Ia-δC-term permaneceu sendo direcionada para corpos de inclusão.

Foram realizados diversos testes para otimizar a expressão da proteína de forma solúvel, incluindo variações na temperatura, tempo de indução, concentração de IPTG, pH do meio e adição de glicose. Apesar dos esforços, a proteína recombinante não foi obtida em sua forma solúvel. Esse comportamento é consistente com relatos na literatura sobre enzimas de outros tripanossomatídeos, como a cruzaína de *Trypanosoma cruzi*, que também apresentam tendência à formação de corpos de inclusão em sistemas procarióticos.

Os resultados obtidos evidenciam as dificuldades associadas à expressão da LmMCA-Ia em *Escherichia coli*, sugerindo que estratégias alternativas podem ser mais apropriadas para a produção desta proteína. Temos como perspectivas futuras a aplicação de protocolos de *refolding* a partir de corpos de inclusão e a utilização de sistemas de expressão eucarióticos, como *Pichia pastoris*. A adoção desse sistema poderá favorecer a obtenção da LmMCA-Ia em sua forma solúvel e funcional, viabilizando sua purificação e estudos posteriores para caracterização bioquímica da enzima.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.

AMBIT, A.; FASEL, N.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. An essential role for the Leishmania major metacaspase in cell cycle progression. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 1, p. 113–22, 2008.

ARAUJO, L. H. **Prospecção de moléculas como possíveis moduladores para a metacaspase-2 (tbMCA-IIa) de Trypanossoma brucei**. 2024. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2024.

ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1269–1281, 2000.

BARCINSKI, M. A. Apoptosis in trypanosomatids: facts and hypotheses. **Journal of Microbes & their Vectors Causing Human Infections**, v. 92, suppl.1, nov. 1997.

BEN AYED, S.; ALI, M. B.; BALI, A.; GARGOURI, Y.; LAOUINI, D.; BEN ALI, Y. Secretory lipase from the human pathogen Leishmania major: Heterologous expression in the yeast Pichia pastoris and biochemical characterization. **Biochimie**, v. 146, p. 119–126, 2018.

BERG, M.; VEKEN, P. Van der; JOOSSENS, J.; MUTHUSAMY, V.; BREUGELMANS, M.; MOSS, C. X.; RUDOLF, J.; COS, P.; COOMBS, G. H.; MAES, L.; HAEMERS, A.; MOTTRAM, J. C.; AUGUSTYNS, K. Design and evaluation of Trypanosoma brucei metacaspase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 6, p. 2001–2006, 2010.

BICKLE, T. A.; KRÜGER, D. H. Biology of DNA restriction. **Microbiological reviews**, v. 57, n. 2, p. 434–450, 1993.

BORTNER, C. D.; OLDENBURG, N. B. E.; CIDLOWSKI, J. A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 5, n. 1, p. 21–26, 1995.

BOZHKOV, P. V; SUAREZ, M. F.; FILONOVA, L. H.; DANIEL, G.; ZAMYATNIN, A. A.; 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. 14463–8, 2005.

CASTIÑEIRAS, T. S.; WILLIAMS, S. G.; HITCHCOCK, A. G.; SMITH, D. C. E. coli strain engineering for the production of advanced biopharmaceutical products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 15, 2018.

CEULEERS, H.; VAN SPAENDONK, H.; HANNING, N.; HEIRBAUT, J.; LAMBEIR, A. M.; JOOSSENS, J.; AUGUSTYNS, K.; DE MAN, J. G.; DE MEESTER, I.; DE WINTER, B. Y. Visceral hypersensitivity in inflammatory bowel diseases and irritable

bowel syndrome: The role of proteases. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 47, p. 10275–10286, 2016.

CHAKRABARTY, S.; KAHLER, J. P.; VAN DE PLASSCHE, M. A. T.; VANHOUTTE, R.; VERHELST, S. H. L. Recent Advances in Activity-Based Protein Profiling of Proteases. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 420, p. 253-281, 2019.

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

CHOI, Y. J.; MOREL, L.; FRANÇOIS, T. Le; BOURQUE, D.; LUCIE, B.; GROLEAU, D.; MASSIE, B.; MIGUEZ, C. B. Novel, versatile, and tightly regulated expression system for escherichia coli strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 15, p. 5058–5066, 2010.

CLEMSON, M.; KELLY, W. J. Optimizing alkaline lysis for DNA plasmid recovery. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 37, n. Pt 3, p. 235, 2003.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C. Y.; BOYER, H. W.; HELLING, R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 11, p. 3240-3244, 1973.

CONCHOU, L.; DOUMÈCHE, B.; GALISSON, F.; VIOLOT, S.; DUGELAY, C.; DIESIS, E.; PAGE, A.; BIENVENU, A. L.; PICOT, S.; AGHAJARI, N.; BALLUT, L. Structural and molecular determinants of Candida glabrata metacaspase maturation and activation by calcium. **Communications Biology 2022 5:1**, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2022.

DALZOTO, L. A. M.; TRUJILHO, M. N. R.; SANTOS, T. 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.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.

DE CASTRO, P. A.; SAVOLDI, M.; BONATTO, D.; BARROS, M. H.; GOLDMAN, M. H. S.; BERRETTA, A. A.; GOLDMAN, G. H. Molecular characterization of propolis-induced cell death in Saccharomyces cerevisiae. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 3, p. 398-411, 2011.

DONEHOWER, L. A.; BRADLEY, A. The tumore suppressor p53. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1155, n. 2, p. 181-205, 1993.

DOS REIS, F. C. G.; JÚDICE, W. A. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; SCHARFSTEIN, J.; ANA PAULA, A. P. C. The substrate specificity of cruzipain 2, a

cysteine protease isoform from Trypanosoma cruzi. **FEMS microbiology letters**, v. 259, n. 2, p. 215-220, 2006.

DRENTH, J.; JANSONIUS, J. N.; KOEKOEK, R.; WOLTHERS, B. G. The Structure of Papain. **Advances in Protein Chemistry**, v. 25, n. C, p. 79-115, 1971.

EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D. Isolation of plasmids from E. coli by alkaline lysis. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 235, p. 75-78, 2003.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

ENGELBRECHT, D.; DURAND, P. M.; COETZER, T. L. On Programmed Cell Death in *Plasmodium falciparum: Status Quo*. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

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

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.-M.; 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, S.; 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.

GAO, Q.; LU, S.; WANG, Y.; HE, L.; WANG, M.; JIA, R.; CHEN, S.; ZHU, D.; LIU, M.; ZHAO, X.; YANG, Q.; WU, Y.; ZHANG, S.; HUANG, J.; MAO, S.; OU, X.; SUN, D.; TIAN, B.; CHENG, A. Bacterial DNA methyltransferase: A key to the epigenetic world with lessons learned from proteobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1129437, 2023.

GAY, G.; WAGNER, D. T.; KEATINGE-CLAY, A. T.; GAY, D. C. Rapid modification of the pET-28 expression vector for ligation independent cloning using homologous recombination in Saccharomyces cerevisiae. **Plasmid**, v. 76, p. 66, 2014.

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

GONZÁLEZ, 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, n. 2, p. 161-72, 2007.

GOODSELL, D. S. The Molecular Perspective: Caspases. **STEM CELLS**, v. 18, n. 6, p. 457–458, 2000.

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli. **The protein journal**, v. 32, n. 6, p. 419-25, 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. 11, p. 833–843, 2015.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Minipreps. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2016, n. 10, p. 911-916, 2016.

GUPTA, S. K.; SHUKLA, P. Advanced technologies for improved expression of recombinant proteins in bacteria: perspectives and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 1089-1098, 2016.

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

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 25, n. 5, p. 363-370, 2000.

HILL, S. M.; NYSTRÖM, T. The dual role of a yeast metacaspase: What doesn't kill you makes you stronger. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 37, n. 5, p. 525-31, 2015.

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

HUDSPETH, E. M.; WANG, Q.; SEID, C. A.; HAMMOND, M.; WEI, J.; LIU, Z.; ZHAN, B.; POLLET, J.; HEFFERNAN, M. J.; MCATEE, C. P.; ENGLER, D. A.; MATSUNAMI, R. K.; STRYCH, U.; ASOJO, O. A.; HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E. Expression and purification of an engineered, yeast-expressed Leishmania donovani nucleoside hydrolase with immunogenic properties. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 12, n. 7, p. 1707–1720, 2016.

HULEANI, S.; ROBERTS, M. R.; BEALES, L.; PAPAIOANNOU, E. H. Escherichia coli as an antibody expression host for the production of diagnostic proteins: significance and expression. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 756–773, 2022.

HWANG, P. M.; PAN, J. S.; SYKES, B. D. Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in Escherichia coli. **FEBS Letters**, v. 588, n. 2, p. 247-252, 2014.

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

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

KANG, S. G.; ORTEGA, J.; SINGH, S. K.; WANG, N.; HUANG, N.; STEVEN, A. C.; MAURIZI, M. R. Functional Proteolytic Complexes of the Human Mitochondrial ATP-dependent Protease, hClpXP. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 23, p. 21095–21102, 2002.

KARBALAEI, M.; REZAEE, S. A.; FARSIANI, H. Pichia pastoris: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 9, p. 5867, 2020.

KAZLAUSKAS, R. J.; HAEFFNER, F.; NORIN, T. Molecular modeling and biocatalysis: Explanations, predictions, limitations, and opportunities. **TRENDS in Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 127–132, 2002.

KHOW, O.; SUNTRARACHUN, S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 159–162, 2012.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 1, p. 1–24, 1990.

KLEMENČIČ, M.; FUNK, C. Structural and functional diversity of caspase homologues in non-metazoan organisms. **Protoplasma**, v. 255, n. 1, p. 387–397, 2018.

LE CHAT, L.; SINDEN, R. E.; DESSENS, J. T. The role of metacaspase 1 in Plasmodium berghei development and apoptosis. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 153, n. 1, p. 41–47, 2007.

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. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 10, p. 1745–57, 2007.

LEES, J.; GLADSTONE, R. A. R-M systems go on the offensive. **Nature reviews. Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 131, 2015.

LI, L.; LI, H.; TIAN, Q.; GE, B.; XU, X.; CHI, Y.; ZHAO, H.; LIU, Y.; JIA, N.; ZHOU, T.; ZHU, Y.; ZHOU, Y. Expression and purification of soluble recombinant β-lactamases using Escherichia coli as expression host and pET-28a as cloning vector. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 1–9, 2022.

LIMA, A. P. C. A.; DOS REIS, F. C. G.; SERVEAU, C.; LALMANACH, G.; JULIANO, L.; MÉNARD, R.; VERNET, T.; THOMAS, D. Y.; STORER, A. C.; SCHARFSTEIN, J. Cysteine protease isoforms from Trypanosoma cruzi, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, n. 1, p. 41–52, 2001.

LU, L.; PATEL, H.; BISSLER, J. J. Optimizing DpnI digestion conditions to detect replicated DNA. **BioTechniques**, v. 33, n. 2, p. 316–318, 2002.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249–270, 2005.

MACHADO, M. F. M.; 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. 2608–21, 2013.

MAHAJAN, R.; BADGUJAR, S. B. Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. **Journal of Pharmacy Research**, 2010.

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 Gα 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.

MARINO, C. L.; LASCELLES, B. D. X.; VADEN, S. L.; GRUEN, M. E.; MARKS, S. L. Prevalence and classification of chronic kidney disease in cats randomly selected from four age groups and in cats recruited for degenerative joint disease studies. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n. 6, p. 465-472, 2014.

MASTROPIETRO, G.; AW, R.; POLIZZI, K. M. Expression of proteins in Pichia pastoris. **Methods in Enzymology**, v. 660, p. 53–80, 2021.

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

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.

MESLIN, B.; BARNADAS, C.; BONI, V.; LATOUR, C.; DE MONBRISON, F.; KAISER, K.; PICOT, S. Features of apoptosis in Plasmodium falciparum erythrocytic stage through a putative role of PfMCA1 metacaspase-like protein. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 12, p. 1852–1859, 2007.

MESLIN, B.; BEAVOGUI, A. H.; FASEL, N.; PICOT, S. Plasmodium falciparum metacaspase PfMCA-1 triggers a z-VAD-fmk inhibitable protease to promote cell death. **PloS one**, v. 6, n. 8, 2011a.

MESLIN, B.; ZALILA, H.; FASEL, N.; PICOT, S.; BIENVENU, A.-L. Are protozoan metacaspases potential parasite killers? **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 26, 2011b.

MIERZEJEWSKA, K.; SIWEK, W.; CZAPINSKA, H.; KAUS-DROBEK, M.; RADLINSKA, M.; SKOWRONEK, K.; BUJNICKI, J. M.; DADLEZ, M.; BOCHTLER, M. Structural basis of the methylation specificity of R.DpnI. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 13, p. 8745, 2014.

MININA, E. A.; COLL, N. S.; TUOMINEN, H.; BOZHKOV, P. V. Metacaspases versus caspases in development and cell fate regulation. **Cell death and differentiation**, v. 24, n. 8, p. 1314–1325, 2017.

MININA, E. A.; STAAL, J.; ALVAREZ, V. E.; BERGES, J. A.; BERMAN-FRANK, I.; BEYAERT, R.; BIDLE, K. D.; BORNANCIN, F.; CASANOVA, M.; CAZZULO, J. J.; CHOI, C. J.; COLL, N. S.; DIXIT, V. M.; DOLINAR, M.; FASEL, N.; FUNK, C.; GALLOIS, P.; GEVAERT, K.; GUTIERREZ-BELTRAN, E.; HAILFINGER, S.; KLEMENČIČ, M.; KOONIN, E. V; KRAPPMANN, D.; LINUSSON, A.; MACHADO, M. F. M.; MADEO, F.; MEGENEY, L. A.; MOSCHOU, P. N.; MOTTRAM, J. C.; NYSTRÖM, T.; OSIEWACZ, H. D.; OVERALL, C. M.; PANDEY, K. C.; RULAND, J.; SALVESEN, G. S.; SHI, Y.; SMERTENKO, A.; STAEL, S.; STÅHLBERG, J.; SUÁREZ, M. F.; THOME, M.; TUOMINEN, H.; VAN BREUSEGEM, F.; VAN DER HOORN, R. A. L.; VARDI, A.; ZHIVOTOVSKY, B.; LAM, E.; BOZHKOV, P. V. Classification and Nomenclature of Metacaspases and Paracaspases: No More Confusion with Caspases. **Molecular cell**, v. 77, n. 5, p. 927–929, 2020.

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. 5635-9, 2007.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. **Current opinion in microbiology**, v. 7, n. 4, p. 375–381, 2004.

NEDELCU, A. M.; DRISCOLL, W. W.; DURAND, P. M.; HERRON, M. D.; RASHIDI, A. ON THE PARADIGM OF ALTRUISTIC SUICIDE IN THE UNICELLULAR WORLD. **Evolution**, v. 65, n. 1, p. 3–20, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 7ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2018.

NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular Responses to DNA Damage. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 367–401, 2001.

OKADA, Y.; MAENO, E.; MORI, S. Anion Channel Involved in Induction of Apoptosis and Necrosis. *In*: LAUF, Peter K.; ADRAGNA, Norma C. **Cell Volume and Signaling**. New York: Springer US, 2005. p. 205-209.

OTTO, H. H.; SCHIRMEISTER, T. Cysteine proteases and their inhibitors. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 1, p. 133–171, 1997.

PENÃ, M. S.; CABRAL, G. C.; FOTORAN, W. L.; PEREZ, K. R.; STOLF, B. S. Metacaspase-binding peptide inhibits heat shock-induced death in Leishmania (L.) amazonensis. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 3, p. e2645, 2017.

PRADO, I. R. S.; SANTOS, T. R.; SOUZA, L. F. L. P.; ARAUJO, L. H.; MARCONDES, M. F.; MACHADO, M. F. M. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA METACASPASE YCA1 COM A DELEÇÃO DO N-TERMINAL. **Revista Científica UMC**, v. 4, n. 3, 2019.

PROTO, W. R.; CASTANYS-MUNOZ, E.; BLACK, A.; TETLEY, L.; MOSS, C. X.; JULIANO, L.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Trypanosoma brucei Metacaspase 4 Is a Pseudopeptidase and a Virulence Factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 46, p. 39914, 2011.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical journal**, v. 290, pt 1, p. 205-218, 1993.

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**, v. 46, n. D1, p. D624-D632, 2018.

RIBEIRO, V. T.; ASEVEDO, E. A.; DE PAIVA VASCONCELOS, L. T. C.; FILHO, M. A. O.; DE ARAÚJO, J. S.; DE MACEDO, G. R.; DE SOUSA JÚNIOR, F. C.; DOS

SANTOS, E. S. Evaluation of induction conditions for plasmid pQE-30 stability and 503 antigen of Leishmania i. chagasi expression in E. coli M15. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 16, p. 6495-6504, 2019.

RIBEIRO, V. T.; DE SÁ LEITÃO, A. L. O.; DE PAIVA VASCONCELOS, L. T. C.; FILHO, M. A. O.; MARTINS, D. R. A.; DE SOUSA JÚNIOR, F. C.; DOS SANTOS, E. S. Use of plasmids for expression of proteins from the genus Leishmania in Escherichia coli: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v**.**104, n.10, p.4273-4280, 2020.

ROSANO, G. L.; MORALES, E. S.; CECCARELLI, E. A. New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update. **Protein Science**, v. 28, n. 8, p. 1412–1422, 2019.

ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2009, n. 4, 2009.

RUBIO-MOSCARDO, F. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3214–3222, 2005.

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. da R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543, 2021.

SANTOS, T. R. **Clonagem, expressão e purificação da metacaspase (CaMCA) de Candida albicans**. 2020. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de Mogi das Cruzes, 2020.

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.

SHILLING, P. J.; MIRZADEH, K.; CUMMING, A. J.; WIDESHEIM, M.; KÖCK, Z.; DALEY, D. O. Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in Escherichia coli. **Communications Biology**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2020.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubihzation and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303–310, 2005.

SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 26, p. 14376-14381, 2000.

STELLER, H. Mechanisms and Genes of Cellular Suicide. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1445–1449, 1995.

STOTHARD, P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. **BioTechniques**, v. 28, n. 6, 2000.

TOVAR, A. E. G.; TRUJILLO, C. O.; ROHANA, P. T. Leishmaniosis. **Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias**, p. 38-41, 2017.

TSIATSIANI, L.; VAN BREUSEGEM, F.; GALLOIS, P.; ZAVIALOV, A.; LAM, E.; BOZHKOV, P. V. Metacaspases. **Cell death and differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1279-88, 2011.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; KUMAGAI, I.; ARAKAWA, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein Expression and Purification**, v. 28, n. 1, p. 1-8, 2003.

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**, v. 6, n. 4, p. 961-967, 2000.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 79-99, 2019.

VANDERSALL-NAIRN, A. S.; MERKLE, R. K.; O'BRIEN, K.; OELTMANN, T. N.; MOREMEN, K. W. Cloning, expression, purification, and characterization of the acid alpha-mannosidase from Trypanosoma cruzi. **Glycobiology**, v. 8, n. 12, p. 1183-1194, 1998.

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. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45329–36, 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, 2016.

WELBURN, S. C.; BARCINSKI, M. A.; WILLIAMS, G. T. Programmed cell death in trypanosomatids. **Parasitology Today**, v. 13, n. 1, p. 22–26, 1997.

WILSON, G. G. Organization of restriction-modification systems. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 10, p. 2539, 1991.

WONG, A. H.-H.; YAN, C.; SHI, Y. Crystal structure of the yeast metacaspase Yca1. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 35, p. 29251–9, 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, 2019.

YUAN, S.; AKEY, C. W. Apoptosome Structure, Assembly, and Procaspase Activation. **Structure**, v. 21, n. 4, p. 501–515, 2013.

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, n. 1, p. 222-239, 2011.

ZHANG, H.; CISNEROSB, R. J.; DUNLAPB, R. B.; JOHNSON, L. F. Efficient synthesis of mouse thymidylate synthase in Escherichia coli (Recombinant DNA; expression vector; protein engineering; 5-fluorodeoxyuridine; site-directed mutagenesis). **Gene**, v. 84, n. 2, p. 487-491, 1989.