

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Caracterização Cinética e Estrutural do Sintase
do Óxido Nítrico de *Leishmania infantum***

Fábio Mira Rocha Sabino

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Especialização Bioquímica Médica

2012

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Caracterização Cinética e Estrutural do Sintase do Óxido Nítrico de *Leishmania infantum*

Tese de mestrado orientada pela Doutora Marta Sousa Silva e pelo Doutor
Carlos Cordeiro

Fábio Mira Rocha Sabino

Dissertação de Mestrado em Bioquímica

Especialização Bioquímica Médica

2012

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha gratidão para com todas as pessoas que me ajudaram durante a realização deste trabalho, e sem as quais a conclusão do mesmo não teria sido possível.

Em primeiro lugar, gostaria de prestar um grande agradecimento aos meus dois orientadores:

À Doutora Marta Sousa Silva, por todos os ensinamentos, por toda a ajuda, disponibilidade, paciência, optimismo e simpatia, e por me ter deixado seguir as minhas ideias.

Ao Doutor Carlos Cordeiro, por tudo o que me ensinou, por todo o optimismo e apoio prestado, e por todos os conselhos sábios.

Quero também agradecer aos restantes elementos do grupo de enzimologia por todo o apoio prestado. Ao Doutor Ricardo Gomes por toda a ajuda com as análises de espectrometria de massa, pelas discussões sobre os problemas que fui encontrando, e pelas ideias de como os resolver. Ao Doutor António Ferreira por toda a ajuda com o tratamento de resultados, por todos os conselhos, e pela paciência para responder às minhas questões. Gostaria também de agradecer ao Doutor Gonçalo da Costa pelos conselhos acerca da purificação do anticorpo, à Ana Moreira e ao Pedro Cordeiro pela ajuda com os testes de expressão do *LiNOS*, e ao Daniel Fonseca, Ana Cristina Silva e Raquel Mesquita, meus colegas de laboratório.

A realização deste trabalho não teria sido possível caso não fosse a cedência dos parasitas por parte da Doutora Ana Tomás, líder do grupo de Parasitologia Molecular (IBMC, Universidade do Porto), a quem quero prestar o meu sincero agradecimento. Agradeço também a preparação do anticorpo anti-*LiNOS* e a cedência do anticorpo anti-GAPDH. Em particular, gostaria de enaltecer o trabalho da Filipa Teixeira, da Márcia Lamy, da Sandra Carvalho, do André Sousa e da Helena Castro, pela preparação dos parasitas e pela clonagem e transfecção do gene do *LiNOS* em *Leishmania*.

Agradeço ao Doutor Carlos Farinha e ao seu grupo, em especial ao Simão Luz, por toda a ajuda, disponibilidade e simpatia, e pelo empréstimo do *scanner* e espectrofotómetro *nanodrop*.

Por fim, agradeço à FCT pelo financiamento dos projectos que me permitiram realizar este trabalho (REDE/1501/REM/2005, PTDC/SAL-MIC/115178/2009 e PEst-OE/QUI/UI0612/2011).

Resumo

A leishmaniose é uma doença que ameaça cerca de 350 milhões de pessoas a nível mundial. O tipo mais grave da doença é a leishmaniose visceral, causada pelo parasita *Leishmania infantum*, com incidência na bacia do Mediterrâneo e América latina. Não existem ainda vacinas humanas nem tratamentos eficazes para a leishmaniose, o controlo desta doença é insuficiente e a área afectada pelo parasita tem aumentado. Consequentemente, a identificação de novos alvos terapêuticos eficazes assume uma elevada importância.

Este projecto teve como principal objectivo caracterizar o sintase do óxido nítrico (NOS) de *Leishmania infantum* a nível estrutural, funcional e cinético ao longo do ciclo de vida do parasita, e o seu potencial como alvo terapêutico dada a relevância deste enzima em processos celulares vitais.

Demonstrou-se pela primeira vez a presença de um NOS constitutivo dependente do cálcio activo nos diferentes estadios do ciclo de vida de *Leishmania infantum*. Foi descoberto que a sua actividade é regulada pelo cofactor tetrahydrobiopterina (BH₄). Apesar da expressão do NOS não variar entre promastigotas e amastigotas, observou-se que a actividade do enzima é mais elevada em promastigotas em fase exponencial de crescimento do que em promastigotas em estado estacionário e amastigotas, evidenciando assim que o NO endógeno desempenha um importante papel importante na infectividade dos parasitas.

Após optimização das condições de produção de NOS recombinante, elucidou-se pela primeira vez a estrutura quaternária do NOS de um tripanosomatídeo. O NOS de *Leishmania infantum* é um homotetrâmero enquanto os NOS de mamíferos são homodímeros. Observou-se ainda que o enzima do parasita não necessita de cofactores para formação da estrutura quaternária, sendo no entanto estabilizado pela ligação do heme e do BH₄. Este enzima é destabilizado termicamente e por exposição ao NO, similarmente ao enzima de mamíferos. As diferenças estruturais e de sequência entre o NOS do parasita e as isoformas de mamíferos sugerem que este enzima seja um potencial alvo terapêutico em tripanosomatídeos.

Palavras chave: Leishmaniose, *Leishmania infantum*, Óxido nítrico, Sintase do óxido nítrico, Promastigota, Amastigota, Heme, Tetrahydrobiopterina

Abstract

Leishmaniasis is a disease that threatens 350 million people worldwide. The most serious type of the disease is the visceral leishmaniasis, caused by *Leishmania infantum* in the Mediterranean sea and Latin America. There are no human vaccines nor efficient treatment methods for the disease, the control of the infected animals is inefficient, and the area affected by the parasite is expanding. Therefore, the discovery of new therapeutic targets is extremely important.

Our aim was to characterize kinetic, functional and structurally the nitric oxide synthase (NOS) from *Leishmania infantum*, during the parasite's life cycle, accessing the potential of the NOS as a therapeutic target, due to its great importance for the cell.

We showed for the first time the existence of a calcium-dependent constitutive NOS, which is active during the different stages of *Leishmania infantum's* life cycle. This enzyme's activity is regulated by the cofactor BH₄, and its expression does not change between promastigotes and amastigotes. However, we showed that its activity is higher in exponential growth phase promastigotes than in stationary phase promastigotes and amastigotes. This way, it was shown that endogenous NO is important for parasite's infectivity.

After optimization of the recombinant enzyme production, we unveiled for the first time the quaternary structure of a NOS from a trypanosomatid. The NOS from *Leishmania infantum* is homotetrameric, while the mammalian NOS are homodimers. It was also observed that the parasite's NOS does not need the presence of cofactors for the assembly of the quaternary structure. However, it is stabilized by the ligation of the heme group and tetrahydrobiopterin (BH₄), and destabilized by high temperature and NO, similarly to the mammalian enzymes. The differences regarding the structure and sequence of the parasite's and mammalian NOS, point this enzyme as a potential therapeutic target in trypanosomatids.

Keywords: Leishmaniasis, *Leishmania infantum*, Nitric oxide, Nitric oxide synthase, Promastigote, Amastigote, Heme, Tetrahydrobiopterin

Abreviaturas

BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BSA	Albumina de soro bovino
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i>
cNOS	NOS constitutivo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>
eNOS	NOS endotelial
FAD	<i>Flavin adenine dinucleotide</i>
FMN	<i>Flavin mononucleotid</i>
FTICR	<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>
GSH	Glutatio (reduzido)
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GSNO	Nitrosoglutatio
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HIV	Virus da imunodeficiência Humana
HPDP-Biotina	<i>N-[6-(biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide</i> - Biotina
iNOS	NOS indutível
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Luria-Bertani
LiNOS	NOS de <i>Leishmania infantum</i>
LTD	<i>long-term depression</i>
LTP	<i>Long-term potentiation</i>
LT-PAGE	<i>Low temperature SDS-PAGE</i>
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
Met-Hb	Metahemoglobina
MMTS	<i>Methyl methane thiosulfonate</i>
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de massa
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NNA	<i>N-nitro-L-arginine</i>
nNOS	NOS neuronal
NO	Óxido nítrico

NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Sintase do óxido nítrico
Oxi-Hb	Oxihemoglobina
PBS	Tampão fosfato salino
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprinting</i>
PTM	Modificação pós-traducional
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécies reactivas de azoto
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
RT	Temperatura ambiente
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TBS	Tampão Tris salino
TBST	TBS com tween 20
TCA	Ácido tricloroacético
V	Velocidade limite
WHO	<i>World Health Organization</i>

Índice

1- Introdução.....	1
1.1 - Género <i>Leishmania</i> e ciclo de vida.....	1
1.2 - Tipos de leishmaniose	2
1.3 - Leishmaniose: Uma enfermidade ainda sem solução!	6
1.4 - <i>Leishmania infantum</i> e leishmaniose visceral na actualidade: um problema crescente	7
1.5 - <i>Sintase do óxido nítrico</i> – Um potencial alvo terapêutico contra <i>Leishmania infantum</i> ..	8
1.6 - Óxido nítrico (NO)	9
1.7 - Funções do NO em mamíferos.....	9
1.8 - Síntese de NO.....	10
1.9 - Isoformas de sintase do óxido nítrico	11
1.10 - Óxido nítrico e <i>Leishmania infantum</i>	13
2 - Objectivos.....	15
3 - Materiais e Métodos.....	16
3.1 - Expressão do NOS recombinante de <i>L. infantum</i>	16
3.2 - Purificação do <i>LiNOS</i> recombinante	16
3.3 - Produção e purificação de anticorpo anti- <i>LiNOS</i>	17
3.4 - Análises por <i>western blot</i>	17
3.5 - Preparação extractos de <i>Leishmania infantum</i>	18
3.6 - Digestão de proteínas <i>in gel</i> para análise por MALDI-FTICR.....	19
3.7 - Análise dos espectros de MS.....	19
3.8 - Ensaio cinéticos	20
3.9 - Identificação do heme em <i>LiNOS</i>	21
3.10 - Estudo estrutural do <i>LiNOS</i> por LT-PAGE: influência do heme, BH ₄ e do NO para a estrutura quaternária.....	21
3.11 - Nitrosilação de proteínas	22
4 - Resultados e Discussão	23
4.1 – NOS de <i>L. infantum</i> : sequência e domínios	23
4.2 - Expressão e purificação do <i>LiNOS</i> recombinante	24
4.3 - Produção e teste funcional do anticorpo anti- <i>LiNOS</i>	28
4.4 - Análise do extracto do parasita por <i>western blot</i>	29

4.4.1 - Purificação do anticorpo	29
4.5 - Estudo cinético do sintase do óxido nítrico de <i>L. infantum</i>	36
4.5.1 Detecção de actividade enzimática em extractos celulares.....	36
4.5.2 - Testes com o inibidor N-Nitro-L-Arginina (NNA)	38
4.5.3 - Influência dos substratos e cofactores da reacção para actividade enzimática.....	39
4.5.4 - Actividade do NOS ao longo do ciclo de vida do parasita	44
4.6 - Determinação da estrutura do LiNOS e elucidação do efeito do heme, do BH ₄ e do NO sobre a mesma	47
4.6.1 - Estudo da estrutura quaternária do LiNOS	48
4.6.1.1 - Preparação de LiNOS recombinante na presença de BH ₄ e heme	48
4.6.1.2 - Análise do LiNOS recombinante por LT-PAGE.....	50
4.6.1.3 - Validação por MS das estruturas identificadas por LT-PAGE	53
4.6.2- Influência do grupo heme e do BH ₄ para a estrutura quaternária do LiNOS.....	55
4.6.3 – Acção do NO sobre o LiNOS.....	58
4.6.3.1 - Nitrosilação do sintase do óxido nítrico de <i>Leishmania infantum</i>	59
4.6.3.2 – Influência do NO sobre a estrutura quaternária do LiNOS	59
5 - Conclusões e perspectivas	64
6 - Anexos.....	66

1- Introdução

1.1 - Género *Leishmania* e ciclo de vida

O género *Leishmania* engloba um conjunto de parasitas protozoários pertencente à família dos Tripanossomatídeos e que são causadores dos diversos tipos de leishmaniose (revisto em [1-3]). Estes parasitas possuem um ciclo de vida tanto dimórfico como digenético, caracterizado pela migração entre dois hospedeiros distintos: a mosca da areia fêmea (*Phlebotomine*) e um mamífero (revisto em [4, 5]).

Na mosca da areia, o parasita subsiste na forma de promastigota extracelular: estado caracterizado pelo aspecto alongado da célula (10-15 μm), por uma reprodução sexuada [6], e pela capacidade móvel conferida pela presença de um flagelo (revisto em [3, 4]). Os promastigotas diferenciam-se e desenvolvem-se ao longo do tracto gastrointestinal do insecto, através de um processo que comporta várias fases, culminando na formação de parasitas metacíclicos. Neste estado, os parasitas encontram-se prontos para infectar um hospedeiro vertebrado, migrando para a cavidade bucal da mosca (revisto em [2, 7, 8]). Quando esta pica um mamífero, os promastigotas metacíclicos são injectados para a corrente sanguínea, tornando-se o mamífero também ele portador de *Leishmania* (revisto em [2, 3]).

Ao percorrer a corrente sanguínea do novo hospedeiro, os promastigotas são fagocitados por macrófagos, iniciando então a segunda fase do seu ciclo de vida. Ocorre uma série de alterações morfológicas e bioquímicas que culminam na diferenciação em amastigota e que possibilitam a adaptação às novas condições acídias no interior dos vacúolos fagocíticos das células fagocitárias (revisto em [1, 2, 4]). Ao contrário dos promastigotas, os amastigotas são intracelulares obrigatórios, não possuem flagelo, e apresentam uma forma circular ou ovular consideravelmente menor que os promastigotas (2-3 μm) (revisto em [1, 2]). A própria reprodução do parasita sofre alterações, passando a ocorrer de forma assexuada (revisto em [2]). É neste ambiente ácido dos vacúolos fagocíticos que os amastigotas proliferam e se multiplicam, acabando por levar à morte e ruptura da célula hospedeira. Desta forma, os parasitas são libertados para o exterior, disseminando-se pelo organismo, voltando posteriormente a ser fagocitados por outras células do sistema imunitário (revisto em [2, 8]).

Quando um mamífero infectado é picado por uma mosca da areia, esta ingere também células fagocitárias repletas de amastigotas. O parasita passa novamente ao estado de promastigota, e o ciclo recomeça (revisto em [2]).

Pode então dizer-se que a mosca da areia funciona como vector para a difusão do parasita, enquanto o mamífero desempenha o papel de reservatório do mesmo, permitindo a sua multiplicação (figura 1) (revisto em [9]). Quando o reservatório corresponde a um ser humano, diz-se que ocorre uma transmissão antrópica, no caso de esse mamífero não corresponder ao homem, mas sim a um outro animal, diz-se um caso de leishmaniose zoonótica (revisto em [10]).

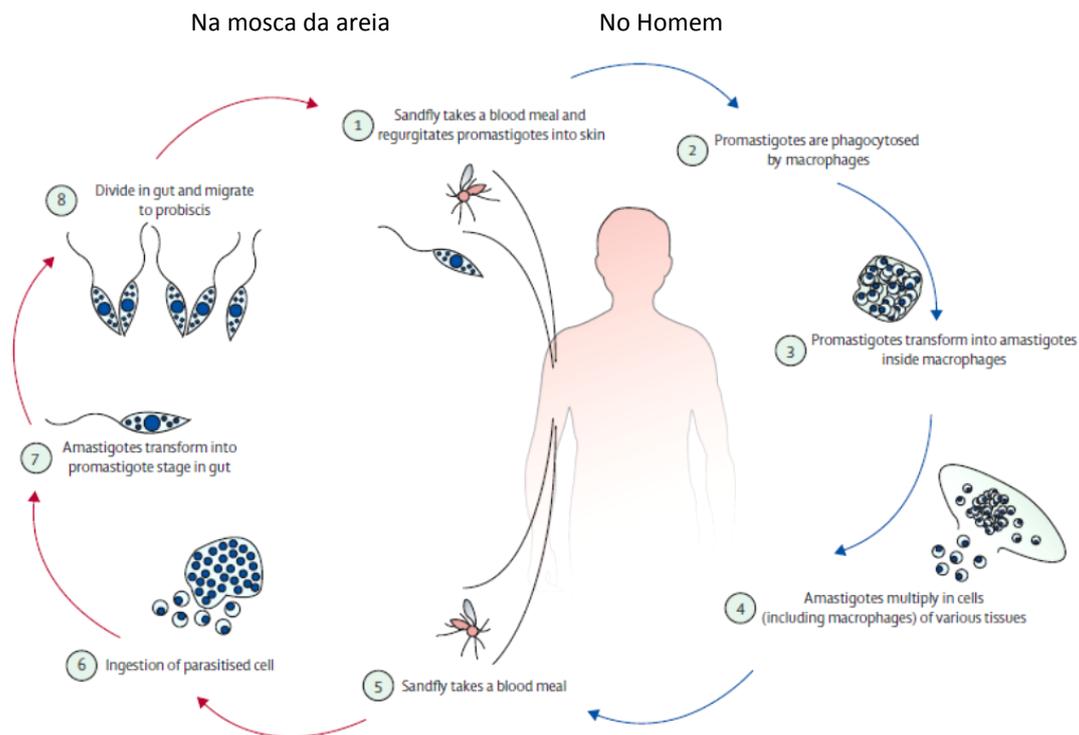


Figura 1: Representação do ciclo de vida do parasita *Leishmania*. Quando uma mosca da areia infectada pica um mamífero, injecta no vertebrado promastigotas infecciosos (1) que dentro das células fagocitárias se desenvolvem em amastigotas (2 a 4). Quando esse mesmo vertebrado é picado por outra mosca da areia, esta alimenta-se de sangue com macrófagos repletos de amastigotas (5 e 6), que na mosca se diferenciam em promastigotas (7 e 8), recomeçando o ciclo [11].

1.2 - Tipos de leishmaniose

A leishmaniose é uma epidemiologia extremamente diversa, na medida em que 20 espécies de *leishmania* são patogénicas para o Homem, enquanto 30 espécies de mosca da areia têm capacidade para transmitir a doença (revisto em [3]). É uma doença com grande impacto a nível mundial, ameaçando cerca de 350 milhões de

peças em 88 países. Segundo a WHO (**W**orld **H**ealth **O**rganization), a prevalência da enfermidade situa-se aproximadamente nos 12 milhões de casos, com uma mortalidade anual de cerca de 60.000 indivíduos (Figura 2), (revisto em [5, 7, 9]).

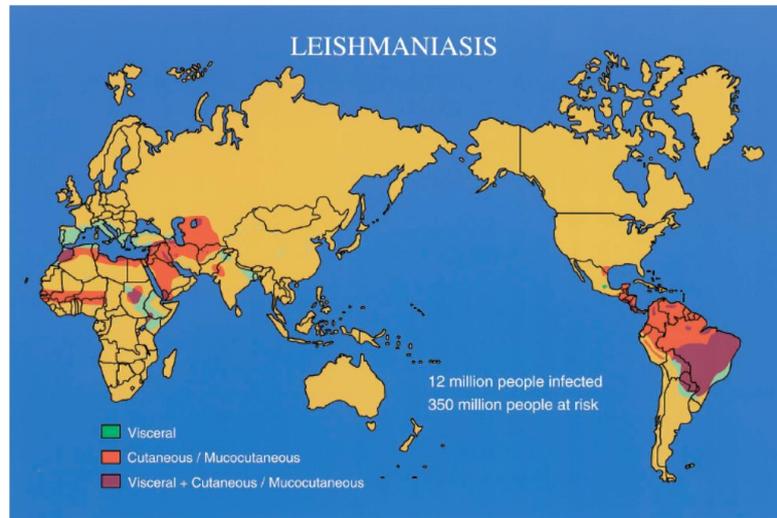


Figura 2: Distribuição geográfica das zonas endêmicas de Leishmaniose visceral e cutânea/mucocutânea [5].

As consequências de infecção com leishmaniose são diversas, variando tanto em termos de sintomatologia como no tempo de progressão e severidade da doença, dependendo da espécie parasitária em questão e da resposta imunitária desencadeada pelo hospedeiro (revisto em [9]). As diferentes respostas sintomáticas provocadas possibilitam a distinção entre 4 tipos de leishmaniose nos humanos (revisto em [3]):

Leishmaniose cutânea: É o tipo mais comum de leishmaniose, sendo endêmica nas regiões tropicais e neotrópicas. É caracterizada pelo desenvolvimento de lesões cutâneas no local picado pela mosca da areia, e que variam consoante a espécie parasitária em questão, podendo levar ao desenvolvimento de úlceras (figura 3) (revisto em [11, 12]). É também o tipo de leishmaniose menos grave, sendo muitas vezes assintomática ou curada espontaneamente (revisto em [13]). Os indivíduos afetados apresentam cicatrizes que se mantêm para o resto da vida. (revisto em [3, 9, 11]).

Ocorre por infecção de *Leishmania mexicana*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania panamensis* nas Américas, e *Leishmania major* e *Leishmania tropica* em todos os outros países (revisto em [14]).



Figura 3: Diversidade sintomatológica da leishmaniose cutânea: (A) Úlceras (causada por *L. tropica*); (B) Destruição da mucosa (causada por *L. brasiliensis*); (C) Lesões secundárias variadas (causada por *L. tropica*); (D) Lesão tratada com ácido de bateria; (E) Pessoa infectada com leishmaniose mucocutânea (adaptado de [7, 11]).

Leishmaniose mucocutânea: A leishmaniose mucocutânea é uma variante de leishmaniose cutânea caracterizada pela destruição das cavidades oral, nasal e da faringe (revisto em [14]). Muitas das vezes a doença tem início no septo nasal, que começa por ficar inflamado, mas que com o passar do tempo tende a ser perfurado. Ocorre também uma deformação das cartilagens do nariz (revisto em [12]). Por outro lado, o palato, a faringe, as amígdalas e os lábios podem também ser afectados por lesões normalmente dolorosas, desfigurantes e que se mantêm por toda a vida (figura 3) (revisto em [3, 7, 12]). Contrariamente à leishmaniose cutânea, esta variante pode chegar a pôr em risco a vida da pessoa afectada, não sendo tratada sem o auxílio de medicamentos (revisto em [14]).

A progressão da leishmaniose para este tipo de condição deve-se à migração dos parasitas até às mucosas, ocorrendo portanto posteriormente ao aparecimento da leishmaniose cutânea comum. Visto que muitas das vezes a leishmaniose cutânea tende a ser curada espontaneamente, a evolução para esta variante mais grave está normalmente associada a lesões múltiplas ou persistentes com duração superior a um ano, como também a lesões mal curadas (revisto em [12]).

Ocorre por infecção por *Leishmania* do subgénero *Viannia*, normalmente presente nas Américas (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania guyanensis*) (revisto em [14]).

Leishmaniose cutânea difusa: É um tipo raro de leishmaniose provocado por um sistema imunitário deficitário, nomeadamente uma imunidade celular comprometida (promovendo uma infecção anérgica, sem resposta imunitária ao parasita). Nunca se cura espontaneamente, e devido à sua gravidade é tida como um

problema para a saúde pública (revisto em [3, 12, 13]). É caracterizada por lesões nodulares disseminadas e não ulcerativas, semelhantes ao que se observa na lepra. A resposta aos tratamentos por parte desta variante da doença é apenas parcial, tornando-se frequentemente crónica (revisto em [12, 15]).

Leishmaniose visceral (kala-azar): A leishmaniose visceral é uma enfermidade sistémica causada pela disseminação do parasita através do sistema reticuloendotelial do hospedeiro, afectando assim os órgãos vitais (revisto em [12, 16]). Por esta razão, é o tipo mais grave de leishmaniose, sendo uma doença crónica e debilitante caracterizada por febres elevadas, esplenomegalia, hepatomegalia, hiperglobulinemia, pancitopenia, redução da imunidade celular, xerose, anemia, entre outros (figura 4) (revisto em [3, 12, 16, 17]). O desenvolvimento de xerose, em conjunto com um aumento da actividade melanoblástica, leva normalmente a um escurecimento da pele (revisto em [12, 16]). Esta característica está na origem da denominação de “kala-azar”, ou “febre-negra” (revisto em [16]). As principais espécies causadoras de leishmaniose visceral são: *L. donovani* na Índia e África Central, e *L. infantum* nas Américas, Médio Oriente, Ásia Central, China e Mediterrâneo, sendo que 90% dos casos em humanos tendem a ocorrer na Índia, Bangladesh, Sudão e Brasil (revisto em [17]).

Para além desta miríade de sintomas, existem também muitos casos assintomáticos (dependendo uma vez mais da espécie do parasita e da resposta imunitária do hospedeiro, mas também de outros factores como idade e estado nutricional) (revisto em [18, 19]). Este aspecto da doença pode ter graves consequências para a propagação da mesma, devido por exemplo a transfusões de sangue provenientes de pessoas cuja condição não tenha sido diagnosticada (revisto em [19]).

No período que vai de alguns meses até 2 a 7 anos subsequentemente à aparente recuperação de leishmaniose visceral, é possível que os pacientes desenvolvam um tipo de leishmaniose cutânea normalmente designado leishmaniose dérmica pós-kala-azar. Esta patologia é normalmente bastante difícil de tratar e requer medicamentos caros que devem ser ingeridos durante longos períodos de tempo, sendo caracterizada pelo aparecimento de manchas hipopigmentadas e nódulos (figura 5) (revisto em [3, 20, 21]).



Figura 4: Crianças com hepatomegalia derivada de infecção com leishmaniose visceral [18].



Figura 5: Paciente com manchas hipopigmentadas e nódulos devidos a leishmaniose dérmica pós-kalazar [21].

1.3 - Leishmaniose: Uma enfermidade ainda sem solução!

Apesar da grande incidência global da leishmaniose, e do risco latente de epidemias, o desenvolvimento de vacinas para a doença não se tem apresentado como um alvo prioritário para a indústria, na medida em que esta é uma doença que afecta principalmente pessoas pobres (revisto em [10, 22]). Sendo assim, e apesar de muitos antigénios de *Leishmania* terem já sido identificados como potenciais alvos para vacinas, poucos foram aqueles realmente testados (revisto em [17]).

Por falta de uma vacina que vise especificamente algum antigénio do parasita, são ainda vários os países que utilizam a designada “leishmanização”, técnica esta segundo a qual são utilizados parasitas intactos desenvolvidos em cultura para imunizar o paciente. No entanto, dada a complexidade da resposta imunitária, é impossível prever o desfecho de tal procedimento (revisto em [22]). Sendo assim, a eficiência do processo é limitada, variando entre 0-75% para a leishmaniose cutânea, e 0-6% para a leishmaniose visceral (revisto em [23]). Para além do mais, este tipo de vacinas acarreta também problemas relacionados com a padronização da virulência do parasita, ou o ocasional desenvolvimento de lesões resultantes da injeção dos mesmos. Como tal, continua sem existir uma verdadeira vacina para a leishmaniose (revisto em [24]). Sendo assim, o combate à leishmaniose é apenas feito utilizando os fármacos existentes, e que são ainda limitados (revisto em [24]).

Actualmente, a primeira linha de medicação tanto contra a leishmaniose cutânea como visceral continua a ter por base químicos desenvolvidos em 1945, os antimónios pentavalentes (*Glucantime* e *Pentostam*) (revisto em [9, 16]). Estes são fármacos que, de uma forma ainda desconhecida, inibem o metabolismo glicolítico e de ácidos gordos do parasita. Contudo, são bastante tóxicos para quem os ingere, provocando antralgias, mialgias, desconforto abdominal, alterações dos níveis de enzimas hepatocelulares, entre outros (revisto em [12, 15]). Para além disso, tem-se observado uma crescente resistência parasitária a este tipo de tratamento (revisto em [3, 9]).

Numa segunda linha de fármacos anti-leishmaniose encontram-se a anfotericina-B e a pentamidina. Estes actuam sob o ergosterol presente na membrana celular do parasita, aumentando a permeabilidade da mesma (revisto em [15]). No entanto, sofrem dos mesmos defeitos que os antimónios pentavalentes, ou seja, apresentam elevados efeitos secundários (como toxicidade renal (revisto em [15])), e a eficiência tem também vindo a decair devido ao desenvolvimento de resistência por parte do parasita (revisto em [9, 16]).

Uma outra razão que torna os fármacos actuais pouco eficientes é o facto de não conseguirem curar definitivamente a doença (revisto em [16]).

1.4 - *Leishmania infantum* e leishmaniose visceral na actualidade: um problema crescente

O parasita *Leishmania infantum* é responsável pela transmissão da variante mais grave de leishmaniose, a leishmaniose visceral (revisto em [25]). Segundo os registos, cerca de 500.000 pessoas serão infectadas anualmente por este tipo de leishmaniose (revisto em [16]). *L. infantum* é endémico na zona do Mediterrâneo, tendo o cão como o seu principal hospedeiro e reservatório, sendo por isso um caso de leishmaniose zoonótica (o hospedeiro principal é um animal, e não o Homem) (revisto em [17, 26]).

Em termos de transmissão a humanos, as crianças mais jovens e os indivíduos imunocomprometidos são os mais afectados (revisto em [17, 27]). Neste contexto, os casos de co-infecção de leishmaniose/HIV ganham especial preponderância, estando mesmo na origem da importância crescente conferida à leishmaniose visceral na Europa. Inicialmente, esta era tida como uma doença pediátrica, contudo, entre o final da década de 80 e o início de 2001, foram detectados mais de 1900 casos de co-infecção com leishmaniose e HIV. Observou-se então que em muitos dos casos a infecção por *Leishmania* tinha ocorrido antes do contágio com HIV (apesar da ausência de sintomas). Isto mostrou que o parasita poderia ter um comportamento oportunista,

devendo existir um grande número de indivíduos assintomáticos (e portanto não diagnosticados) (revisto em [28]).

Esta situação adquire contornos ainda mais preocupantes se for tido em consideração o risco de crescimento das zonas afectadas. Isto deve-se em parte a um controlo insuficiente tanto do vector do parasita, como do cão como organismo reservatório (que tem visto assim a sua prevalência aumentada) (revisto em [24, 26]). Outro factor de grande importância é o aumento das regiões afectadas pela *L. infantum* (a partir da região mediterrânica), como consequência da actividade humana, nomeadamente uma adaptação proporcionada pelo aquecimento global, pela desflorestação e pela urbanização (revisto em [10, 24]).

Por estas razões, o parasita *L. infantum* é um problema latente para a saúde pública (revisto em [10]), e que requer medidas de prevenção. A abordagem a tomar poderá passar por um maior controlo da infecção tanto no vector (mosca da areia) como nos hospedeiros (cães) (revisto em [26]). Por outro lado, dadas as lacunas existentes no tratamento da leishmaniose em geral, o desenvolvimento de terapêuticas eficazes tanto para humanos como animais adquire uma importância crescente. Neste sentido, é imperativo encontrar novas formas de combate à *L. infantum*, o que pode passar pela descoberta de novos alvos terapêuticos. A sequenciação do genoma tanto do parasita como dos vectores (mosca da areia), poderá prestar um enorme contributo neste sentido (revisto em [18]). Contudo, apesar da grande quantidade de informação disponibilizada, muito trabalho é ainda necessário, pois cerca de 65% dos genes que codificam para proteínas ainda não possuem funções identificadas (revisto em [29]).

1.5 - Sintase do óxido nítrico – Um potencial alvo terapêutico contra *Leishmania infantum*

A exploração de proteínas específicas como alvos terapêuticos é uma estratégia promissora e racional contra as doenças causadas por tripanosomatídeos. Começa com a identificação de candidatos-alvo no parasita, tendo por base tanto as diferenças que apresentem relativamente ao hospedeiro como a essencialidade das mesmas para o parasita.

Neste sentido, a informação fornecida pela sequenciação do genoma de *L. infantum* possibilitou a inferência do transcriptoma do parasita, facilitando assim pesquisa de possíveis alvos terapêuticos. No entanto, nem todos os genes do hospedeiro têm homólogos anotados no parasita. Uma das proteínas cuja existência não foi prevista com base na informação genética foi o sintase do óxido nítrico (*nitric oxide synthase* (NOS), EC 1.14.13.39), não existindo qualquer anotação do gene que codifica para este enzima no genoma de nenhum tripanosomatídeo. Recentemente o

gene que codifica para um NOS foi identificado em *L. infantum*, com base numa pesquisa de domínios característicos do enzima, sendo a sua identidade confirmada experimentalmente com ensaio de actividade [30]. A sequência desse NOS de *Leishmania infantum* apresenta uma baixa homologia com os seus homólogos de mamífero, como tal, tendo em consideração a importância que o NOS tem para os organismos, este poderá ser um alvo terapêutico ideal para o combate ao parasita, na medida em que poderá ser possível actuar selectivamente sobre o enzima de *Leishmania* [30].

1.6 - Óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico é um radical livre gasoso que era inicialmente reconhecido pela sua toxicidade para os seres vivos (especialmente como um gás poluente) [31, 32]. Daí que a descoberta em 1987/88 da via de síntese do mesmo pelo *nitric oxide synthase* em células endoteliais tenha sido recebida com cepticismo (revisto em [32, 33]). No entanto, hoje em dia é ponto assente que o NO é sintetizado não só virtualmente em todas as células de mamíferos mas também em outros organismos mais simples, através da oxidação da L-arginina a L-citrulina catalisada pelo NOS (revisto em [34, 35]). O NO tem um tempo de vida muito curto, visto na presença de oxigénio ser convertido sequencialmente a nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (revisto em [36]).

À medida que a importância do NO para os organismos vivos tem sido elucidada, a via L-arginina:NO tem ganho cada vez mais preponderância no mundo científico (revisto em [34]).

1.7 - Funções do NO em mamíferos

O óxido nítrico é uma molécula efectora e sinalizadora com importância reconhecida para diversos sistemas do organismo de mamíferos (revisto em [33, 37]). A forma clássica desta sinalização promovida pelo NO resulta da reacção do mesmo com o enzima guanilato ciclase solúvel, aumentando a formação de cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*), que desencadeará então cascatas de fosforilação culminando na resposta por parte da célula (chamada via NO-cGMP) (revisto em [33]). Por outro lado, existem formas não clássicas de sinalização mediada pelo NO, uma das quais é exercida sob o citocromo c oxidase presente na cadeia respiratória. Ao competir com o oxigénio pela ligação aos grupos heme deste enzima, o NO regula o consumo de oxigénio e a produção de espécies reactivas de oxigénio (revisto em [33, 38]). O NO regula ainda a actividade de diversas proteínas através da nitrosilação de grupos tiol (revisto em [34]). Um exemplo disto mesmo é o *feedback* negativo que o NO exerce sob o NOS após nitrosilação do mesmo [39-41].

Através dos referidos mecanismos de sinalização, o NO apresenta múltiplas funções para o organismo. Uma das quais é a regulação do sistema cardiovascular, actuando como vasodilatador, antitrombótico, possuindo também propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias, e preventivas da formação de ateromas (revisto em [42]).

O NO é também extremamente importante para o sistema nervoso, funcionando como neurotransmissor, e estando envolvido em processos de plasticidade sináptica (*long-term potentiation* (LTP) e *long-term depression* (LTD)). Desta forma, é associado a processos de aprendizagem e memória (revisto em [43]).

Outro papel fundamental do NO organismo é desempenhado no sistema imunitário, funcionando como espécie tumoricida e antimicrobiana produzida pelos macrófagos. Esta é a função mais clássica do óxido nítrico na defesa do organismo, podendo também ter um efeito anti-inflamatório, modular a produção de citocinas e quimiocinas, controlar o desenvolvimento de células do sistema imunitário, regular a expressão genética, entre outras (revisto em [44]).

Hoje em dia, a gama de funções biológicas conhecidas desempenhadas pelo NO é já diversa, no entanto, muitos dos processos que se pensa serem influenciados por este radical necessitam ainda de confirmação e compreensão. É portanto certo que mais descobertas serão feitas, e que a importância concebida ao NO deverá ainda aumentar (revisto em [45]).

1.8 - Síntese de NO

A síntese de óxido nítrico ocorre através da conversão de L-arginina e oxigénio molecular a NO e citrulina, consistindo a via L-arginina:NO (figura 6) (revisto em [32, 34, 45, 46]). Para além dos substratos, o enzima necessita também da ligação à calmodulina e da presença de cinco cofactores/cosubstratos: um grupo heme, FMN (*Flavin mononucleotid*), FAD (*Flavin adenine dinucleotide*), NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) e BH₄ (tetrahidrobiopterina) (revisto em [32]). Todos os NOS são constituídos por um domínio oxigenase N-terminal (que liga o heme, o BH₄, e que contém o centro activo, ligando portanto também a arginina), e por um domínio redutase C-terminal (que por sua vez liga as flavinas (FMN e FAD), NADPH e calmodulina). O domínio redutase apresenta elevada homologia com outros enzimas que ligam FMN e FAD, nomeadamente o citocromo P-450 (revisto em [32]). Na interface dos dois domínios está localizado o local de ligação à calmodulina [47].

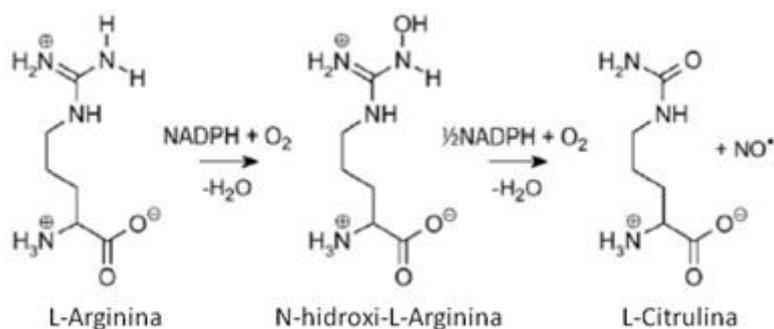


Figura 6: Síntese de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina. Quando no centro activo do enzima, a L-arginina sofre duas oxidações, levando formação do intermediário N-hidroxi-L-arginina, e à conversão de oxigénio (que se encontrava ligado ao grupo heme) a água. Este intermediário sofre mais duas oxidações, levando à síntese de L-citrulina e NO, e à libertação de mais uma molécula de água (adaptado de [45]).

A reacção de síntese de NO envolve duas mono-oxidações da L-arginina (figura 6). Numa primeira fase, as flavinas FMN e FAD recebem 2 electrões do NADPH, e transferem-nos para o grupo heme, tornando assim possível a ligação de oxigénio (revisto em [32, 46]). Esta transferência de electrões das flavinas para o heme é desencadeada pela calmodulina, cuja ligação ao NOS pode ser dependente da presença de cálcio (como tal, este metal pode também funcionar como regulador da actividade enzimática), (revisto em [32, 48]). Após esta primeira fase de ligação do oxigénio ao heme, o BH₄ fornece mais um electrão e um protão ao complexo ferro hémico-oxigénio, ocorrendo então a formação do intermediário N-hidroxiarginina e libertação de água. A regeneração do BH₄ ocorre por intermédio de electrões provenientes das flavinas (FMN e FAD), (revisto em [49]).

Na segunda etapa do processo de catálise (oxidação do intermediário N-hidroxiarginina) as reacções são similares às que ocorreram na primeira fase, mas a com diferença de ocorrer apenas a transferência de um electrão proveniente do NADPH. Todos os cofactores já referidos voltam a ser necessários, culminando na síntese de citrulina e NO (revisto em [49, 50]).

1.9 - Isoformas de sintase do óxido nítrico

Em mamíferos, foram identificadas três isoformas diferentes de NOS: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS indutível (iNOS) (revisto em [32]). Cada uma das três variantes corresponde ao produto de um gene distinto (figura 7), apresentando entre 50-60% de homologia entre si [40, 51].

As diferenças entre as três isoformas não se limitam apenas aos aspectos genéticos, divergindo também em termos de localização subcelular, distribuição nos tecidos, e modo de regulação (revisto em [35, 40]). No entanto, apresentam também fortes semelhanças, na medida em que todas elas são homodimericas (revisto em [35]), apresentam o mesmo mecanismo de reacção (ver secção “Síntese de NO”), e a manutenção da estrutura quaternária é fundamental para a actividade enzimática (revisto em [34, 49, 50]).

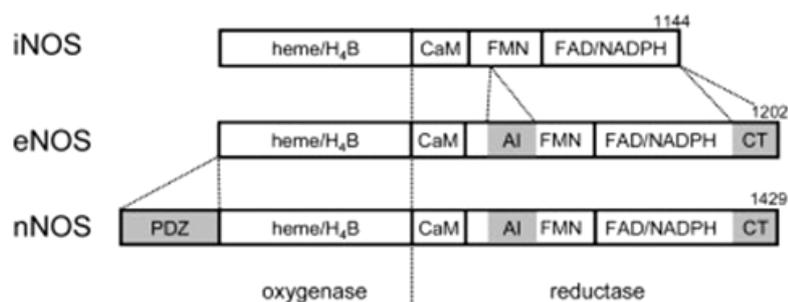


Figura 7: Alinhamento das várias isoformas de sintase do óxido nítrico de mamífero, com indicação dos locais de ligação aos diversos cofactores e cosubstratos (heme, BH₄, Calmodulina, FMN, FAD e NADPH) (adaptado de [45]).

nNOS – Foi a primeira isoforma a ser purificada e clonada [32]. Possui entre 150 e 160 kDa [46] e é constitutivamente expressa nas células nervosas, músculo-esquelético, músculo-cardíaco e terminais sinápticos de nervos não adrenérgicos e não colinérgicos disseminados pelo corpo (como no tracto gastrointestinal e respiratório, certas células epiteliais, entre outros), (revisto em [35, 45, 46]). É uma isoforma que detém uma elevada actividade tanto no cérebro como nos músculos esqueléticos, sendo dependente de cálcio e da calmodulina (revisto em [32]). No cérebro, o nNOS é activado pelo influxo de Ca²⁺ no decurso de neurotransmissão excitatória (revisto em [32, 35]).

eNOS – Tal como o nNOS, esta variante é também constitutiva, sendo expressa no endotélio vascular (revisto em [32]). É uma proteína miristoilada de membrana com 135 kDa, cuja actividade é regulada pelo Ca²⁺ (o cálcio permite a ligação da calmodulina e a activação do enzima). Contudo, contrariamente ao nNOS, o eNOS não possui uma actividade elevada, não sendo portanto responsável pela produção de grandes quantidades de NO. É a variante do enzima responsável pela regulação do sistema cardiovascular (revisto em [46]).

iNOS – O iNOS é uma proteína citosólica de entre 125 e 135 kDa, que foi pela primeira vez isolada a partir de macrófagos de rato (revisto em [46]). Ao contrário das outras duas isoformas de NOS, o iNOS não é constitutivo, mas sim expresso como resposta do sistema imunitário a diversos factores, nomeadamente à presença de citocinas, hipoxia, poliósidos bacterianos, entre outros (revisto em [32, 45, 46]). Para além dos macrófagos, a expressão de iNOS tem sido documentada em muitos outros tipos de células, como miócitos cardíacos, células epiteliais, microglia do cérebro, células de Kupffer, osteoblastos, entre outras. Mesmo na presença de baixas concentrações de Ca^{2+} , o iNOS liga fortemente a calmodulina, o que torna a sua actividade praticamente independente do cálcio (revisto em [46]). Esta variante de NOS desempenha um papel antitumoricida ao permitir aos macrófagos sintetizar NO (revisto em [44]).

1.10 - Óxido nítrico e *Leishmania infantum*

O radical NO desempenha um papel fundamental para o sistema imunitário. A defesa do organismo desempenhada por este radical estende-se também ao combate a parasitas tripanossomatídicos. Desta forma, o NO apresenta também elevada relevância protecção contra infecções por *Leishmania infantum*, sendo a principal forma de combate às infecções pelo parasita. Neste sentido, o NO promove a apoptose dos amastigotas existentes no interior de macrófagos (revisto em [52-54]).

Contudo, o mecanismo molecular da acção do NO ainda não está bem elucidado (revisto em [55, 56]), pensando-se que possa actuar em conjunto com outras espécies reactivas de oxigénio e azoto (ROS e RNS) para danificar DNA, proteínas e lípidos do parasita [57]. Por outro lado, pouco se conhece acerca da resistência natural da *Leishmania infantum* a este radical, existindo no entanto alguns estudos a esse nível.

Num outro, foi descrita a sobreexpressão de proteínas de *stress (heat shock proteins 83, 70 e 65)* como resposta à exposição de parasita ao NO [58], levando assim a um aumento da resistência do mesmo. Por outro lado, está também documentada a regulação exercida pela *Leishmania infantum* sob a quantidade de NO produzido pelo macrófago, seja através da modulação da expressão do mRNA de iNOS ou da actividade do enzima [59-62], reduzindo assim a produção de RNS [63, 64].

Alguns estudos efectuados em organismos do género *Leishmania* apontam no sentido da existência da via L-arginina/NO no parasita [65-67]. Tanto o NOS de *L. donovani* [68] como o NOS constitutivo de *L. amazonensis* [67, 69] já foram purificados, e a síntese de NO foi demonstrada em *Leishmania chagasi*, *amazonensis* e *braziliensis*. Contudo, a importância tanto do enzima como da produção de NO em *Leishmania* ainda não foram esclarecidas [70]. Mais recentemente, o gene que codifica para o NOS de *Leishmania infantum* foi clonado e expresso em *E. coli*, consistindo

assim o primeiro trabalho em que o gene de um NOS de tripanossomatídeo foi identificado [30]. O trabalho desenvolvido com a respectiva proteína recombinante revelou que, apesar de não existir qualquer similaridade com as isoformas humanas, o enzima exibe uma actividade clássica de NOS. Apesar do significado biológico deste enzima permanecer desconhecido, a presença de modificações pós-traducionais causadas pelo NO (nitrosilação) em proteínas de *Leishmania* essenciais para a infecção e diferenciação do parasita (resultados não publicados), sugere que este enzima exerce um papel fundamental no desenvolvimento do parasita.

Desta forma, é lícito levantar interrogações acerca da importância da síntese endógena de NO pela *Leishmania infantum* (como por exemplo, a possibilidade do NO sintetizado pelo parasita regular a produção do mesmo pela célula hospedeira) [70].

2 - Objectivos

Tendo em conta a grande importância que o NO tem para os seres vivos, o NOS é um enzima essencial para o bom funcionamento dos diversos organismos. Por outro lado, é também conhecida a importância que o NO apresenta no combate à *Leishmania infantum*, havendo também evidências da existência da via L-arginina/NO em *Leishmania*. Como tal, o objectivo primordial deste projecto é a caracterização do sintase do óxido nítrico de *L. infantum* ao longo do ciclo de vida do parasita, a nível cinético, funcional e estrutural. Pretende-se obter informação acerca da relevância do enzima (e consequentemente da síntese de NO) no desenvolvimento e infectividade do parasita.

Este projecto tem como objectivo a longo prazo a identificação do potencial deste enzima como alvo terapêutico, não só contra o parasita *L. infantum*, mas também contra outras doenças causadas por tripanossomatídeos, como a tripanossomíase.

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Expressão do NOS recombinante de *L. infantum*

A expressão do *LiNOS* recombinante (com uma cauda de 6 histidinas no N-terminal) em *E. coli* BL21-plus foi otimizada anteriormente [30]. Foram preparadas pré-culturas de 15 mL, crescidas a 37°C em meio LB suplementado com 34 µg/mL de cloranfenicol, 34 µg/mL de canamicina, e 0,1% de glucose, que serviram para inocular 400 mL de meio LB, também suplementado com 34 µg/mL de cloranfenicol, 34 µg/mL de canamicina, e 0,1% de glucose. As células cresceram a 37°C com agitação até atingirem a fase exponencial (Abs_{600nm} entre 0,6 e 0,8), e a expressão foi induzida por adição de IPTG para uma concentração final de 0,5 mM. A expressão decorreu durante 3 horas a 37°C, tendo as células sido posteriormente centrifugadas a 13000 g durante 10 min. Os *pellets* de células foram utilizados para purificar o enzima ou armazenados a -20°C.

Para expressão de enzima hémico, foram adicionados 6 µM de cloreto de hemina ao meio de cultura, e o procedimento anterior foi seguido. A solução de hemina foi preparada por diluição de 6,52 mg de hemina em 250 µL de NaOH 0,1 M, sendo então adicionados 0,1 g de Tris-base, 9,55 mL de H₂O e finalmente 0,2 mL de HCl 0,1 M [30].

3.2 - Purificação do *LiNOS* recombinante

Os *pellets* das células foram ressuspensos em PBS pH 7,4, à razão de 50 mL para cada litro de cultura. As células foram sonicadas 15 vezes, a 70%, com ciclos de 0,7 e durante 10 segundos (sonicador UP200S, hielscher Ultrasounds technology). O lisado celular foi centrifugado a 13000 g durante 15 minutos, tendo-se eliminado o sobrenadante, uma vez que este enzima é expresso na fracção insolúvel. O *pellet* foi ressuspensado sequencialmente em PBS pH 7,4 com 4M ureia e PBS pH 7,4 com 8M ureia. As centrifugações intermédias a estes passos foram realizadas a 13000 g durante 7 minutos. A solubilização do *LiNOS* (massa molecular 64,1 kDa) foi analisada por SDS-PAGE (em gel de poliacrilamida a 10% em Tris, tampão de *loading* Tris-HCl a 62,5 mM, 25% glucose, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 5% azul de bromofenol, e tampão de corrida Tris-Glicina, 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS, a pH 9,0).

O sobrenadante final, que continha o enzima, foi congelado em azoto líquido e posteriormente incubado com *beads* magnéticas revestidas de níquel (Pure Proteome, Nickel Magnetic Beads, Millipore), à razão de 750 µL de beads para 8 mL de sobrenadante, durante 2h para purificação da proteína His6-LiNOS.

A eluição do enzima das *magnetic beads* foi efectuada de forma sequencial com 2 mL de PBS pH 7,4 contendo 8 M de ureia com concentrações crescentes de imidazolo: 5 mM, 25 mM, 50 mM, 250 mM (três vezes), 500 mM e 1 M.

Após eluição, as fracções contendo o LiNOS foram identificadas por SDS-PAGE, e a proteína foi concentrada utilizando amicons ultra de *cut-off* 10 kDa (Millipore). A concentração da proteína foi determinada utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay, baseado no método de Bradford, segundo as indicações do fabricante.

3.3 - Produção e purificação de anticorpo anti-LiNOS

O anticorpo anti-LiNOS foi produzido em ratos Wistar (Charles River, Spain) no Instituto de Biologia Molecular e Celular (Porto, Portugal), através de cinco injeções subcutâneas repetidas em adjuvante de Freund completo e incompleto (primeiro inóculo e *boosts*, respectivamente). O anticorpo foi purificado por afinidade, utilizando uma membrana de PVDF contendo a proteína recombinante. Neste sentido, a proteína recombinante foi carregada em todas as *lanes* e separada por SDS-PAGE. O gel foi transferido durante 1 hora e 30 minutos para uma membrana de PVDF, que foi depois corada com corante de Ponceau (0,1% Ponceau S, em ácido acético 1%) durante 2 min. A zona contendo a proteína LiNOS foi cortada e bloqueada em 5% leite durante 1 hora a RT, e posteriormente incubada *overnight* a 4°C com o soro imune diluído 1:20 em TBS. A membrana foi lavada três vezes em TBST, durante 2 minutos cada lavagem. O anticorpo foi eluído com 3 lavagens de 2 min cada (com agitação) em 2 mL de tampão glicina 0,1 mM, pH 2,5. Após cada ronda de eluição do anticorpo, 100 µL de tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, foram adicionados à solução (para neutralizar o pH ácido do tampão glicina-HCl). Finalmente, o anticorpo foi concentrado e a glicina foi retirada usando amicons ultra de *cut-off* 10 kDa (Millipore). A concentração do anticorpo purificado foi estimada utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay. A diluição do anticorpo a utilizar para o *western blot* foi otimizada utilizando proteína recombinante.

3.4 - Análises por western blot

As proteínas a analisar (recombinante ou extractos celulares de parasitas) foram separadas por SDS-PAGE (ou LT-PAGE) e transferidas para uma membrana de

PVDF. A membrana foi bloqueada em leite em pó 5% diluído em TBST, durante 1 hora à temperatura ambiente ou *overnight* a 4 °C.

As análises do enzima *LiNOS* por *western blot* foram feitas utilizando o anticorpo produzido em ratos Winstar pelo grupo de Parasitologia Molecular (IBMC-UP). O anticorpo foi diluído em TBST com 5% de leite em pó (a diluição variou consoante o lote de anticorpo purificado). Para a proteína recombinante, incubou-se a membrana durante 2 horas com o anticorpo, e para os extractos celulares a incubação decorreu *overnight* a 4°C. A membrana foi lavada 30 minutos em TBST e incubada 1 hora com o anticorpo secundário anti-rato (Sigma), diluído 1:3000 em TBST com 5% de leite em pó. Lavou-se a membrana 40 minutos em TBST, antes de revelar. Foi utilizado o reagente de revelação ECL Western Blotting Substrate (Pierce) no caso do enzima recombinante e o Western Lightning-ECL (Perkin-Elmer), mais sensível, no caso do extracto celular.

Para a análise da expressão do enzima GAPDH (usado como *loading control*), utilizou-se um anticorpo anti-GAPDH cedido pelo grupo de Parasitologia Molecular (IBMC-UP), diluído 1:10000 em TBST com 5% de leite em pó, e incubado com a membrana *overnight* a 4 °C. Para anticorpo secundário utilizou-se um anticorpo anti-coelho (Sigma), diluído 1:4000 em TBST com 5% de leite em pó. O restante procedimento foi idêntico ao descrito.

3.5 - Preparação extractos de *Leishmania infantum*

Os parasitas em estadio de promastigota foram crescidos em meio SDM79 suplementado com 10% de soro fetal bovino e os amastigotas foram crescidos em meio MAA20 (fornecidos pelo grupo de Parasitologia Molecular do IBMC). As células (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ promastigotas em fase exponencial de crescimento, $1,2 \times 10^9$ promastigotas em fase estacionária, e 7×10^8 amastigotas) foram ressuspensas em diferentes tampões dependendo da sua utilização.

Os extractos para os ensaios cinéticos foram preparados em tampão Tris-HCl 1M, pH 7,5, suplementado com 20% glicerol, 1 mM EDTA, 0,4% Triton X-100, à razão de 16 mL por mg de *pellet*. Foram adicionados inibidores de proteases complete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, *EASYpack* (Roche), e os parasitas foram sonicados quatro vezes durante 15 segundos a amplitude de 50% e com ciclos de 0,5 segundos. O extracto celular foi centrifugado 15 minutos a 10000 rpm a 4°C em microcentrifuga, e os sobrenadantes foram recolhidos.

Os extractos para análise por SDS-PAGE e *western blot* foram preparados em PBS, pH 7,4, à razão de 16 mL por mg de *pellet*. O restante procedimento não foi alterado.

Os doseamentos da concentração proteica foram feitos utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay, segundo as indicações do fabricante.

3.6 - Digestão de proteínas *in gel* para análise por MALDI-FTICR

A solução proteica a analisar foi separada por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 10% (como descrito anteriormente). O gel foi corado com azul brilhante de coomassie. As zonas onde se encontravam as proteínas de interesse foram excisadas manualmente com uma lâmina e o procedimento subsequente foi baseado no método de Shevchenko e colaboradores [71]. Os pedaços de gel foram lavados 10 min com água mili-Q suficiente para cobrir os pedaços de gel. Seguiram-se lavagens com 50 μL de acetonitrilo a 50% (até a solução de lavagem vir incolor), e desidratação com 50 μL de acetonitrilo a 100%. As proteínas foram reduzidas com 50 μL de 10 mM DTT em 100 mM de hidrogenocarbonato de amónio, durante 45 min a 56^o C com agitação. Seguidamente, as amostras foram alquiladas com 55 mM de iodocetamida em 100 mM de hidrogenocarbonato de amónio durante 30 min no escuro, para prevenir formação de ligações persulfureto. A iodocetamida foi removida, e as bandas de gel lavadas com 50 μL de acetonitrilo a 50%, seguido de 50 μL de acetonitrilo a 100% e secaram ao ar.

Para a digestão *in gel*, foram adicionados 30 μL de 6,7 ng/ μL de tripsina (sequencing grade modified, Promega) em 50 mM de hidrogenocarbonato de amónio a cada amostra a analisar, e incubadas 30 min em gelo. Nos casos em que a solução de tripsina foi absorvida pelo gel, tornando-se insuficiente para cobrir as amostras, mais tripsina foi adicionada, e o processo repetido. No fim, o excesso de solução não absorvida foi removida, e foram adicionados 30 μL de 50 mM hidrogenocarbonato de amónio (sem tripsina). As amostras foram incubadas durante 16h a 37 $^{\circ}\text{C}$. A solução contendo os péptidos a analisar foi removida e guardada a – 20 $^{\circ}\text{C}$.

Para análise por MALDI-FTICR, as soluções contendo os péptidos foram injectadas em microcolunas com resina R2 construídas a partir de GELoaders, e eluídas com 1 μL de solução de acetonitrilo a 50%, ácido fórmico a 0,1%, saturada de ácido hidroxicinamico-4-ciano (Sigma), directamente para uma placa de MALDI (MALDI target AnchorChip, Brüker Daltonics).

3.7 - Análise dos espectros de MS

Os espectros da massa foram obtidos por MALDI-FTICR num espectrómetro de massa Apex Ultra, Apollo II Combi-Source (Brüker Daltonics), com magneto de 7 Tesla (Magnex Corporation). A determinação das massas monoisotópicas foi conseguida utilizando o algoritmo SNAP2, do *software* Data Analysis 4.0 (Brüker Daltonics). Os espectros da proteína recombinante foram calibrados internamente, servindo estes dados para calibrar externamente os espectros obtidos a partir do extracto. O

tratamento e análise dos dados foram feitos com o *software* BioTools 3.2 (Brüker Daltonics) e a identificação das proteínas com o programa MASCOT (www.matrixscience.com).

3.8 - Ensaio cinéticos

Os ensaios cinéticos foram realizados num espectrofotómetro de matriz de díodos Agilent HP 8453, com temperatura controlada e agitação na cuvette. A formação de NO foi seguida a 30 ° C através da conversão de oxi-hemoglobina a meta-hemoglobina, por cálculo da diferença entre a absorvência a 421 e 401 nm, usando o coeficiente de absorvidade molar $\epsilon_{421-401\text{nm}} = 77.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (tal como previamente descrito [30]). A oxi-hemoglobina foi preparada a partir de uma solução de 20 mg/mL de hemoglobina (de bovino, Sigma) em tampão HEPES 50 mM (pH 7,4), à qual foi adicionando ditionito de sódio em excesso (20X mais ditionito de sódio). A solução foi agitada cuidadosamente até a coloração castanha (Met-Hb) passar a vermelho-vivo (Oxi-Hb). O ditionito de sódio em solução foi eliminado por diálise da solução contra tampão HEPES 50 mM pH 7,4. A concentração de oxihemoglobina (normalmente entre os 8 e 12 μM) foi determinada espectrofotometricamente a 415 nm ($\epsilon_{415\text{nm}} = 131,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Todas as reacções foram iniciadas pela adição de extracto proteico, e as actividades foram calculadas com base na diferença entre os declives registados previamente e posteriormente à adição do mesmo.

Os ensaios com proteína recombinante foram realizados num volume de 800 μL presença de 12 μg de *LiNOS* purificado, com adição de 6 μM oxi-hemoglobina, 1,5 mM CaCl_2 , 100 μM L-arginina, 1 μM FAD, 1 μM FMN, 0,1 μM calmodulina bovina, 200 μM BH_4 e 150 μM NADPH.

Os testes de actividade em extracto celular de *Leishmania infantum* foram feitos num volume final de 800 μL , na presença de 60 ou 120 μg de extracto celular do parasita, 6 μM oxi-hemoglobina, 1,5 mM CaCl_2 , 100 μM L-arginina, 1 μM FAD, 1 μM FMN, 200 μM de BH_4 , 150 μM de NADPH, na presença de 0,1 μM calmodulina bovina. A influência de cada um dos substratos e cofactores da reacção na cinética do enzima foi determinada utilizando 60 μg de extracto celular, sendo mantidas todas as outras condições. Os testes na presença de EGTA (concentrações finais entre 0 e 6 mM) foram realizados utilizando 60 μg de extracto celular e na ausência de calmodulina bovina, mantendo-se as restantes condições. Para o estudo da influência do BH_4 (concentração variou entre 0 e 1,2 mM) e para a comparação da actividade ao longo do ciclo de vida, foram utilizados 60 μg de extracto celular, não foi adicionada calmodulina bovina, e todos os outros constituintes da reacção foram mantidos constantes.

Os ensaios cinéticos na presença do inibidor NNA foram realizados nas mesmas condições descritas, variando a concentração de inibidor de 0 a 800 μM .

3.9 - Identificação do heme em *LiNOS*

Para elucidação da presença do grupo heme no enzima *LiNOS* recombinante, foram utilizados dois métodos, um espectrofotométrico, baseado no espectro de absorção característico deste grupo, e o outro em gel através da coloração com um corante específico de proteínas hémicas.

Para a determinação do espectro de UV-Vis característico da presença de heme mediu-se a absorvência entre 350 e 500 nm em espectrofotómetro ND1000 (Nanodrop) de diversas variantes de enzima recombinante: *LiNOS* expresso com hemina e dialisado com BH_4 após purificação, *LiNOS* expresso sem hemina e dialisado com BH_4 , e *LiNOS* sem quaisquer cofactores. Comparou-se com o espectro de uma solução de hemina sem proteína.

Para o método de coloração de proteínas hémicas, corou-se o *LiNOS* com corante específico *o*-dianisidine. O enzima recombinante expresso com hemina (e dialisado com BH_4 após purificação) foi separado por SDS-PAGE na ausência de agentes redutores (que interferem com a reacção de coloração). A coloração das proteínas hémicas ocorre devido à oxidação do *o*-dianisidine pelo grupo heme na presença de H_2O_2 (revisto em [72]). O gel foi fixado 15 minutos com TCA 10%, lavado 4 vezes com água destilada (5 min cada). Incubou-se durante uma hora à temperatura ambiente em 50 mM citrato de trisódio, 0,7% H_2O_2 , e 1 mg/mL *o*-dianisidine. Foi utilizada a proteína lisozima como controlo negativo, e a hemoglobina e mioglobina (proteínas hémicas) como controlos positivos.

3.10 - Estudo estrutural do *LiNOS* por LT-PAGE: influência do heme, BH_4 e do NO para a estrutura quaternária

A estrutura quaternária do *LiNOS* foi determinada por LT-PAGE (com base no método de Klatt e colaboradores [73]). Aproximadamente 1 μg de enzima recombinante purificado foi separado em gel de BIS-Tris de gradiente (4-12%) e tampão MES a pH 7,3 (sistema NuPAGE, Invitrogen), ou em géis de poliacrilamida a 10% (em Tris nas condições descritas anteriormente), a 4^o C. As análises foram feitas por *western blot* com o anticorpo anti-*LiNOS*.

Para determinar a influência do grupo heme, do BH_4 e do NO para a estrutura quaternária do *LiNOS*, 1 μg de proteína foi incubada 30 minutos a 37°C com agitação, na presença de 0 a 1 mM de hemina, de BH_4 ou de GSNO (nitrosoglutationo, dador de NO). As amostras foram separadas por LT-PAGE, seguida de *western blot* com anticorpo específico para o *LiNOS*.

3.11 - Nitrosilação de proteínas

Para induzir a S-nitrosilação do LiNOS foi utilizado o método descrito por Jaffrey e colaboradores [74]. Aproximadamente 40 µg de proteína recombinante foi incubada 1 hora no escuro com 50 µM de GSNO. Como controlo negativo, a proteína foi incubada com a mesma concentração de glutatióno (GSH). Posteriormente, a amostra foi incubada 1 hora a 50°C com 3 volumes de solução de bloqueio (tampão 250 mM HEPES pH 7,7, 1 mM EDTA, 0,1 mM neocuproína, 20 mM MMTS), vortexando frequentemente, para bloqueio das cisteínas livres. As proteínas foram precipitadas por incubação com 2 volumes de acetona gelada *overnight* a -20°C, e centrifugada 15 min a 7000 rpm em microcentrifuga. O *pellet* foi ressuspensionado em 0,1 mL no mesmo tampão suplementado com 0,1% (m/v) SDS, por cada mg de proteína inicial. As cisteínas nitrosiladas foram reduzidas com 50 mM de ascorbato, permitindo a posterior reacção com 1 mM de HPDP-Biotina (a amostra foi incubada 1 hora a RT no escuro). Por fim, foi adicionado SDS-PAGE *loading buffer* sem agentes redutores, e as proteínas foram analisadas por SDS-PAGE ou armazenadas a -20°C.

As amostras foram separadas em gel de poliacrilamida a 10%, e transferidas para uma membrana de PVDF. A membrana foi bloqueada 1 hora com BSA 5% em TBST, e incubada 2 horas com anticorpo anti-biotina, à diluição de 1:3000 em TBST com 5% BSA.

4 - Resultados e Discussão

4.1 – NOS de *L. infantum*: sequência e domínios

O sintase do óxido nítrico (*Nitric Oxide Synthase* (NOS)) de *Leishmania infantum* (LiNOS) foi identificado previamente no genoma deste parasita através de uma pesquisa de domínios característicos de NOS [30]. Esta análise revelou um gene candidato, codificando para um oxidoreductase (LinJ.19.1490), que foi amplificado a partir do DNA genómico de *L. infantum* (clone MHOM/MA67ITMAP263) e clonado no vector pET-28a (representação do plasmídeo no anexo 1). A sobre-expressão em bactéria desta proteína de 64,1 kDa confirmou que é um enzima que catalisa a reacção de síntese de NO a partir da L-arginina, usando BH₄, FAD, FMN, Ca²⁺ e calmodulina como cofactores [30]. Este enzima apresenta uma baixa homologia com os NOS de mamíferos, possuindo no entanto diversos motivos característicos desta família de enzimas (figura 8).

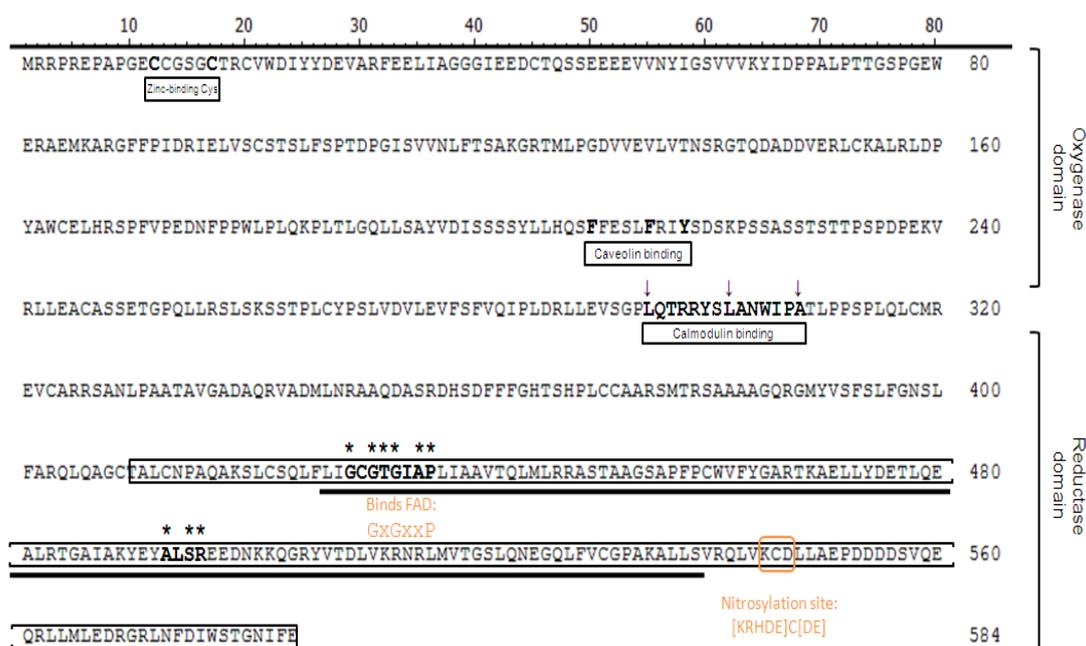


Figura 8: Sequência do sintase do óxido nítrico de *L. infantum* (UniProt ID A4HYH5). Identificação dos locais de previsível ligação ao zinco (CxxxxC), à caveolina (FxxxxFxxF, sendo F um resíduo aromático W, F ou Y), à calmodulina (as setas indicam resíduos hidrófobos nas posições 1-8-14) e ao FAD (GxGxxP), e de nitrosilação ([KRHDE]C[DE]). O domínio de ligação ao NADPH está dentro de uma caixa e o motivo de ligação ao FAD/NAD(P) característico dos oxidoreductases está sublinhado. À semelhança dos NOS de mamíferos, esta proteína tem dois domínios, oxigenase e redutase, separados pelo local de ligação à calmodulina. Esta análise foi feita por M. Sousa Silva, utilizando as ferramentas ScanProsite [75], InterProScan [76], Calmodulin Target Database [77] e Magiic-Pro [78], disponíveis online.

Com base na sequência da proteína é possível prever a existência de dois domínios distintos: um domínio oxigenase (contendo um local de ligação ao zinco e outro à caveolina), e um domínio redutase (onde é possível prever os locais de ligação à calmodulina e ao FAD, e de possível nitrosilação).

Os parâmetros cinéticos para o enzima *LiNOS* recombinante (K_m e V), tal como a influência dos diversos cofactores na actividade, foram calculados num trabalho anterior [30].

4.2 - Expressão e purificação do *LiNOS* recombinante

O *LiNOS* recombinante foi expresso em *E. coli* tendo por base os métodos previamente optimizados [30]. Esta proteína é expressa na fracção insolúvel da bactéria (encontrando-se presente em corpos de inclusão), acumulando-se assim na forma de agregados insolúveis, apesar das diversas condições de expressão testadas (factores como a concentração de indutor, temperatura, e co-expressão de chaperones foram anteriormente analisados). Este é um fenómeno bastante comum quando são produzidas grandes quantidades de proteína (revisto em [79]), e em especial ao expressar proteínas eucariotas em *E. coli*, na medida em que pode ser necessária a introdução de modificações pós-traducionais ou de vias ausentes em organismos mais básicos como os procariontes (revisto em [80]).

Os corpos de inclusão são desprovidos de actividade biológica, necessitando de um elaborado processo de solubilização, *refolding* e purificação para que o produto de expressão se torne funcional. Normalmente, a solubilização proteica é conseguida usando elevadas concentrações de agentes caotrópicos (como ureia ou hidrócloro de guanidina), procedendo-se de seguida ao *refolding* através da remoção lenta do desnaturante (revisto em [79]). Sendo assim, de forma a evitar a complexidade acrescida inerente à purificação de *LiNOS* a partir dos corpos de inclusão, envolvendo a solubilização em 8M de ureia e a sua remoção por vários passos de diálise, outras condições de expressão foram testadas.

Está já documentada a forma como o cofactor BH_4 e o grupo heme promovem a estabilização da estrutura dimérica do nNOS de rato [81]. Por outro lado, foram também feitos estudos nos quais foi conseguido expressar nNOS humano funcional em *E. coli*, através de um processo que envolveu a co-expressão com os chaperones groE1 e groES, e a adição dos precursores do heme e de flavinas ao meio de cultura (ácido aminolevulínico e riboflavina, respectivamente) [82]. Assim, foram feitos novos testes de expressão do *LiNOS* na presença de diferentes combinações de BH_4 , hemina e riboflavina no meio de cultura, e co-expressão com chaperones (DnaK, DnaJ, GrpE e ClpB). Contudo, nenhuma das novas tentativas de expressar *LiNOS* solúvel se mostrou eficiente (dados não apresentados).

Desta forma, dada a impossibilidade de melhorar as condições de expressão do NOS de *L. infantum*, seguiu-se o método previamente implementado para expressão e subsequente purificação do enzima a partir dos corpos de inclusão. Sendo assim, a expressão do *LiNOS* foi induzida com 0,5 mM IPTG, a 37°C durante 3 horas, e sem a adição de qualquer suplemento ao meio de cultura [30].

Com o propósito de purificar o enzima recombinante, a fracção insolúvel do extracto celular de bactéria foi ressuspendida em PBS com 4 M de ureia. Apesar de se ter já observado que esta quantidade de ureia não permite a solubilização do *LiNOS* [30], muitos contaminantes puderam ser solubilizados, sendo portanto removidos após centrifugação. A solubilização do *LiNOS* foi finalmente atingida utilizando PBS com 8 M de ureia (figura 9).

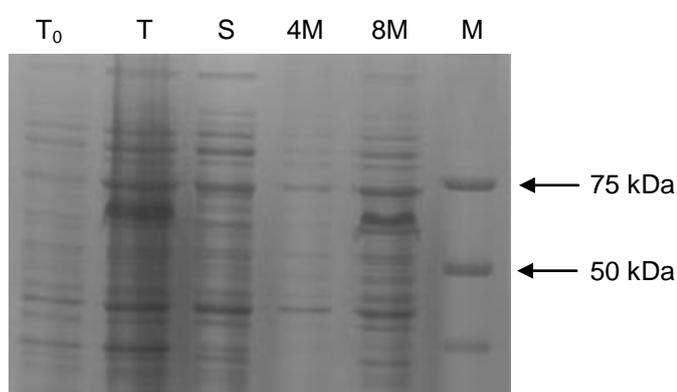


Figura 9: Análise por SDS-PAGE da expressão e solubilização do *LiNOS*. T₀, Extracto total de bactéria sem expressão de *LiNOS*. T, Extracto total de bactéria após a expressão de *LiNOS*. Observa-se a expressão do enzima recombinante entre os 75 e 50 kDa. S, Fracção solúvel do extracto celular. 4M, Solubilização do *pellet* (contendo os corpos de inclusão) em 4 M de ureia. 8M, Solubilização do *pellet* em 8 M de ureia, sendo observado o enzima *LiNOS*. M, Marcador de massa molecular (BioRad).

A proteína recombinante *LiNOS* é expressão com uma cauda de 6 histidinas no N-terminal, como tal, explorou-se a grande afinidade das histidinas para metais como o níquel de forma a purificar o enzima. Neste sentido, e seguindo o protocolo anteriormente otimizado [30], incubou-se o enzima solubilizado em 8 M de ureia com *beads* magnéticas revestidas de níquel (Millipore). A eluição da proteína de interesse foi feita utilizando imidazolo, que compete com as histidinas pela ligação ao níquel. As fracções contendo o *LiNOS* foram identificadas por SDS-PAGE, tendo sido observado que a maior quantidade de enzima elui na fracção de 250 mM de imidazolo (figura 10).

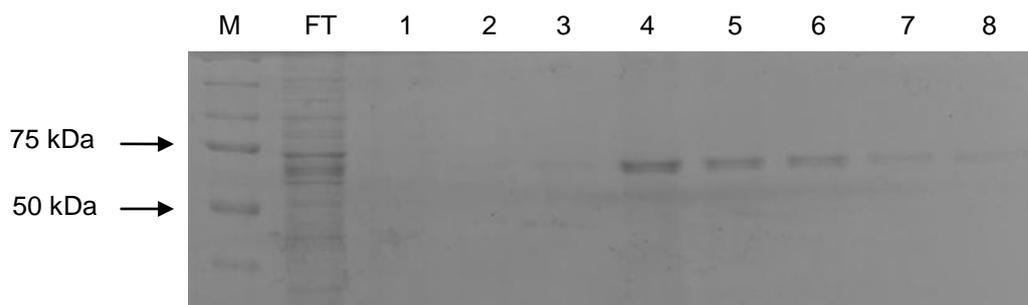


Figura 10: Análise por SDS-PAGE das diversas fracções de eluição do *LiNOS* das *beads* magnéticas de níquel. M, Marcador de massa molecular (BioRad). FT, Proteínas que não ligaram às *beads* magnéticas (*flow through*). 1 a 8, Fracções recolhidas com a adição de concentrações crescentes de imidazolo (5 mM, 20 mM, 50 mM, 250 mM (1ª vez), 250 mM (2ª vez), 250 mM (3ª vez), 500 mM e 1 M).

De forma a retirar a ureia do meio e a promover o *refolding* do *LiNOS*, a solução proteica foi dialisada a 4º C em PBS com concentrações sucessivamente menores de ureia (4 M, 2 M, 1 M e finalmente sem ureia), durante pelo menos duas horas para cada uma das concentrações. Desta forma, foi possível remover lentamente o desnaturante da solução, permitindo um *refolding* lento do enzima, maximizando assim a probabilidade de este adquirir a conformação nativa.

No final do processo de purificação descrito, obtiveram-se rendimentos de aproximadamente 1 mg de proteína por litro de cultura.

O sucesso do processo de purificação do *LiNOS* recombinante foi comprovado por espectrometria de massa, através da técnica de *peptide mass fingerprinting* (PMF). Para tal, a proteína purificada foi separada por SDS-PAGE e a banda foi excisada manualmente (figura 11 A), para digestão *in gel* utilizando tripsina. Os péptidos obtidos foram analisados por MALDI-FTICR (espectro apresentado no anexo 3), e submetidos à ferramenta MASCOT para identificação da proteína, tendo por base o padrão de péptidos obtidos após hidrólise da mesma.

A identificação do *LiNOS* foi inequívoca, tendo sido identificados 20 péptidos, correspondentes a uma cobertura de sequência de 39% (figura 11 B). Desta forma, comprovou-se que se estava efectivamente a trabalhar com a proteína de interesse, validando o procedimento até então realizado.

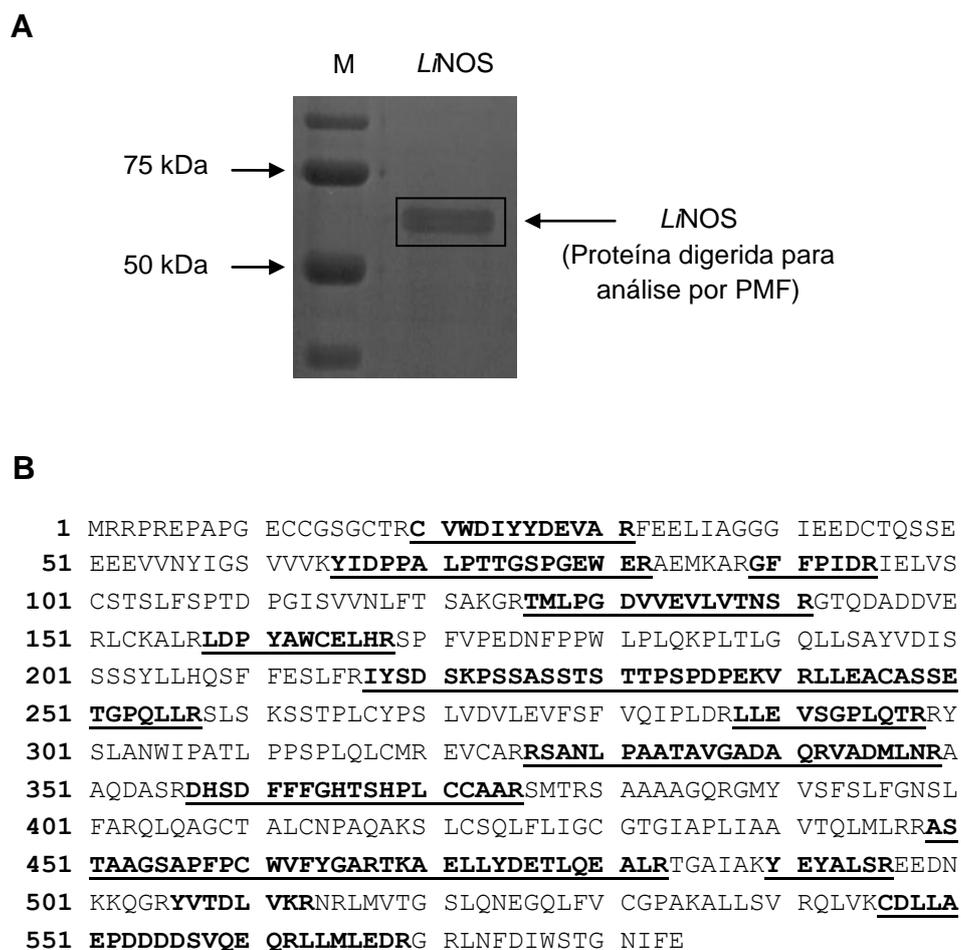


Figura 11: Análise da proteína purificada por PMF. (A) Separação da proteína recombinante purificada por SDS-PAGE. M, Marcador de massa molecular (BioRad). A banda na zona de massa correspondente ao *LiNOS* (64,1 kDa) foi excisada. (B) Sequência da proteína *LiNOS* com representação a negrito e sublinhado das zonas da sequência identificadas por PMF (20 péptidos identificados, correspondendo a uma cobertura de sequência de 39%). A identificação do *LiNOS* foi confirmada após submissão das massas monoisotópicas à ferramenta MASCOT.

De forma a testar a viabilidade do *LiNOS* purificado, realizaram-se ensaios cinéticos utilizando o método da oxi-hemoglobina (descrição detalhada do método no anexo 6), na presença dos cofactores e substratos para a reacção (Figura 12). Foi calculada uma actividade de formação de NO de $3,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, o que se encontra em conformidade com os registos obtidos previamente, onde foi descrita uma actividade de $3,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para o *LiNOS* recombinante [30]. Deste modo, comprovámos que o enzima recombinante se encontrava funcional, mostrando que este adquiriu o *fold*ing correcto.

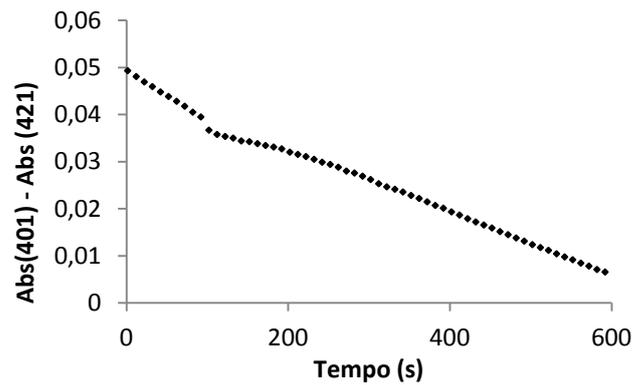


Figura 12: Actividade enzimática do *LiNOS* recombinante. Ensaio realizado com o método da oxi-hemoglobina. A reacção foi iniciada pela adição do enzima recombinante purificado, obtendo-se uma actividade específica de $3,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Para determinar a actividade, o valor do declive antes da adição de enzima foi subtraído ao declive da zona linear após a adição de proteína.

4.3 - Produção e teste funcional do anticorpo anti-*LiNOS*

O enzima *LiNOS* recombinante foi usado para produzir um anticorpo em ratos Wistar (produzido no IBMC-UP). Este anticorpo foi fornecido na forma de soro imune do animal que o sintetizou, sendo necessário testar a sua funcionalidade.

Após a expressão e purificação de *LiNOS* recombinante, a proteína foi analisada por *western blot* para confirmar a funcionalidade do anticorpo produzido contra este enzima.

Após a optimização da concentração de anticorpo a utilizar (directamente a partir do soro do rato), foi possível observar que este apresentava afinidade para o *LiNOS* recombinante, permitindo a obtenção de uma marcação por *western blot* (figura 13).

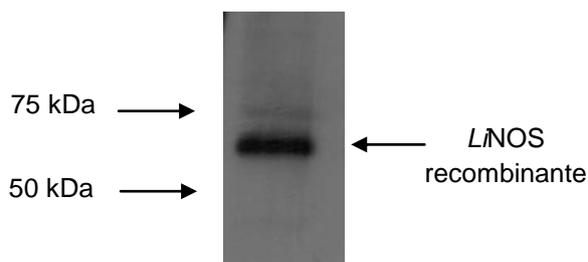


Figura 13: Detecção da proteína recombinante *LiNOS* por *western blot* utilizando o anticorpo anti-*LiNOS* produzido para a proteína.

4.4 - Análise do extracto do parasita por *western blot*

Sendo o anticorpo anti-*LiNOS* específico para o enzima recombinante, foi utilizado em extractos proteicos de *L. infantum* para detectar o NOS endógeno do parasita, confirmando a presença deste enzima de forma a correlacionar com a actividade anteriormente detectada em promastigotas de *L. infantum* [30].

Contrariamente ao que se havia verificado para a proteína recombinante purificada, a análise do extracto celular do parasita por *western blot* revelou-se bastante mais difícil, porque era visível um elevado *background* sem que houvesse a marcação de bandas definidas (dados não apresentados). Este resultado provavelmente deveu-se à grande complexidade do extracto em si, ao facto do anticorpo ser policlonal, e a ter sido utilizado o soro directamente sem uma purificação prévia. Foi então necessário purificar o anticorpo a partir do soro imune.

4.4.1 - Purificação do anticorpo

Existem diversos métodos para a purificação de anticorpos a partir do soro [83, 84], contudo, aquando da escolha do procedimento, foi prestada especial atenção a factores como a facilidade de implementação e a simplicidade do processo. Neste sentido, o anticorpo foi purificado utilizando o método de *blotted antigen*, que se baseia na separação do antígeno por SDS-PAGE, transferência para uma membrana, e incubação da zona da membrana onde se encontra o antígeno de interesse com o soro imune. Posteriormente, o anticorpo é eluído da membrana (esquema de purificação no anexo 7).

A comparação entre o anticorpo antes e após purificação é apresentada na figura 14.

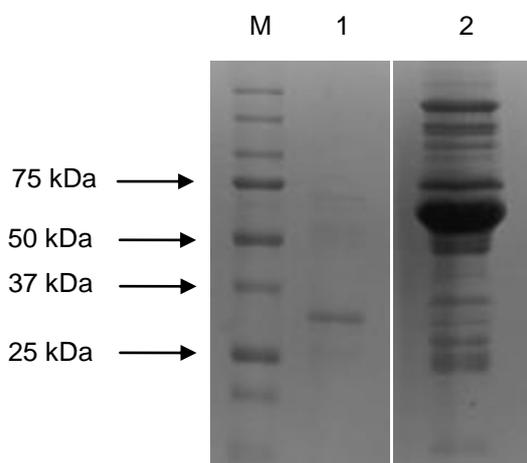


Figura 14: Análise por SDS-PAGE da purificação efectuada ao anticorpo presente no soro imune. M, Marcador de massa molecular (BioRad). 1, Anticorpo purificado. 2, Soro imune antes da purificação.

Através do procedimento descrito, em particular ao incubar com o soro imune apenas a zona da membrana contendo o *LiNOS*, certificámo-nos de que não estariam também presentes eventuais proteínas contaminantes purificadas com o enzima de interesse. Assim, reduziu-se a probabilidade dos epítomos presentes na membrana serem reconhecidos por anticorpos que não o pretendido.

Após optimização das condições de utilização do anticorpo purificado, analisou-se a expressão diferencial do NOS nos principais estadios do ciclo de vida do parasita: promastigotas (em estado estacionário) e amastigotas (figura 15).

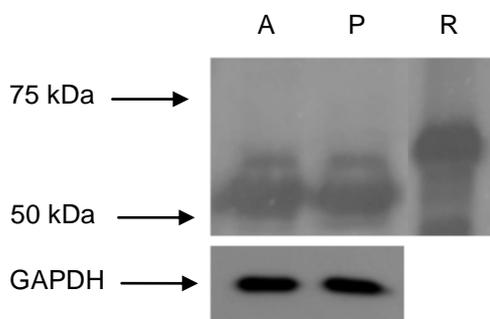


Figura 15: Análise do extracto celular de *L. infantum* por *western blot*, com o anticorpo específico para o *LiNOS* purificado. O *loading control* foi feito com o anticorpo anti-GAPDH. A, amastigotas. P, promastigotas. R, *LiNOS* recombinante.

Utilizando o anticorpo anti-*LiNOS* purificado em extractos proteicos de *Leishmania infantum*, obtiveram-se duas bandas claramente definidas em ambos os estadios do parasita, uma acima dos 50 kDa (mais intensa), e outra mais acima mas com massa molecular inferior à do *LiNOS* recombinante (Figura 15). De forma a verificar se as estruturas reconhecidas corresponderiam ao *LiNOS*, confirmando também a expressão do enzima pelo parasita, analisaram-se as proteínas correspondentes por PMF. Para o efeito, o extracto total de promastigotas e de amastigotas de *L. infantum* foi separado por SDS-PAGE, excisando-se manualmente quatro zonas no gel: uma banda correspondente à massa do *LiNOS* recombinante (Figura 16 b), as zonas imediatamente acima e abaixo (Figura 16 a,c), e a banda acima dos 50 kDa (Figura 16 d).

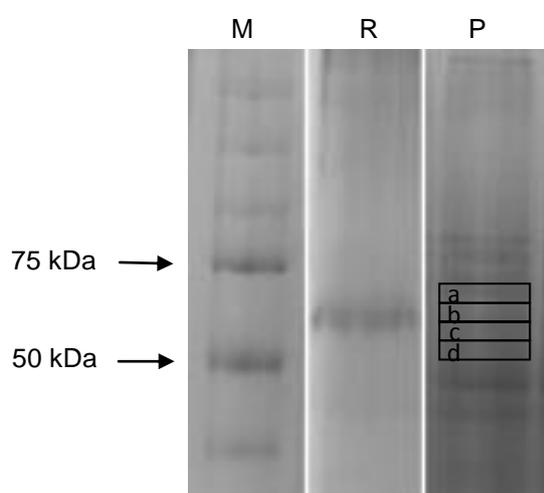


Figura 16: Separação do extracto celular do parasita e da proteína recombinante por SDS-PAGE para análise por PMF. M, Marcador de massa molecular (BioRad). R, *LiNOS* recombinante purificado. P, Extrato celular de promastigotas (em estado estacionário). As áreas assinaladas correspondem às zonas excidas do gel: a) Zona de migração acima do *LiNOS* recombinante. b) Zona de migração do *LiNOS* recombinante. c) Zona de migração abaixo do *LiNOS* recombinante. d) Zona imediatamente acima dos 50 kDa.

As proteínas presentes em cada uma das áreas excisadas foram digeridas *in gel* com tripsina, tendo os péptidos resultantes sido analisados por MALDI-FTICR. Utilizando o software BioTools, as massas monoisotópicas dos espectros obtidos foram comparadas com a digestão teórica do *LiNOS* e com as massas monoisotópicas experimentais obtidas após digestão da proteína recombinante. Os péptidos identificados em promastigotas e amastigotas são apresentados nos quadros 1 e 2, respectivamente, tal como os erros associados à identificação dos mesmos, e a comparação com o espectro de massa da proteína recombinante. Na figura 17 é apresentada a comparação detalhada de um espectro de massa obtido a partir do extracto celular e outro a partir do *LiNOS* recombinante.

Quadro 1: Análise dos péptidos do LiNOS detectados em cada zona do extracto de promastigotas de *L. infantum*. Os desvios associados à identificação e as coberturas de sequência correspondentes são apresentados, bem como a identificação dos péptidos comuns ao enzima recombinante, e desvio associado. As diferentes cores representam péptidos distintos.

Promastigotas

<u>Zona do gel</u>	<u>Péptidos detectados</u>	<u>Cobertura de sequência</u>	<u>Massa teórica</u>	<u>Massa monoisotópica em extracto</u>	<u>Desvios ao valor teórico (ppm)</u>	<u>Massa monoisotópica em recombinante</u>	<u>Desvio ao valor em extracto (ppm)</u>
a	IYSDSKPSSASSTSTTPSPDPEKVR EVCARRSANLPAATAVGADAQR AELLYDETLQEALR	10,5 %	2624,269 2284,157 1663,854	2624,255 2284,175 1663,845	-0,024 7,736 -5,734	2624,262 2284,171 1663,856	2,667 -1,751 6,611
b	EVCARRSANLPAATAVGADAQR AELLYDETLQEALR	6,2%	2284,157 1663,854	2284,225 1663,845	7,513 -5,323	2284,171 1663,856	-23,641 -6,611
c	YIDPPALPTTGSPGEWERAEMKAR IYSDSKPSSASSTSTTPSPDPEKVR EVCARRSANLPAATAVGADAQR AELLYDETLQEALR	14,8%	2672,314 2624,269 2284,157 1663,854	2672,354 2624,241 2284,185 1663,845	14,988 10,409 11,877 -5,221	2672,299 2624,262 2284,171 1663,856	-20,581 8,002 -6,129 6,611
d	EVCARRSANLPAATAVGADAQR ASTAAGSAPFCWVFGARTK AELLYDETLQEALR	6,8%	2284,157 2245,086 1663,854	2284,194 2245,089 1663,852	15,879 1,169 -1,196	2284,171 não encontrado 1663,856	-10,069 não encontrado 2,404

Quadro 2: Análise dos péptidos do LiNOS detectados em cada zona do extracto de amastigotas de *L. infantum*. Os desvios associados à identificação e as coberturas de sequência correspondentes são apresentados, bem como a identificação dos péptidos comuns ao enzima recombinante, e desvio associado. As diferentes cores representam péptidos distintos.

Amastigotas

<u>Zona do gel</u>	<u>Péptidos detectados</u>	<u>Cobertura de sequência</u>	<u>Massa teórica</u>	<u>Massa monoisotópica em extracto</u>	<u>Desvios ao valor teórico (ppm)</u>	<u>Massa monoisotópica em recombinante</u>	<u>Desvio ao valor em extracto (ppm)</u>
a	YIDPPALPTTGSPGEWERAEMKAR AELLYDETLQEALR	6,5%	2672,314 1663,854	2672,349 1663,839	13,169 -9,507	2672,299 1663,856	18,710 -10,217
b	YIDPPALPTTGSPGEWERAEMKAR EVCARRSANLPAATAVGADAQR AELLYDETLQEALR YEYALSREEDNKK	12,5%	2672,314 2284,157 1663,854 1644,786	2672,352 2284,190 1663,844 1644,786	14,410 14,143 -5,988 6,840	2672,299 2284,171 1663,856 1644,794	19,833 8,318 -7,21 4,864
c	AELLYDETLQEALR	2,4%	1663,854	1663,839	-8,715	1663,856	-10,037
d	AELLYDETLQEALR	2,4%	1663,854	1663,853	0,662	1663,856	-1,623

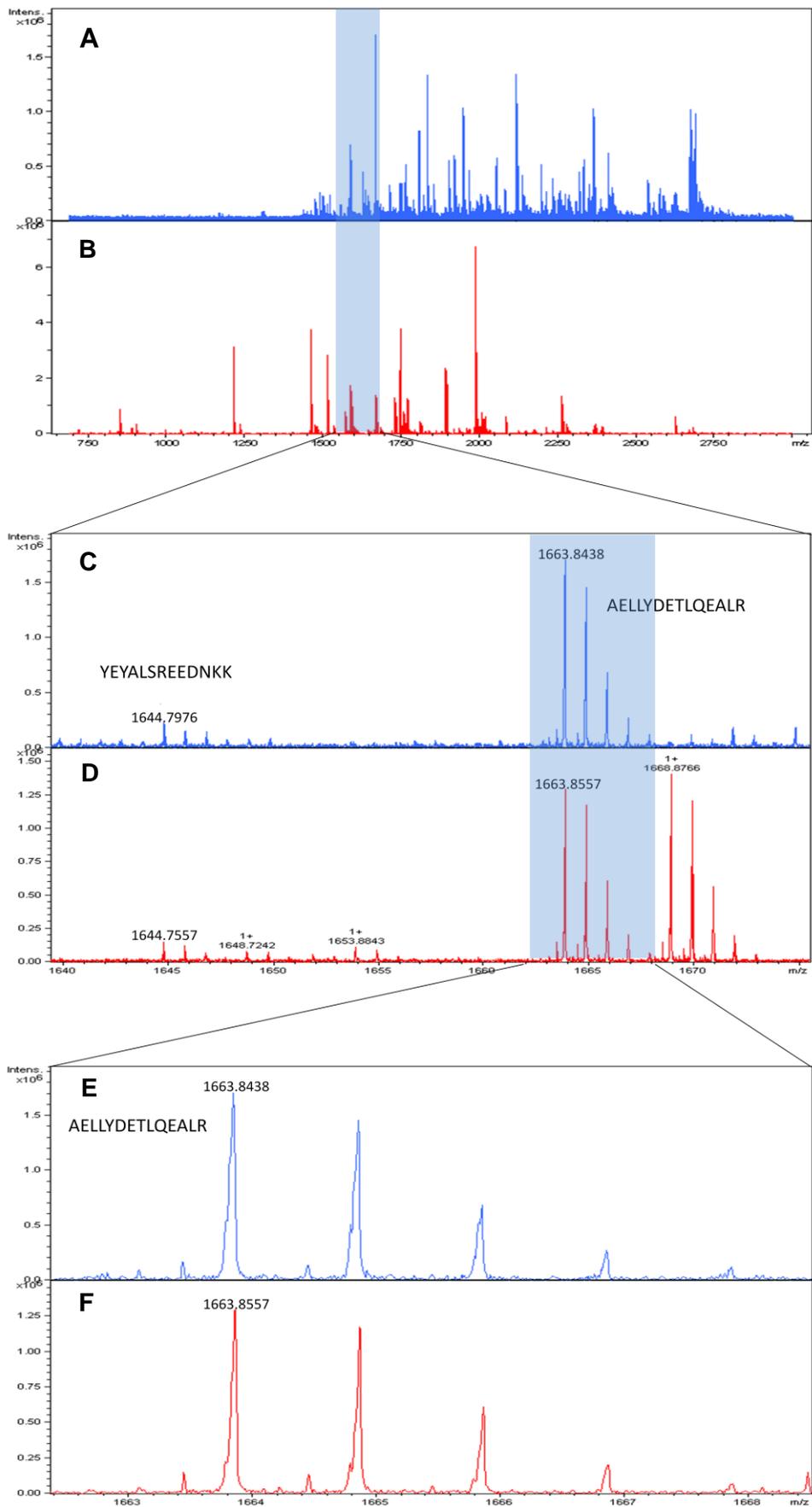


Figura 17: Comparação detalhada entre o espectro de massa do *LiNOS* recombinante (B,D,F) e o do extrato de amastigotas (A,C,E) (proteína digerida a partir da zona de migração do enzima recombinante, zona b). Identificação de dois péptidos correspondentes.

A submissão dos espectros obtidos a partir do extracto à ferramenta MASCOT não permitiu identificação do NOS, devido ao grande número de outras proteínas presentes na mesma zona do gel. Por outro lado, não foi possível a fragmentação dos péptidos por MS-MS, o que permitiria a identificação da sequência dos mesmos, confirmando que se tratariam de péptidos do *LiNOS*. Contudo, os dados já referidos, nomeadamente cobertura de sequência superior a 10% em certas zonas do gel, presença dos péptidos no espectro de massa do *LiNOS* recombinante, e desvios baixos relativamente tanto ao digerido teórico como ao enzima recombinante, apresentam fortes indícios de que o NOS se encontra no extracto do parasita (tanto de promastigotas como amastigotas). O facto de a razão entre os picos da série monoisotópica do espectro da proteína recombinante ser semelhante à do espectro obtido a partir do extracto (figura 17), indicia também que a sequência do péptido comparado deverá ser a mesma, constituindo mais um factor que indica que os péptidos encontrados pertencem ao NOS.

Com base nos resultados obtidos (quadros 1 e 2), observa-se que foram detectados péptidos com massa correspondente às da digestão teórica do *LiNOS* em todas as zonas digeridas do gel, tanto para promastigotas como para amastigotas. No caso dos promastigotas, o maior número de péptidos (4 péptidos) foi encontrado na banda imediatamente abaixo do enzima recombinante, correspondendo a uma cobertura de sequência de 14,8% (quadro 1). Relativamente aos amastigotas, o maior número de péptidos (também 4 péptidos) foi detectado na zona de migração do *LiNOS*, correspondendo a uma cobertura de sequência de 12,5% (quadro 2). Todos os péptidos detectados apresentam desvios baixos relativamente às massas monoisotópicas teóricas, entre 0 e 20 ppm (quadros 1 e 2). Observa-se que 5 dos 6 péptidos encontrados no extrato de *Leishmania* foram também detectados no espectro do enzima recombinante (quadros 1 e 2 e figura 17), com desvios até aproximadamente 25 ppm. Estes valores de cobertura de sequência obtidos em extractos são muito inferiores ao que se conseguiu com o enzima recombinante purificado, visto a abundância da proteína no extracto ser menor que no recombinante. Para além disso, no extracto há muitas outras proteínas que migram na mesma massa molecular, com concentrações superiores e que dominam o processo de ionização.

As maiores coberturas de sequência foram detectada nas zonas próximas do local de migração do enzima recombinante, enquanto na banda acima dos 50 kDa apenas foi detectado um péptido, indicando que o *LiNOS* deverá corresponder à proteína detectada no *western blot* da figura 15 com massa mais próxima do enzima recombinante (sinal menos intenso). O facto do NOS endógeno do parasita possuir uma massa menor que a variante recombinante poderá estar associado à presença da cauda de histidinas na variante recombinante (sequência adicional:

MGSHHHHHSSGLVPR, correspondendo a uma massa de aproximadamente 2 kDa). No entanto, a diferença de massas observada no *western blot* da figura 15 parece ser superior a 2 kDa. Isto poderá indiciar que o enzima seja processado na célula, através de edição do mRNA por um processo de trans-splicing [85, 86], ou por algum processo de hidrólise pós-traducional [86]. No entanto, uma análise da sequência do *LiNOS* com as ferramentas SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e PrediSi (<http://www.predisi.de/>) não revelou a existência de qualquer péptido sinal.

Os resultados até aqui apresentados evidenciam que o NOS será expresso tanto em promastigotas como amastigotas, apresentado uma massa ligeiramente inferior à do enzima recombinante. Os dados obtidos mostram também que a expressão do NOS será igual em amastigotas e promastigotas em estado estacionário (figura 15).

O trabalho futuro passa pela confirmação inequívoca de que a estrutura reconhecida por *western blot* corresponde efectivamente ao NOS, por exemplo através da digestão teórica do proteoma total de *L. infantum* com tripsina, e identificação das proteínas que possam gerar péptidos da mesma massa daqueles que foram identificados. A sobreexpressão do *LiNOS* em *L. infantum* poderá também permitir elucidar este facto, caso se observe um aumento de uma das proteínas reconhecidas.

4.5 - Estudo cinético do sintase do óxido nítrico de *L. infantum*

Os resultados anteriores evidenciam que o sintase do óxido nítrico está presente em promastigotas e amastigotas, apresentando iguais níveis de expressão. De forma a perceber se esses níveis de expressão se traduziriam numa produção igual de NO nestes estadios do ciclo de vida do parasita, realizou-se um estudo cinético do enzima presente no extracto.

4.5.1 Detecção de actividade enzimática em extractos celulares

Para a determinação da actividade de NOS em *L. infantum*, utilizaram-se extractos celulares (extractos proteicos totais) de parasitas no estado de promastigotas (em fase estacionária) e de amastigotas. Foi adicionado o substrato do enzima (arginina) e todos os cofactores conhecidos dos NOS de outros organismos (BH_4 , FAD, FMN, Ca^{2+} , calmodulina e NADPH) e já utilizados anteriormente com o *LiNOS* recombinante.

Após a adição de extracto celular de promastigotas ou de amastigotas, observou-se um aumento na diferença de absorvências entre 401 e 421 nm, correspondendo a um aumento da quantidade de meta-hemoglobina em solução

(figura 18 A e B). Observou-se também que esta variação de absorvência é proporcional à quantidade de extracto celular adicionado, com valores de actividade específica de $1,32 \pm 0,06 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ($n=9$) e de $1,33 \pm 0,13 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ($n=3$) para 60 e 120 μg de extracto (média \pm SEM), respectivamente, no caso dos promastigotas. Para os amastigotas, as actividades registadas foram $1,48 \pm 0,13 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ ($n=3$) para 60 μg de extracto, e $1,11 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ para 120 μg de extracto.

Quando o extracto celular é fervido previamente à adição à mistura reaccional, não se observa variação da diferença de absorvências, e na ausência de extracto celular não promove qualquer formação de meta-hemoglobina (figura 18 C).

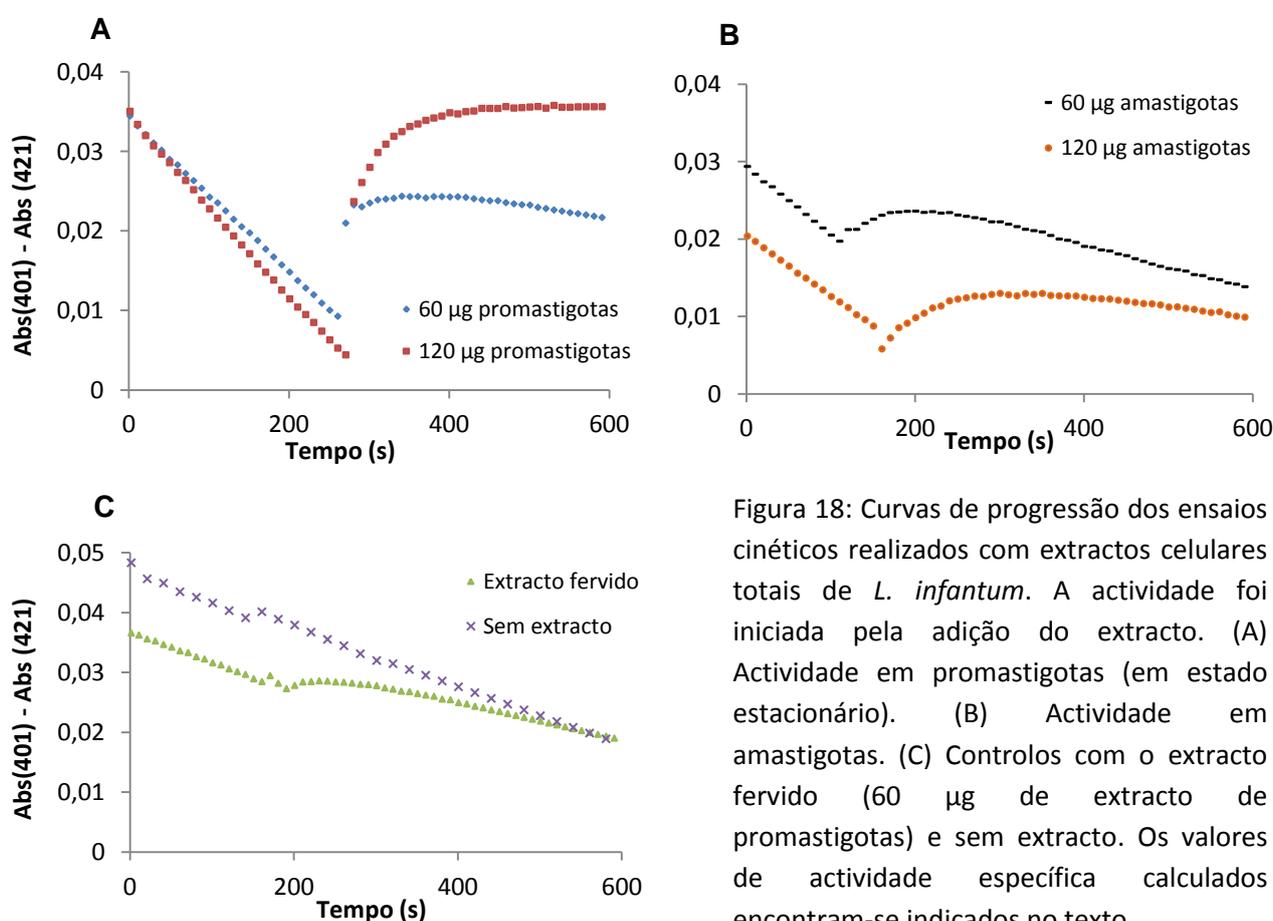


Figura 18: Curvas de progressão dos ensaios cinéticos realizados com extractos celulares totais de *L. infantum*. A actividade foi iniciada pela adição do extracto. (A) Actividade em promastigotas (em estado estacionário). (B) Actividade em amastigotas. (C) Controlos com o extracto fervido (60 μg de extracto de promastigotas) e sem extracto. Os valores de actividade específica calculados encontram-se indicados no texto.

A actividade específica calculada para o NOS de *L. infantum* em extracto celular do parasita é mais elevada que aquela que foi obtida para o NOS de *Trypanosoma cruzi* em extracto celular ($0,1 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) [87]. Contudo, as condições experimentais utilizadas pelos autores diferem daquelas que foram por nós seguidas (especialmente em termos da concentração de arginina, cálcio e BH_4), tornando portanto impossível a comparação directa entre a actividade do NOS destes dois tripanossomatídeos.

4.5.2 - Testes com o inibidor N-Nitro-L-Arginina (NNA)

De forma a confirmar que a actividade enzimática observada se deveu efectivamente à formação de NO pelo NOS, os ensaios cinéticos foram repetidos na presença de concentrações crescentes de N-Nitro-L-Arginina (NNA) com promastigotas em estado estacionário. Sendo o NNA um análogo da arginina (substrato do NOS), este está caracterizado como inibidor competitivo do enzima [88], permitindo portanto validar o estudo. Para evitar o uso de concentrações muito elevadas de inibidor, estes ensaios foram realizados na presença de 50 μM de arginina, ao contrário dos 100 μM usados nos ensaios anteriores (visto o NNA competir com o substrato pela ligação ao enzima). O facto de se usar 50 μM de substrato não apresenta quaisquer limitações à actividade enzimática, visto o enzima manter-se em condições saturantes (ver secção “Influência dos diversos substratos e cofactores da reacção para actividade enzimática - Influência do substrato: Arginina”).

As actividades específicas registadas na presença de NNA são apresentadas no gráfico da figura 19. Observa-se que a actividade diminui à medida que a concentração de inibidor vai aumentando, mostrando portanto que a adição do análogo da arginina NNA inibiu a formação de meta-hemoglobina a partir da variante oxy-Hb, ou seja, inibiu a formação de NO por um sintase do óxido nítrico presente no extracto celular de *L. infantum*.

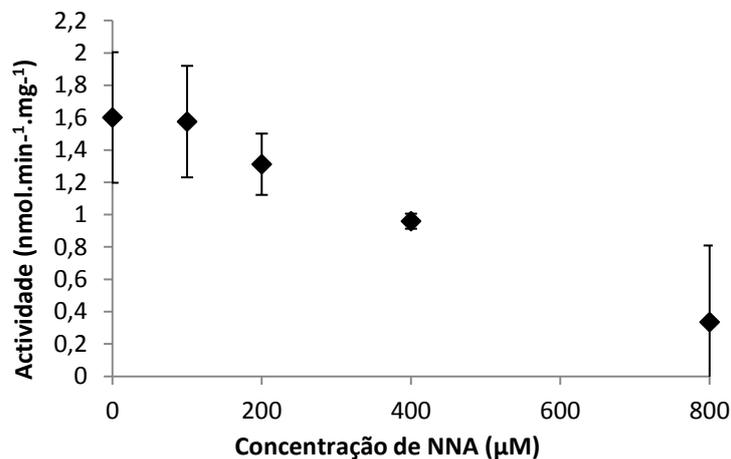


Figura 19: Actividade específica do *LiNOS* na presença do inibidor N-Nitro-L-Arginina (NNA) (os resultados apresentados correspondem à média \pm desvio padrão ($n=2$)).

4.5.3 - Influência dos substratos e cofactores da reacção para actividade enzimática

A síntese de NO pelo sintase do óxido nítrico foi demonstrada em extractos celulares de *L. infantum* (trabalho desenvolvido no âmbito desta tese). No entanto, é importante compreender em maior detalhe a forma como a reacção ocorre e a dependência dos diversos cofactores, como anteriormente feito para o LiNOS recombinante [30]. Para tal, testou-se a importância dos diversos intervenientes da reacção (isto é, arginina, cálcio, FMN, FAD, BH₄, NADPH e calmodulina) na cinética do enzima, através da comparação da actividade na presença e na ausência dos referidos substratos e co-substratos/cofactores. Os resultados são apresentados em termos percentuais relativamente à actividade obtida para a reacção na presença de todos os intervenientes (quadro 3).

Quadro 3: Valores percentuais da actividade obtida na ausência de cada um dos cofactores e substratos da reacção. Os testes foram executados 3 vezes, apresentando-se a média dos três ensaios \pm SEM (*standard error of the mean*). Nas células em que não aparecem valores, os ensaios não foram realizados.

<u>Interveniente excluído da reacção</u>	<u>Percentagem (%) da actividade detectada</u>	
	Extracto <i>L. infantum</i>	Enzima recombinante [30]
Nenhum	100,0	100,0
Arginina	93,6 \pm 15,6 (n=3)	-
BH₄	46,6 \pm 5,7 (n=3)	28,0
CaCl₂	83,5 \pm 12,9 (n=3)	21,0
NADPH	70,1 \pm 16,8 (n=3)	-
Flavinas (FAD e FMN)	109,3 \pm 7,4 (n=3)	54,0
Calmodulina bovina	166 \pm 10,4 (n=3)	-
Calmodulina, FAD e FMN	-	35,0

Influência do substrato: Arginina

Observa-se que a não adição de arginina à mistura reaccional não afecta a cinética da reacção (aproximadamente 90% de actividade), revelando que a concentração de arginina no extracto deverá ser saturante para o NOS. Esta hipótese foi comprovada com o aumento da concentração de arginina, visto não se ter observado um aumento da actividade com o aumento da concentração do substrato.

Desta forma, não foi possível a determinação dos parâmetros cinéticos do enzima em extractos proteicos totais, como foi feito para o *LiNOS* recombinante [30], visto neste último caso não existir qualquer arginina prévia na mistura reaccional.

Influência dos dadores de electrões: Flavinas (FAD e FMN) e NADPH

A exclusão das flavinas (FAD e FMN) em nada afectou a actividade enzimática, visto o valor de actividade se manter nos 100%. Este resultado poderá ser explicado, uma vez mais, pela existência de FMN e FAD endógenos no extracto celular que contribuam para actividade enzimática. No caso do enzima recombinante, não existe qualquer outra fonte de flavinas, e daí que a remoção das mesmas se traduza num decréscimo da actividade em 46% [30].

Quanto aos níveis de NADPH adicionado externamente, terão uma influência mais significativa para a actividade do NOS endógeno do parasita, visto a ausência deste co-substrato provocar uma redução de aproximadamente 30% na actividade enzimática.

Influência do cálcio

A ausência da adição de cálcio à mistura reaccional traduziu-se numa diminuição da actividade do NOS endógeno em cerca de 20%, enquanto no caso do enzima recombinante a ausência deste metal levou a um decréscimo da actividade de 80 % (relativamente ao controlo em que estão presentes todos os cofactores) [30]. Uma vez mais, esta diferença poderá ser explicada pela já existência de cálcio no extracto celular do parasita, no entanto será também possível que existam que existam diversas isoformas de NOS em *Leishmania* com diferentes dependências de Ca^{2+} .

Estes resultados parecem indicar que à semelhança dos nNOS e eNOS de mamíferos (isoformas constitutivas, revisto em [32, 46]), o NOS de *L. infantum* será também dependente do cálcio para se tornar activo.

Com o intuito de comprovar esta dependência de cálcio pelo NOS presente no extracto de *L. infantum*, foram realizados ensaios cinéticos na presença do quelante EGTA, visto este ter uma elevada afinidade para o cálcio (geralmente utilizado neste tipo de estudos) e ser compatível com o método da oxi-hemoglobina [88-91]. As actividades obtidas para as diferentes concentrações de EGTA são apresentadas na figura 20.

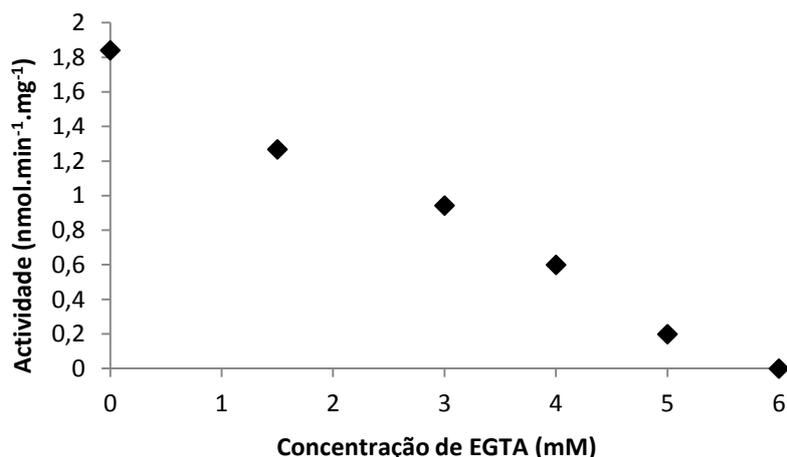


Figura 20: Influência da concentração de EGTA para a actividade específica em extractos totais de promastigotas em estado estacionário.

Observa-se que a actividade do enzima diminui com o aumento da concentração do quelante, ficando assim demonstrado que o sintase do óxido nítrico de *L. infantum* é dependente do cálcio. O facto de a actividade decrescer até 0 com a concentração mais elevada de EGTA (6 mM) parece também indicar que nos extractos totais dos parasitas crescidos nas condições utilizadas para o presente estudo (ver “Materiais e métodos”), não deverão existir outras isoformas de NOS independentes do cálcio.

Influência da calmodulina bovina

Contrariamente ao que foi observado para os outros intervenientes da reacção, a ausência de calmodulina bovina no extracto celular aumentou a velocidade da reacção em cerca de 65%. Este resultado contrasta com o que foi observado para o enzima recombinante, em que a ausência da calmodulina e das flavinas reduzem a actividade do *LiNOS* em 65%, face a um decréscimo de cerca de 45 % na ausência das flavinas apenas [30]. Esta observação pode ser explicada pelo facto de nos ensaios com enzima recombinante não existir outro tipo de calmodulina que permita a ocorrência da reacção, sendo esse papel desempenhado pela calmodulina bovina adicionada. No caso do extracto celular, muito provavelmente existirá calmodulina endógena no parasita. Uma pesquisa no genoma de *L. infantum* revelou a existência de vários genes que poderão codificar para a calmodulina (UniProt ID: A4HU13, A4HVP4, A4ID29, A4I620, A4I3F5, A4HZA9, A4HWJ1, E9AH80, A4HTS8, A4IBS7 [92]). Sendo assim, a variante bovina adicionada à reacção competirá com a proteína endógena pela ligação ao NOS, e não sendo natural no parasita poderá reduzir a actividade enzimática.

Por esta razão, a partir do momento desta observação, todos os ensaios subsequentes em extractos de parasitas foram efectuados na ausência de calmodulina bovina.

Influência do BH₄

O cofactor cuja variação de concentração terá maior influência na actividade enzimática será o BH₄, visto a ausência do mesmo traduzir-se num decréscimo da actividade em aproximadamente 55%. Estes dados são concordantes com o que foi observado para o enzima recombinante, onde ficou demonstrada a grande importância deste cofactor para a actividade do *iNOS* recombinante (a ausência de BH₄ reduziu a actividade do enzima recombinante para 28% do valor na presença do cofactor [30]).

Este resultado permite inferir que a concentração de BH₄ no extracto celular será limitante para a actividade do NOS, o que implica que variações na concentração fisiológica do mesmo possam ter implicações na regulação da actividade enzimática. Para melhor compreender o papel deste cofactor para a cinética deste enzima, estudou-se a influência da variação da concentração de BH₄ na sua actividade em extractos de promastigotas e amastigotas.

Os primeiros testes foram efectuados com extractos celulares de promastigotas em fase estacionária, na presença de calmodulina. Os ensaios foram realizados quatro vezes para cada concentração de BH₄, apresentando-se a média das actividades calculadas (figura 21).

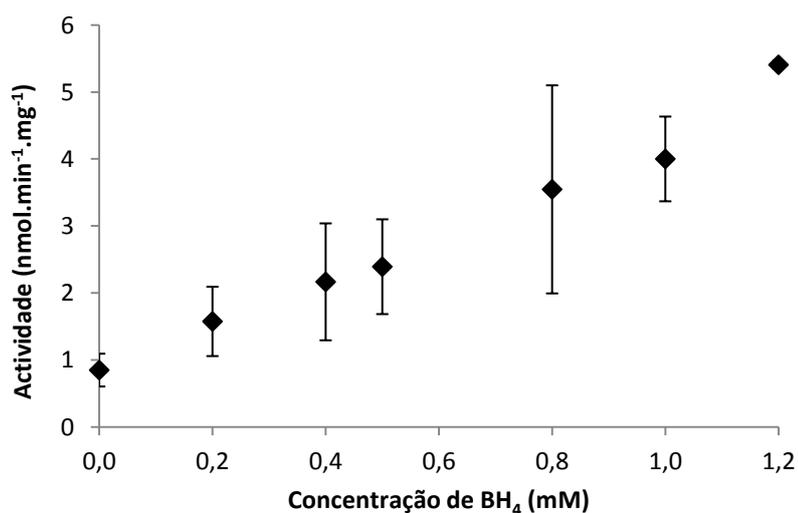


Figura 21: Influência da concentração de BH₄ para a actividade específica do NOS em extractos totais de promastigotas em estado estacionário (n=4).

No gráfico da figura 21, observa-se que a actividade do sintase do óxido nítrico aumenta linearmente com a concentração de BH_4 . Esta tendência prolonga-se numa gama alargada de concentrações, o que sugere que a variação na concentração de BH_4 no interior celular será muito provavelmente um regulador da actividade do sintase do óxido nítrico.

Estudos anteriores com o *LiNOS* recombinante mostraram que a actividade do enzima aumenta com o aumento da concentração de BH_4 de forma cooperativa [30]. Este comportamento é consistente com o modelo de associação-dissociação de cooperatividade para a acção do BH_4 [93], anteriormente descrito para outros NOS. No entanto, se o enzima recombinante for pré-incubado com o cofactor BH_4 , deixa de haver uma relação sigmoidal entre a concentração de BH_4 e a actividade enzimática, passando a existir uma dependência linear (M. Sousa Silva, comunicação pessoal), idêntico ao que se observou em extractos de *L. infantum*. Desta forma, é muito provável que o enzima endógeno ao parasita possua o BH_4 ligado.

Com o objectivo de perceber se esta tendência se manteria em outras etapas do ciclo de vida do parasita, a experiência foi repetida utilizando extractos celulares de amastigotas, desta vez já na ausência de calmodulina bovina. Os resultados encontram-se expostos no gráfico da figura 22.

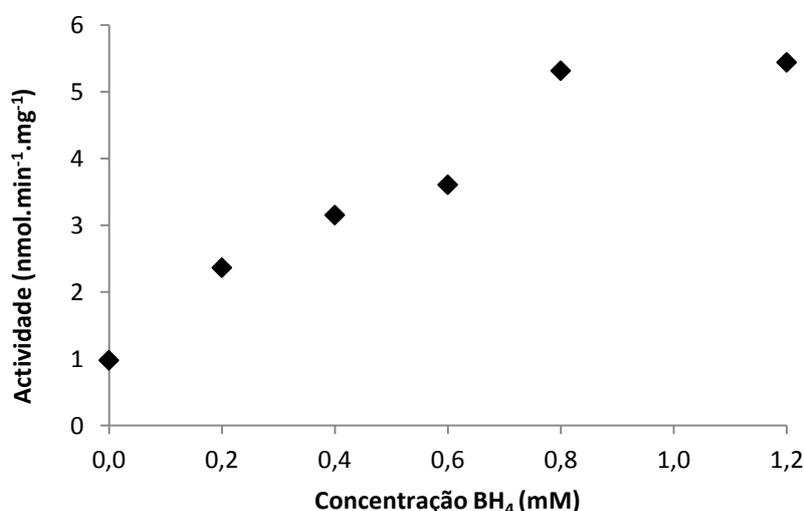


Figura 22: Influência da concentração de BH_4 para a actividade específica do NOS em amastigotas.

Uma vez mais, pode observar-se uma relação linear entre a actividade do NOS e a concentração de BH_4 , ficando portanto demonstrado que esta tendência mantém-se nos dois principais estadios do ciclo de vida do parasita (promastigotas e amastigotas).

4.5.4 - Actividade do NOS ao longo do ciclo de vida do parasita

A existência do NOS em *L. infantum* foi previamente demonstrada, no entanto, não possuímos ainda quaisquer evidências experimentais acerca da sua função na célula e relevância para a sobrevivência do parasita. Uma das hipóteses já formuladas para o papel do NOS em *Leishmania* foi a do NO sintetizado endogenamente exercer um *feedback* negativo sob a produção de NO pelos macrófagos, contribuindo desta forma para a sobrevivência da *Leishmania* [70]. Por outro lado, é conhecida a existência de um NOS constitutivo em *Trypanosoma cruzi*, que sintetiza NO que leva à inibição da apoptose, contribuindo para a sobrevivência do parasita (revisto em [44]). Visto este projecto ter o objectivo a longo prazo de identificar o potencial do NOS como alvo terapêutico contra a *Leishmania infantum* e outros tripanossomatídeos, a obtenção de informação sobre a função e relevância do enzima na célula é de elevada importância.

Ao longo do ciclo de vida da *L. infantum*, o parasita alterna entre um estado de promastigota flagelado no vector (mosca da areia) e uma forma amastigota, sem flagelo, que se desenvolve nos macrófagos do hospedeiro mamífero (revisto em [2, 7, 8]). Sendo o óxido nítrico um importante mensageiro celular, e estando também envolvido na defesa celular anti-tripanosomatídeos, a determinação da actividade do NOS ao longo do desenvolvimento da *L. infantum* poderá permitir inferir acerca da relevância do enzima para cada uma das fases do ciclo de vida.

De modo a analisar como a actividade do enzima NOS de *L. infantum* varia em resposta ao BH₄ ao longo do ciclo de vida do parasita, foram feitos testes de actividade em extractos celulares de promastigotas em fase exponencial de crescimento, de promastigotas em estado estacionário, e de amastigotas, para duas concentrações de BH₄: 0,2 e 1,2 mM (quadro 4).

Quadro 4: Actividade do NOS em extractos de *L. infantum* ao longo do ciclo de vida do parasita: promastigotas em fase exponencial e em fase estacionária de crescimento, e amastigotas. Os ensaios foram realizados para duas concentrações de BH₄, 0,2 e 1,2 mM, apresentando-se a média ± SEM.

Os valores médios obtidos com 0,2 mM de BH₂ por 10⁸ células foram comparados através de um teste t: para promastigotas em divisão e promastigotas em estado estacionário, p-value < 0,05; para promastigotas em divisão e amastigotas, p-value < 0,001; e para promastigotas em estado estacionário e amastigotas, p-value < 0,05.

Estadio dos parasitas	<u>Actividade por massa de proteína</u> (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)		<u>Actividade por 10⁸ células</u> (nmol.min ⁻¹ .10 ⁻⁸ células)	
	0,2 mM BH ₄	1,2 mM BH ₄	0,2 mM BH ₄	1,2 mM BH ₄
Promastigotas em fase exponencial	1,73 ± 0,018 (n=3)	5,77	0,367 ± 0,004 (n=3)	0,977
Promastigotas em fase estacionária	1,61 ± 0,012 (n=7)	6,80	0,218 ± 0,012 (n=7)	0,757
Amastigotas	1,64 ± 0,117 (n=3)	6,81	0,180 ± 0,014 (n=3)	0,561

A actividade do NOS por miligrama de proteína para 0,2 mM de BH₄ não varia durante os estadios estudados do ciclo de vida do parasita. O aumento da concentração de BH₄ poderá ter maior influência para a actividade do enzima presente em promastigotas em estado estacionário e amastigotas do que nos promastigotas em fase exponencial, visto o aumento de BH₄ de 0,2 para 1,2 mM ter aumentado a actividade dos promastigotas em estado estacionário e amastigotas em cerca de 4 vezes, enquanto para os promastigotas em fase exponencial de crescimento o aumento foi de apenas 3,3 vezes. Contudo, os dados relativos à relação entre a actividade e a concentração de BH₄ necessitam confirmação.

Relativamente à actividade do NOS de *Leishmania infantum* por 10⁸ parasitas, observa-se que a síntese de NO decresce ao longo do ciclo de vida do parasita, tanto para 0,2 mM como 1,2 mM de BH₄ (actividade em promastigotas em crescimento > actividade em promastigotas em estado estacionário > actividade em amastigotas). Uma vez mais, o aumento da concentração de BH₄ parece promover um aumento maior na actividade dos promastigotas em estado estacionário e amastigotas, do que dos promastigotas em divisão celular (aumento de actividade de aproximadamente 2,6 vezes nos promastigotas em divisão, e de aproximadamente 3,3 vezes nos promastigotas em estado estacionário e amastigotas).

A actividade do NOS de *L. infantum* é muito influenciada pela concentração de BH₄ (trabalho realizado nesta tese), sendo portanto potencialmente regulada por variações da concentração fisiológica deste cofactor. Neste sentido, sabe-se que a expressão dos transportadores de pteridinas diminui ao longo do ciclo de vida da *Leishmania* [94], reduzindo assim a internalização de biopterina e BH₂. A biopterina e o BH₂ são percursores essenciais à síntese de BH₄ em *Leishmania*, visto estes parasitas serem auxotróficos para as pteridinas (revisto em [95]). A concentração intracelular de BH₄ foi também já determinada para promastigotas de *Leishmania major* em fase exponencial de crescimento e em estado estacionário (15 nmol/10⁸ células e 1 nmol/10⁸ células, respectivamente) [95]. No mesmo estudo, foi igualmente demonstrado que a metaciclogénese (e consequentemente a infectividade dos parasitas) é proporcionalmente inversa ao nível de BH₄ (parasitas com mais BH₄ apresentam menor metaciclogénese). Uma das hipóteses colocadas para explicar as observações feitas, é a existência de algum enzima não identificado que esteja a ser regulado pelo BH₄, sendo responsável pelo aumento de infectividade em parasitas em estado estacionário. Tendo em consideração a já referida relevância da concentração de BH₄ para a actividade do NOS de *L. infantum*, colocámos a hipótese do NOS ser o enzima cuja actividade desempenha um papel importante no controlo da metaciclogénese no parasita. Neste sentido, o aumento de BH₄ em parasitas em divisão celular promoveria um aumento da síntese de NO, reduzindo a metaciclogénese.

Os resultados obtidos são concordantes com a hipótese por nós levantada de que a actividade do NOS seria mais elevada em promastigotas em crescimento, devido à maior concentração intracelular de BH₄ [95]. Desta forma, estes resultados sugerem que NO (sintetizado pelo NOS) pode ser responsável pela regulação da metaciclogénese, através de um controlo exercido por variações da concentração intracelular de BH₄, em resposta à variação de expressão dos transportadores de biopterinas. No futuro, o doseamento da concentração de BH₄ nos diferentes estadios do ciclo de vida de *L. infantum* será essencial para perceber a regulação da actividade do NOS.

Uma das hipóteses colocadas relativamente à importância do NO para a *Leishmania* foi a deste radical exercer um *feedback* negativo sob a produção de NO pelos macrófagos [70]. Contudo, observa-se que a actividade do NOS por parasita apresenta um valor mais baixo em amastigotas, o que parece contradizer a hipótese descrita. Apesar desta evidência, não é possível refutar a hipótese do NO endógeno ao parasita regular a síntese de NO pelo macrófago, pois seria necessário um estudo mais detalhado, possivelmente através da medição directa do nível de NO sintetizado em macrófagos infectados e não infectados.

4.6 - Determinação da estrutura do LiNOS e elucidação do efeito do heme, do BH₄ e do NO sobre a mesma

Todas as isoformas de NOS de mamífero (nNOS, eNOS e iNOS) são homodiméricas [34] e a manutenção do estado de homodímero é essencial para funcionalidade do enzima e consequente produção de NO e L-citrulina a partir da oxidação de L-arginina e NADPH (revisto em [34, 96]). Visto a dimerização ser essencial para a activação do NOS, a compreensão da forma como a célula controla este processo tem sido alvo de interesse. Neste sentido, foi observado que a formação do dímero é promovida pela ligação de arginina ou de cofactores como o grupo heme ou BH₄. Os estudos a este nível permitiram a construção de modelos explicativos do processo de dimerização do NOS, como o exemplo apresentado na figura 23 relativamente ao iNOS. Neste caso, a dimerização é promovida pela adição do grupo heme, pela arginina e pelo BH₄, num processo que envolve dois estados distintos: primeiro o domínio redutase torna-se funcional, e posteriormente ocorre a dimerização induzida pelo heme e incorporação estável de BH₄ (revisto em [34]).

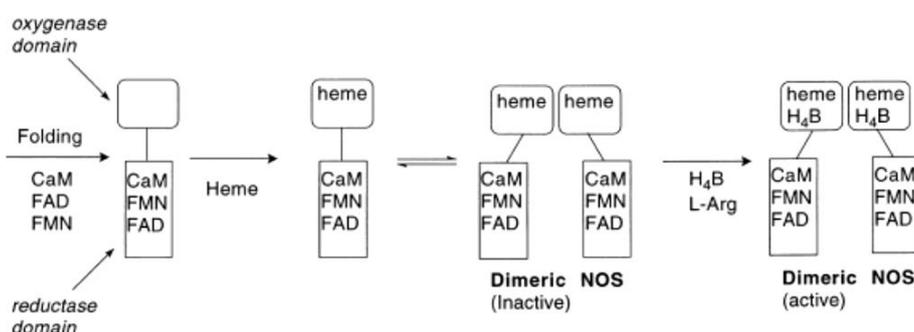


Figura 23: Modelo para a formação do dímero de iNOS. Após tradução, a proteína liga a calmodulina, FMN e FAD, formando um monómero heme-free. A ligação do heme promove a dimerização do enzima, que posteriormente ao ligar Arginina e BH₄ se torna funcional [34].

Relativamente às isoformas constitutivas (eNOS e nNOS), a incorporação do heme é uma vez mais essencial à dimerização. Contudo, o BH₄ apresenta uma relevância menor, tendo sido observado que em eNOS e nNOS expressos em *E. coli* (e portanto sem BH₄) podiam ser detectadas quantidades significativas de dímero (revisto em [97]). Pensa-se que estas diferenças entre isoformas de NOS se deverão à zona da enzima responsável pela dimerização, ou seja, enquanto para o iNOS apenas o domínio oxidase deverá estar envolvido na formação de dímero (sendo que é neste domínio que se localiza o local de ligação ao BH₄), para o eNOS e nNOS tanto o domínio oxidase como redutase contribuirão para a dimerização (revisto em [97]). Contudo, apesar desta menor importância do BH₄ face à formação da estrutura quaternária funcional

do enzima, foi demonstrado em nNOS que a ligação deste cofactor promove a formação de dímeros extremamente estáveis, resistentes ao SDS [73]. Os restantes cofactores têm um papel variável para a estabilização da estrutura quaternária do enzima, dependendo da variante de NOS. No caso do eNOS, foi observado que a presença de Ca^{2+} /CaM, FAD, FMN, NADPH, e heme não contribui para a estabilização do dímero [47]. Por outro lado, o iNOS é estabilizado pela ligação à calmodulina [98], pela formação de *clusters* de zinco [99], e pela ligação ao substrato, a arginina [73].

A actividade dos NOS de mamífero pode ser regulada pela acção do NO, nomeadamente através da competição com o oxigénio pela ligação ao grupo heme ou pela nitrosilação do enzima (adição de uma modificação pós-traducional (PTM) pelo NO) [96-99]. Na literatura, estão descritos diversos estudos que mostram como o NO leva a alterações na estrutura quaternária do enzima, promovendo uma destabilização do dímero [40, 99, 100]. Sendo assim, de forma a elucidar outros possíveis mecanismos de regulação do NOS de *L. infantum*, pretendeu-se estudar a influência do NO para o enzima, nomeadamente para a estrutura quaternária do mesmo. Como tal, tornou-se necessário elucidar em primeiro lugar a estrutura quaternária do LiNOS, e perceber também os mecanismos que regulam a formação e estabilização da mesma.

4.6.1 - Estudo da estrutura quaternária do LiNOS

Dada a elevada estabilidade apresentada pelos NOS na presença de alguns cofactores, nomeadamente estabilidade ao SDS [73], um dos métodos mais utilizados para estudar a estrutura quaternária do enzima baseia-se na realização de SDS-PAGE a baixa temperatura (isto é, LT-PAGE, do inglês *Low Temperature-PAGE*), visto permitir a manutenção das interacções que estabilizam a estrutura quaternária do enzima.

Existem estudos que destacam o papel importante do heme e do BH_4 para a dimerização e estabilização da estrutura dos NOS de mamíferos, como tal os testes de LT-PAGE foram realizados em enzima recombinante na presença de heme e BH_4 , seguindo-se uma análise por *western blot*.

4.6.1.1 - Preparação de LiNOS recombinante na presença de BH_4 e heme

Estudos anteriores mostram que a adição de BH_4 promove um aumento da actividade do LiNOS recombinante [30], e que na ausência deste cofactor o enzima recombinante é instável a -20°C , formando agregados numa forma dependente do tempo. A preparação de LiNOS recombinante com BH_4 foi efectuada através da adição de $5\ \mu\text{M}$ deste cofactor às soluções com 1M e 0M de ureia durante a diálise efectuada para retirar a ureia e renaturar o enzima.

Relativamente à produção de *LiNOS* com heme, está descrito que a sobre-expressão de proteínas hémicas em bactéria não é eficiente [100-104]. Por outro lado, a tentativa de obter *LiNOS* hémico através da adição de heme à forma *heme-free* do enzima [81] não foi bem sucedida (dados não apresentados). No entanto, apesar da expressão de *LiNOS* recombinante em *E. coli* na presença de hemina não ter permitido a solubilização do mesmo, após purificação do enzima a solução apresentava uma coloração acastanhada característica de proteínas hémicas. Para perceber se ocorreu ligação do grupo heme ao *LiNOS*, foi traçado o espectro de absorção de UV-Vis entre 220 e 550 nm do enzima expresso com hemina e dialisado com BH_4 , e comparado com a proteína expressa sem hemina e também dialisada com BH_4 , com o enzima sem quaisquer cofactores, e com o espectro da hemina sem proteína (figura 24).

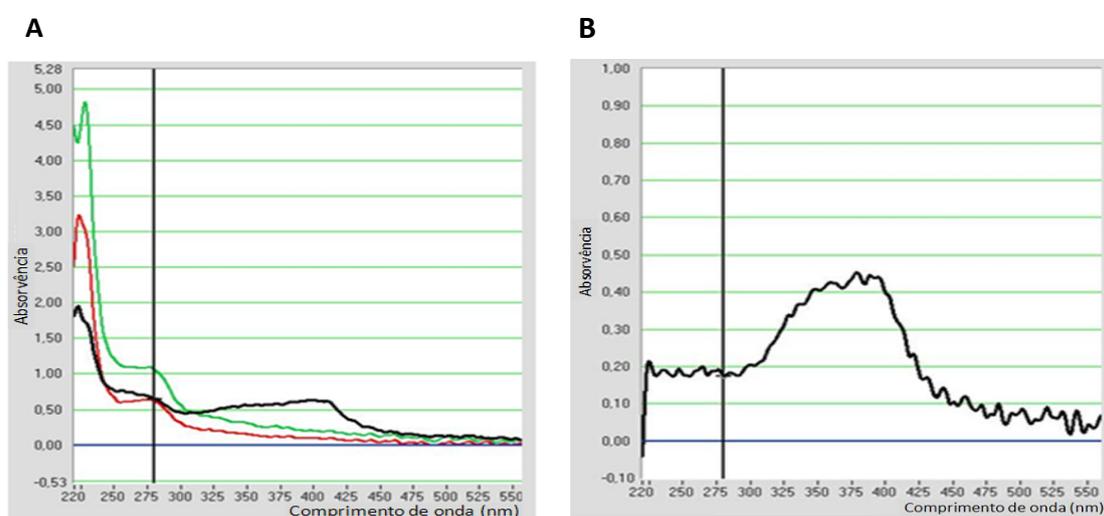


Figura 24: Espectros de UV-Vis entre 220 e 550 nm de diversas variantes do *LiNOS* recombinante: (A) **Linha preta:** Enzima expresso na presença de hemina e dialisado com BH_4 . **Linha vermelha:** Enzima expresso na ausência de hemina e dialisado com BH_4 . **Linha verde:** Enzima sem qualquer cofactor adicionado. (B) Espectro de hemina na ausência de proteína, observando-se um aumento de absorvência característico entre os 350 e os 400nm.

Nos espectros apresentados na figura 24, observamos que a proteína expressa na presença de hemina e dialisada com BH_4 apresenta um aumento de absorvência entre os 350 e os 400nm, característico da presença do grupo heme, como observado no espectro de uma solução contendo apenas hemina.

De forma a comprovar a ligação do heme utilizou-se um método alternativo, coloração em gel com um corante específico de proteínas hemicas: *o*-dianisidine. Esta molécula, na presença H_2O_2 é oxidada pelo grupo heme das proteínas, formando um composto corado (figura 25).

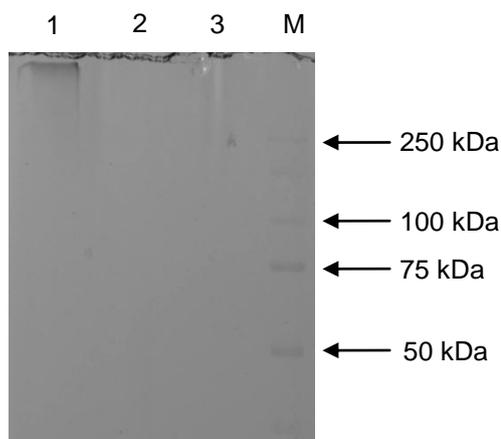


Figura 25: Separação do *LiNOS* com heme por SDS-PAGE (condições não redutoras), e coloração com *o*-dianisidine. (1) *LiNOS* expresso com hemina e dialisado com BH_4 . (2) *LiNOS* expresso sem hemina e dialisado com BH_4 . (3) Lisozima comercial (controlo negativo). M, Marcador de massa molecular (BioRad).

Observa-se coloração apenas na proteína expressa com hemina (e dialisada com BH_4), numa massa molecular muito superior (figura 25, (1)). O facto de o enzima ter migrado muito acima da massa molecular esperada deve-se à utilização de condições não redutoras durante a realização do ensaio, o que fez com que o enzima agregasse. No caso do enzima expresso sem hemina, ou do lisozima, não se observa qualquer coloração. Foram realizados também controlos positivos utilizando mioglobina e hemoglobina, tendo havido coloração das proteínas (dados não apresentados).

Uma vez mais, comprova-se que a expressão de *LiNOS* na presença de hemina possibilitou a produção de enzima hémico, permitindo assim o estudo da importância do heme para a estrutura quaternária do mesmo. Fica assim demonstrado que, tal como os NOS de mamífero, também o sintase do óxido nítrico de *L. infantum* é um enzima hémico.

4.6.1.2 - Análise do *LiNOS* recombinante por LT-PAGE

De forma a elucidar a estrutura do *LiNOS*, o enzima recombinante foi separado por LT-PAGE em géis de gradiente de 4-12%, em tampão MES a pH aproximadamente neutro, e analisado por *western blot*. Testaram-se três variantes distintas do enzima: *LiNOS* com heme e BH_4 , *LiNOS* só com BH_4 , e *LiNOS* sem quaisquer cofactores, tanto para amostras fervidas como não fervidas. Os resultados obtidos são apresentados na figura 26.

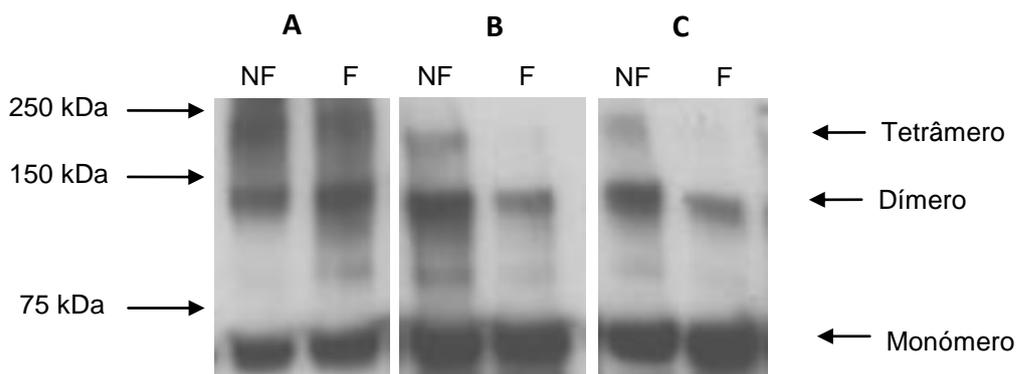


Figura 26: Separação do *LiNOS* recombinante por LT-PAGE (em condições redutoras) e análise por *western blot* para elucidação da estrutura quaternária do enzima. (A) Variante expressa com heme e dialisada com BH_4 . (B) Variante sem heme e dialisada com BH_4 . (C) Variante sem cofactores. F, Amostra fervida; NF, Amostra não fervida.

Nas amostras não fervidas (figura 26, NF), é possível observar o monómero do *LiNOS* (64,1 kDa) e a existência de duas estruturas com massas correspondentes a múltiplos do monómero, nomeadamente um dímero, (de aproximadamente 130 kDa) e um tetrâmero (de aproximadamente 250 kDa). É também observável que nas amostras fervidas, os oligómeros das variantes sem heme (figura 26 B e C, F) sofreram uma diminuição significativa, em especial da estrutura tetramérica, ocorrendo um aumento da forma monomérica. Por outro lado, a variante com heme e BH_4 foi pouco afectada pelo aumento da temperatura, continuando a ser claramente identificados o dímero e o tetrâmero de *LiNOS* (figura 26 A). Estes resultados indiciam que o grupo heme é um forte estabilizador da estrutura quaternária do *LiNOS*, denotando-se uma especial relevância para a manutenção da integridade do tetrâmero.

De forma a melhor explicitar o efeito da temperatura para a estrutura quaternária do *LiNOS*, quantificou-se densitometricamente a intensidade das bandas observadas. Os valores obtidos foram utilizados para traçar os histogramas da figura 27.

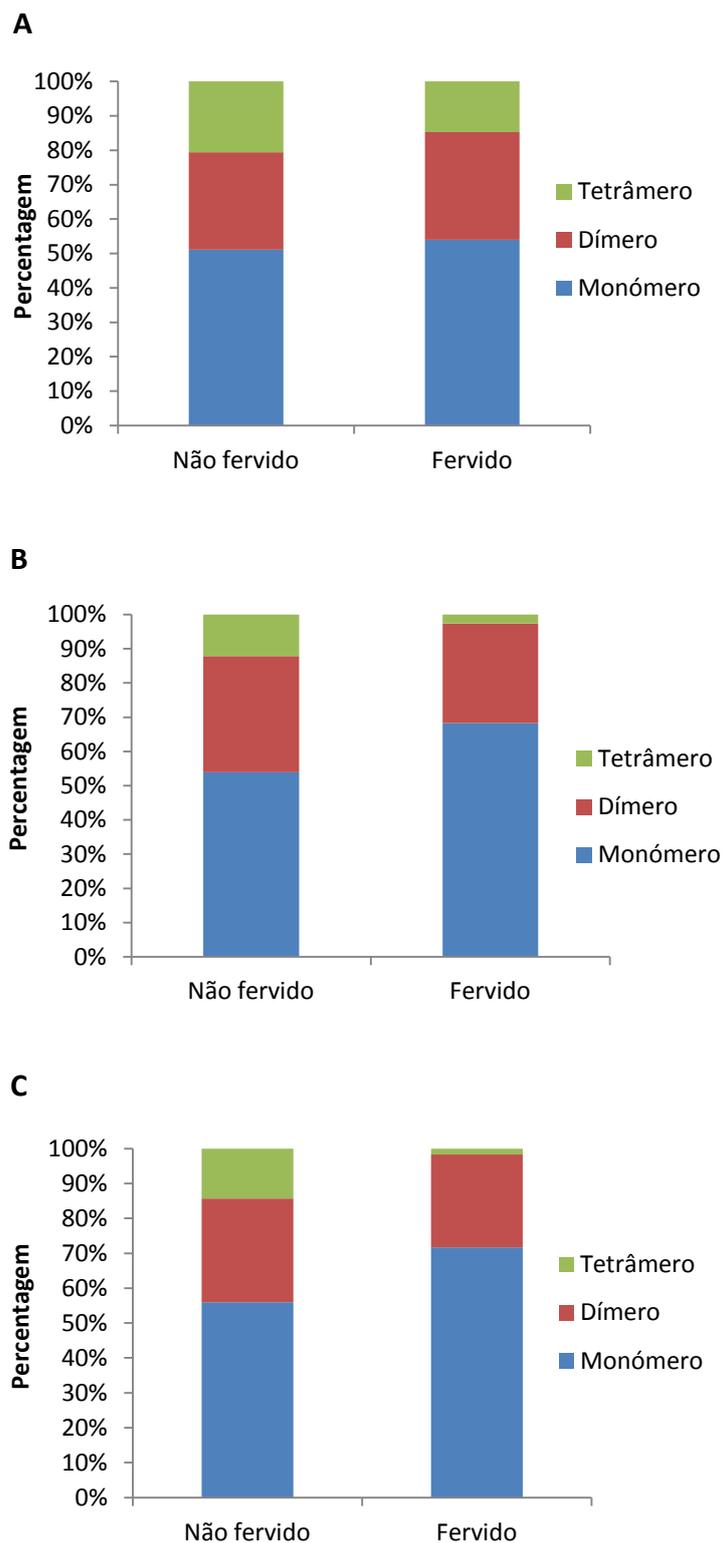


Figura 27: Efeito da temperatura para a estrutura quaternária do NOS de *L. infantum*. Comparação entre os valores percentuais de monómero, dímero e tetrâmero de várias variantes de enzima recombinante, para amostras não fervidas e fervidas. (A) *Li*NOS com Heme e BH₄. (B) *Li*NOS com BH₄. (C) *Li*NOS sem cofactores. Os valores apresentados são a média de três ensaios diferentes.

Através da quantificação densitométrica efectuada (figura 27), o efeito já anteriormente detectado pela observação dos *western blots* torna-se ainda mais evidente: a destabilização da estrutura quaternária do *LiNOS* proporcionada pelo aquecimento no caso das variantes não hémicas (Figura 27 B e C), e a grande estabilidade proporcionada pela presença do grupo heme, em especial para a estrutura tetramérica (Figura 27 A).

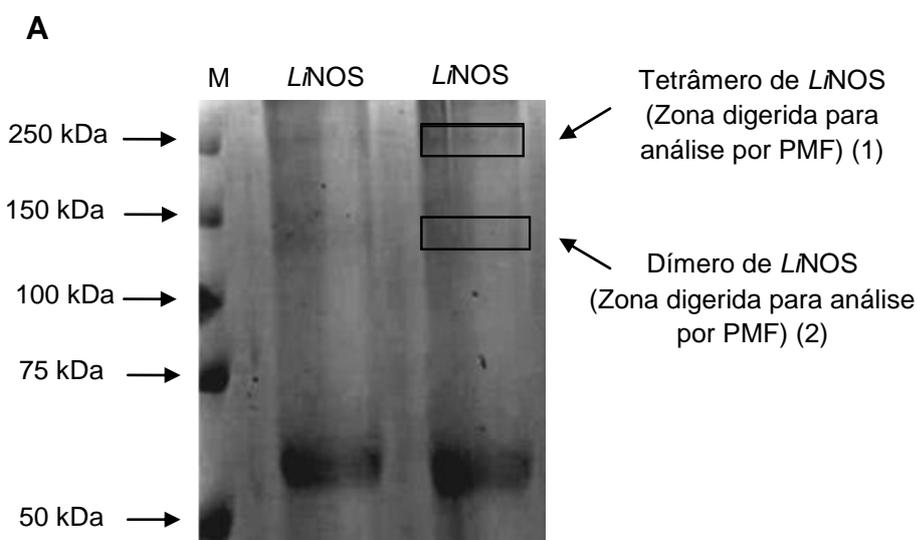
Os testes apresentados na figura 27 foram realizados sob condições redutoras permitindo também afirmar que a estrutura quaternária do *LiNOS* não será dependente de ligações persulfureto.

Por outro lado, o facto de estarem presentes estruturas oligoméricas na variante sem quaisquer cofactores (Figura 27 C), mostra que ao contrário dos NOS de mamíferos, o sintase do óxido nítrico de *L. infantum* não necessitará de cofactores para a formação da estrutura quaternária.

Observa-se ainda que a forma monomérica do enzima está sempre presente, o que pode ser uma consequência da expressão em bactéria [105].

4.6.1.3 - Validação por MS das estruturas identificadas por LT-PAGE

De forma a comprovar que as estruturas observadas correspondem efetivamente a oligómeros do *LiNOS*, e não a quaisquer contaminantes que pudessem ter sido co-purificados com o enzima, a variante de *LiNOS* recombinante contendo o grupo heme e BH_4 foi separada por LT-PAGE. As bandas correspondentes às estruturas de aproximadamente 130 e 250 kDa foram excisadas manualmente e posteriormente digeridas *in gel* com tripsina, para subsequente análise por MALDI-FTICR e identificação por PMF (figura 28). Os espectros resultantes são apresentados nos anexos 4 e 5).



B

(1)	{	1	MRR	<u>PREPAPG</u>	<u>ECCGSGCTRC</u>	<u>VWDIYYDEVA</u>	<u>RFEELIAGGG</u>	<u>IEEDCTQSSE</u>
		51	EEEVVNYIGS	VVVK <u>YIDPPA</u>	<u>LPTGSPGEW</u>	<u>ERAEMKARGF</u>	<u>FPIDRIELVS</u>	
		101	CSTSLFSPTD	PGISVVNLFT	SAK <u>GRTMLPG</u>	<u>DVVEVLVTNS</u>	<u>RGTQDADDVE</u>	
		151	RLCKALR <u>LDP</u>	<u>YAWCELHRSP</u>	FVPEDNFPPW	LPLQKPLTLG	QLLSAYVDIS	
		201	SSSYLLHQSF	FESLFRI <u>YSD</u>	<u>SKPSSASSTS</u>	<u>TTPSPDPEKV</u>	<u>RLLEACASSE</u>	
		251	TGPQLLRSLs	KSSTPLCYPS	LVDVLEVFsf	VQIPLDR <u>LLE</u>	<u>VSGPLQTRRY</u>	
		301	SLANWIPATL	PPSPLQLCMR	EVCAR <u>RSANL</u>	<u>PAATAVGADA</u>	<u>QRVADMLNRA</u>	
		351	AQDASR <u>DHSD</u>	<u>FFFGHTSHPL</u>	<u>CCAAR</u> SMTRS	AAAAGQR <u>GMY</u>	<u>VSFSLFGNSL</u>	
		401	<u>FARQLQAGCT</u>	ALCNPAQAKS	LCSQLFLIGC	GTGIAPLIAA	VTQLMLRRAS	
		451	TAAGSAPFPC	WVfyGART <u>KA</u>	<u>ELLYDETLQE</u>	<u>ALRTGAIKY</u>	<u>EYALSREEDN</u>	
		501	<u>KKQGRYVTDL</u>	<u>VKRNRLMVTG</u>	SLQNEGQLFV	CGPAKALLSV	RQLVK <u>CDLLA</u>	
		551	<u>EPDDDDSVQE</u>	<u>QRLLMLEDRG</u>	<u>RLNFDIWSTG</u>	<u>NIFE</u>		

(2)	{	1	MRR	<u>PREPAPG</u>	<u>ECCGSGCTRC</u>	<u>VWDIYYDEVA</u>	<u>RFEELIAGGG</u>	<u>IEEDCTQSSE</u>
		51	EEEVVNYIGS	VVVK <u>YIDPPA</u>	<u>LPTGSPGEW</u>	<u>ERAEMKARGF</u>	<u>FPIDRIELVS</u>	
		101	CSTSLFSPTD	PGISVVNLFT	SAKGR <u>TMLPG</u>	<u>DVVEVLVTNS</u>	<u>RGTQDADDVE</u>	
		151	RLCKALR <u>LDP</u>	<u>YAWCELHRSP</u>	FVPEDNFPPW	LPLQKPLTLG	QLLSAYVDIS	
		201	SSSYLLHQSF	FESLFRI <u>YSD</u>	<u>SKPSSASSTS</u>	<u>TTPSPDPEKV</u>	<u>RLLEACASSE</u>	
		251	<u>TGPQLLRSLs</u>	KSSTPLCYPS	LVDVLEVFsf	VQIPLDR <u>LLE</u>	<u>VSGPLQTRRY</u>	
		301	SLANWIPATL	PPSPLQLCMR	EVCAR <u>RSANL</u>	<u>PAATAVGADA</u>	<u>QRVADMLNRA</u>	
		351	AQDASR <u>DHSD</u>	<u>FFFGHTSHPL</u>	<u>CCAAR</u> SMTRS	AAAAGQR <u>GMY</u>	<u>VSFSLFGNSL</u>	
		401	<u>FARQLQAGCT</u>	ALCNPAQAKS	LCSQLFLIGC	GTGIAPLIAA	VTQLMLRRAS	
		451	<u>TAAGSAPFPC</u>	<u>WVfyGARTKA</u>	<u>ELLYDETLQE</u>	<u>ALRTGAIKY</u>	<u>EYALSREEDN</u>	
		501	<u>KKQGRYVTDL</u>	<u>VKRNRLMVTG</u>	SLQNEGQLFV	CGPAKALLSV	RQLVK <u>CDLLA</u>	
		551	<u>EPDDDDSVQE</u>	<u>QRLLMLEDRG</u>	<u>RLNFDIWSTG</u>	<u>NIFE</u>		

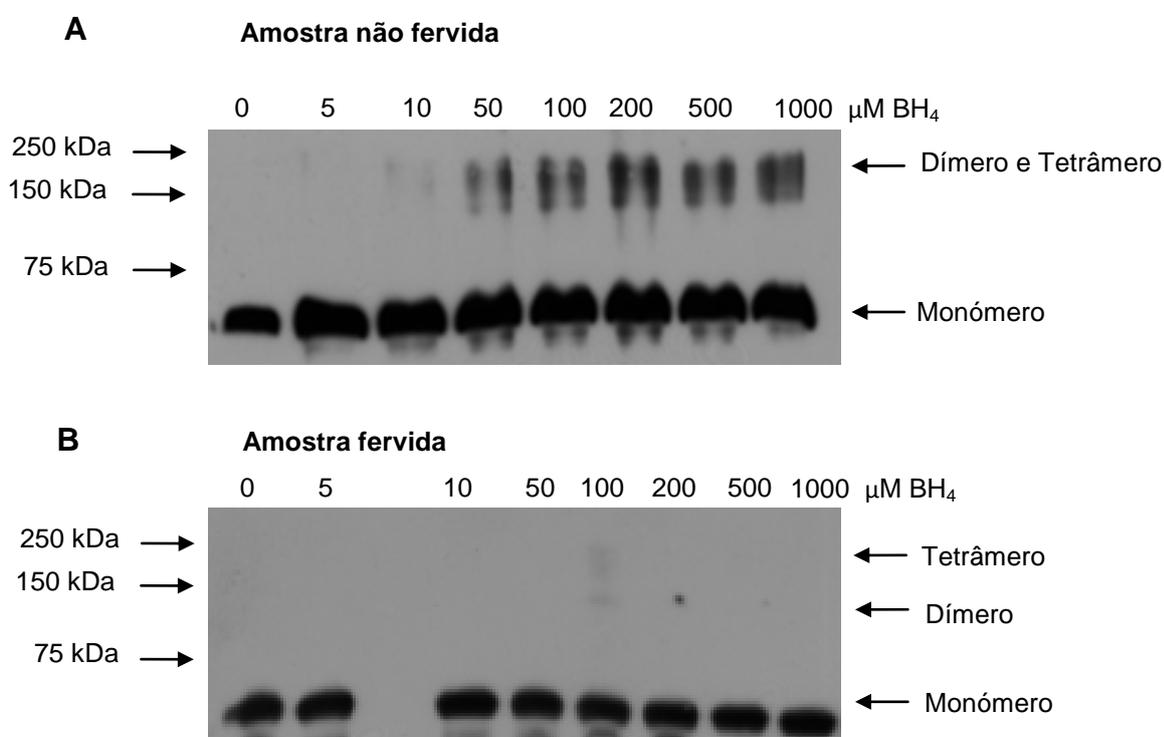
Figura 28: Análise por PMF do dímero e do tetrâmero de *LiNOS*. A identificação do *LiNOS* foi feita após submissão das massas peptídicas à ferramenta MASCOT, para o dímero e para o tetrâmero. (A) Separação da variante hémica do *LiNOS* por LT-PAGE. M, Marcador de massa molecular (BioRad). *LiNOS*, proteína recombinante expressa com heme e dialisada com BH₄. O tetrâmero de aproximadamente 250 kDa (1) e o dímero de aproximadamente 130 kDa (2) foram excisados manualmente. (B) Sequência do *LiNOS* com representação a negrito e sublinhado dos péptidos identificados. Na estrutura tetramérica foram identificados 21 péptidos, correspondente a 43% de cobertura de sequência. Na estrutura dimérica foram identificados 27 péptidos, correspondendo a 45% de cobertura de sequência.

Após submissão das massas monoisotópicas à ferramenta MASCOT, ficou provado que as duas estruturas com massas de aproximadamente 130 e 250 kDa correspondem efectivamente ao *LiNOS*, confirmando que estas são oligómeros do enzima, nomeadamente um dímero e um tetrâmero. Desta forma, foi demonstrado que, ao contrário das diversas isoformas de mamífero, o sintase do óxido nítrico de *L. infantum* é um enzima tetramérico.

Verifica-se curiosamente que a massa do tetrâmero do *Li*NOS (aproximadamente 250 kDa) é similar à massa do dímero das isoformas de NOS de mamíferos (270 kDa para eNOS, 300-320 kDa para o nNOS, e 250-270 kDa para o iNOS (revisto em [46])), remetendo para a ideia de que o tamanho será importante para a função dos enzimas, tendo sido conservado entre espécies distintas (mesmo havendo diferenças significativas a nível estrutural e de sequência).

4.6.2- Influência do grupo heme e do BH₄ para a estrutura quaternária do *Li*NOS

Os resultados já apresentados mostram que o grupo heme estabiliza fortemente a estrutura quaternária do NOS de *L. infantum* (figura 26 A). No entanto, de forma a melhor compreender o efeito do heme, assim como do BH₄, para a estrutura do *Li*NOS é necessário um estudo mais abrangente. Sendo assim, a variante de *Li*NOS sem quaisquer cofactores foi incubada com diferentes concentrações de hemina ou de BH₄ (entre 0 e 1 mM), separada por LT-PAGE em géis de poliacrilamida a 10%, e analisada por *western blot*. A utilização da variante do enzima sem cofactores garantiu que os resultados obtidos não pudessem ter sido influenciados por cofactores já endógenos ao *Li*NOS. Os resultados obtidos são apresentados na figura 29.



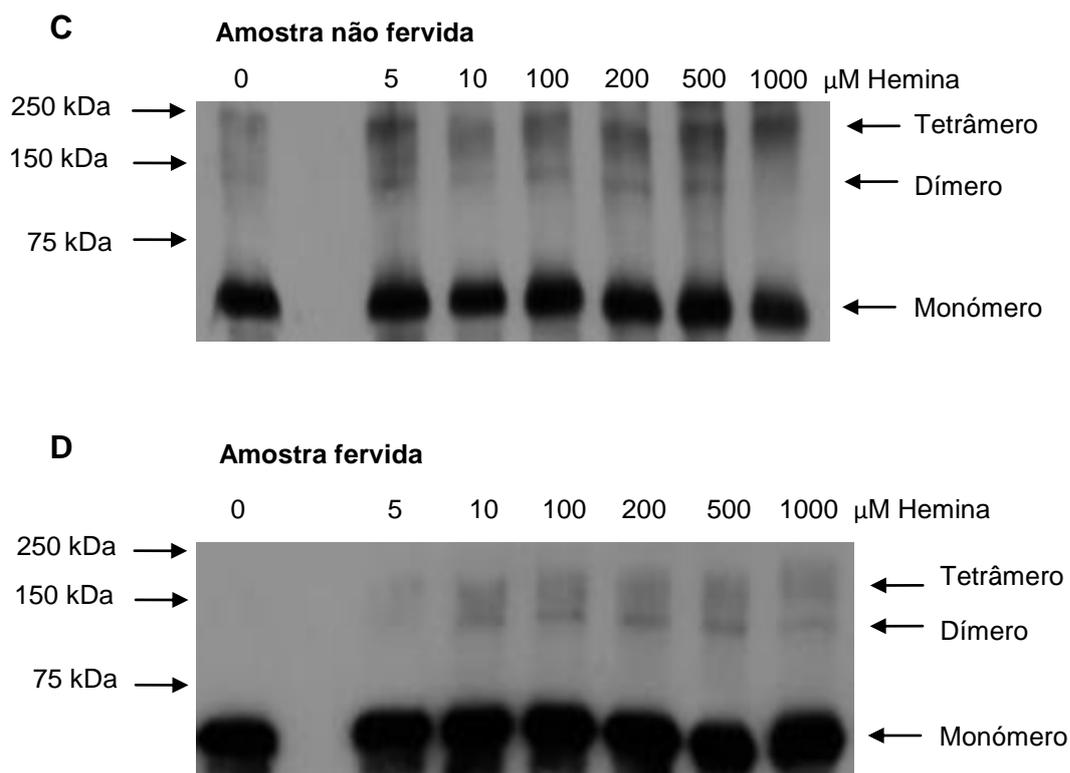
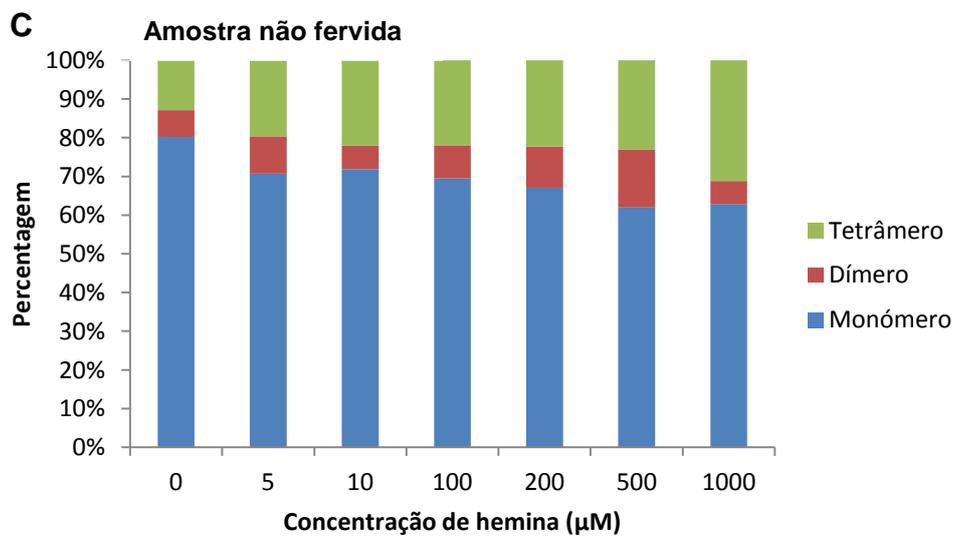
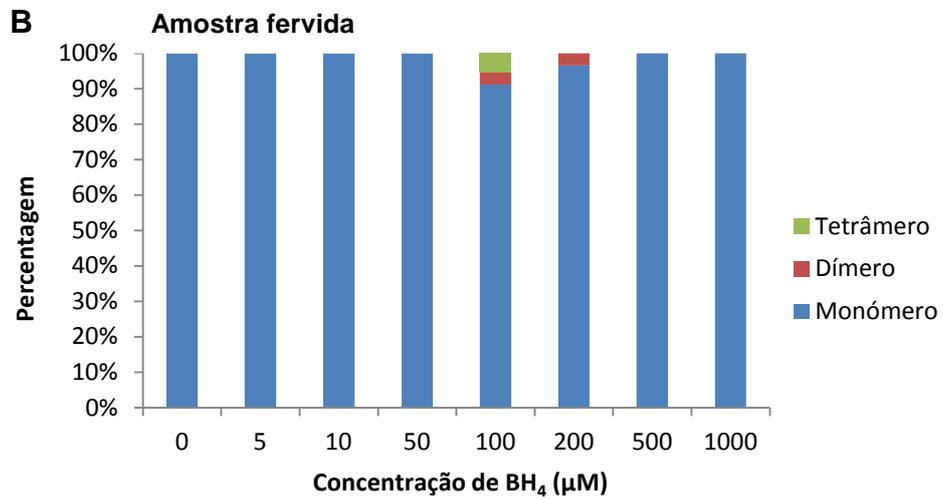
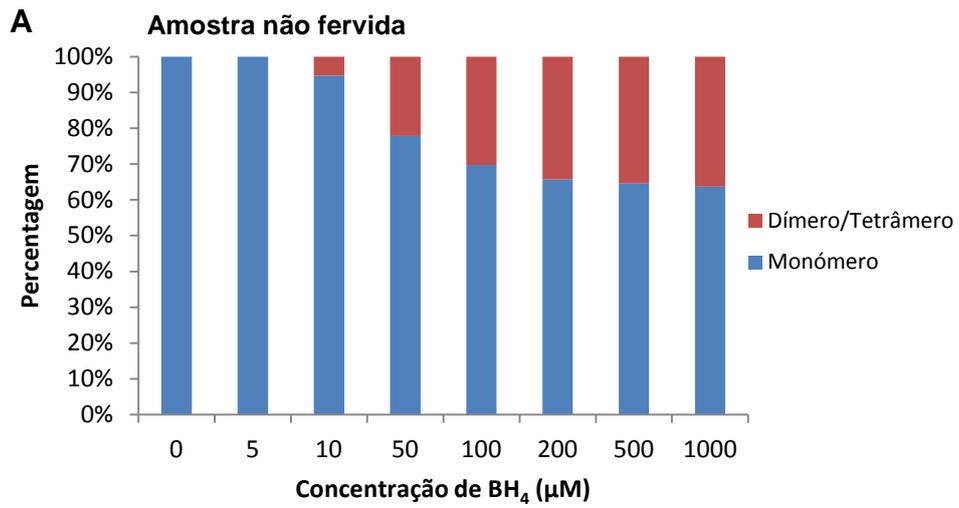


Figura 29. Análise por *western blot* da influência do BH₄ e do grupo heme para a estrutura quaternária do NOS de *L. infantum*. (A e B) *LiNOS* incubado com concentrações crescentes de BH₄, em amostras não fervidas (A) e fervidas (B). (C e D) *LiNOS* incubado com concentrações crescentes de hemina em amostras não fervidas (C) e fervidas (D).

Relativamente à acção do BH₄, observa-se que no caso das amostras não fervidas (Figura 29 A) o aumento da concentração deste cofactor promove o aparecimento de uma marcação entre os 250 e 130 kDa, correspondendo ao dímero e ao tetrâmero (que devido à baixa resolução resultante do uso de géis contínuos, são de difícil distinção). Este resultado mostra que o *LiNOS*, quando em solução na presença de BH₄, liga o referido cofactor, provando que o método utilizado para produzir enzima recombinante com BH₄ é eficiente. Por outro lado, quando as amostras foram fervidas previamente à análise efectuada, o efeito deixa de ser notório (Figura 29 B).

Relativamente ao efeito da hemina sobre o enzima, observa-se também uma estabilização da estrutura quaternária do *LiNOS*, mesmo quando as amostras foram fervidas (Figura 29 D). Contudo, este efeito não é tão evidente como no caso do BH₄, como tal, de forma a obter uma análise mais precisa dos resultados apresentados, a intensidade das bandas obtidas foi quantificada, e os resultados normalizados tendo em consideração a soma das intensidades das 3 espécies oligoméricas (monómero, dímero, tetrâmero, quando detectáveis). Os resultados obtidos são apresentados na figura 30.



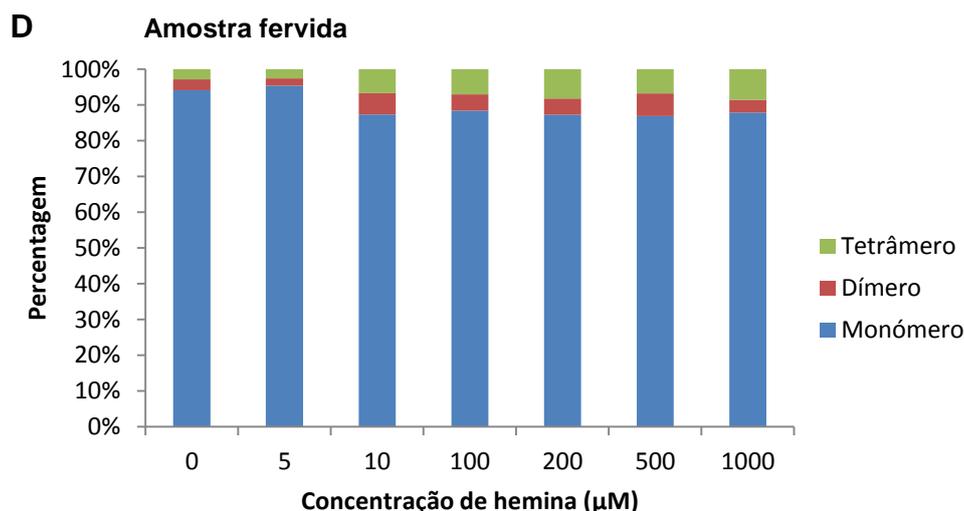


Figura 30. Efeito do BH_4 e do grupo heme sobre a quantidade relativa de monómero, dímero e tetrâmero do *LiNOS*. (A e B) Efeito da incubação com BH_4 em amostras não fervidas (A) e fervidas (B). (C e D) Efeito da incubação com heme em amostras não fervidas (C) e fervidas (D).

Confirma-se o efeito estabilizador do BH_4 em relação à estrutura quaternária do NOS de *L. infantum*, visto a intensidade da banda referente ao dímero e ao tetrâmero aumentar com a concentração do cofactor, ocorrendo também uma diminuição do monómero (figura 30 A).

Os dados relativos à acção da heme sobre o enzima mostram um efeito estabilizador mais acentuado que o BH_4 , visto ser possível detectar estruturas diméricas e tetraméricas do *LiNOS* mesmo para amostras fervidas (comparar figura 30 B com D). Este resultado mostra também que o efeito estabilizador do heme ocorre mesmo com enzima já nativo, não sendo necessário que a expressão ocorra na presença de heme para que ocorra a ligação.

Os resultados relativos à acção do BH_4 foram confirmados em géis de gradiente (dados não apresentados). No entanto, é necessária uma futura confirmação relativamente à quantificação da estabilização promovida pelo heme e pelo BH_4 , permitindo também validar o estudo.

4.6.3 – Acção do NO sobre o *LiNOS*

Tendo verificado a natureza tetramérica do enzima *LiNOS*, procedeu-se para o estudo da influência do NO para a estrutura do mesmo. A análise da sequência do *LiNOS* revelou um local de provável nitrosilação (-K-D-E-, Figura 8), tornando-se assim importante comprovar a formação desta PTM no *LiNOS*, de forma estudar a acção do NO sobre o enzima.

4.6.3.1 - Nitrosilação do sintase do óxido nítrico de *Leishmania infantum*

A nitrosilação é uma modificação pós-traducional lábil e de baixa estabilidade [106], portanto, para testar a nitrosilação do *LiNOS* utilizou-se o método do *biotin-switch* [74], no qual a nitrosilação é convertida em biotinição [107], (descrição detalhada do processo no anexo 8). O dador de NO utilizado foi o nitrosoglutationo (GSNO), tendo também sido realizado um controlo no qual foi utilizado glutationo (GSH). As amostras de *LiNOS* foram posteriormente analisadas por *western blot*, tendo sido utilizado um anticorpo específico para a detectar a biotina. Os resultados obtidos são apresentados na figura 31.

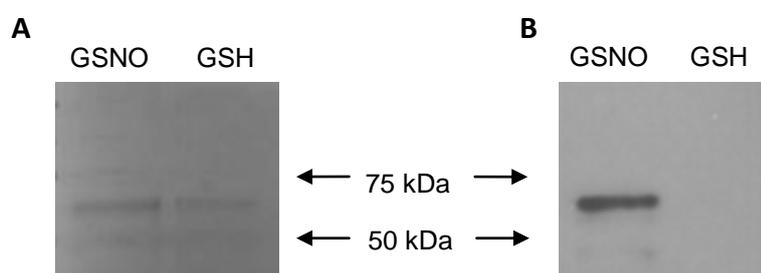


Figura 31: Análise por *western blot* da nitrosilação do enzima *LiNOS* recombinante. Controlo de *loading* (A) e *western blot* com anti-biotina da amostra incubada com nitrosoglutationo (GSNO) e da amostra controlo incubada com glutationo (GSH).

Observa-se por *western blot* a presença de biotina na amostra incubada com o dador de NO. Pelo contrário, não se observou qualquer marcação no controlo incubado com glutationo. Desta forma, foi comprovado que o enzima é efectivamente nitrosilável.

4.6.3.2 – Influência do NO sobre a estrutura quaternária do *LiNOS*

Tendo comprovado a capacidade do *LiNOS* em ser nitrosilado, procedeu-se para o estudo da influência do NO para a estrutura do enzima. Neste sentido, utilizou-se a uma abordagem que teve por base a incubação das três variantes recombinantes de *LiNOS* (enzima com heme e BH_4 , enzima com BH_4 , e a variante sem quaisquer cofactores) com nitrosoglutationo (dador de NO). As amostras foram de seguida separadas por LT-PAGE em gel de gradiente em tampão MES a pH aproximadamente neutro, e analisadas por *western blot* com o anti-*LiNOS*. As intensidades das bandas obtidas foram quantificadas, tendo sido utilizadas para traçar histogramas (figuras 32 e 33).

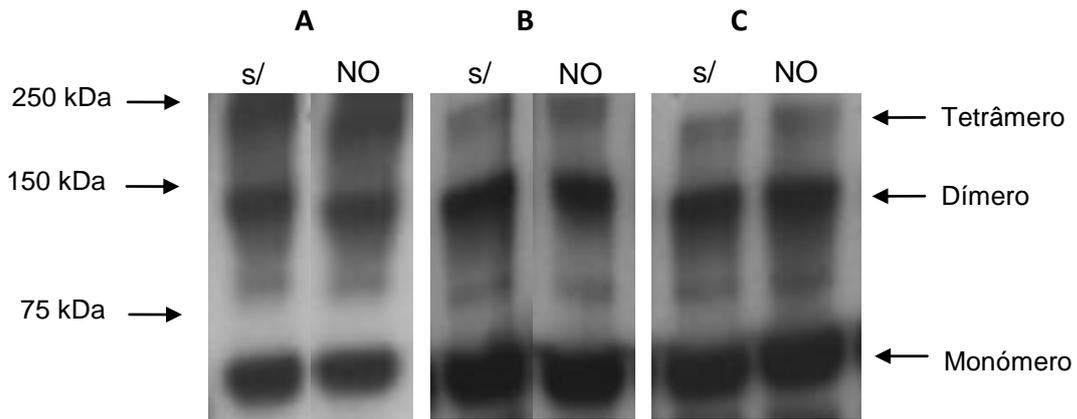
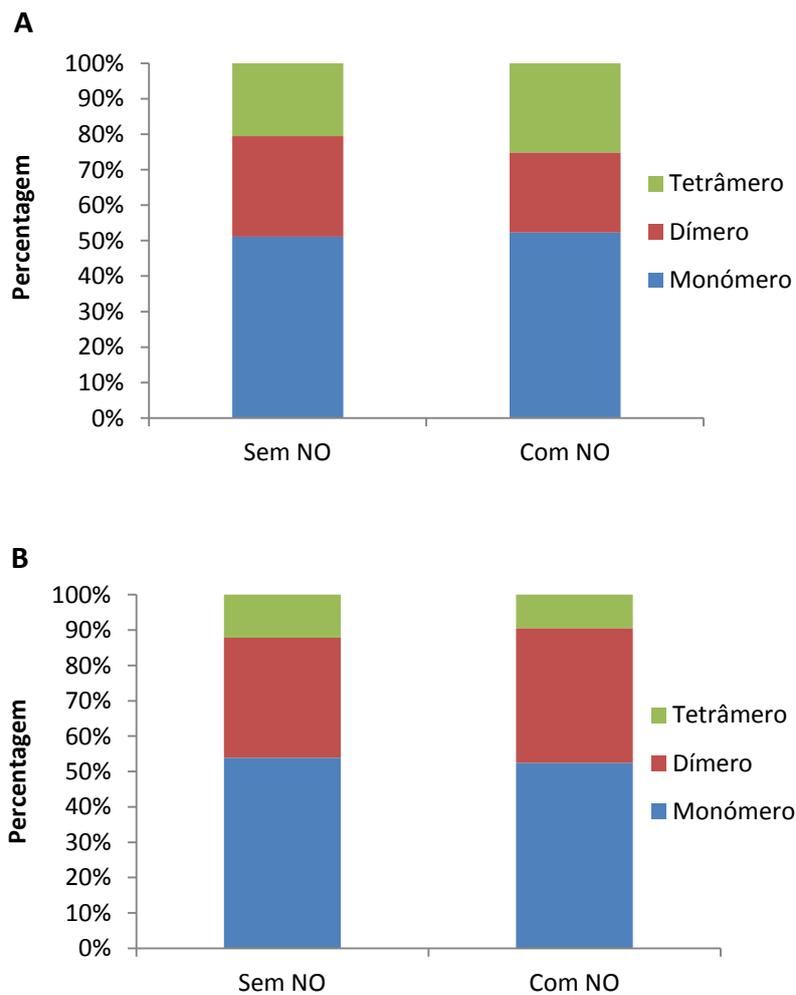


Figura 32: Influência do NO para a estabilidade da estrutura quaternária do *LiNOS*. (A) *LiNOS* com heme e dialisado com BH_4 . (B) *LiNOS* dialisado com BH_4 . (C) *LiNOS* sem cofactores. *s/*, controlo sem NO. NO, amostra tratada com $50 \mu M$ GSNO.



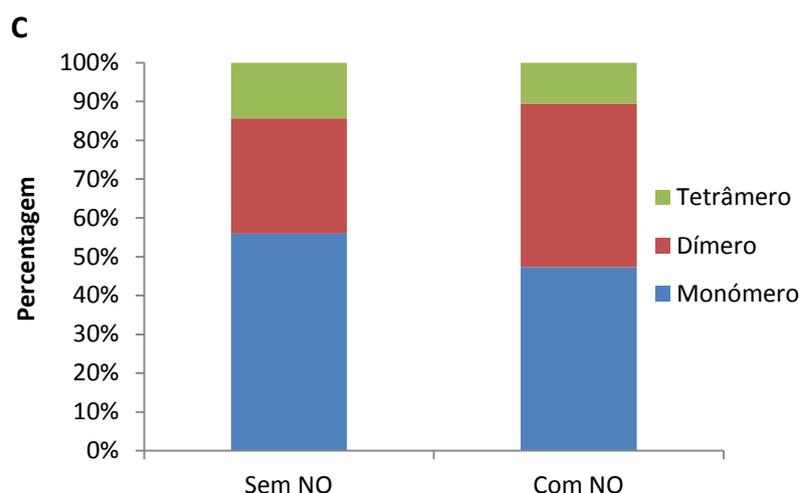


Figura 33: Influência do NO sobre a quantidade relativa de monómero, dímero e tetrâmero para diversas variantes de *LiNOS*. (A) *LiNOS* com heme e BH_4 . (B) *LiNOS* com BH_4 . (C) *LiNOS* sem cofactores.

Os resultados obtidos (figuras 32 e 33), mostram que nas condições utilizadas para experiência, a incubação com 50 μM de GSNO não afectou significativamente a estrutura quaternária do sintase do óxido nítrico de *Leishmania infantum*, pois não se observam alterações claras das três formas do enzima (monómero, dímero e tetrâmero), impedindo assim retirar conclusões. Observa-se também que este facto se verifica para as três variantes de *LiNOS* recombinante testadas (enzima na presença de heme e BH_4 , enzima só com BH_4 , e uma variante sem quaisquer cofactores).

De forma a estudar em maior detalhe a influência do NO para a estrutura quaternária do *LiNOS*, repetiu-se a experiência anterior utilizando a variante de enzima sem quaisquer cofactores, e concentrações mais elevadas de GSNO (entre 0 e 1 mM) (figura 34). Uma vez mais, a intensidade das bandas correspondentes ao *LiNOS* foi quantificada, permitindo traçar os histogramas da figura 35.

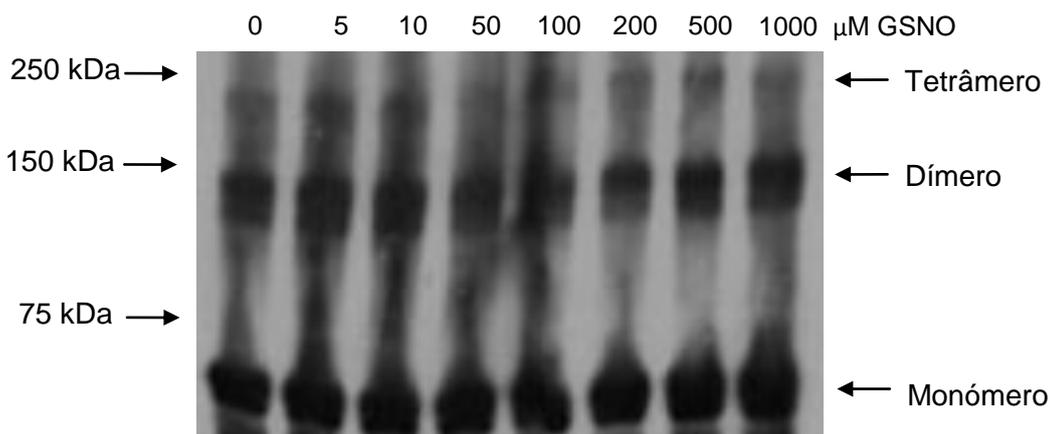


Figura 34: Influência do NO para a estrutura quaternária do NOS de *L. infantum* sem quaisquer cofactores. Incubação com diferentes concentrações de GSNO.

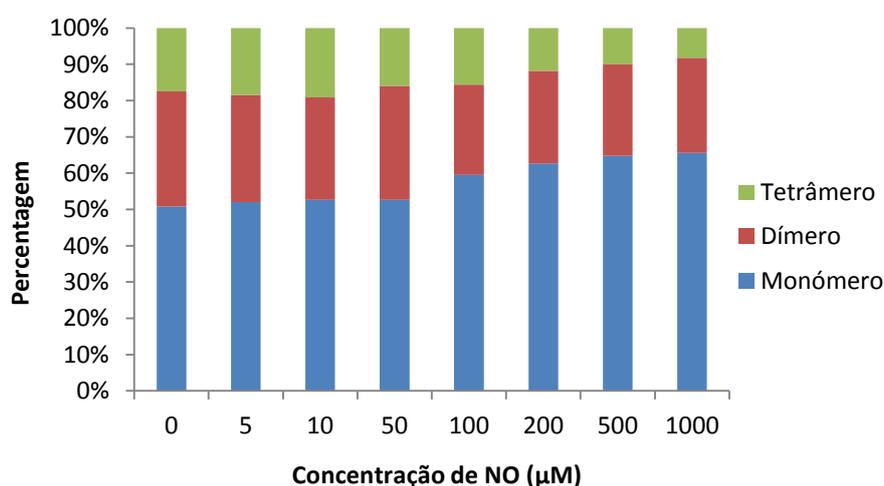


Figura 35: Efeito do NO sobre a quantidade relativa de monómero, dímero e tetrâmero do NOS de *L. infantum* na ausência de cofactores. As amostras foram incubadas com concentrações de GSNO entre 0 e 1000 μM.

A observação directa do *western blot* da figura 34 não permite retirar conclusões, visto não haver diferenças muito significativas entre as bandas presentes nas diversas *lanes*. Contudo, a quantificação densitométrica permitiu perceber que a quantidade relativa das espécies oligoméricas (dímero e tetrâmero) tende a diminuir, enquanto o monómero de *LiNOS* aumenta com a concentração de GSNO (figura 35).

Concluimos portanto que à semelhança do que ocorre para os NOS de mamíferos, o NO promove uma destabilização da estrutura quaternária do sintase do óxido nítrico de *L. infantum*.

O efeito do NO foi reproduzido utilizando géis contínuos a 10% de poliacrilamida. No entanto, a diferenciação entre a estrutura dimérica e tetramérica é difícil. Sendo assim, a realização de mais ensaios utilizando géis de gradiente e a pH neutro é fulcral para uma análise mais detalhada do efeito do NO e para uma quantificação desse mesmo efeito.

Estes resultados poderão indicar um papel do NO na regulação do enzima endógeno, através de um mecanismo de *feedback* negativo, que poderá ocorrer através da nitrosilação do enzima.

O estudo aqui apresentado revela que contrariamente aos NOS de mamíferos, o *Li*NOS adquire a estrutura quaternária sem a necessidade de quaisquer cofactores. Tal como os análogos de mamíferos, o *Li*NOS é também um enzima hémico, sendo que tanto o grupo heme como o BH₄ estabilizam a estrutura quaternária do enzima. Contudo, o grupo heme promove uma maior estabilização do que o BH₄, podendo este ligar-se ao enzima após a obtenção do *folding*. Por outro lado, tanto o grupo heme como o BH₄ ligam-se ao *Li*NOS sem a necessidade que qualquer outro cofactor esteja presente.

Pode concluir-se também que, similarmente aos NOS de mamíferos, a estrutura quaternária do sintase do óxido nítrico de *L. infantum* é destabilizada pelo NO, evidenciando que o NO poderá funcionar *in vivo* como um regulador da actividade do NOS, através de um mecanismo de *feedback* negativo, possivelmente através da nitrosilação do enzima.

5 - Conclusões e perspectivas

A leishmaniose visceral é uma doença ainda sem cura e para a qual não existem vacinas humanas, que se apresenta actualmente como um problema latente na zona Mediterrânica, onde o parasita causador da mesma – a *Leishmania infantum* – é endémico. Factores como a expansão do território afectado pelo parasita (devido às alterações climáticas), e um controlo deficitário tanto do vector (mosca da areia) como do reservatório (principalmente o cão), fazem com que o aparecimento de epidemias tenha um risco cada vez mais elevado. Como tal, o desenvolvimento de fármacos eficazes contra estes parasitas é de especial importância (revisto em [10, 16, 17, 22, 24, 26]).

A grande quantidade de informação disponibilizada pela sequenciação do genoma [108] possibilitou a pesquisa de novos potenciais alvos terapêuticos, idealmente apresentando grandes diferenças relativamente ao hospedeiro, como é o caso do enzima sintase do óxido nítrico.

Com este projecto, comprovou-se a expressão de um NOS em *Leishmania infantum*, cujas características permitem estabelecer comparações com os NOS constitutivos de mamíferos (eNOS e nNOS), nomeadamente: a actividade dependente do cálcio, uma expressão constitutiva e oligomerização independente do BH₄.

Observámos que a actividade do NOS é superior em promastigotas em fase exponencial de crescimento, decrescendo para promastigotas em estado estacionário, e atingindo o valor mais baixo em amastigotas. Está descrito que a expressão dos internalizadores dos precursores de BH₄ decresce ao longo do ciclo de vida da *Leishmania* (expressão em promastigotas em crescimento > expressão em promastigotas em estado estacionário > amastigotas) [94]. A concentração de BH₄ intracelular foi já quantificada em *Leishmania major*, sendo elevada em promastigotas em divisão [95]. No mesmo estudo, foi também reportado que a metaciclógenese (e consequentemente a infectividade dos parasitas) diminui com o aumento da concentração de BH₄. Visto que demonstrámos a grande relevância do BH₄ para a actividade do NOS de *L. infantum*, e que a actividade do enzima é mais elevada em promastigotas em crescimento, os resultados aqui apresentados suportam a hipótese de que a actividade do NOS poderá ser relevante para o controlo da metaciclógenese, através de uma regulação promovida pela alteração da concentração intracelular de BH₄.

Um estudo futuro a este nível passaria pela elucidação da hipótese formulada, em primeiro lugar confirmando a concentração mais elevada de BH₄ em parasitas de *Leishmania infantum* em fase exponencial de crescimento. Seguidamente, a comparação da nitrosilação basal nos diversos estadios permitiria testar se a actividade é superior *in vivo*, e finalmente a identificação das proteínas

diferencialmente nitrosiladas entre promastigotas em divisão e os outros estádios poderia permitir a identificação de alvos relacionados com o controlo da metaciclógenese.

O trabalho aqui apresentado permitiu a expressão de enzima ligado ao heme, mostrando assim que tal como os NOS de mamíferos, o NOS de *L. infantum* é também um enzima hémico. Contudo, apresenta a particularidade de possuir uma estrutura tetramérica que se forma sem a necessidade de cofactores, enquanto todas as isoformas conhecidas de NOS de mamíferos correspondem a enzimas diméricos e que necessitam de heme para formar a estrutura quaternária. No entanto, tanto o heme como o BH_4 aumentam a estabilidade do NOS de *L. infantum*, sendo que o heme confere uma elevada estabilidade a temperaturas elevadas. No futuro, a continuidade deste estudo passaria pela elucidação da acção de outros cofactores e do substrato para a estrutura do enzima, e pela confirmação da estrutura tetramérica por HPLC, utilizando uma coluna de exclusão molecular.

Tal como previsto com base na sequência primária do *LiNOS*, o enzima é nitrosilável, e similarmente ao que se observa para as isoformas de NOS de mamífero, o NO promove a destabilização da estrutura quaternária do enzima.

Com base na informação estrutural obtida, foi possível desenvolver o seguinte modelo para a tetramerização do *LiNOS*:

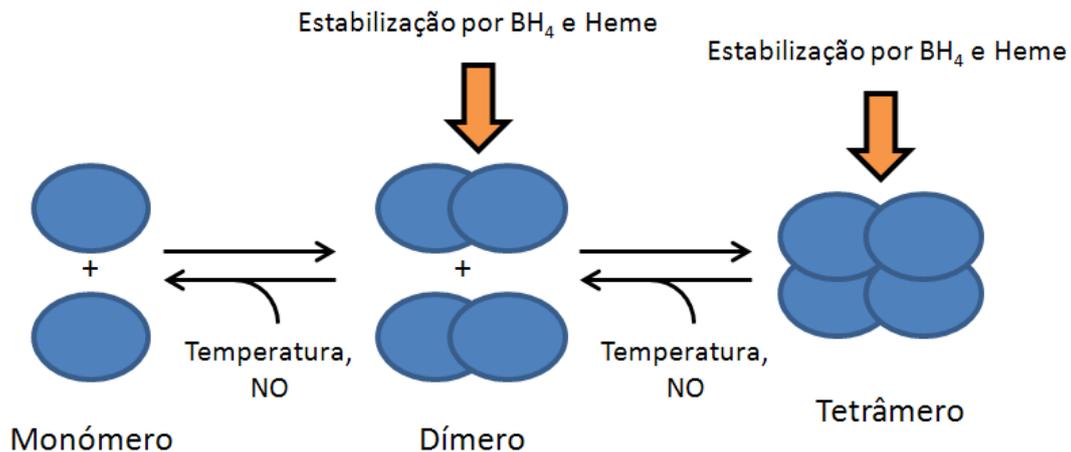


Figura 36: Modelo da formação da estrutura quaternária do NOS de *L. infantum*. A dimerização e tetramerização do enzima ocorre sem a necessidade da acção de cofactores. Tanto o BH_4 como o heme estabilizam a estrutura quaternária do enzima, sendo que o heme é um estabilizador bastante mais forte que o BH_4 , tornando os oligómeros pouco sensíveis à temperatura. O NO promove a destabilização da estrutura quaternária do *LiNOS*.

6 - Anexos

Anexo 1 – Representação do plasmídeo pET28a

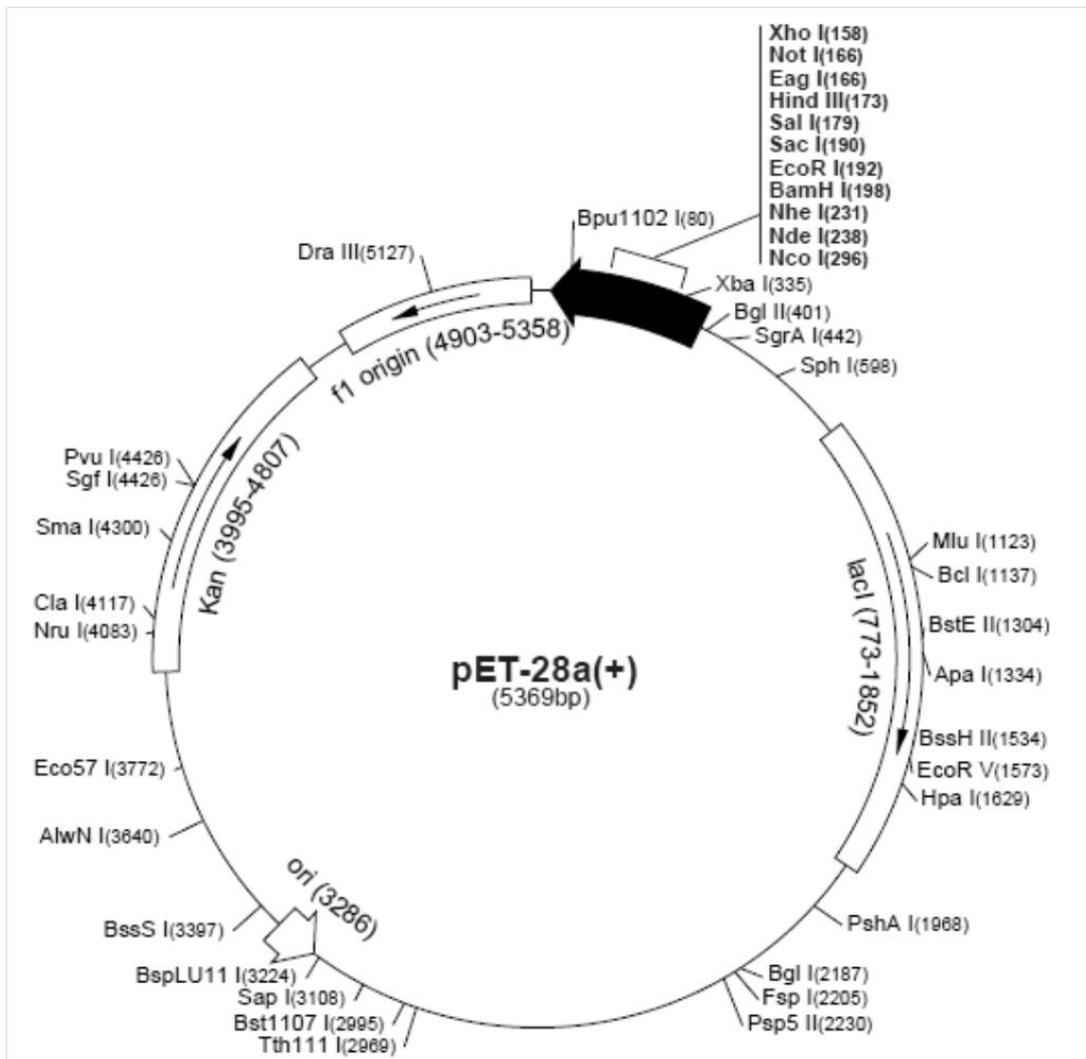


Figura A1: Representação do plasmídeo pET-28-a (Invitrogen). Presença do marcador de selecção para kanamicina, e codificação para uma cauda de 6 histidinas no N-terminal da sequência a expressar.

Anexo 2 – Representação do plasmídeo pTEX

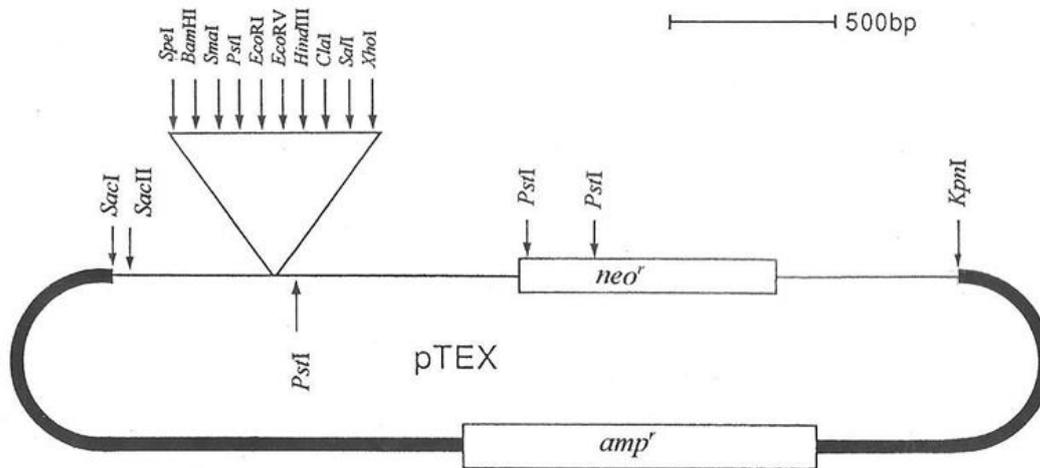


Figura A2: Representação do plasmídeo pTEX (cedido pelo grupo de Parasitologia Molecular do IBMC –UP). Presença do marcador de selecção para ampicilina.

Anexo 3 – Espectro de MALDI-FTICR do *LiNOS* recombinante

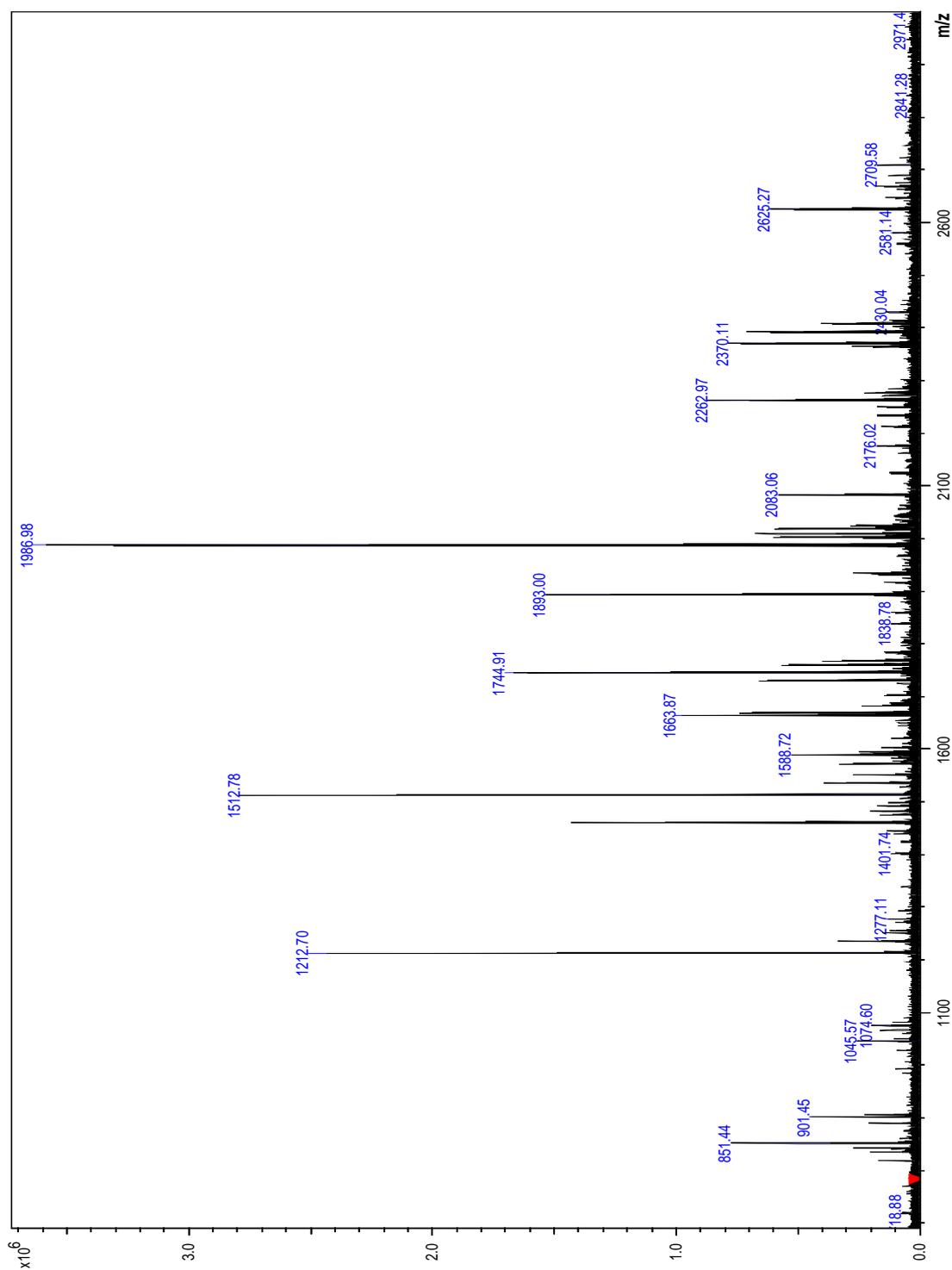


Figura A3: Espectro de MALDI-FTICR obtido para o *LiNOS* recombinante digerido in gel com tripsina

Anexo 4 – Espectro de MALDI-FTICR do dímero de *LiNOS* recombinante.

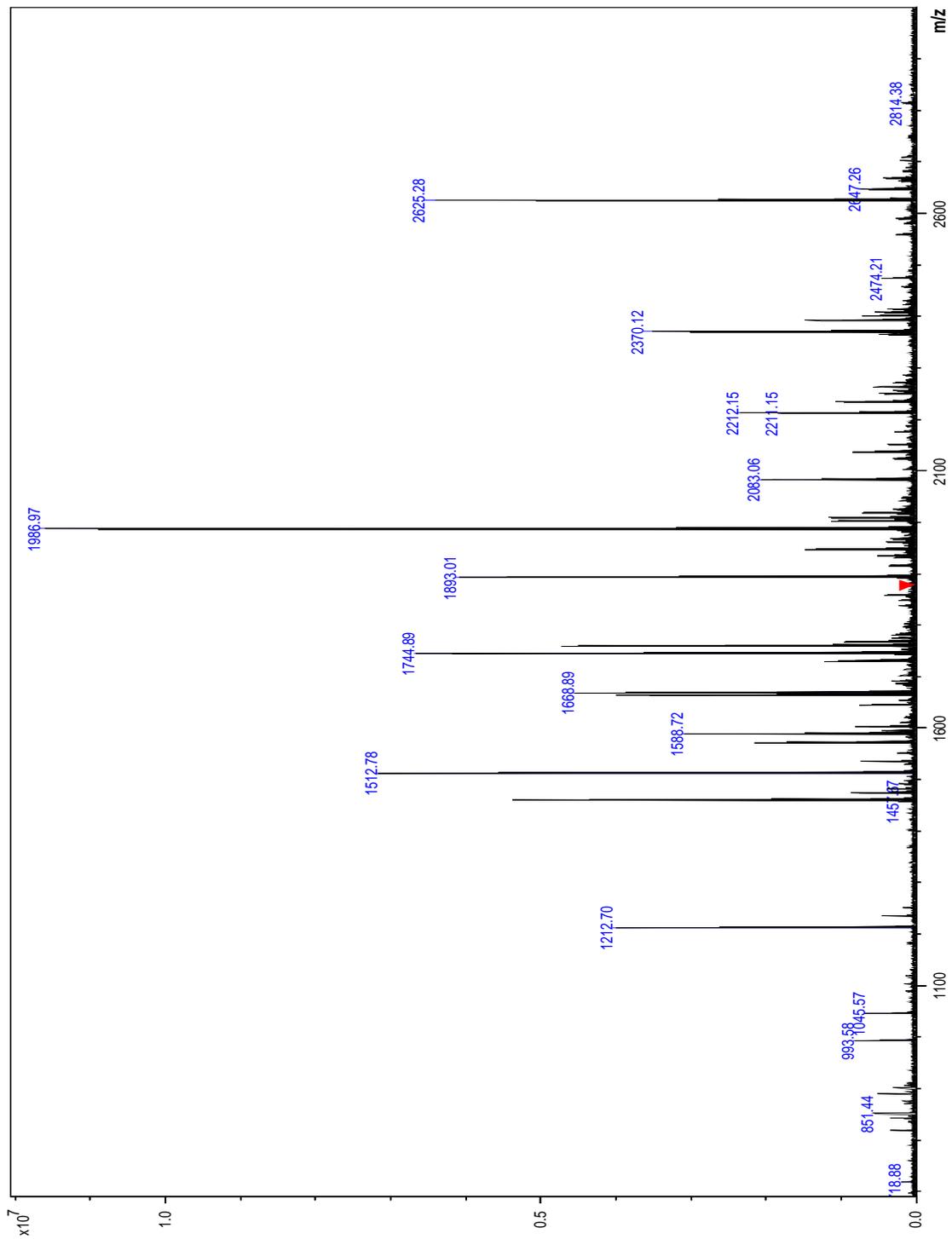


Figura A4: Espectro de MALDI-FTICR obtido para o dímero de *LiNOS* recombinante, digerido in gel com tripsina

Anexo 5 – Espectro de MALDI-FTICR do tetrâmero de *LiNOS* recombinante.

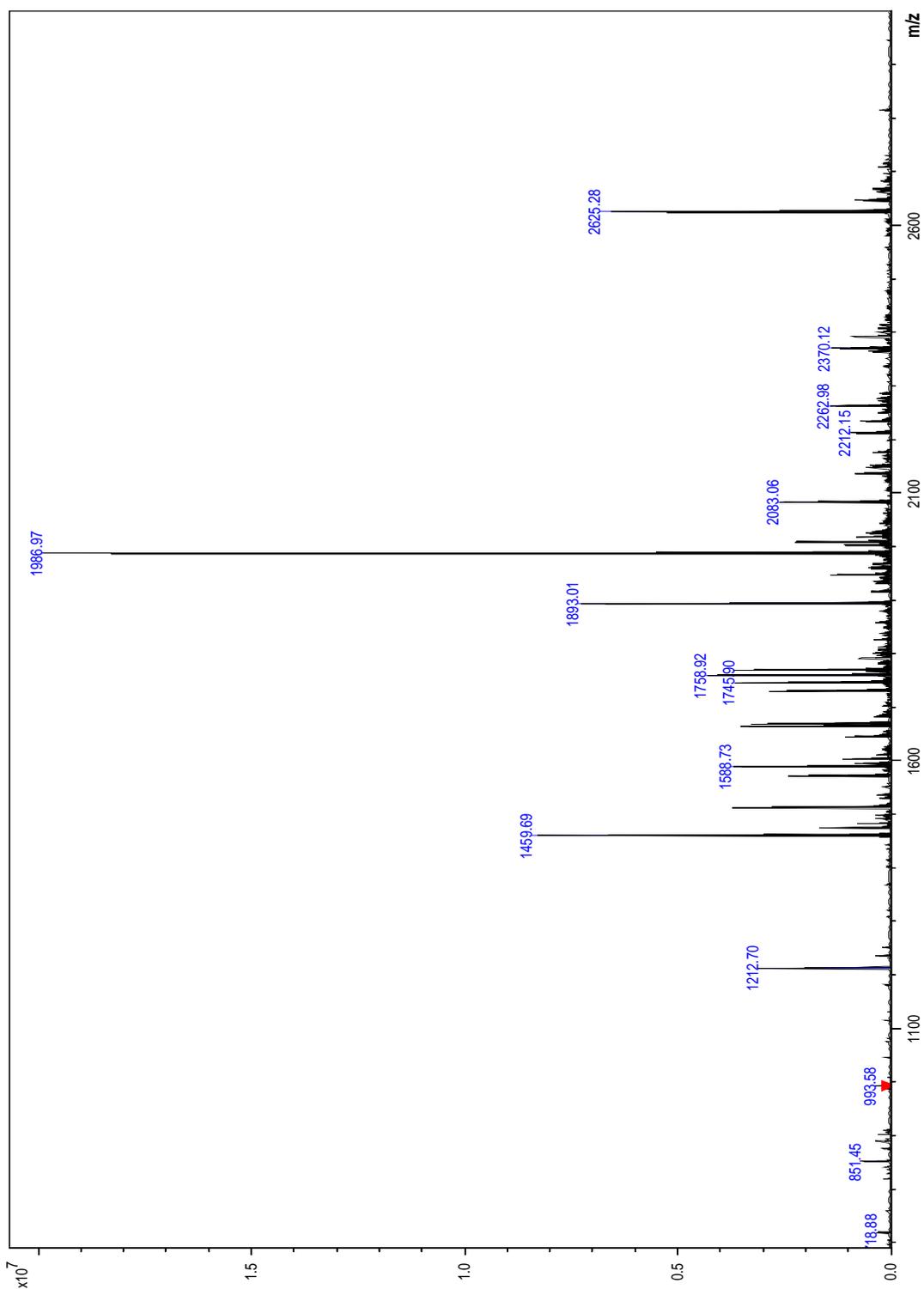


Figura A5: Espectro de MALDI-FTICR obtido para o tetrâmero de *LiNOS* recombinante, digerido *in gel* com tripsina.

Anexo 6 – Método da oxi-hemoglobina

Um método bastante comum de determinar a actividade do NOS tem por base a conversão de oxi-hemoglobina (oxyHb) a meta-hemoglobina (metHb) por reacção com o NO, e que pode ser descrita segundo a equação 1 [109].

(1)

Tanto a oxi-hemoglobina como a meta-hemoglobina possuem espectros de UV-Vis muito característicos: o espectro de absorção da oxi-hemoglobina (a pH 7,4) é caracterizado por uma banda de solet (banda γ) com máximo de absorção a 421 nm, e por duas bandas β e α menos intensas com máximos a 542 e 577 nm, respectivamente. O espectro da meta-hemoglobina apresenta os máximos de absorção da banda de solet a 405 nm (figura A6-1) [109].

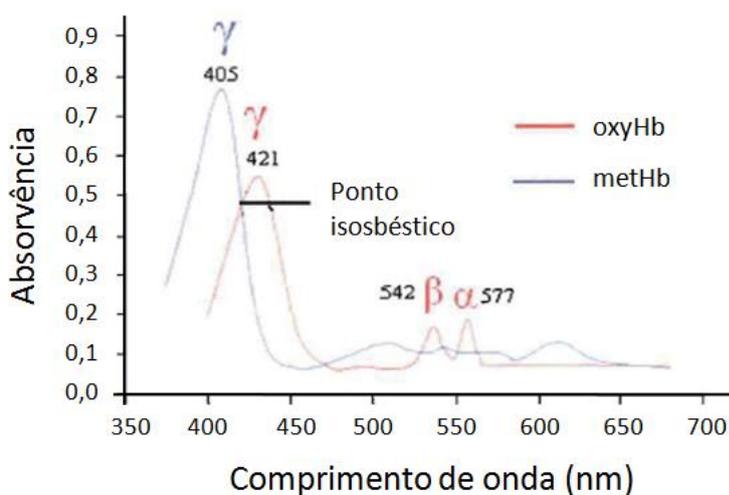


Figura A6-1: Sobreposição dos espectros da oxi-hemoglobina (oxyHb) e da meta-hemoglobina (metHb). O ponto de intersecção representa o ponto isobéptico, em que a absorção das duas espécies é idêntica. A forma (di)oxigenada da hemoglobina (oxyHb) apresenta máximos de absorção a 415, 542 e 577 nm, enquanto a forma oxidada (metHb) possui os máximos de absorção a 405 nm (adaptado de [109]).

A actividade do NOS pode então ser determinada indiretamente através da adição de oxi-hemoglobina à mistura reaccional, e subsequente monitorização da conversão espectral da forma oxigenada em meta-hemoglobina (figura A6-2). A extensão de conversão em meta-hemoglobina ao longo do tempo (e

consequentemente, de produção de NO), é obtida através da diferença entre a absorvência a 401 e 421 nm, que correspondem respectivamente ao mínimo e ao máximo de absorção da forma meta-hemoglobina (visto permitir uma maior sensibilidade que a diferença entre o mínimo da absorvência da metHb (401 nm) e o valor do ponto isobéstico (411 nm)) [88, 110].

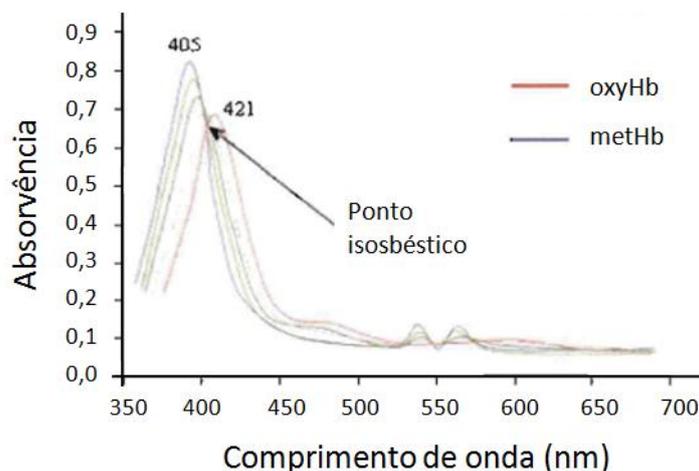


Figura A6-2: Alterações espectrais do espectro de absorção da oxi-hemoglobina pela conversão a meta-hemoglobina promovida pelo NO [109].

Este método com base na oxidação da oxi-hemoglobina é vantajoso para a determinação da actividade do NOS, na medida em que permite uma elevada sensibilidade, sendo também bastante específico para o NO em condições aeróbias. A reacção entre o NO e a oxi-hemoglobina é extremamente rápida (pensa-se que poderá ser pelo menos 26 vezes mais rápida que a autooxidação do NO), sendo portanto pouco afectada por outros competidores, como oxigénio, radical superóxido ou tióis. Por outro lado, apresenta-se também como um método não muito dispendioso e de fácil implementação [109].

Contudo, possui algumas limitações, prendendo-se a maior das quais com o facto de não existir oxi-hemoglobina comercial. Sendo assim, é necessário prepará-la a partir da forma meta, num processo que envolve a redução dos grupos heme por ditionito, seguido de oxidação e remoção do redutor [111]. Por outro lado, sendo um método indirecto, pode apresentar restrições relativamente aos compostos adicionados à solução de reacção, visto poderem interferir directamente com a hemoglobina.

No entanto, pelas vantagens atrás referidas, esta apresentou-se como a melhor forma ao nosso dispor para estudar a actividade do sintase do óxido nítrico.

Anexo 7 – Esquema de purificação do anticorpo

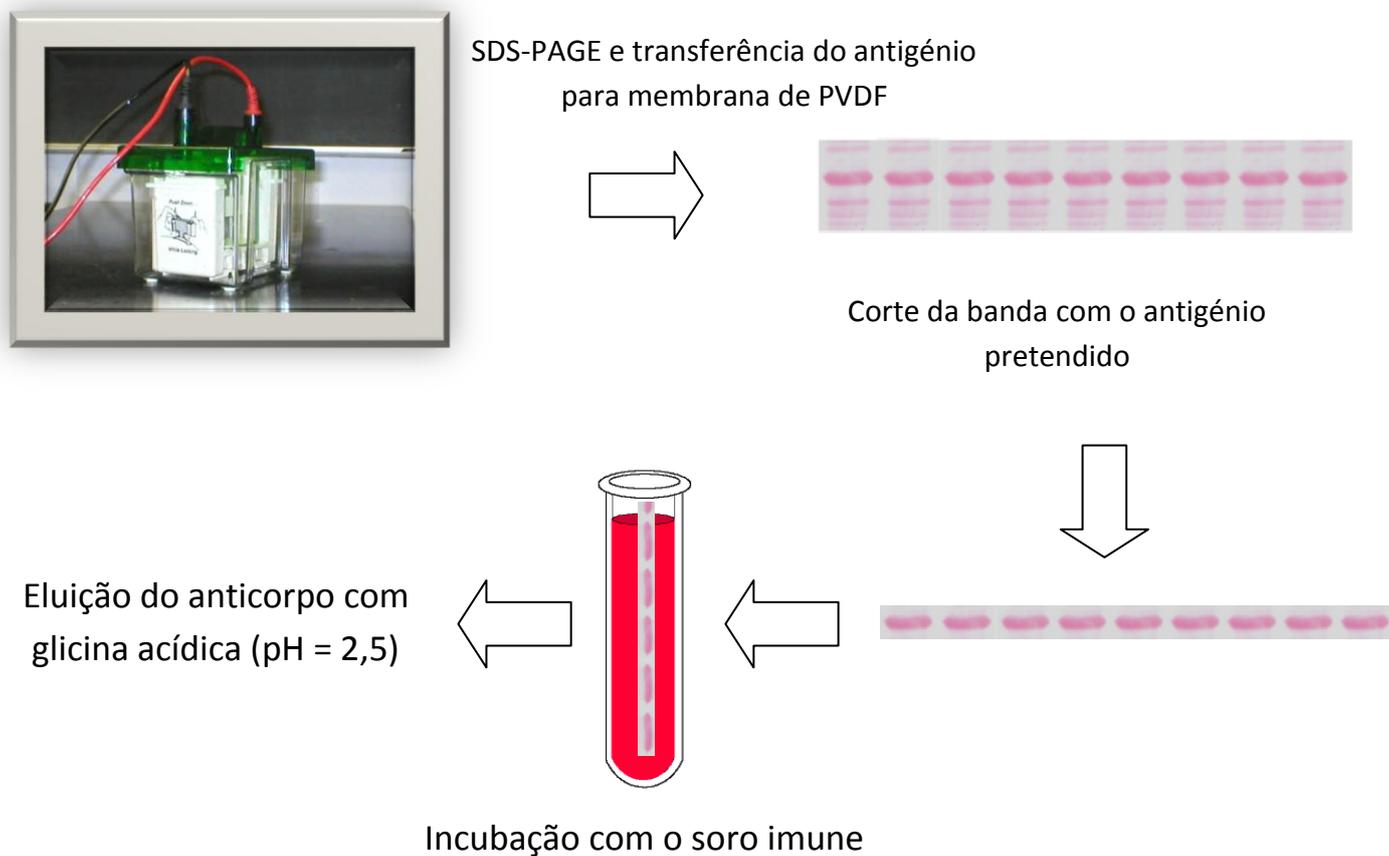


Figura A7: Esquema do processo utilizado para purificação do anticorpo específico para o NOS de *Leishmania infantum*, usando a técnica de *blotted antigen*. O enzima recombinante foi separado dos contaminantes por SDS-PAGE (A), e transferido para uma membrana de PVDF. A membrana foi corada com crante de Ponceau, e a tira com a proteína de interesse foi cortada (B). A zona da membrana com o LiNOS foi incubada com o soro imune do rato, e o anticorpo de interesse foi eluído com tampão glicina-HCl a pH ácido (pH = 2,5), e neutralizado com tampão Tris-HCl 1M, pH 8,8 .

Anexo 8 – Método *biotin-switch*.

O método *biotin-switch* é uma técnica que promove a biotinição das cisteínas nitrosiladas existentes numa ou mais proteínas, formando assim uma estrutura estável. Desta forma, esta é uma técnica que permite o estudo do nitrosoproteoma, ou seja, o conjunto das proteínas existentes num organismo que podem ser nitrosiladas (seja por nitrosilação induzida ou basal).

A indução da nitrosilação de proteínas inicia-se com a adição de um dador de NO à solução proteica, induzindo a nitrosilação de todas as cisteínas onde esta possa ocorrer. Posteriormente, todas as outras cisteínas que não foram nitrosiladas são bloqueadas. A adição de ascorbado à mistura reaccional leva à redução das cisteínas nitrosiladas, tornando-as reactivas. Finalmente, a adição de HPDP-biotina promove a biotinição das cisteínas que se encontraram nitrosiladas no início do processo (figura A8). A mistura reaccional pode ser posteriormente analisada por *western blot* ou MS, por exemplo.

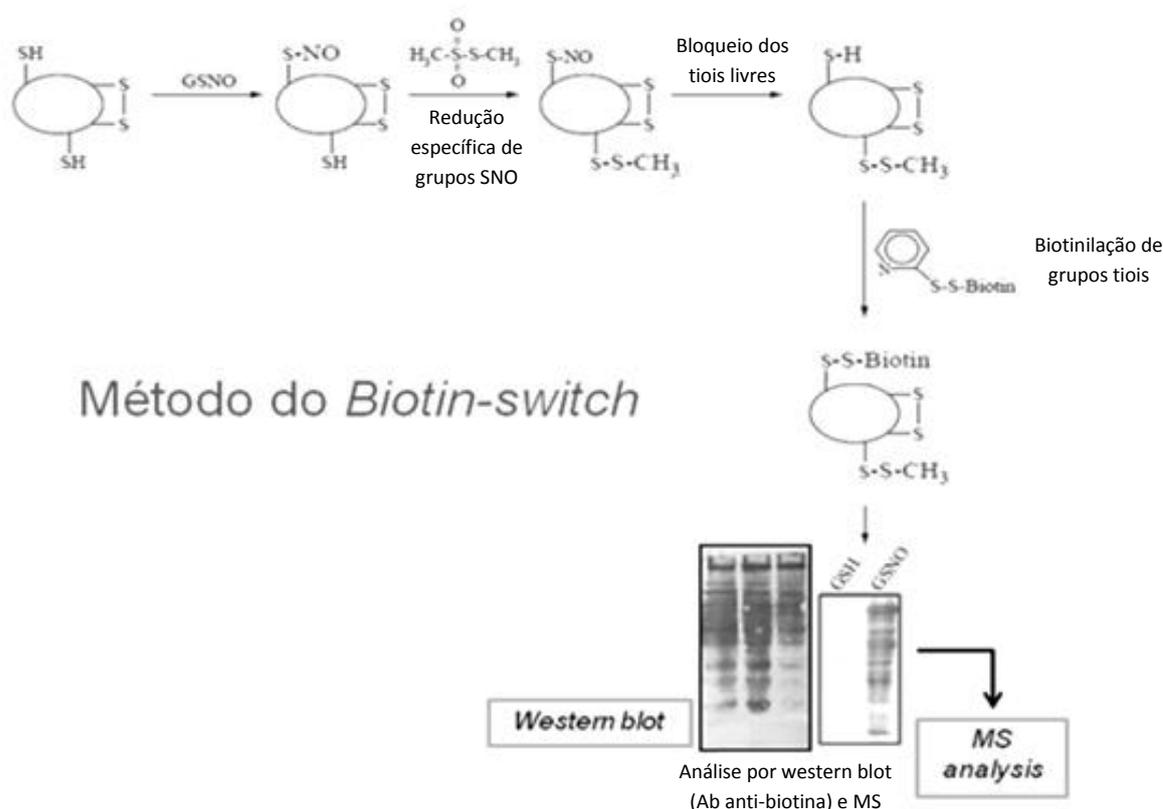


Figura A8: Esquema do processo *biotin switch*. Biotinição das cisteínas nitrosiláveis.

7 - Referências

1. McConville, M.J. and T. Naderer, Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol*, 2011. **65**: p. 543-61.
2. Jong, E.C. and R. McMullen, *The travel and tropical medicine manual*. 3rd ed. 2003, Philadelphia, Pa.: Saunders. xviii, 644 p.
3. Desjeux, P., *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2004. **27**(5): p. 305-18.
4. Burchmore, R.J. and M.P. Barrett, Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*. *Int J Parasitol*, 2001. **31**(12): p. 1311-20.
5. Handman, E., *Leishmaniasis: current status of vaccine development*. *Clin Microbiol Rev*, 2001. **14**(2): p. 229-43.
6. Akopyants, N.S., et al., Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*, 2009. **324**(5924): p. 265-8.
7. Neuber, H., *Leishmaniasis*. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2008. **6**(9): p. 754-65.
8. Tomás, A.M.R., S. F. *Biologia do parasita (Capítulo I)*. In: *Leishmaniose canina*, Santos-Gomes, G. M. e IMfonseca Eds. Lisboa: Chaves Ferreira Publicações S.A. (2008).
9. Haldar, A.K., Sen, P. and Roy, S, Use of Antimony in the Treatment of *Leishmaniasis: Current Status and Future Directions*. *Molecular Biology International*, 2011. **2011**: p. 1-23.
10. Ready, P.D., *Leishmaniasis emergence in Europe*. *Euro Surveill*, 2010. **15**(10): p. 19505.
11. Reithinger, R., et al., *Cutaneous leishmaniasis*. *Lancet Infect Dis*, 2007. **7**(9): p. 581-96.
12. Grevelink, S.A. and E.A. Lerner, *Leishmaniasis*. *J Am Acad Dermatol*, 1996. **34**(2 Pt 1): p. 257-72.
13. Salman SM, R.N., Kibbi AG, *Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis*. *Clin Dermatol*, 1999. **17**(3): p. 291-6.
14. David, C.V. and N. Craft, *Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis*. *Dermatol Ther*, 2009. **22**(6): p. 491-502.
15. Goto, H. and J.A. Lindoso, *Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010. **8**(4): p. 419-33.
16. Tiuman, T.S., et al., *Recent advances in leishmaniasis treatment*. *Int J Infect Dis*, 2011. **15**(8): p. e525-32.
17. Palatnik-de-Sousa, C.B. and M.J. Day, *One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis*. *Parasit Vectors*, 2011. **4**: p. 197.
18. Murray, H.W., et al., *Advances in leishmaniasis*. *Lancet*, 2005. **366**(9496): p. 1561-77.
19. Michel, G., et al., *Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human*. *Acta Trop*, 2011. **119**(2-3): p. 69-75.
20. Singh, S., U. Sharma, and J. Mishra, *Post-kala-azar dermal leishmaniasis: recent developments*. *Int J Dermatol*, 2011. **50**(9): p. 1099-108.
21. Ganguly, S., et al., *Post-kala-azar dermal leishmaniasis--an overview*. *Int J Dermatol*, 2010. **49**(8): p. 921-31.

22. Kaye, P.M. and T. Aebischer, Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clin Microbiol Infect*, 2011. **17**(10): p. 1462-70.
23. Coler, R.N. and S.G. Reed, Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 2005. **21**(5): p. 244-9.
24. Campino L., C.M., *Epidemiologia das Leishmanioses em Portugal*. *Acta Med Port*, 2010. **23**: p. 859-864.
25. Srivastava, P., et al., Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2011. **105**(1): p. 1-6.
26. Reis, A.B., et al., Immunity to Leishmania and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 2010. **26**(7): p. 341-9.
27. Quinnell, R.J. and O. Courtenay, Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 2009. **136**(14): p. 1915-34.
28. Dujardin, J.C., et al., Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis*, 2008. **14**(7): p. 1013-8.
29. Solano-Gallego, L., et al., Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 2009. **165**(1-2): p. 1-18.
30. Silva, F.S., *Caracterização do sintase do óxido nítrico de Leishmania infantum*. 2010.
31. Demple, B., Protection from the dark side of NO: Signaling and cellular defenses against nitric oxide toxicity. *Iubmb Life*, 2004. **56**(2): p. 59-64.
32. Knowles, R.G. and S. Moncada, Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 1994. **298 (Pt 2)**: p. 249-58.
33. Martinez-Ruiz, A., S. Cadenas, and S. Lamas, Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radic Biol Med*, 2011. **51**(1): p. 17-29.
34. Stuehr, D.J., Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1411**(2-3): p. 217-30.
35. Mayer, B. and P. Andrew, Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1998. **358**(1): p. 127-33.
36. Moncada, S. and E.A. Higgs, Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J*, 1995. **9**(13): p. 1319-30.
37. Nathan, C., Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 1992. **6**(12): p. 3051-64.
38. Marletta, M.A., Nitric oxide: biosynthesis and biological significance. *Trends Biochem Sci*, 1989. **14**(12): p. 488-92.
39. Sekar, Y., et al., Protein tyrosine nitration of aldolase in mast cells: a plausible pathway in nitric oxide-mediated regulation of mast cell function. *J Immunol*, 2010. **185**(1): p. 578-87.
40. Mitchell, D.A., et al., S-Nitrosation and regulation of inducible nitric oxide synthase. *Biochemistry*, 2005. **44**(12): p. 4636-47.
41. Ravi, K., et al., S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased enzyme activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(8): p. 2619-2624.
42. Gkaliagkousi, E. and A. Ferro, Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front Biosci*, 2011. **16**: p. 1873-97.

43. Paul, V. and P. Ekambaram, Involvement of nitric oxide in learning & memory processes. *Indian J Med Res*, 2011. **133**: p. 471-8.
44. Bogdan, C., Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*, 2001. **2**(10): p. 907-16.
45. Daff, S., NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 2010. **23**(1): p. 1-11.
46. Gilbert Daniel, L. and C.A. Colton, *Reactive oxygen species in biological systems : an interdisciplinary approach*. 1999, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. xxv, 707 p.
47. Venema, R.C., et al., Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem*, 1997. **272**(2): p. 1276-82.
48. Cho, H.J., et al., Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med*, 1992. **176**(2): p. 599-604.
49. Werner, E.R., N. Blau, and B. Thony, Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem J*, 2011. **438**(3): p. 397-414.
50. Cochrane, C.G. and M.A. Gimbrone, *Biological oxidants : generation and injurious consequences. Cellular and molecular mechanisms of inflammation,*. 1992, San Diego: Academic Press. x, 253 p.
51. Reif, D.W. and S.A. McCreedy, N-nitro-L-arginine and N-monomethyl-L-arginine exhibit a different pattern of inactivation toward the three nitric oxide synthases. *Arch Biochem Biophys*, 1995. **320**(1): p. 170-6.
52. Colasanti M, G.L., Mattu M, Persichini T, Salvati L, Venturini G, Ascenzi P., Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). *Int J Mol Med.*, 2002. **9**(2): p. 131-4.
53. Nathan C, S.M., Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2000. **97**(16): p. 8841-8.
54. Brunet, L.R., Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunopharmacol*, 2001. **1**(8): p. 1457-67.
55. Clark, I.A. and K.A. Rockett, Nitric oxide and parasitic disease. *Adv Parasitol*, 1996. **37**: p. 1-56.
56. Pirmez, C., et al., Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999. **37**(6): p. 1819-1823.
57. Li, Y., et al., Catalase inhibits nitric oxide synthesis and the killing of intracellular *Leishmania major* in murine macrophages. *Eur J Immunol*, 1992. **22**(2): p. 441-6.
58. Adhuna, A., P. Saltora, and R. Bhatnagar, Nitric oxide induced expression of stress proteins in virulent and avirulent promastigotes of *Leishmania donovani*. *Immunol Lett*, 2000. **71**(3): p. 171-6.
59. Holzmuller, P., D. Sereno, and J.L. Lemesre, Lower nitric oxide susceptibility of trivalent antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(10): p. 4406-9.
60. Piani, A., et al., *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. *Microbes Infect*, 1999. **1**(8): p. 589-99.

61. Linares, E., et al., *Leishmania amazonensis* infection does not inhibit systemic nitric oxide levels elicited by lipopolysaccharide in vivo. *J Parasitol*, 2000. **86**(1): p. 78-82.
62. Balestieri, F.M., et al., *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect*, 2002. **4**(1): p. 23-9.
63. Bogdan, C. and M. Rollinghoff, How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitology Today*, 1999. **15**(1): p. 22-28.
64. Kima, P.E., The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal for Parasitology*, 2007. **37**(10): p. 1087-1096.
65. Fonseca-Geigel, L., *A via do óxido nítrico em Leishmania amazonensis*. 2000, Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ Brazil: Rio de Janeiro.
66. Genestra, M., et al., The nitric oxide pathway in *Leishmania* sp., A.o.t.X.A.M.o.t.F.o.S.o.E. Biology, Editor. 2001: Caxambu city, Brazil.
67. Genestra, M., et al., Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry*, 2003. **8**(1): p. 1-6.
68. Basu, N.K., et al., Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite, *Leishmania donovani*. *FEMS Microbiol Lett*, 1997. **156**(1): p. 43-7.
69. Genestra, M., et al., Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. *Arch Microbiol*, 2006. **185**(5): p. 348-54.
70. Genestra, M., et al., Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania* sp. *Medical Microbiology and Immunology*, 2003. **192**(4): p. 217-223.
71. Shevchenko, A., et al., In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 2006. **1**(6): p. 2856-60.
72. Napoli, E., et al., Hemin rescues adrenodoxin, heme a and cytochrome oxidase activity in frataxin-deficient oligodendrogloma cells. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1772**(7): p. 773-80.
73. Klatt, P., et al., Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO J*, 1995. **14**(15): p. 3687-95.
74. Jaffrey, S.R. and S.H. Snyder, The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. *Sci STKE*, 2001. **2001**(86): p. pl1.
75. de Castro, E., et al., ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(Web Server issue): p. W362-5.
76. Zdobnov, E.M. and R. Apweiler, InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics*, 2001. **17**(9): p. 847-8.
77. Yap, K.L., et al., Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics*, 2000. **1**(1): p. 8-14.
78. Hsu, C.M., C.Y. Chen, and B.J. Liu, MAGIIC-PRO: detecting functional signatures by efficient discovery of long patterns in protein sequences. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(4): p. 1400-6.
79. Singh, S.M. and A.K. Panda, Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*, 2005. **99**(4): p. 303-10.

80. Alibolandi, M. and H. Mirzahoseini, Chemical assistance in refolding of bacterial inclusion bodies. *Biochem Res Int*, 2011. **2011**: p. 631607.
81. Hemmens, B., et al., Haem insertion, dimerization and reactivation of haem-free rat neuronal nitric oxide synthase. *Biochem J*, 1998. **332 (Pt 2)**: p. 337-42.
82. Roman, L.J., et al., High-level expression of functional rat neuronal nitric oxide synthase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92(18)**: p. 8428-32.
83. Gagnon, P., Technology trends in antibody purification. *J Chromatogr A*, 2012. **1221**: p. 57-70.
84. Chin-Sang. http://130.15.90.245/antibody_purification.htm. [cited 2011 14-12-11].
85. Blumenthal, T., Trans-splicing and operons. *WormBook*, 2005: p. 1-9.
86. Myler, P.J. and N. Fasel, *Leishmania : after the genome*. 2008, Wyomndham: Caister Academic. xiv, 306 p., 1 p. of plates.
87. Paveto, C., et al., The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*, 1995. **270(28)**: p. 16576-9.
88. Salter, M. and R.G. Knowles, Assay of NOS activity by the measurement of conversion of oxyhemoglobin to methemoglobin by NO. *Methods Mol Biol*, 1998. **100**: p. 61-5.
89. Qin, N., et al., Ca²⁺-induced inhibition of the cardiac Ca²⁺ channel depends on calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96(5)**: p. 2435-8.
90. Nava, E., G. Noll, and T.F. Luscher, Increased activity of constitutive nitric oxide synthase in cardiac endothelium in spontaneous hypertension. *Circulation*, 1995. **91(9)**: p. 2310-3.
91. Michel, J.B., et al., Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem*, 1997. **272(25)**: p. 15583-6.
92. Consortium, T.U., Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.*, 2012. **40**: p. 71-75.
93. Price, N.C. and L. Stevens, *Fundamentals of enzymology : the cell and molecular biology of catalytic proteins*. 3rd ed. 1999, Oxford ; New York: Oxford University Press. xviii, 478 p., 7 col. plates.
94. Cunningham, M.L. and S.M. Beverley, Pteridine salvage throughout the *Leishmania* infectious cycle: implications for antifolate chemotherapy. *Mol Biochem Parasitol*, 2001. **113(2)**: p. 199-213.
95. Cunningham, M.L., et al., Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin. *Science*, 2001. **292(5515)**: p. 285-7.
96. Kopincova, J., A. Puzserova, and I. Bernatova, Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. *Interdiscip Toxicol*, 2011. **4(2)**: p. 63-8.
97. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 2001. **357(Pt 3)**: p. 593-615.
98. Panda, K., S. Ghosh, and D.J. Stuehr, Calmodulin activates intersubunit electron transfer in the neuronal nitric-oxide synthase dimer. *J Biol Chem*, 2001. **276(26)**: p. 23349-56.
99. Li, H., et al., Crystal structures of zinc-free and -bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase. Implications for dimer stability and comparison with endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 1999. **274(30)**: p. 21276-84.

100. Jung, Y., J. Kwak, and Y. Lee, High-level production of heme-containing holoproteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001. **55**(2): p. 187-91.
101. Nishimoto, M., J.E. Clark, and B.S. Masters, Cytochrome P450 4A4: expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of catalytic properties. *Biochemistry*, 1993. **32**(34): p. 8863-70.
102. Sinha, N. and S.J. Ferguson, An *Escherichia coli* ccm (cytochrome c maturation) deletion strain substantially expresses *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome c552 in the cytoplasm: availability of haem influences cytochrome c552 maturation. *FEMS Microbiol Lett*, 1998. **161**(1): p. 1-6.
103. Smith, M.A., et al., Expression of a biologically active plant cytochrome b5 in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1994. **303 (Pt 1)**: p. 73-9.
104. Nie, G., N.S. Reading, and S.D. Aust, Expression of the lignin peroxidase H2 gene from *Phanerochaete chrysosporium* in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **249**(1): p. 146-50.
105. Li, D., et al., Regulation of the monomer-dimer equilibrium in inducible nitric-oxide synthase by nitric oxide. *J Biol Chem*, 2006. **281**(12): p. 8197-204.
106. Cook, S.L. and G.P. Jackson, Characterization of tyrosine nitration and cysteine nitrosylation modifications by metastable atom-activation dissociation mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2011. **22**(2): p. 221-32.
107. Hao, G., et al., SNOSID, a proteomic method for identification of cysteine S-nitrosylation sites in complex protein mixtures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(4): p. 1012-7.
108. Peacock, C.S., et al., Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*, 2007. **39**(7): p. 839-47.
109. Feelisch, M. and J.S. Stamler, *Methods in nitric oxide research*. 1996, Chichester ; New York: J. Wiley. xix, 712 p., 1 leaf of plates.
110. Privat, C., et al., Nitric oxide production by endothelial cells: comparison of three methods of quantification. *Life Sci*, 1997. **61**(12): p. 1193-202.
111. Dacres, H. and R. Narayanaswamy, Sensitive optical NO sensor based on bis[(2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline)] copper(II) complex. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2005. **107**(1): p. 14-23.