

# Cisteína-proteinases de *Leishmania*

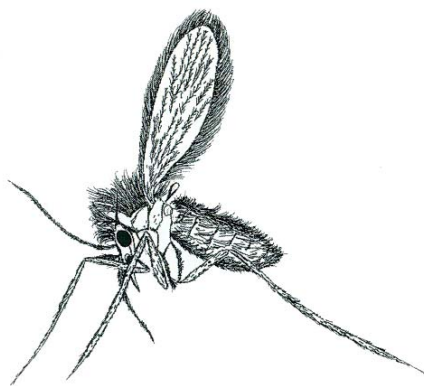
novο alvo para terapias?

Leishmania são protozoários parasitas causadores das leishmanioses, que vão desde formas graves viscerais, fatais quando não tratadas, até formas cutâneas de cura espontânea. Estas doenças afetam milhões de pessoas em todo o mundo, e são um grave problema de saúde pública no Brasil. Estes parasitas são transmitidos ao hospedeiro mamífero, inclusive o homem, pela picada de um pequeno inseto, o flebótomo. No inseto a *Leishmania* existe como um parasita flagelado extracelular, uma forma chamada promastigota. Quando o promastigota é injetado no mamífero pela picada do inseto, ele invade as células que normalmente são responsáveis pela defesa imune do organismo, os macrófagos, onde se transforma numa forma arredondada imóvel, o amastigota, que aí se multiplica. A ingestão destas formas pelo inseto fecha o ciclo infeccioso. A capacidade de sobrevivência da *Leishmania* nestas células de defesa, um ambiente normalmente hostil a organismos invasores, tem atraído o interesse de muitos pesquisadores. Apesar dos mecanismos de escape não serem ainda totalmente compreendidos, vários aspectos fascinantes já são conhecidos, como o desenvolvimento de estratégias de detoxificação que incluem a produção de moléculas inibitórias específicas como catalases, novos agentes redutores e inibidores de proteína quinases.

O conhecimento de características das formas amastigotas que sobrevivem nos macrófagos, e das moléculas por elas produzidas, que podem estar envolvidas nestes mecanismos de escape, é portanto de grande importância potencial para o desenvolvimento de vacinas e novas terapias. Nosso laboratório vem trabalhando com uma destas moléculas

amastigota-específicas, as cisteína-proteinases.

Provavelmente a cisteína-proteinase mais conhecida popularmente é a papaína do mamão, muito utilizada no amaciamento de carnes. Cisteína-proteinases existem em praticamente todos os organismos onde foram procuradas, desde vírus, bactérias e plantas, até nos mamíferos, tendo funções diferentes nos vários casos. Elas foram encontradas também em vários parasitas de interesse para o homem. Uma produção aumentada de cisteína-proteinases por amebas, parasitas unicelulares que podem provocar sérias diarreias, foi correlacionada à gravidade da doença causada, uma vez que estas proteinases parecem estar implicadas na capacidade invasiva destes parasitas. O *Schistosoma*, um verme que tem um estágio de diferenciação num vetor caramujo, é transmitido ao homem em águas infectadas por uma pequena forma chamada cercária, que penetra pela pele. Uma cisteína-proteinase foi responsabilizada por este processo invasivo. Testes preliminares demonstraram que a utilização de inibidores destas proteinases, quando passados na pele de animais de laboratório, eram capazes de bloquear a transmissão do parasita. Cisteína-proteinases foram também detectadas, e estão sendo exaustivamente estudadas, em protozoários parasitas como o plasmódio causador da malária, e os tripanosomatídeos patogênicos *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono na África, e o *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas no Brasil e outros países das Américas, como um alvo potencial para novas terapias e desenvolvimento de vacinas. No caso do protozoário causador da malária, cisteína-proteinases são responsáveis pela



**Yara Maria Traub-Cseko**

Ph.D em Biologia Molecular pela Universidade de Columbia, New York - EUA.

Chefe do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz.

Pesquisadora Visitante na Universidade de Yale, EUA.

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Rio de Janeiro, RJ

quebra da hemoglobina que nutre estes parasitas. No *T. cruzi* elas parecem ter um importante papel no ciclo de desenvolvimento do parasita. Em *Leishmania*, inibidores de cisteína-proteinases inibem em grande parte a transformação de promastigotas para amastigotas, e diminuem dramaticamente a infecção de macrófagos. Informações detalhadas sobre cisteína-proteinases de *Leishmania* podem ser obtidas numa revisão que publicamos em *Ciência e Cultura* (vol. 45 N.5, 1993).

Nossos trabalhos sobre cisteína-proteinases de *Leishmania* iniciaram-se pela identificação e caracterização dos genes que codificam estas enzimas. Isto foi possível explorando uma de suas características, a alta conservação das seqüências correspondentes aos sítios ativos, aos quais se liga o substrato. Isto permitiu o desenho de pequenas seqüências de DNA que foram usadas como iniciadoras numa técnica de amplificação de DNA conhecida como PCR, a reação em cadeia da polimerase. As seqüências amplificadas foram seqüenciadas e desta maneira conseguimos identificar dois genes que codificam duas cisteína-proteinases distintas. O estudo cuidadoso destas seqüências nos permitiu chegar a várias conclusões interessantes: trata-se de duas proteinases bastante diferentes, tão diferentes entre si, digamos, como uma cisteína-proteinase de *T. cruzi* e qualquer uma das de *Leishmania*. A quantidade das proteínas produzidas por estes genes, que chamamos de Lpcys1 e Lpcys2, é bastante diferente, a 2 sendo muito mais abundante que a 1, o que é correlacionado com o número de genes presentes no genoma, apenas um gene na 1, e uma dezena de cópias pelo menos da 2. Outra diferença que chamou a atenção foi a ausência, em Lpcys1, de uma extensão no fim C-terminal da proteína, que é característico de todas as cisteína-proteinases de tripanosomatídeos estudadas até agora. Os dois tipos de genes encontram-se também em cromosomas diferentes. Sua localização celular na *Leishmania* foi determinada através de marcação com anticorpos e visualização por microscopia eletrônica. Ambas foram encontradas em abundância nos lisosomas e Lpcys1 em quantidades significativas na bolsa flagelar, uma cavidade na base do flagelo que parece servir como um importante sítio de ingestão e secreção nestes parasitas.

Neste meio tempo, um grupo de pesquisadores na Escócia estava estudando alguns outros aspectos desta proteinase de *Leishmania*. Estudos funcionais foram feitos através da técnica de eliminação ou knockout gênico. Esta técnica tornou-se possível a partir do

desenvolvimento de transfecção em *Leishmania*. Um dos carros-chefes da engenharia genética é a técnica de clonagem molecular, onde genes heterólogos são ligados a plasmídeos bacterianos e depois reintroduzidos e amplificados em bactérias. O equivalente desta técnica foi também desenvolvido para tripanosomatídeos, inclusive *Leishmania*. Foram criados plasmídeos capazes de se replicar nestes parasitas, que são introduzidos na *Leishmania* pela técnica de eletroporação. O plasmídeo introduzido pode conter um gene construído de tal maneira que, através de recombinação genética, se insira no gene normal da célula e o destrua, causando assim uma deficiência de seu produto. A chamada genética reversa é uma arma poderosa para o estudo funcional de genes específicos. Quando o grupo da Escócia eliminou o gene de Lpcys1 de *Leishmania*, não foi possível detectar qualquer efeito deletério nas células, indicando não ser este um produto essencial para a sobrevivência do parasita. Quando, entretanto, as cópias de Lpcys2 foram eliminadas, essas leishmânias perderam em grande parte sua capacidade de infectar e sobreviver nos macrófagos, comprovando assim seu importante papel na virulência destes parasitas.

Nosso interesse atual se foca principalmente no estudo de mecanismos de trânsito celular de cisteína-proteinases em *Leishmania*, ou seja, na sinalização que leva estas proteinases aos lisosomas. Pouco se sabe a respeito das características moleculares responsáveis pelo endereçamento de proteínas em tripanosomatídeos em geral. Foi identificado um sinal de apenas três aminoácidos que é capaz de levar proteínas ao glicosoma, uma organela característica de tripanosomatídeos onde se concentram enzimas glicolíticas. Os sinais de direcionamento ao lisosoma são bem conhecidos em vários organismos, existindo mesmo, em mamíferos, patologias definidas relacionadas a mecanismos deficientes de endereçamento de enzimas ao lisosoma. O mecanismo mais comum, que envolve receptores e uma marcação por glicose-6-fosfato nas enzimas lisossomais, não parece existir em *Leishmania*. Foi aventada na literatura a hipótese do envolvimento da extensão C-terminal, característica de tripanosomatídeos, neste processo. A descoberta, em nosso laboratório, de uma classe de cisteína-proteinases de *Leishmania* que não tem esta extensão, e mesmo assim tem uma localização lisosomal, vai contra esta hipótese. Duas abordagens estão sendo utilizadas neste estudo. Estão sendo clonados os fragmentos gênicos que antecedem e sucedem a seqüência que dará origem à

proteinase madura e ativa, juntamente com um gene repórter, que dá origem à proteína verde fluorescente, de uma água-viva marinha. A fluorescência desta proteína repórter pode ser visualizada por microscopia, sendo assim possível determinar qual fragmento da cisteína-proteinase é responsável pelo endereçamento ao lisosoma. Na outra abordagem está sendo investigado o envolvimento potencial de açúcares no direcionamento. Já foi demonstrada a presença de açúcares em cisteína-proteinases de tripanosomatídeos. É possível determinar, a partir da seqüência primária dos aminoácidos na proteína, os sítios potenciais de glicosilação. Dois destes sítios foram identificados em Lpcys2, a cisteína-proteinase abundante de *Leishmania*. Nossa intenção é modificar estes aminoácidos através de mutagênese dirigida, e depois verificar se estas proteinases, agora deficientes em sua glicosilação, ainda são capazes de encontrar seu caminho ao lisosoma. Já conseguimos com sucesso eliminar um destes sítios, e no momento estamos introduzindo estes genes mutados em *Leishmania* através de transfecção. Outro experimento que já foi levado a cabo em nosso laboratório foi a introdução do gene de Lpcys2 numa espécie de *Leishmania* que normalmente apresenta níveis baixos desta proteinase, com o intuito de averiguar o efeito de uma superprodução no parasita, em relação, por exemplo, à virulência. Quando o gene heterólogo foi introduzido em formas promastigotas, observamos um efeito inesperado: quando a proteinase foi visualizada em géis com o auxílio de anticorpos específicos, não foi visto o processamento que dá origem à proteinase madura e ativa, como é o caso nas formas amastigotas da espécie de onde foi clonado Lpcys2. Isto pode ter dois significados: ou esta espécie distinta de *Leishmania* não reconhece os sinais de processamento molecular da espécie original e/ou o processamento, que ocorre normalmente em amastigotas, não ocorre na forma promastigota. As duas são possibilidades excitantes que estão sendo investigadas no momento.

Talvez a aplicação mais dramática, com direito a manchetes recentes nos jornais, das cisteína-proteinases como um alvo para quimioterapias, seja a utilização de inibidores destas proteinases como um dos componentes dos tão divulgados “coquetéis” anti-HIV. É possível que um futuro não muito distante veja o desenvolvimento de novas terapias baseadas em inibidores de cisteína-proteinases em várias doenças infecciosas e parasitárias, inclusive as leishmanioses, tão carentes de novos desenvolvimentos nesta área