

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Mestrado em Biologia Celular e Molecular – IOC**

**Avaliação da relevância da gp63 de  
*Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* na  
interação com o hospedeiro invertebrado**

**Ellen Cristina Felix Altoé**

Orientador: Claudia Masini d'Avila Levy

Rio de Janeiro  
2013

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Mestrado em Biologia Celular e Molecular – IOC**

Ellen Cristina Felix Altoé

**Avaliação da relevância da gp63 de  
*Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* na  
interação com o hospedeiro invertebrado**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Masini d'Avila Levy**

**Rio de Janeiro**

**2013**

**Ellen Cristina Felix Altoé**

**Avaliação da relevância da gp63 de  
*Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* na  
interação com o hospedeiro invertebrado**

**Orientadora: Claudia Masini D'ávila Levy**

**Aprovada em: 31 / 10 / 2013**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil – IOC/FIOCRUZ  
(Presidente)**

---

**Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares - René Rachou/FIOCRUZ  
(Membro)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Izabela Marques Dourado Bastos – UNB  
(Membro)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Cuervo Escobar – IOC/ FIOCRUZ  
(Suplente e Revisora)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Fampa Negreiros Lima – UFRRJ  
(Suplente)**

Rio de Janeiro, 31 de outubro de 2013.

Dedico primeiramente a Deus, por todas as vitórias alcançadas. Aos meus pais, irmãs, sobrinhos, namorado, amigos... Todos aqueles que sempre me deram todo apoio, confiança, carinho e amor. Amo muito todos vocês.

Obrigada por tudo!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço em especial a Deus pelas grandes maravilhas que tem feito. Minha vida o Senhor tem guardado, cada dia me revela Teu amor.

Aos meus amados pais Elisete e João Evandro, obrigada pelo amor dispensado, pelos cuidados e pela educação. Não teria chegado aqui sem vocês. Vocês são a minha força.

À minha orientadora, Claudia Masini d'Avila Levy, que me incentivou, puxou minha orelha e aconselhou durante a minha iniciação científica e mestrado. Obrigada por confiar e apostar em mim.

À doutora Constança Felícia De Paoli de C. Britto, chefe do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim.

Às minhas amadas irmãs Elaine e Elgeane, que sempre acreditaram em mim e me deram todos os melhores conselhos para essa vida.

Aos mais lindos e fofos sobrinhos do mundo, Sofia e Heitor, que sempre me dão aquele sorriso gostoso na hora que mais preciso.

Ao meu amor, Gilber, obrigado por todo o carinho e alegria, por cada instante compreendido, por cada “pirraça” minha esquecida. Você faz parte disso.

A todos os amigos do laboratório, em especial Aline, Andrezinho, Angélica, Bernardo, Carol(s), Cris, Dani, Franklin, Geovanne, Hanna, Ícaro, Ju, Keyla, Léo, Nat, Otacílio, Paula, Raquel, Rhagner, Sheilinha, Thaís e Vitor, pela companhia diária sempre muito agradável e divertida.

Às minhas amadas amigas de trabalho e diversão Bianca (Bibi), Lívia Santos (chefinha), Lívia Uehara (xu) e Camilinha (xuxu), o carinho de vocês me impulsiona.

Aos amigos, que não fizeram parte desse trabalho, mas fazem parte da minha vida, muito obrigada por todas as loucuras e alegrias, por partilharem momentos de dificuldade e de conquista. Vocês são lindos.

Aos doutores Aline Garcia, Nataly de Souza, Rodrigo Soares e Vanderlei Silva, vocês, sem dúvida, são parte fundamental desse trabalho. Muito obrigada por toda sabedoria.

A todos os meus familiares, que sempre torceram e vibraram por cada vitória alcançada.

As agências de fomento CNPQ, CAPES, FAPERJ e FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

A Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular.

Ao Laboratório de Transmissores de Leishmanioses chefiado pela Dra. Elizabeth Rangel pelo fornecimento dos flebotomíneos, cruciais para execução desse trabalho.

Obrigada por tudo!

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii - ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1 - 41</b>
1.1 . Considerações gerais sobre a leishmaniose	1
1.2. Manifestações Clínicas	6
1.2.1. Leishmaniose Visceral	6
1.2.2. Leishmaniose Tegumentar	7
1.3. O parasito	11
1.3.1. O ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	14
1.4. Vetores da <i>Leishmania</i>	16
1.5. Principais moléculas envolvidas na interação parasito-vetor	17
1.6. Peptidases	23
1.7. Peptidases em <i>Leishmania</i> spp.	24
1.8. A gp63	29
<b>II. JUSTIFICATIVA</b>	<b>42</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>44 - 48</b>
1. Células e cultivo	44
2. Insetos	44
3. Efeito de inibidores proteolíticos sobre a viabilidade dos parasitos	44
4. Ensaio de Aglutinação	45
5. Ensaio de interação entre <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania infantum</i> com linhagem celular de <i>Lutzomyia longipalpis</i> (LL5)	45
6. Ensaio de interação entre <i>Leishmania braziliensis</i> e <i>Leishmania infantum</i> com o intestino dissecado dos insetos vetores	46
7. Parasito e obtenção do sobrenadante da cultura contendo proteínas secretadas por <i>L. braziliensis</i>	46
8. Precipitação com sulfato de amônio	47

9. Determinação da concentração de proteínas	47
10. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e zimografia (SDS-PAGE-substrato)	47
11. Análise estatística	48
<b>V. RESULTADOS</b>	49 - 58
1. Efeitos de 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA na viabilidade celular de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i>	49
2. Efeito do inibidor de metalopeptidases sobre o índice de associação de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> às células LL5	50
3. Efeito do anticorpo anti-gp63 sobre o índice de associação de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> às células LL5	52
4. Efeitos dos inibidores de metalopeptidases sobre o índice de adesão de <i>Leishmania infantum</i> ao intestino dissecado de <i>Lu. longipalpis</i>	53
5. Efeito dose-dependente do inibidor de metalopeptidases, 1,10-fenantrolina, sobre o número de parasitos <i>L. infantum</i> aderidos ao intestino dissecado de <i>Lu. longipalpis</i>	55
6. Efeito do anticorpo anti-gp63 sobre o índice de adesão de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> ao intestino dissecado dos insetos vetores, <i>Lu. intermedia</i> e <i>Lu. longipalpis</i> , respectivamente	56
7. Análise das frações enriquecidas do sobrenadante de <i>L. braziliensis</i> através de SDS-PAGE e SDS-PAGE-Gelatina	58
<b>VI. DISCUSSÃO</b>	59 - 66
<b>VII. CONCLUSÕES</b>	67
<b>VIII. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS ASSOCIADAS À DISSERTAÇÃO</b>	68 - 69
1. Apresentação de poster na XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia/XL Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas (2013, Caxambu)	68 - 69
2. Produção de capítulo do livro: <i>Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma. Subcellular Biochemistry. 74ed.: Springer Netherlands, 2014, p. 253-270.</i>	69
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	70 - 95

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribuição geográfica das leishmanioses.	2
Figura 1.2. Imagem de uma cerâmica pré-Inca.	7
Figura 1.3. Esquema da localização dos subgêneros de <i>Leishmania</i> de acordo com seu padrão de desenvolvimento e seu ciclo de vida dentro do flebotomíneo.	12
Figura 1.4. Os morfotipos de <i>Leishmania</i> encontrados dentro dos vetores flebotomíneos.	13
Figura 1.5. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> .	15
Figura 1.6. Visão geral dos clãs e famílias de metalopeptidases de acordo com o banco de dados MEROPS.	30
Figura 1.7. Subpopulações de gp63 (MSP) e possíveis funções em promastigotas de <i>Leishmania</i> no inseto vetor e no hospedeiro mamífero.	32
Figura 4.1. Efeito <i>in vitro</i> de 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA sobre a viabilidade de <i>Leishmania braziliensis</i> (A) e <i>Leishmania infantum</i> (B).	50
Figura 4.2. Efeito do inibidor de metalopeptidases, 1,10-fenatrolina, sobre o índice de associação de <i>L. braziliensis</i> (A) e <i>L. infantum</i> (B) às células LL5.	51
Figura 4.3. Efeito do anticorpo anti-gp63 sobre o índice de associação de <i>L. braziliensis</i> (A) e <i>L. infantum</i> (B) às células LL5.	53
Figura 4.4. Efeitos dos inibidores de metalopeptidases sobre o número de parasitos <i>L. infantum</i> aderidos ao intestino dissecado de <i>Lu. longipalpis</i> .	54
Figura 4.5. Efeito dose-dependente do inibidor de metalopeptidases, 1,10-fenantrolina, sobre o número de parasitos <i>L. infantum</i> aderidos ao intestino dissecado de <i>Lu. longipalpis</i> .	56
Figura 4.6. Efeito do anticorpo anti-gp63 sobre o índice de adesão de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. infantum</i> ao intestino dissecado dos insetos vetores.	57
Figura 4.7. Análise das etapas preliminares de purificação da peptidase extracelular (gp63) de <i>Leishmania braziliensis</i> por SDS-PAGE corado por prata (A) e SDS-PAGE-gelatina corado com Coomassie Blue (B).	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Combinações naturais de parasito-vetor.	10
Tabela 1.2. Presença de homólogos da gp63 em tripanossomatídeos monoxênicos e de plantas.	38



## LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS = Síndrome de Imunodeficiência Adquirida  
BSA = albumina do soro bovino  
CP = Cisteína-peptidase  
CRD = epítipo determinante de reação cruzada  
DAN = éster metílico de DL-diazoacetil-norleucina  
DAT = teste de aglutinação direta  
DO = densidade óptica  
DTT = ditioneitol  
EDTA = ácido etileno-diamino tetracético  
EGTA = etileno glicol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter)  
ELISA = Ensaio Imunoenzimático  
FIOCRUZ = Fundação Oswaldo Cruz  
FLAG = proteína flagelar  
FUNASA = Fundação Nacional de Saúde  
GPI = glicosilfosfatidilinositol  
GPIs = glicoinositol-fosfolipídeos  
gp63 = glicoproteína de 63 kDa  
HAART = terapia antirretroviral altamente ativa  
HIV = Vírus da imunodeficiência humana  
IDRM = Intradermorreação de Montenegro  
IPs = inibidores de peptidases  
kDa = kiloDaltons  
LC = leishmaniose cutânea  
LCD = leishmaniose cutânea-difusa  
LDPK = Leishmaniose dermal pós-kalazar  
LL5 = células embrionárias de *Lutzomyia longipalpis*  
LMC = leishmaniose muco-cutânea  
LPG = Lipofosfoglicano

LT = leishmaniose tegumentar  
LTA = leishmaniose tegumentar americana  
LV = leishmaniose visceral  
LVA = leishmaniose visceral americana  
MARCKS = substrato para proteína quinase C rico em resíduos de alanina miristoladas  
MSP = principal peptidase de superfície  
OMS = Organização Mundial da Saúde  
OPB = Oligopeptidase B  
PARP = proteína ácida repetitiva em procíclicos  
PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida  
PBS = solução salina tamponada com fosfato  
PCR = Reação em Cadeia pela Polimerase  
PLC = fosfolipase C  
PPGs = proteofosfoglicanos  
PSP = peptidase de superfície de promastigotas  
q.s.p. = quantidade suficiente para  
RIFI = Reação de Imunofluorescência Indireta  
RNA = ácido ribonucleico  
RNAm = ácido ribonucleico mensageiro  
SDS = dodecil sulfato de sódio  
SFB = soro fetal bovino  
SINANWEB = Sistema de Informação de Agravos de Notificação  
SMP's = pequenas proteínas miristoladas  
TBP = Meio Triptose Fosfato  
U = unidade  
UTRs = regiões não traduzidas  
VSG = proteína de superfície variante ancorada por GPI  
WHO = World Health Organization  
× = vezes

## RESUMO

A gp63, metalopeptidase altamente abundante na superfície de *Leishmania*, contribui para uma infinidade de funções bem estabelecidas na interação deste parasito com o hospedeiro mamífero. No entanto, apesar desta molécula ser abundantemente expressa na superfície das formas promastigotas, encontradas no inseto vetor, pouco é conhecido sobre as funções desempenhadas por essa metalopeptidase no flebotomíneo. Nosso grupo de pesquisa, utilizando abordagens bioquímicas, tem demonstrado que moléculas de gp63 de vários tripanosomatídeos não patogênicos ao homem estão implicadas na adesão ao intestino de insetos hospedeiros. Aqui, nós analisamos o papel da gp63 na interação de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum*, com os seus respectivos insetos hospedeiros, *Lutzomyia intermedia* e *Lu. longipalpis* e com a linhagem celular derivada de *Lu. longipalpis* (LL5). Os intestinos dissecados de insetos foram pré-tratados ou não com o fosfoglicano (PG) puro derivado do lipofosfoglicano e colocados para interagir com os parasitos. Em paralelo, promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* foram pré-tratados com anticorpo anti-gp63 ou com inibidores da metalopeptidase. Depois disso, os parasitos foram colocados para interagir com os intestinos dissecados de insetos ou com as células LL5. Como esperado, o PG praticamente elimina a capacidade dos parasitos de se ligarem ao intestino dos insetos. Todos os tratamentos relacionados com a gp63 também provocaram uma diminuição acentuada nestes ensaios de ligação. Além disso, o sobrenadante de cultura de *L. braziliensis* foi concentrado por precipitação com sulfato de amônio e analisado por SDS-PAGE e SDS-PAGE-gelatina. Observamos uma degradação proteolítica, por volta de 63 kDa, que corresponde à enzima gp63 já identificada e caracterizada em várias espécies de *Leishmania*. Esses resultados em conjunto demonstram uma possível participação da gp63 na interação com o inseto vetor e nos estimulam a continuar estudando o papel dessa metalopeptidase no ciclo de vida de *Leishmania*.

## ABSTRACT

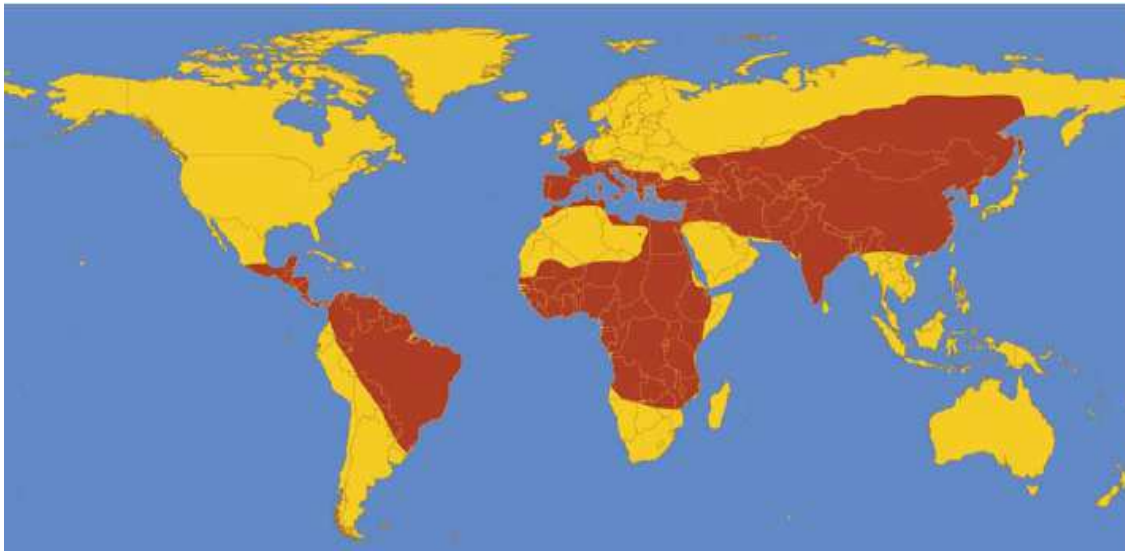
The highly abundant surface metallopeptidase of *Leishmania*, gp63, contributes to a myriad of well-established functions in the interaction of this parasite with the mammalian host. However, despite this molecule being abundantly expressed on the surface of promastigote forms, found in the insect vector, little is known about the functions performed by this metallopeptidase in the phlebotomine. Our research group, using biochemical approaches, has demonstrated that gp63 molecules from several not pathogenic trypanosomatids to man are implicated in the adhesion to guts of insect hosts. Here, we analyzed the role of gp63 in the interaction of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* with their respective insect hosts, *Lutzomyia intermedia* and *Lu. longipalpis* and with the cell line derived from *Lu. longipalpis* (LL5). The dissected insect guts were pretreated or not with purified phosphoglycan (PG) derived from the lipophosphoglycan and placed to bind with the parasites. In parallel, promastigotes of *L. braziliensis* and *L. infantum* were pretreated with anti-gp63 antibodies or with metallopeptidase inhibitors. Thereafter, the parasites were placed to interact with dissected insect guts or with the LL5 cells. As expected, PG virtually eliminates parasites ability of bind to the insect guts. All treatments related to gp63 also provoked a pronounced decrease in these binding assays. Moreover, the culture supernatant of *L. braziliensis* was concentrated by precipitation with ammonium sulfate and analyzed by SDS-PAGE and SDS-PAGE-gelatin. We observed a proteolytic degradation around 63 kDa, which corresponds to the gp63 enzyme already identified and characterized in several *Leishmania* species. These results together demonstrate a possible role of gp63 in the interaction with the insect vector and stimulate us to continue studying the role of this metallopeptidase in the life cycle of *Leishmania*.

## I. INTRODUÇÃO

### 1.1 – Considerações gerais sobre a leishmaniose

A leishmaniose é uma doença com ampla distribuição geográfica, principalmente nas regiões de clima tropical e subtropical (Ashford, 2000; Murray *et al.*, 2005). Os parasitos causadores da leishmaniose são protozoários flagelados heteroxênicos pertencentes ao gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida. As formas clínicas observadas são divididas em dois grandes grupos: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) (Desjeux, 2004). No continente americano, as formas clínicas da doença são conhecidas como leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA).

Atualmente, existem cerca de 15 milhões de indivíduos infectados e uma estimativa de 2 milhões de novos casos ao ano, espalhados por 98 países (Figura 1.1). Estima-se que mais de 500 milhões de pessoas encontram-se em áreas de risco nesses países. No Novo Mundo, diversas ordens de mamíferos silvestres (reservatórios naturais) e várias espécies de flebotomíneos (vetores) estão envolvidas na transmissão da leishmaniose ao homem. A maioria dos casos de infecções humanas está relacionada com hábitos, atividades primárias ou secundárias de indivíduos que exploram ou habitam florestas. Recentemente tem ocorrido um aumento significativo nos casos de leishmanioses em áreas peri-urbanas de grandes cidades, particularmente no Brasil (WHO, 2013). Este aumento é resultado principalmente das drásticas mudanças no meio ambiente que estão associadas com o desenvolvimento econômico e são causadas principalmente por movimentos migratórios ocorridos nas últimas décadas, como projetos de colonização, construção de hidrelétricas e construção de rodovias, que têm resultado, na maioria das vezes, em modelos de ocupação desordenados aliados à destruição da cobertura vegetal (WHO, 2013).



**Figura 1.1. Distribuição geográfica das leishmanioses. As áreas com casos de infecções em humanos são mostradas em vermelho (adaptado de Lopes *et al.*, 2010).**

A adaptação do flebotomíneo ao ambiente peri-domiciliar (as regiões ao redor das casas, como jardins, parques, bosques, hortas, árvores frutíferas ou quintais), ou até mesmo domiciliar, facilita a transmissão do parasito a animais domésticos, assim como ao homem, tornando a probabilidade de transmissão semelhante em toda a população que se encontra sob risco, não importando a faixa etária, sexo ou atividade profissional (Guerra *et al.*, 2007; Campbell-Lendrum *et al.*, 2001).

Considerando essas mudanças e correlacionando com a transmissão das leishmanioses, podemos classificar três padrões epidemiológicos:

1. Silvestre – Neste padrão, a transmissão que ocorre em área de vegetação primária, é fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres, que pode acometer o ser humano quando este entra em contato com o ambiente silvestre, onde esteja ocorrendo epizootia.
2. Ocupacional e Lazer – Este padrão de transmissão está associado à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, usinas

hidrelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, de treinamentos militares e ecoturismo.

3. Rural e peri-urbano em áreas de colonização – Este padrão está relacionado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais (Ministério da Saúde, 2007).

Em face destes aspectos, várias regiões do Brasil vêm registrando mudanças no seu quadro epidemiológico (Lainson, 1983, 1988, 1994; Walsh *et al.*, 1993). Estes novos perfis epidemiológicos vêm sendo observados no Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país, devendo-se considerar, nesses casos, a existência de transmissão peri-domiciliar. É possível observar nas regiões Sudeste e Nordeste a doença ao redor de áreas metropolitanas, onde a Mata Atlântica tem sido devastada ao longo dos anos (Rangel, 1995).

Estudos epidemiológicos recentes demonstram a ocorrência de transmissão tanto em áreas rurais desmatadas quanto em regiões peri-urbanas, sugerindo a coexistência de um duplo perfil epidemiológico (FUNASA, 2013). Outras formas de transmissão raras já foram relatadas, são elas: através da placenta (Meinecke *et al.*, 1999), pelo sêmen (Symmers, 1960), agulhas infectadas (Amela *et al.*, 1996) e através da transfusão de sangue (Cohen *et al.*, 1991; Luz *et al.*, 1997; Dey & Singh, 2006).

Existem diferentes métodos para o diagnóstico das leishmanioses, sendo que nenhum apresenta 100% de especificidade e sensibilidade. Em seres humanos os exames podem ser realizados com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos. A doença acomete o sistema linfomonocitário de forma sistêmica. A demonstração do parasito pode ser feita em material de biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos.

O diagnóstico laboratorial baseia-se principalmente na pesquisa de parasitas em esfregaço das lesões após a coloração de Giemsa. Pode-se realizar o diagnóstico de forma indireta, através da mensuração da resposta imune celular com a injeção intradérmica de antígenos do parasita (intradermorreação de Montenegro – IDRM). Em laboratórios de maior complexidade, podem ser realizados outros exames, tais como histopatológico (coloração pela hematoxilina-eosina e uso de anticorpos marcados com imunoperoxidase para detecção do parasito), cultivo *in vitro* (meio NNN bifásico), *in*

*vivo* (hamster dourado), sorologia, testes de aglutinação direta (DAT), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), que utilizam antígenos brutos e são limitados em termos de especificidade e reprodutibilidade (Gontijo & Melo, 2004; Basano & Camargo, 2004). Além desses, também é usado o método molecular da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), sendo este mais utilizado para fins de pesquisa devido a seu elevado custo, mas acrescenta sensibilidade e especificidade ao diagnóstico (Ministério da Saúde, 2006, 2007).

Nos casos humanos, as primeiras escolhas para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes (Sb+5). Alguns cuidados devem ser observados como avaliação e estabilização das condições clínicas, e tratamento das infecções. Não havendo resposta ao tratamento com antimoniais, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) (Ministério da Saúde, 2007). No entanto, existem alguns problemas enfrentados na quimioterapia como o fato de algumas drogas serem extremamente tóxicas e algumas cepas possuem resistência natural a essas drogas.

O controle da doença é responsabilidade do Sistema Único de Saúde, onde as Secretarias Municipais de Saúde, apoiadas pelas Secretarias Estaduais de Saúde deverão, segundo a orientação do Programa Nacional das Leishmanioses, da Secretaria de Vigilância em Saúde, ser responsáveis por organizar a rede básica para atendimento ao paciente e por instituir ações de combate ao vetor (Gouveia, 2008).

O programa brasileiro de controle da leishmaniose baseia sua estratégia em três principais medidas, sendo que a primeira delas tem caráter eminentemente curativo:

- 1) detecção e tratamento de casos humanos;
- 2) controle dos reservatórios domésticos;
- 3) controle de vetores.

Dirigido ao caso humano algumas ações são tomadas em assistência ao paciente, com diagnóstico e tratamento precoce visando diminuir as taxas de letalidade e o grau de morbidade. Controle de reservatórios domésticos tem como foco principal o cão, utilizando como medida profilática as coleiras impregnadas com deltametrina, que



protege os cães das picadas dos flebótomos. O controle também é feito através da remoção e sacrifício dos cães soropositivos (Ministério da Saúde, 2006, 2007).

O controle de vetores da LV tem sido baseado no uso de inseticida direcionado para as formas adultas. O inseticida de ação residual é aplicado no interior das casas e abrigos de animais sendo esta medida considerada eficaz para reduzir a população de flebotomíneos e, conseqüentemente os níveis de transmissão (Gontijo & Melo, 2004; Ministério da Saúde, 2006).

Entretanto, o controle da LTA se mostra como um desafio para o Programa Nacional de Leishmanioses, pois há diversidade de ciclos de transmissão com grande variedade de parasitos, vetores e hospedeiros (Rangel & Lainson, 2003) ocorrendo em nichos ecológicos restritos (Gouveia, 2008), além das mudanças ambientais decorrentes das ações humanas. Isso porque o animal silvestre contaminado, origem da contaminação, passou a conviver com os seres humanos depois do desmatamento e construção de cidades.

Outra medida de controle do Programa Nacional de Leishmanioses, que tem sido muito divulgada, é o desenvolvimento de atividades de educação em saúde, que devem estar presentes nos serviços de vigilância e controle da leishmaniose. No que diz respeito à educação popular, esse programa recomenda a divulgação para a população sobre a ocorrência da doença, sua clínica, diagnóstico e tratamento. O programa recomenda ainda a implantação de programas de educação em saúde que desenvolvam atividades de informação, educação e comunicação nos níveis local, regional e municipal (Ministério da Saúde, 2007). Portanto, conhecer a identidade da população afetada pela leishmaniose no Brasil é de fundamental importância para o estabelecimento de medidas eficazes de controle da doença (Gontijo & Carvalho, 2003).

## 1.2 – Manifestações Clínicas

### 1.2.1 - Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral, conhecida popularmente como calazar ou barriga d'água, é uma doença crônica de ampla distribuição no mundo, sendo grave e potencialmente fatal para o homem se não tratada (Ministério da Saúde, 2006).

O agente etiológico da LV do Novo Mundo, conhecido como *L. chagasi*, parece ter sido introduzido recentemente no continente americano através dos colonizadores europeus (Momen *et al.*, 1993; Mauricio *et al.*, 2000; Kuhls *et al.*, 2011). Alguns estudos como observando variações de microsátelites, mostram que cepas de *L. chagasi*, também conhecidas como *L. infantum* da América do Sul, são muito similares à população de *L. infantum* européia e que estas chegaram ao Novo Mundo há aproximadamente 500 anos (Leblois *et al.*, 2011; Kuhls *et al.*, 2011). Assim, neste trabalho, o nome *L. infantum* será também usado como sinônimo do agente etiológico da LV no Novo Mundo.

Essa doença caracteriza-se por atingir principalmente órgãos como o baço, fígado, medula óssea e linfonodos (Musa *et al.*, 2007). A sintomatologia pode variar muito de acordo com o paciente, caracterizando-se por febres irregulares e de longa duração, hepatoesplenomegalia, emagrecimento, leucopenia, anemia, hipergamaglobulinemia, tosse, dor abdominal, diarreia, perda de peso, caquexia, e finalmente, o óbito se o paciente não receber tratamento adequado (Chappuis *et al.*, 2007). Porém, muitas vezes a análise clínica é complexa, pois a doença pode apresentar sinais e sintomas comuns a outras patologias presentes como, por exemplo, a doença de Chagas, esquistossomose, malária e outras. A partir dessa forma clínica, o paciente pode evoluir para o quadro de leishmaniose dermal pós-kalazar (LDPK), porém casos de LDPK foram descritos predominantemente no Velho Mundo (Ramesh & Mukherjee, 1995; Zijlstra *et al.*, 2003; Ramesh *et al.*, 2007).

No Brasil, a LVA inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Duas características do processo de transmissão contribuem para essa disseminação da leishmaniose visceral. O primeiro é o seu principal reservatório (cão) que é um animal doméstico completamente adaptado à vida junto ao homem, enquanto que o segundo é o

inseto responsável por maior parte das infecções (*Lutzomyia longipalpis*) que sobrevivem ao que pesquisadores denominam de peridomicílio. No entanto, em Corumbá e Ladário (MS), *Lutzomyia cruzi* é suspeita como transmissora de LVA, com base em estudos que registraram a alta densidade e a infecção natural na espécie (Galati *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 1998; Ministério da Saúde, 2006).

### 1.2.2 - Leishmaniose Tegumentar

A LT, de acordo com o trabalho de Basano e Camargo (2004), acompanha o homem desde a antiguidade existindo relatos encontrados desde o século I d.C. , na Ásia Central, onde a enfermidade era referida como "úlceras de Balkh" (Lainson, 1997). Nas Américas foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas pelos índios do Peru (Figura 1.2). Essas figuras apresentam mutilações de lábios e narizes, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose mucocutânea. Posteriormente, através de estudos de paleomedicina, foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose (Santos, 1994).



**Figura 1.2. Imagem de uma cerâmica pré-Inca exibindo mutilação do nariz e lábio superior, lesões típicas de leishmaniose cutânea-mucosa (Altamirano-Enciso *et al.*, 2003).**

A LT é uma doença não contagiosa, de evolução crônica, que acomete as estruturas da pele e cartilaginosa da nasofaringe, de forma localizada ou difusa.

Causam primariamente infecções de caráter zoonótico, acometendo o homem e seus animais domesticados de maneira secundária. Ela divide-se em três formas clínicas:

- 1) A leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada por úlceras rasas ou profundas, geralmente uma única lesão com bordas salientes, endurecidas e bastantes delineadas (Marzochi, 1992; Berman, 1996) encontradas em partes do corpo como a face, braços e pernas. Ocasionalmente pode ser notado exsudato amarelo devido a infecções bacterianas concomitantes (Da-Cruz, 2001). A densidade de parasitos nas bordas da úlcera é relativamente alta nas fases iniciais da lesão enquanto que em úlceras crônicas a carga parasitária é baixa, o que dificulta bastante o diagnóstico parasitológico da doença (Murray *et al.*, 2005).
- 2) A leishmaniose mucocutânea (LMC), também conhecida como espúndia, caracteriza-se por lesões que acometem a mucosa orofaríngea a partir de uma úlcera cutânea. No Novo Mundo está geralmente associada à infecção por *L. braziliensis*, na maioria dos casos ocorrendo em um intervalo de tempo variável após a instalação da lesão cutânea inicial. Os fatores que contribuem para que a doença inicialmente cutânea evolua para essa forma tardia não são todos conhecidos, mas sabe-se que a demora na cicatrização da lesão primária e tratamento inicial inadequado podem estar associados (Marsden, 1986; Carvalho *et al.*, 1995). A infecção do tecido mucoso se dá provavelmente pela via hematogênica, diferente da forma cutânea onde a lesão ocorre no local da picada do inseto vetor. O acometimento das mucosas do nariz, faringe, boca e laringe podem surgir a partir da lesão cutânea ainda em atividade, ou anos após a sua cicatrização (Schubach *et al.*, 1998, Da-Cruz & Azevedo-Coutinho, 2001). O processo é bastante agressivo ao hospedeiro, chegando a ocorrer completa destruição de toda estrutura cartilaginosa nasal, comprometendo nos casos mais severos a respiração, a fala e alimentação levando o indivíduo à morte (Marsden & Nonata, 1975; Marsden, 1984).
- 3) A leishmaniose cutânea-difusa (LCD) é uma doença com longa duração devido a uma resposta imune celular deficiente, e que tem como características múltiplas lesões difusas, papulares e não ulceradas por extensas áreas da pele. Os nódulos são ricos em amastigotas, o que a diferencia das formas cutânea e mucocutânea,

onde há uma escassez de parasitos. É a única forma tegumentar da doença que não responde ao tratamento medicamentoso habitual (Convit & Kerdel-Vegas, 1965; Costa *et al.*, 1992).

A leishmaniose no Brasil varia de acordo com diversos fatores, entre eles estão: as características ecológicas de cada região; a infectividade das espécies de leishmânias; os hábitos e a biologia dos insetos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (de importância na transmissão da doença); a diversidade dos ciclos biológicos dos parasitos; e, ainda, a proporção de indivíduos suscetíveis existente em cada área (WHO, 2013). Foram identificadas as principais espécies de leishmânias dermatrópicas responsáveis por infecções humanas no Brasil, cujos ciclos de transmissão estão associados a algumas espécies de flebotomíneos, como *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia intermedia* (Tabela 1.1). Outra espécie de flebotomíneo é sugerida como transmissora de *L. braziliensis*: *Lutzomyia neivai* (Pinto, 1926). A espécie foi revalidada por Marcondes, em 1996, e segundo estudos de Casanova *et al.*, (1995) e Andrade-Filho (2003), poderia participar do ciclo de transmissão de LTA no Sul e no Sudeste do Brasil.

Tabela 1.1. Combinações naturais de parasito-vetor (adaptada de Souza, 2003).

<b>Vetor</b>	<b>Parasito</b>	<b>Manifestação</b>
<i>Lutzomyia whitmani</i> , <i>Lutzomyia wellcomei</i> , <i>Lutzomyia intermedia</i> , <i>Lutzomyia migonei</i> , <i>Lutzomyia complexa</i> , <i>Lutzomyia neivae</i> , <i>Lutzomyia davisi</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>	tegumentar
<i>Lutzomyia umbratilis</i> , <i>Lutzomyia anduzei</i>	<i>Leishmania guyanensis</i>	tegumentar
<i>Lutzomyia whitmani</i>	<i>Leishmania shawi</i>	tegumentar
<i>Lutzomyia hartmanni</i> , <i>Lutzomyia gomezi</i> , <i>Lutzomyia panamensis</i>	<i>Leishmania colombiensis</i>	tegumentar
<i>Lutzomyia ubiquitatis</i>	<i>Leishmania laisoni</i>	tegumentar
<i>Lutzomyia ayrozai</i> , <i>Lutzomyia paraenses</i> , <i>Lutzomyia squamiventris</i>	<i>Leishmania naiffi</i>	tegumentar
<i>Lutzomyia antunesi</i>	<i>Leishmania lindenberg</i>	tegumentar
<i>Lutzomyia flaviscutellata</i> , <i>Lutzomyia olmeca nociva</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>	tegumentar
<i>Lutzomyia trapidoi</i> , <i>Lutzomyia ylephiletor</i> , <i>Lutzomyia gomez</i> , <i>Lutzomyia panamensis</i>	<i>Leishmania panamensis</i>	tegumentar
<i>Lutzomyia peruensis</i> , <i>Lutzomyia verrucarum</i>	<i>Leishmania peruviana</i>	tegumentar
<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus duboscqi</i>	<i>Leishmania major</i>	tegumentar
<i>Phlebotomus sergenti</i>	<i>Leishmania tropica</i>	tegumentar
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	<i>Leishmania infantum</i>	visceral
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	<i>Leishmania infantum</i>	visceral
<i>Phlebotomus argentipes</i>	<i>Leishmania donovani</i>	visceral

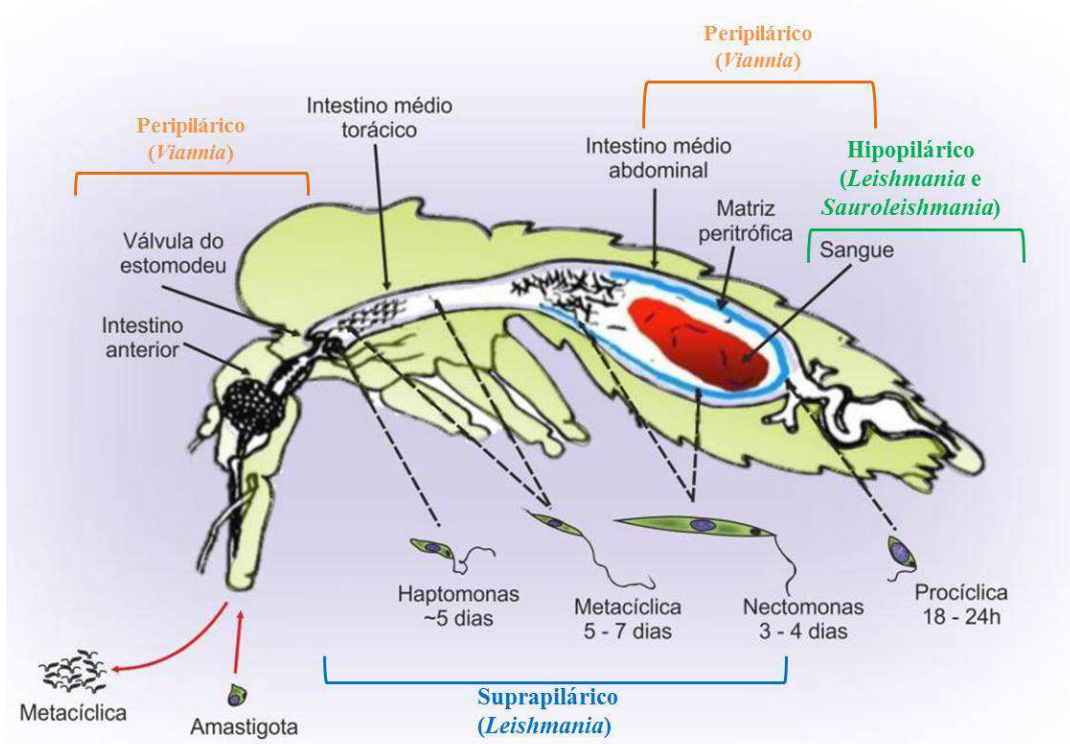
A LTA foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1909 por Lindenberg, que encontrou formas de leishmânia idênticas a *Leishmania tropica* do velho mundo. Atualmente essa doença apresenta ampla distribuição no país, com registro de casos em todas as regiões brasileiras (Ministério da Saúde, 2007, 2006). Foram observados picos de transmissão a cada cinco anos a partir de 1985, quando se solidifica a implantação das ações de vigilância e controle da LTA no país (Ministério da Saúde, 2007). Entre o ano de 2001 a 2009 foram registrados 237.259 casos de LTA (SINANWEB, 2010). Analisando os dados pertinentes a 2003, verificou-se que a região Norte notificou 45% dos casos, predominantemente nos estados do Pará, Amazonas e Rondônia; a região Nordeste, 26% dos casos, principalmente no Maranhão, Bahia e Ceará; a região Centro-Oeste, 15% dos casos, com mais frequência no Mato Grosso; a região Sudeste, 11% dos casos, predominantemente em Minas Gerais; e a região Sul, 3,0%, destacando-se o Paraná (Ministério da Saúde, 2006).

De acordo com a OMS, a LTA está entre as seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produção de deformidades. Além disso, novos aspectos complicadores da enfermidade surgiram a partir da coinfeção com a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), o que aumentou seu grau de impacto nas populações (WHO, 2013).

### **1.3 - O parasito**

As diversas espécies do gênero *Leishmania* são classificadas em dois subgêneros, de acordo com a localização do parasito no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado: subgênero *Viannia*, seus representantes são unicamente encontrados no Novo Mundo, esses parasitos estabelecem uma infecção inicial na região posterior do trato digestivo, na região pilórica e no intestino médio abdominal, migrando para as porções mais anteriores durante o seu desenvolvimento (peripilárico) e subgênero *Leishmania*, seu desenvolvimento é restrito à porção do trato digestivo anterior ao piloro, sobretudo nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio (suprapilárico) (Lainson & Shaw, 1987; Lainson, 1972; 1987a; 2010; Safjanova, 1982; Correa *et al.*, 2005). Outra forma de desenvolvimento que também é encontrado é o hipopilárico, sendo restrito ao intestino posterior e ocorre em espécies de *Leishmania* que infectam

répteis. Esse grupo tem sido classificado tanto dentro do gênero *Leishmania* quanto como um gênero separado chamado *Sauroleishmania* (Saf'janova 1982; Lainson & Shaw, 1987; Croan *et al.*, 1997; Dujardin *et al.*, 2000; Momen & Cupollilo, 2000; Orlando *et al.*, 2002; Zelazny *et al.*, 2005; Fraga *et al.*, 2010; Pimenta *et al.*, 2012) (Figura 1.3).



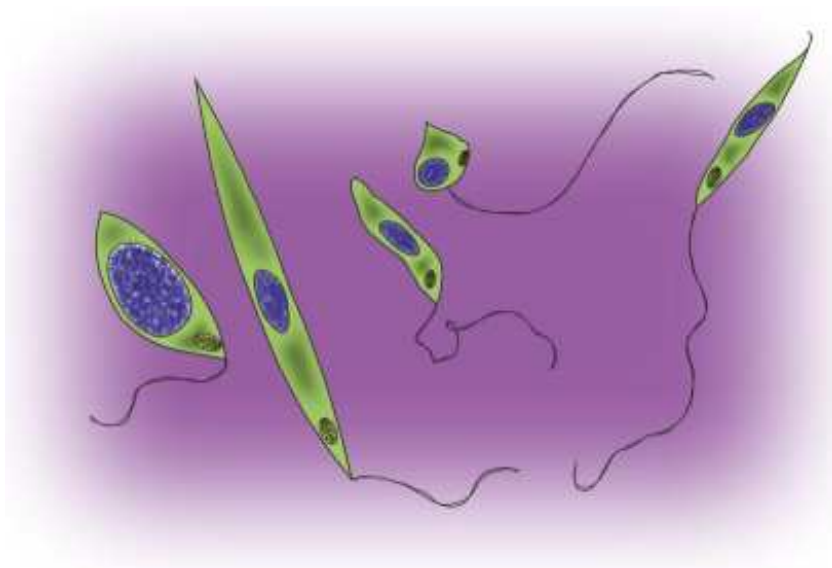
**Figura 1.3.** Esquema da localização dos subgêneros de *Leishmania* de acordo com seu padrão de desenvolvimento e seu ciclo de vida dentro do flebotomíneo (Figura adaptada de Pimenta *et al.*, 2012).

Dependendo do ambiente, os parasitos diferenciam-se em formas altamente especializadas que se distinguem quanto ao seu requerimento nutricional, taxa de crescimento e habilidade de se dividirem, regulação da expressão de moléculas de superfície e também em sua morfologia (revisado por Sacks & Kamhawi, 2001; McConville & Handman, 2007; Besteiro *et al.*, 2007).



A interação parasito-vetor melhor caracterizada ainda hoje foca nos parasitos com desenvolvimento suprapilárico, assim, as características descritas aqui do ciclo biológico de *Leishmania* dentro do flebotomíneo são do subgênero *Leishmania* (Kamhawi, 2006).

Existem diversas denominações para os morfotipos encontrados no vetor (Walters, 1993; Nieves & Pimenta, 2000, 2002; Rogers *et al.*, 2002; Gossage *et al.*, 2003; Bates & Rogers, 2004; Freitas *et al.*, 2012). A nomenclatura aceita universalmente é a proposta por Lawyer e colaboradores em 1990. Os parasitos do gênero *Leishmania* dentro do vetor apresentam as seguintes formas de promastigotas: procíclicas, nectomonas, leptomonas, paramastigotas, haptomonas e metacíclicas (Figura 1.4). E no sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados, como por exemplo, homem, roedores e canídeos, encontra-se a forma amastigota, que tem formato esférico a ovóide com um flagelo pequeno e interno.



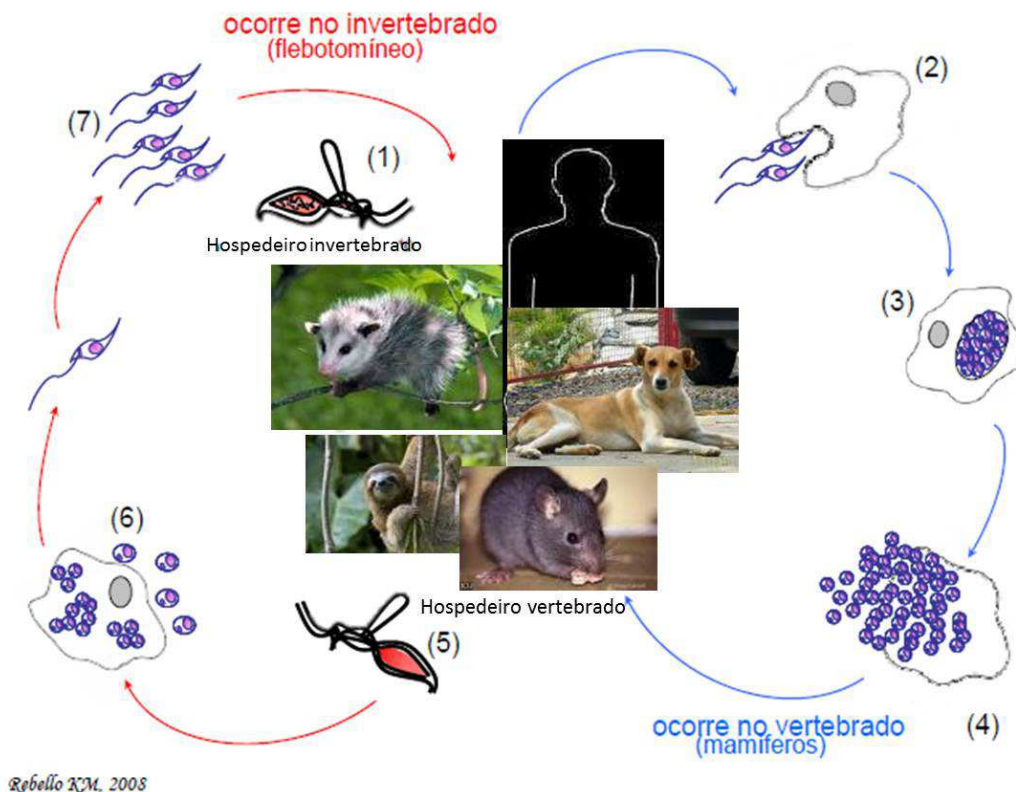
**Figura 1.4.** Os morfotipos de *Leishmania* encontrados dentro dos vetores flebotomíneos. Observa-se da esquerda para direita: promastigota procíclica, promastigota nectomona, promastigota haptomona, promastigota paramastigota e promastigota metacíclica (Lawyer *et al.*, 1990; Pimenta *et al.*, 2012).

### 1.3.1 – O ciclo de vida de *Leishmania* spp.

O modo mais comum de transmissão da leishmaniose ao hospedeiro vertebrado ocorre quando um micro-organismo do gênero *Leishmania* é transmitido na forma de promastigota metacíclica através da picada de flebotomíneos (fêmeas hematófagas infectadas) durante seu repasto sanguíneo (ato do inseto de se alimentar de sangue) em representantes da classe Mammalia susceptíveis à infecção. Os promastigotas são fagocitados por macrófagos teciduais e transformam-se em amastigotas. Estes se reproduzem por divisão binária, até que a célula hospedeira fique repleta de parasitos e se rompa. Com a destruição da célula, inúmeras amastigotas são liberadas e fagocitadas por outros macrófagos, dando continuidade aos ciclos de reprodução assexuada. Um flebotomíneo não infectado, ao fazer o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado previamente infectado, ingere juntamente com o sangue, macrófagos contendo as formas amastigotas e/ou as formas amastigotas livres. Durante o trajeto pelo trato digestório do hospedeiro invertebrado macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas. Dentro do intestino do inseto é formada uma rede fibrosa, composta por quitina e diversas proteínas associadas à membrana peritrófica, onde ocorre a diferenciação de amastigota para promastigotas procíclicas que são ovóides com flagelo curto e pouco móveis (Pimenta *et al.*, 1997; Sacks, 2001; Soares *et al.*, 2005). Essas formas se multiplicam intensamente e ocorre o aparecimento das nectomonas, formas mais alongadas, que preenchem o intestino abdominal anterior. Depois, entre 60-72 horas iniciam-se a evasão da membrana peritrófica, e adesão às microvilosidades das células epiteliais da porção anterior do intestino médio (Walters *et al.*, 1992). De 4 -7 dias após a infecção todo o bolo alimentar já foi eliminado e os promastigotas nectomonas se diferenciam em promastigotas leptomonas, que se dividem, resultando numa infecção massiva do intestino médio anterior (Kamhawi, 2006). Leptomonas diferenciam-se em promastigotas metacíclicas (Sacks, 1989).

O processo de transformação para a forma promastigota metacíclica é conhecido como metaciclogênese. Os promastigotas metacíclicos, que são a forma infectante, são pequenos e delgados com flagelos longos, muito ativos e não se multiplicam (Saraiva *et al.*, 2005). Nesse período do desenvolvimento também são encontradas formas curtas e largas denominadas haptomonas e formas de pequeno corpo classificadas como

paramastigotas. Os promastigotas metacíclicos migram então para o esôfago, faringe e se alojam na probóscide do vetor, bloqueando a entrada de sangue quando um novo repasto sanguíneo ocorre. Uma contração do músculo da probóscide faz com que o flebotomíneo regurgite o sangue recém-ingerido contendo promastigotas metacíclicos (Kamhawi, 2006) (Figura 1.3 e 1.5).



**Figura 1.5. Ciclo biológico da *Leishmania*.** No ciclo peri-urbano e urbano, as fêmeas infectadas podem transmitir as formas metacíclicas ao homem e animais domésticos (1). As formas flageladas infectam as células do sistema fagocítico-mononuclear (2), e dentro dessas células sofrem diferenciação, transformando-se em amastigotas (3). As formas amastigotas se multiplicam intensamente e induzem rompimento das células infectadas (4), ficando livres na corrente sanguínea podendo infectar novas células. Quando um díptero não infectado faz repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado (5) ele ingere juntamente com o sangue células contendo formas amastigotas (6) estas, ao chegarem ao intestino médio ou estômago do vetor sofrem um primeiro ciclo replicativo transformando-se em formas promastigotas procíclicas que irão se multiplicar no trato digestório do díptero e sofrer metaciclógenese, transformando-se em promastigotas metacíclicas (7), migrando posteriormente para a probóscide do vetor (adaptado de Rebello, 2008).

#### 1.4 - Vetores da *Leishmania*

Os vetores da *Leishmania* são dípteros nematóceros, de pequeno porte, da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (Young & Duncan, 1994). No Brasil, de acordo com a região geográfica, os flebotomíneos, são popularmente conhecidos como birigui, mosquito palha, cangalinha, anjinho, arrupiado e tatuquira.

São insetos holometábolos, isto é, o seu desenvolvimento ocorre a partir dos ovos que originam as larvas, pupas e adultos. Diferente dos mosquitos, a sua fêmea põe seus ovos no solo das florestas ou em ambientes modificados pela ação humana. Os ovos são pequenos e uma vez eclodidos, geram larvas, que são de difícil visualização a olho nu. As larvas alimentam-se da matéria orgânica vegetal presente no solo e passam por quatro fases, que no decorrer do desenvolvimento aumentam seu metabolismo e seu tamanho. Após isso, elas se transformam em pupas, que se fixam no substrato e não se alimentam. Esses insetos na fase adulta apresentam uma cabeça pequena, alongada e voltada para baixo, um aparelho bucal do tipo sugador-picador, asas estreitas e de forma lanceolada, ou seja, sempre levantadas quando estão pousados, corpo com coloração castanho-escuro e totalmente revestido por cerdas (Pimenta *et al.*, 2012; Sangiorgi *et al.*, 2012). Além disso, os adultos, criptozoários, possuem delgado exoesqueleto quitinoso, o que os torna bastante sensíveis às variações do meio ambiente (Forattini, 1973). Em flebotomíneos, ambos os sexos alimentam-se de sucos vegetais ou da secreção de afídeos (“honeydew”), substância rica em carboidratos (Forattini, 1973, Killick-Kendrick, 1979, Souza *et al.*, 1995). A hematofagia em flebotomíneos está restrita às fêmeas, desempenhando um papel importante na ovogênese. Algumas espécies de flebotomíneos possuem hábitos antropofílicos, o que lhes confere um importante papel na veiculação de patógenos humanos (Forattini, 1973).

De acordo com Young e Duncan (1994), no Novo Mundo três gêneros de flebotomíneos são reconhecidos: *Lutzomyia* (França & Parrot, 1924), *Brumptomyia* (França & Parrot, 1921) e *Warileyia* (Hertig, 1940); entretanto, no gênero *Lutzomyia* é que são encontradas as espécies responsáveis pela transmissão da doença ao homem. Já no Velho Mundo existem três gêneros: *Phlebotomus* (Rondani & Berté, 1840),

*Sergentomyia* (França & Parrot, 1920) e *Chinius* (Leng, 1987), destacando-se importância para o gênero *Phlebotomus*.

Atualmente podemos estimar em cerca de 800 espécies conhecidas, das quais o Brasil apresenta-se como o país com a maior diversidade (Lainson & Rangel, 2003; Young & Duncan, 1994) (Tabela 1.1).

### **1.5 – Principais moléculas envolvidas na interação parasito-vetor**

Alguns antígenos presentes em *Leishmania* spp. vêm sendo intensamente estudados como possíveis fatores essenciais para seu ciclo de vida, virulência e patogenicidade.

O Lipofosfoglicano (LPG) é um gliconjugado presente principalmente na superfície de promastigotas procíclicos e praticamente ausente em amastigotas de todas as espécies de *Leishmania* até hoje analisadas (Mcconville *et al.*, 1987; 1991; Muskus, *et al.*, 1997; Soares *et al.*, 2005; Turco, 1992; Soares *et al.*, 2002; revisto por de Assis *et al.*, 2011). É ancorado à superfície celular via âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e uma de suas funções é atuar como uma molécula de adesão que participa de processos de interação com o epitélio intestinal do inseto vetor (Soares *et al.*, 2002). Importantes evidências sobre o papel do LPG durante esse processo de interação foram demonstradas através do uso de parasitos mutantes deficientes em LPG que não são capazes de aderir e sustentar a infecção no intestino (Butcher *et al.*, 1996; Sacks *et al.*, 2000).

Soares e colaboradores em 2002 purificaram o fosfoglicano (PG) derivado do LPG extraído de formas procíclicas e metacíclicas de *L. infantum*. Após isso, incubaram o intestino dissecado de *Lu. longipalpis* com estes PGs, lavaram os intestinos e prosseguiram com a interação com formas procíclicas de *L. infantum*. Eles observaram que o índice de adesão dos parasitos procíclicos ao intestino pré-incubado com PG de formas procíclicas foi muito menor do que quando a pré-incubação foi com PG de metacíclicos ou quando a interação foi realizada com intestinos sem pré-tratamento, mostrando assim a participação do PG no processo de interação parasito-vetor e que essa ligação é estágio-específica. O mesmo ensaio foi realizado anos mais tarde pelo mesmo grupo (Soares *et al.*, 2005; 2010) usando o PG derivado do LPG extraído de *L.*

*braziliensis*, onde os intestinos dissecados de *Lu. whitmani* e *Lu. intermedia* foram pré-tratados com o PG de formas procíclicas e metacíclicas de *L. braziliensis* e após isso incubados com as formas procíclicas deste parasito. Porém, neste ensaio, foi visto que ambos os tratamentos com PGs diminuem a adesão dos parasitos procíclicos aos intestinos dissecados dos insetos vetores, no entanto, a inibição foi muito maior quando PG de procíclico foi utilizada.

Além do envolvimento desta molécula na interação com o hospedeiro invertebrado, o LPG também está envolvido na conferência de imunidade protetora no hospedeiro vertebrado contra o parasito, como mostrado por McConville e colaboradores em 1987, que verificaram que imunizando camundongos suscetíveis com LPG de *L. major*, obtinha-se uma proteção desses animais contra leishmaniose cutânea. Posteriormente, Russel e Alexander (1988) também conseguiram induzir proteção em camundongos suscetíveis com LPG de *L. mexicana*.

Outro glicoconjugado abundante, ancorado via GPI, mas expresso nas duas formas do desenvolvimento do parasito (promastigotas e amastigotas) são os pequenos glicosilinositolfosfolipídeos (GIPLs) (Mcconville *et al.*, 1991). Os GIPLs auxiliam o parasito *L. major* na sobrevivência dentro de macrófagos inibindo a síntese de óxido nítrico (Proudfoot *et al.*, 1995; Zufferey *et al.*, 2003). Amastigotas mutantes de *L. amazonensis* e *L. mexicana*, que perderam alguns ou todos GIPLs de superfície, também têm sua habilidade diminuída de sobreviver em macrófagos (Mensa-Wilmot *et al.*, 1999; Ilgoutz *et al.*, 1999; Garami *et al.*, 2001; Ralton *et al.*, 2003). Além disso, GIPLs extraídas de *L. infantum* e *L. braziliensis* também inibem a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos de camundongo estimulados com IFN- $\gamma$  e LPS, os dois principais indutores da produção de NO, mas não inibem a produção de TNF- $\alpha$  (Assis *et al.*, 2012). Neste mesmo trabalho, foi visto que esta inibição é dependente da estrutura intacta de GIPLs, pois com o pré-tratamento de GIPLs por 16 h com fosfolipase C (PLC), que cliva a âncora de GPI, restaura a produção de NO em macrófagos estimulados com IFN- $\gamma$ .

Os proteofosfoglicanos (PPG) são proteínas, que através de *O*-glicosilação, apresentam ligação de fosfossacarídeos na cadeia peptídica. Em promastigotas, um PPG secretado e filamentososo (fPPG), forma um agregado viscoso estabelecendo uma rede de filamentos fibrosos como um gel. O fPPG é secretado pela bolsa flagelar (Stierhof *et al.*, 1994) com 95% de sua composição de fosfoglicanos e a porção peptídica com

abundância de serina, alanina e prolina. Promastigotas leptomonas são as principais formas produtoras de fPPG no flebotomíneo (Rogers *et al.*, 2002). Os fPPGs são detectados no intestino de *Lu. longipalpis* infectado com *L. mexicana* e *L. infantum* em cerca de 2 a 3 dias após infecção, com um pico de produção dentro de 5 a 7 dias (Rogers *et al.*, 2002; Gossage *et al.*, 2003; Rogers & Bates, 2007). Usando uma cepa de *L. major* mutante, deficiente na produção de LPG (*lpg1*) ou deficiente na expressão de todas as moléculas fosfoglicanas (PG) de superfície e secretada (*lpg2*), observou-se uma possível função dos PPGs secretados na sobrevivência de promastigotas durante a digestão do sangue no inseto (Sacks *et al.*, 2000; Svárovská *et al.*, 2010). Corroborando com estes resultados, experimentos *in vitro* usando promastigotas incubados com lisado de intestino de flebotomíneo preparado após diferentes tempos de alimentação sanguínea, mostra que o PPG secretado confere proteção contra a ação enzimática do intestino do inseto (Secundino *et al.*, 2010). Neste mesmo trabalho, os autores mostram que o PPG purificado, mas não o LPG, pode passivamente aderir à superfície de parasitos *lpg2* para conferir tal proteção. Além disso, a participação dessa molécula de PPG parece ser importante no bloqueio do intestino anterior do inseto vetor, detendo a ingestão de alimento e levando o inseto a sucessivos repastos sanguíneos, aumentando as chances de disseminação da *Leishmania* spp. (Walters *et al.*, 1989; Lawyer *et al.*, 1990; Ilg, 2000).

Quando os PPGs são encontrados na membrana celular do parasito, sendo ancoradas por GPI, são chamadas de mPPG (Ilg *et al.*, 1999b). A função do mPPG ainda não está totalmente clara, porém especula-se que esta molécula seja importante como ligante de receptores em macrófagos e em células intestinais do inseto vetor por apresentar uma estrutura bastante peculiar, com uma porção peptídica rica em repetições de serina estendida acima da membrana plasmática de *Leishmania* (Ilg, 2000).

Outra função estabelecida para o PPG, na forma de gel secretado por promastigotas (PSG), é a habilidade de modificar o comportamento da alimentação sanguínea do inseto para a transmissão do parasito. Desde a descoberta dos flebotomíneos como vetores da *Leishmania*, vários trabalhos têm mostrado as diferentes mudanças no comportamento de flebotomíneos infectados. Estes vetores quando infectados exploram a fonte de alimentação (exemplo o homem) mais frequentemente, sendo mais propensos a se alimentar de forma incompleta em relação aos insetos não

infectados (Shortt *et al.*, 1931; Killick-Kendrick *et al.*, 1977; Beach *et al.*, 1985; Rogers *et al.*, 2002; Rogers & Bates, 2007; Maia *et al.*, 2011; Rogers, 2012). Em 2002, uma clara relação entre a intensidade de infecção por *Leishmania* e a habilidade de alimentação de flebotomíneos foi estabelecida (Rogers *et al.*, 2002). Neste trabalho, os autores mostram que a maior parte (87%) dos insetos muito infectados foi somente capaz de pegar uma parte do sangue disponível e isto foi associado com acúmulo de PSG, resultando em um aumento de 3 vezes no volume do intestino anterior e significativa expansão da válvula do estomodeu. Em busca para a sua transmissão, a *Leishmania* também pode causar um dano na válvula do estomodeu revestido por quitina, quando se adere nela, através de modificações do seu flagelo e secreção de quitinase (Schlein *et al.*, 1992; Volfetal, 2004; Rogers *et al.*, 2008). A combinação destes dois eventos resulta na obstrução do intestino médio anterior com um plug de promastigotas de *Leishmania* e junto com seu gel, que distende e mantém permanentemente aberta a válvula danificada. Esta é a hipótese da adaptação do flebotomíneo para a transmissão eficiente, promovendo o refluxo de parasitos durante a alimentação sanguínea e deposição de um grande número de formas infectantes (Shortt & Swaminath, 1928).

Foi sugerido que a adesão de *Leishmania* spp. ao intestino anterior pode interferir com a função de mecanorreceptores que detectam o fluxo sanguíneo, podendo explicar assim, a reduzida habilidade destes insetos em se alimentar de sangue (Jenni *et al.*, 1980; Molyneux & Jefferies, 1986). No entanto, tendo em vista estes resultados, foi proposto que o funcionamento destes mecanorreceptores é prejudicada por fPPG, que desempenha o papel de molécula manipuladora. Isso, por sua vez pode promover o estado de fome e a persistência do inseto, ou alternativamente, aumentar o ponto limite no qual o inseto tem sua procura por sangue inibida (Rogers, 2012).

Além disso, foi proposto que, como a produção de PSG depende da metacicloênese, a quantidade de PSG liberada pode também está correlacionado com o grau de infecção do inseto. Foram usados capilares para alimentação para analisar a transmissão de *L. mexicana* de *Lu. longipalpis*. Esta combinação de parasito-vetor, gerou grande quantidade de PSG (acima de 1 µg/inseto) e alta transmissão para camundongos (Rogers *et al.*, 2006, 2008; Rogers & Bates, 2007). Esses resultados revelam que alta quantidade de PSG liberada está relacionada com grande quantidade de



parasitos transmitidos. Assim, reforçam a idéia de que o fPPG do parasito pode influenciar bastante o número de parasitos transmitidos e a proporção de gel co-regurgitado (Rogers, 2012).

Durante os primeiros dias de infecção, o parasito é mais vulnerável ao potente sistema imune do hospedeiro. Rogers e colaboradores em 2009 mostraram que a presença de PSG com macrófagos *in vitro* ou *in vivo*, beneficia a infecção, independente do estado de ativação da célula. Isto pode permitir a sobrevivência do parasito em um ambiente hostil tal como a pele inflamada devido às picadas do vetor ou imunizada com a saliva. Dentro dos macrófagos, as formas amastigotas secretam aPPG, que estruturalmente são definidas como uma cadeia polipeptídica modificada com fosfoglicanos ligados a resíduos de serina (Ilg *et al.*, 1998). A secreção de aPPG dentro de macrófagos parece contribuir para manutenção do vacúolo parasitóforo (Peters *et al.*, 1997b). Além disso, aPPG é capaz de ativar o complemento via proteína ligadora de manose. Em lesões ativas causadas por *L. mexicana*, a liberação de aPPG por células do hospedeiro rompidas ou devido ao tráfego vesicular, pode esgotar localmente o componente C3 e assim, pode prevenir a lise dos parasitos mediada pelo complemento. Isto foi demonstrado quando amastigotas de *L. mexicana* isoladas de lesões de um camundongo, não apresentaram fragmentos de C3 em sua superfície, enquanto que amastigotas de *L. major* deficientes em aPPG foram opsonizadas por C3b/C3bi (Peters *et al.*, 1997a).

Em 1989, Ismach e colaboradores, conseguiram identificar, através da produção de anticorpos monoclonais a partir de frações enriquecidas do flagelo de *L. braziliensis*, uma proteína de 13,2 kDa que se distribuía ao longo de todo o flagelo e que a pré-incubação de *L. major* com o anticorpo que reconheceu essa proteína, promoveu uma redução em 42% na taxa de adesão ao tubo digestivo dissecado de *P. papatasi*. Essa proteína flagelar foi denominada como FLAG (Rojas, 1997) faz parte da família das pequenas proteínas miristiladas (SMP's) (Tull *et al.*, 2004). Em 2012, Di Blasi mostrou através da análise da transcrição gênica do gene FLAG em *L. pifanoi*, a maior expressão de FLAG na forma promastigota do que na amastigota. Além disso, neste mesmo trabalho foram feitos ensaios de inibição de adesão ao tubo digestivo realizando a pré-incubação de três espécies de *Leishmania* do Novo Mundo com o anticorpo anti-FLAG. Os pares foram *L. infantum* x *Lu. longipalpis*, *L. amazonensis* x *Lu. longipalpis* e *L.*

*major* x *Phlebotomus papatasi*. Nos dois primeiros pares citados acima, não houve redução significativa na taxa de adesão. Porém, usando o par natural do Velho Mundo, *L. major* x *P. papatasi*, foi possível observar uma queda bastante acentuada, em aproximadamente 60%, na taxa de adesão dos parasitos ao tubo digestivo deste inseto.

Outra molécula que parece ter papel fundamental durante a interação parasito-vetor, é a glicoproteína de 63 kDa, gp63. Esta molécula pertence à família das metalopeptidases, é expressa em abundância na superfície celular das formas promastigotas de *Leishmania* (Yao *et al.*, 2003), apresenta uma expressão aumentada nas formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectivas (fase estacionária de crescimento) e possui um baixo, porém detectável, nível de expressão intracelular em amastigotas (Medina-Acosta *et al.*, 1989; Muskus & Marin Villa, 2002; McGwire *et al.*, 2002). Mesmo sendo expressa predominantemente na superfície de promastigotas de *Leishmania*, em vez de em amastigotas, sua função na interação com o hospedeiro invertebrado tem sido pouco investigada. Além disso, existem alguns dados conflitantes sobre o papel da gp63 nesta etapa do ciclo de vida desses tripanossomatídeos. Foi observado que a deleção dos genes codificantes da gp63, em *Leishmania major*, não altera seu desenvolvimento no interior do inseto *Phlebotomus dubosqui* (Joshi *et al.*, 2002). Já em *L. amazonensis*, cuja expressão dessa peptidase foi diminuída usando um vetor contendo o gene da gp63 em orientação reversa, foi demonstrada uma baixa colonização em *Lu. longipalpis* (Hajmová *et al.*, 2004).

Esses resultados contraditórios devem ser interpretados com cautela, pois existe a possibilidade da gp63 funcionar de forma diferente durante a interação dessas duas espécies de *Leishmania* com essas distintas espécies de vetores invertebrados, que pode ser correlacionado com competência vetorial (Santos *et al.*, 2006). Além disso, estudos utilizando parasitos com alterações genéticas (nockout, down-regulação ou silenciamento de RNA, por exemplo) podem levar a uma super expressão de outras moléculas para superar a função interrompida do gene alvo. O próprio LPG pode ser uma dessas moléculas, que além de ser a molécula mais abundante na superfície da forma promastigota deste parasito, também possui funções que se sobrepõe às da gp63, como a resistência à lise mediada pelo complemento e facilitação da fagocitose por macrófagos. Uma das funções melhor caracterizadas do LPG é justamente na interação com o inseto vetor, sendo responsável pela ligação do parasito e sua liberação do

intestino médio dos flebotomíneos, respondendo pela migração retrógrada dos promastigotas metacíclicos para a probóscide dos flebotomíneos (de Assis *et al.*, 2011). Ainda é possível que a gp63 e o LPG, ou mesmo outras moléculas, podem atuar sinergisticamente ou redundantemente, com a falha de uma sendo compensada por outra (Yao, 2010).

## 1.6 – Peptidases

As peptidases, proteases ou peptídeo-hidrolases (E.C. 3.4), são enzimas de ocorrência geral capazes de clivar ligações peptídicas. Tradicionalmente, as peptidases são classificadas baseadas no tipo de reação catalisada e na natureza química do sítio catalítico (Bond & Butler, 1987), sendo divididas em exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N ou C terminal. Aquelas que atuam na região amino terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases). As exopeptidases que atuam na região carboxi terminal livre liberam um único aminoácido (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases) (Beynon & Bond 1989, 2001).

Algumas exopeptidases são específicas para dipeptídeos (dipeptidases) ou removem resíduos terminais que são substituídos, ciclizados ou ligados por ligações isopeptídicas. Ligações isopeptídicas são ligações peptídicas diferentes daquelas entre uma  $\alpha$ -carboxila e um  $\alpha$ -amino grupo, e estes tipos de enzimas são denominados omega peptidases. Já as endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal (Beynon & Bond 1989, 2001).

De acordo com o tipo de reação catalisada e o aminoácido crítico para a catálise, as peptidases podem ser divididas em subclasses do tipo serina-, cisteína-, aspártico-, metalo-, treonina- e glutâmico-peptidases. Algumas peptidases não se encaixam nestas subclasses e formam a subclasse 3.4.99, de mecanismo catalítico desconhecido (Barret, Rawlings & O'Brien, 2001). Em 2012, outro método de classificação foi apresentado e pode ser facilmente acessado no servidor de banco de dados MEROPS. Neste sistema, peptidases das diferentes classes podem ser ainda agrupadas em famílias com base nas semelhanças estatisticamente significativas na sequência de aminoácidos. Para

nomenclatura, cada família é identificada por uma letra que representa o domínio catalítico, onde A é utilizado para aspártico, C para cisteína, M para metalo, S para serina, T para treonina, L para glutâmico, N para o tipo de asparagina e U para um tipo desconhecido; seguido por um número característico. Famílias com homologia, que surgiram a partir de um único ancestral comum, são agrupadas em um clã. Ele representa uma ou mais famílias que mostram evidências sobre a relação evolutiva através de semelhantes estruturas terciárias, da ordem de resíduos no sítio catalítico na cadeia polipeptídica e seus motivos de sequências comuns ao redor do sítio catalítico. Para a representação do clã, duas letras são usadas, sendo a primeira relacionada com a família (MEROPS, 2012; Barret *et al.*, 2003).

Peptidases, entre muitas outras moléculas, têm sido avaliadas no que diz respeito ao seu potencial como novos alvos terapêuticos. Funções centrais em processos fisiológicos são realizadas por peptidases, que podem ser encontradas em organismos representantes de diversos domínios da vida como Eukarya, Bacteria e Archaea, assim como em Vírus (Lopez-Otín & Bond 2008). A importância das peptidases em sistemas biológicos é facilmente reconhecida, uma vez que todas as proteínas de uma célula precisam ser proteoliticamente processadas e ou degradadas, em algum momento do desenvolvimento celular. A regulação da localização de proteínas; a mobilidade e a atividade; a modulação de interações proteína-proteína; a geração, transdução e amplificação de sinais moleculares podem ser todos influenciados por atividade de peptidases (Lopez-Otín & Bond 2008).

### **1.7 – Peptidases em *Leishmania* spp.**

Em *Leishmania* spp. e outros tripanossomatídeos as peptidases desempenham um papel fundamental na interação parasito-hospedeiro, uma vez que estão envolvidas com a invasão pela degradação de tecido conjuntivo; com a degradação de proteínas do citoesqueleto do hospedeiro durante invasão ou ruptura das células do hospedeiro; com o escape ou modulação do sistema imunológico por degradação ou ativação de moléculas do sistema imune e com a invasão de células hospedeiras. Além de sua importância para a patogenicidade desses parasitas, as peptidases também estão envolvidas em eventos cruciais do ciclo de vida destes micro-organismos, tais como

remodelação do parasito durante a transição de um estágio de vida para outro e ativação ou degradação de enzimas ou proteínas regulatórias do parasito, além de participarem no processamento de proteínas para fins nutricionais (Sajid & McKerrow, 2002).

Quatro classes de peptidases foram descritas em *Leishmania* spp. : aspártico-peptidases, serina-peptidases, cisteína-peptidases e metalo-peptidases (Jaffe & Dwyer, 2003; Mottram *et al.*, 2004; Guedes *et al.*, 2007; Valdivieso *et al.*, 2007).

As aspártico-peptidases estão presentes em um amplo grupo de organismos como vertebrados, plantas, fungos, protozoários, procariontes e retrovírus (Hill & Phylip 1997; James 1998; Dash *et al.*, 2003). Essas endopeptidases têm atraído muito a atenção da comunidade científica, por exemplo, devido a sua potencial aplicação da indústria alimentícia e como alvo para terapia em doenças humanas importantes, como o uso da renina para hipertensão, catepsina D em metástases de diferentes células cancerígenas e na terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Vermelho *et al.*, 2008; Cooper, 2002; Scott *et al.*, 2006; Coombs *et al.*, 2001; Benes *et al.*, 2008; Vassar, 2002; Dominguez *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2013).

O primeiro indício da presença de aspártico-peptidases em *Leishmania* foi relatado em *L. amazonensis* durante a diferenciação celular (Alves *et al.*, 2005). A identificação destas enzimas foi confirmada em *L. mexicana* (Valdivieso *et al.*, 2007). No entanto, devido a grande abundância de cisteína e metalo-peptidases nesse gênero, poucos estudos foram realizados a fim de buscar mais informações sobre as aspártico-peptidases nesses parasitos. Em *L. amazonensis* a atividade proteolítica do extrato bruto foi inibida por inibidores de aspártico-peptidases, como a pepstatina A e inibidores de peptidases do HIV (IPs HIV) (Alves *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2009). A atividade proteolítica do extrato bruto de *L. mexicana* também foi parcialmente inibida por pepstatina A e por éster metílico de DL-diazoacetil-norleucina (DAN). O DAN também provocou em promastigotas desse parasito um efeito anti-proliferativo e induziu significativas alterações morfológicas como uma forma mais esférica e pelo menos dois núcleos por parasito, indicativo de bloqueio de divisão celular (Valdivieso *et al.*, 2007).

Atualmente, é conhecido que existem três genes de aspártico-peptidases descritos no genoma de *Leishmania* e que essas peptidases participam de vários processos responsáveis pela manutenção do metabolismo básico desses

tripanossomatídeos como proliferação, diferenciação e vias de sinalização para morte celular. Em adição, elas também participam em diferentes contextos da interação parasito-hospedeiro, tais como disseminação, adesão, escape, nutrição e imunomodulação das respostas imunes do hospedeiro (Rawlings, Barret & Bateman 2012; Santos *et al.*, 2013).

Outra classe de peptidase descrita em *Leishmania* é a serina-peptidase. Existem aproximadamente 40 famílias de serina-peptidases que são distinguíveis pelas suas estruturas primárias, sendo que estas famílias estão agrupadas em seis clãs pela comparação de suas estruturas terciárias. A classe serina-peptidase é subdividida em duas superfamílias que apresentam mecanismos catalíticos similares que evoluíram de forma independente. A superfamília de tripsina inclui tripsina e quimiotripsina, que são encontradas abundantemente em animais, enquanto a superfamília de subtilisinas está presente nas bactérias e fungos estudados até o momento (Hu & Leger, 2004; Page & DiCera, 2008). As serina-peptidases são bem conhecidas por suas funções essenciais em vários processos fisiológicos como o desenvolvimento, digestão (tripsina e quimiotripsina), coagulação, inflamação e na imunidade.

A primeira evidência experimental da presença de serina peptidases em *Leishmania* spp. foi demonstrado em 2000 por Almeida-Campos e Horta (Almeida-Campos & Horta 2000). Os autores correlacionaram o efeito lítico do extrato bruto de *L. amazonensis* para macrófagos devido a uma serina peptidase, com base na inativação deste efeito por inibidores específicos dessa peptidase. Uma proteína homóloga à serina peptidase foi posteriormente identificada em *L. major*, cuja atividade de hidrolisar substratos foi inibida por inibidores de peptidase específicos (Alphey *et al.*, 2003). Em *L. amazonensis*, estudos de localização subcelular sugerem que em promastigotas uma serina peptidase com cerca de 56 kDa é predominantemente localizada na bolsa flagelar e em estruturas vesiculares que são morfológicamente semelhantes aos compartimentos de vias endocíticas assim como de vias de exocitose. Em amastigotas, a enzima foi localizada em estruturas correspondentes aos megassomos, além de em estruturas subcelulares como bolsa flagelar e vesículas citoplasmáticas, como também é visto em promastigotas (Silva-Lopez *et al.*, 2004a). Além disso, outra enzima, porém com peso molecular de 68 kDa (Silva-Lopez & De-Simone 2004b) foi identificada e parece estar

presente na superfície da célula, bem como em compartimentos membranosos no citoplasma do parasito (Morgado-Díaz *et al.*, 2005).

Outra serina peptidase, agora de 110 kDa, que aparece no extrato solúvel em detergente de *L. amazonenses*, é vista como um dímero de 60 e 45 kDa (Silva-Lopez & De-Simone 2004c). A enzima liberada de 110 kDa foi também identificada e parece ocorrer como um homodímero (Silva-Lopez *et al.*, 2005). Enzimas semelhantes também foram identificados em *L. braziliensis* (Guedes *et al.*, 2007) e *L. donovani* (Choudhury *et al.*, 2009). Uma característica comum destas enzimas é a sua capacidade de digerir uma vasta gama de substratos proteicos e várias dessas enzimas são homodiméricas ou proteínas heterodiméricas. Em promastigotas de *L. infantum*, através de abordagens por imunocitoquímica, as serina-peptidases foram localizadas na região da bolsa flagelar e vesículas citoplasmáticas (da Silva-López *et al.*, 2010).

A Oligopeptidase B (OPB) é uma serina peptidase de ocorrência restrita, aparentemente estando presente em bactérias, plantas e tripanossomatídeos (Coetzer *et al.*, 2008). A OPB tem sido descrita em várias espécies de *Leishmania* (de Matos Guedes *et al.*, 2007; Ivens *et al.*, 2005; Peacock *et al.*, 2007; Morty *et al.*, 1999; Bastos *et al.*, 2013). Detecção de atividade de OPB no meio de cultura demonstrou a liberação de OPB por promastigotas de *L. donovani* (Silverman *et al.*, 2008). Sua expressão é aumentada em amastigotas de *L. braziliensis* e *L. donovani* quando comparado com promastigotas (Gamboa *et al.*, 2007; Rosenzweig *et al.*, 2008), enquanto seus níveis de expressão são similares em todos os estágios de vida de *L. major* e *L. mexicana* (Ouakad *et al.*, 2007; Holzer *et al.*, 2006).

Munday e colaboradores em 2011 mostraram, através do uso de cepas de *L. major* mutantes deficientes em OPB ( $\Delta$ opb), a redução no número de promastigotas metacíclicos em relação à população de cepas selvagens. Além disso, essa população de promastigotas metacíclicos mutantes teve uma capacidade de infectar macrófagos, proliferar e hidrolisar substratos bastante reduzidos em comparação com a cepa selvagem.

As cisteína-peptidases são bastante distribuídas na família Trypanosomatidae. Têm sido detectadas em vários gêneros como *Crithidia*, *Phytomonas*, *Herpetomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*. Estas enzimas estão envolvidas na

nutrição, ciclo de vida e na diferenciação morfológica destes parasitos (Rawling & Barret 1994).

Em *Leishmania*, cisteína-peptidases são particularmente importantes para sobrevivência, a replicação, desenvolvimento, metabolismo, a infecção da célula hospedeira e evasão da resposta imune do hospedeiro. Assim, elas têm atraído considerável interesse como alvos para o desenho de novos agentes quimioterápicos e vacinas (Mottram *et al.*, 2004). *Leishmania* spp. contêm três tipos de cisteína peptidases do clã CA, a CPA e CPB semelhantes a catepsina L e a CPC semelhante a catepsina B (Mottram *et al.*, 2004). Estas CPs são frequentemente referidas como as únicas CPs em *Leishmania*. No entanto, uma análise detalhada sobre o banco de dados do genoma de *L. major* revela um total de 56 genes que codificam para as CPs putativas, que são divididas em quatro clãs e 13 famílias. É possível que estas CPs desempenhem um papel crucial para o parasito, embora até agora a função da maioria destas CPs só pode ser prevista, com base no conhecimento atual dos homólogos de enzimas (Mottram *et al.*, 2004).

Até agora, as cisteína-peptidases bem caracterizadas funcionalmente são de *Leishmania mexicana* do Novo Mundo. Informações sobre as funções e importância dessas enzimas em interações parasito-hospedeiro foram obtidas pela geração de *L. mexicana* deficiente em CPB ( $\Delta$ cpb). Foi mostrado que promastigotas  $\Delta$ cpb são menos capazes de infectar macrófagos que os parasitos do tipo selvagem *in vitro* e que esses promastigotas e amastigotas mutantes são capazes de formar apenas lesões pequenas, de crescimento lento em camundongos BALB/c (Mottram *et al.*, 1996; Alexander *et al.*, 1998; Frame *et al.*, 2000). Além disso, foi mostrado que a ausência dos genes *cpb* resultou numa mudança na resposta imune predominantemente Th2 (do tipo selvagem) à resposta Th1, normalmente observado quando as isoenzimas CPBs estão presentes (Alexander *et al.*, 1998). Tem sido sugerido que em *L. mexicana* estas enzimas são vitais para a autofagia e diferenciação do parasito (Williams *et al.*, 2006). Recentemente, o nosso grupo descreveu que a autofagia de *Leishmania* induzida por drogas é acompanhada por aumento da expressão de *cpb* (Santos *et al.*, 2009).

Os membros do complexo *L. donovani* também possuem múltiplas classes de cisteína peptidases, que são reguladas durante seu desenvolvimento (Omara-Opyene & Gedamu 1997; Mundodi *et al.*, 2002), e estão envolvidas na sobrevivência do parasita



intracelular (Mundodi *et al.*, 2005). Além disso, foi proposto que cisteína peptidases de *L. donovani* e *L. infantum* ativam o sistema cinina, um grupo de potentes peptídeos vasoativos proteoliticamente liberados por cininogênios (pertencem ao grupo das cistatinas, inibidores protéicos de cisteína peptidases), que têm sido reconhecidos como sinais de alerta do sistema imune inato (Svensjo *et al.*, 2006).

Em *L. braziliensis*, apenas cisteína peptidases variando de 20 kDa a 65 kDa têm sido relatadas (Alves *et al.*, 1993). Um anticorpo policlonal contra CPB de *L. amazonensis* foi capaz de reconhecer polipeptídeos em *L. braziliensis* (Rebello *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2009) e sua expressão parece estar correlacionada com a virulência do parasito (Lima *et al.*, 2009). Um gene *cpb* de *L. braziliensis* foi clonado e expresso, revelando diferenças na utilização de substrato entre CPs de *L. mexicana* e *L. braziliensis* (Lanfranco *et al.*, 2008).

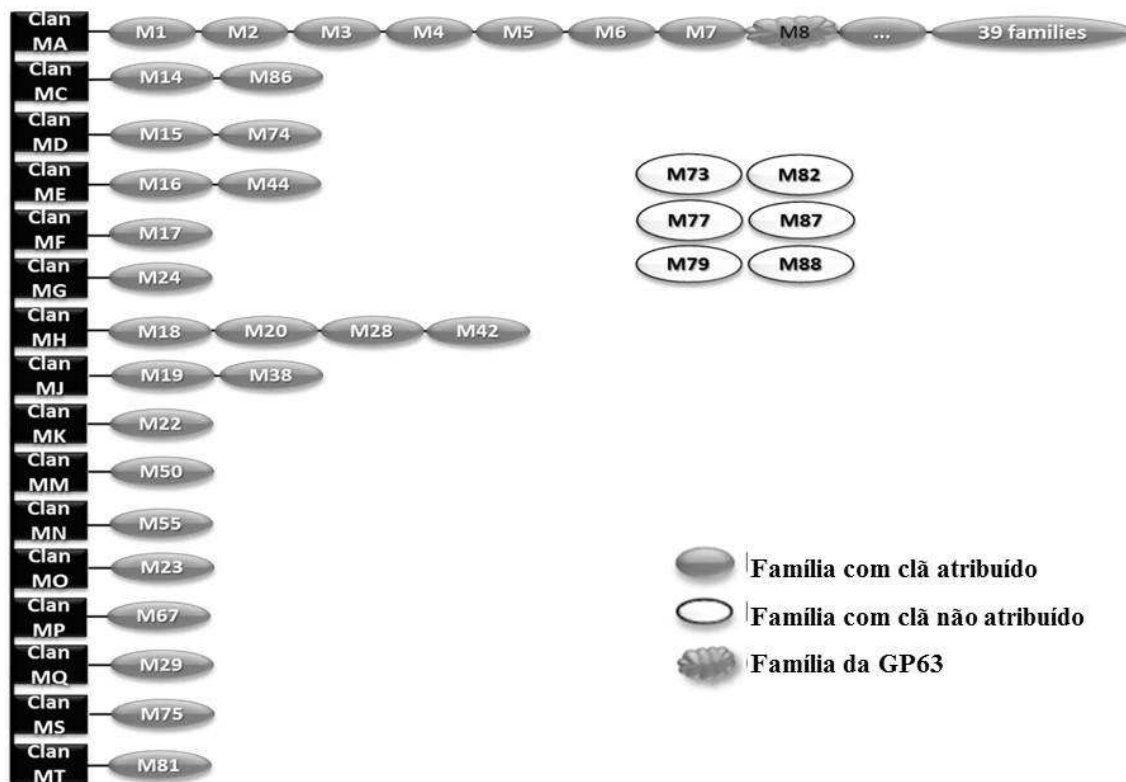
Outra cisteína peptidase descrita em *Leishmania* é a calpaína. Em *L. major*, um total de 27 peptidases como as calpaínas têm sido descritas com base na busca por domínios conservados no genoma (Ersfeld *et al.*, 2005). Em *L. major*, foi demonstrado que uma peptidase relacionada à calpaína (LmCALP20.2) é altamente expressa na fase de promastigotas e LmCALP20.1, codificada pelo gene adjacente, muito expressa na fase metacíclica subsequente (Saxena *et al.*, 2003). Nosso grupo demonstrou que MDL28170, um inibidor potente de calpaína, é capaz de reduzir proliferação de promastigota em cultura e induzir a morte celular (d'Avila-Levy *et al.*, 2006c), provavelmente através de apoptose (dados não publicados).

As metalo-peptidases são endopeptidases bem estudadas e caracterizadas no gênero *Leishmania* e já foram descritas em todas as espécies desse gênero. Nos últimos anos vem sendo demonstrado que a massa molecular das metalo-peptidases desse parasito é muito variada, podendo ser detectadas enzimas entre 59 kDa a 205 kDa (de Araujo Soares *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2004; Cuervo *et al.*, 2006). Essas peptidases são dependentes de zinco, e a mais estudada é a glicoproteína gp63.

## **1.8 – A gp63**

Em meados da década de 1980, foi identificada e caracterizada uma proteína em promastigotas de diferentes espécies do gênero *Leishmania* (Fong & Chang 1982;

Lepay *et al.*, 1983; Bouvier *et al.*, 1985; Etges, Bouvier & Bordier 1986) que apresentava reatividade imunológica cruzada com o soro obtido de hospedeiros infectados com *Leishmania* spp. Esta proteína apresenta uma massa molecular com cerca de 63 kDa; é uma metalopeptidase dependente de zinco; e é responsável por cerca de 1% das proteínas totais em promastigotas (Bouvier *et al.*, 1985). Esta proteína também é conhecida como leishmanolisina, glicoproteína de 63 kDa (gp63), peptidase ácida de superfície, peptidase de superfície de promastigotas (PSP) e ultimamente como principal peptidase de superfície (major surface peptidase, MSP), e pertence a classe enzimática EC 3.4.24.36 (clã MA, família M8 de endopeptidases), com várias características em comum com metalopeptidases de matriz extracelular de mamíferos (Figura 1.6) (Yao *et al.*, 2003; Yao 2010; d'Avila-Levy *et al.*, 2013).



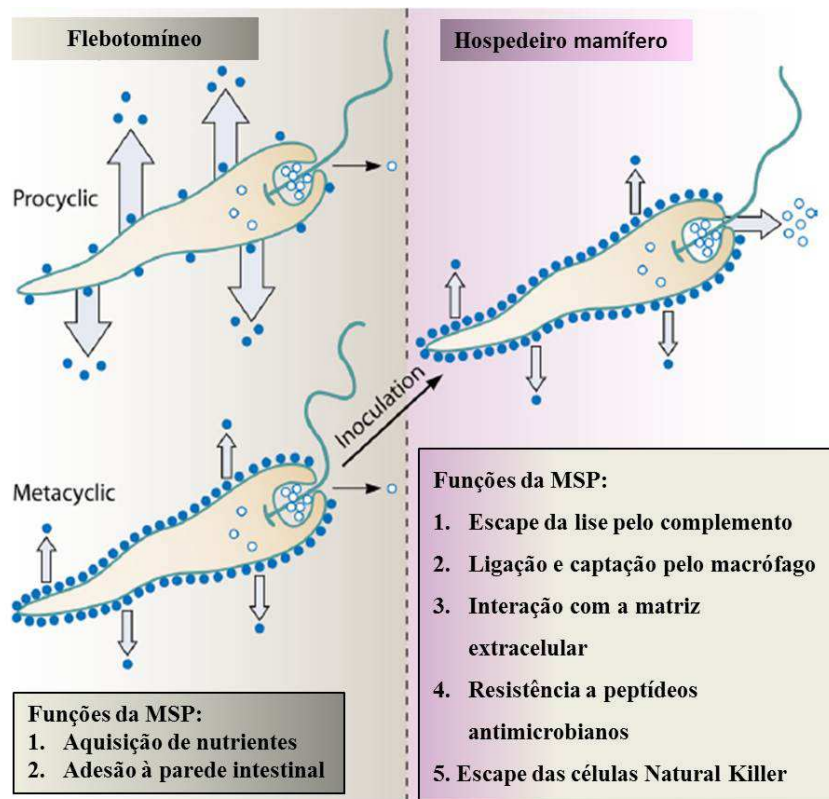
**Figura 1.6.** Visão geral dos clãs e famílias de metalopeptidases de acordo com o banco de dados MEROPS (Rawlings, Barret & Bateman 2012). O clã (caixas pretas) contém enzimas que têm surgido a partir de uma origem evolutiva comum de peptidases e representam uma ou mais famílias (círculos cinza escuro) que mostram evidências de sua relação evolutiva. Os círculos brancos representam seis famílias com clãs não atribuídos. A GP63 pertence ao clã MA, família M8, como destacado. Este clã possui 39 famílias, das quais apenas oito são representados (d'Avila-Levy *et al.*, 2013).

A gp63 é sintetizada no retículo endoplasmático, onde a sequência sinal é clivada após a tradução. Um carboidrato N-ligado é adicionado e o peptídeo C-terminal (cerca de 25 aminoácidos) é substituído por uma estrutura de ancoragem à membrana, uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Processamento proteolítico subsequente envolve a clivagem de um pró-peptídeo para produzir a cadeia polipeptídica madura. O pró-peptídeo predito contém um resíduo de cisteína que é conservado em todas as moléculas de gp63 através das espécies. Em *L. major*, este resíduo parece contribuir na modulação da ligação de átomos de zinco no local do sítio ativo e regulando assim a atividade enzimática. Esse mecanismo pode ser usado pelo parasito para evitar sua autodestruição pela enzima gp63 ativa (Macdonald *et al.*, 1995).

Essa peptidase é principalmente encontrada na sua forma ancorada à membrana plasmática por uma âncora de GPI (Bordier *et al.*, 1986), mas através de biotinylation de superfície, citofluorimetria e microscopia imunoeletrônica, mostram-se existir também as isoformas hidrofílicas (Weise *et al.*, 2000). Além disso, a gp63 associada à membrana ou na forma livre, também é liberada por promastigotas para o meio extracelular. Capeamento de células vivas induzido por anticorpo demonstrou que a peptidase de superfície é livre para se mover no plano da membrana, concentrando primeiro nas extremidades das células, e depois sendo liberada para o meio (Fong & Chang 1982, Chang *et al.* 1986). Embora a âncora GPI possa ser clivada com a fosfolipase C (PLC), revelando o epítipo determinante de reação cruzada (CRD), evidências usando anticorpos contra CRD indicam que a âncora de GPI não é enzimaticamente clivada *in vivo* durante a liberação da gp63 a partir da superfície do parasito (McGwire *et al.*, 2002, Yao *et al.*, 2003). Foi demonstrado que a liberação de gp63 de *L. amazonensis* para o meio extracelular foi poderosamente diminuída na presença de um quelante de metal, a 1,10 – fenantrolina ou quando havia uma mutação no sítio de ligação ao zinco, sugerindo que a liberação da gp63 é dependente de autoproteólise (McGwire *et al.*, 2002).

Várias espécies de *Leishmania* contêm distintas classes de genes *GP63* que são diferentemente regulados durante todos os estágios do ciclo de vida, incluindo amastigotas, promastigotas procíclicos e metacíclicos (Medina- Acosta *et al.*, 1993). Por exemplo, a expressão de gp63 ligada à membrana na forma amastigota é muito reduzida, embora uma forma solúvel de gp63 seja localizada no lisossomo do parasito (Medina -

Acosta *et al.*, 1989, Schneider *et al.*, 1992 , Ilg *et al.*, 1993). Por isso, a proteína gp63 pode desempenhar um papel vital nas diferentes fases do ciclo de vida de *Leishmania* (Figura 1.7).



**Figura 1.7.** Subpopulações de gp63 (MSP) e possíveis funções em promastigotas de *Leishmania* no inseto vetor e no hospedeiro mamífero. Círculos sólidos e abertos representam as MSPs localizadas na superfície e internamente, respectivamente. As setas representam liberação de MSP para o meio extracelular, com suas larguras proporcionais às quantidades de MSP liberadas. A liberação de MSP na forma de promastigotas procíclicos e metacíclicos dentro do inseto (lado esquerdo) é retratada no diagrama superior e no inferior respectivamente. Um promastigota metacíclico é retratado no lado direito referente ao hospedeiro mamífero (Adaptado de Yao *et al.*, 2007).

Homólogos de gp63 também têm sido identificados em *T. cruzi*, *T. brucei* e *T. rangeli* (Bangs *et al.*, 1997, El-Sayed & Donelson 1997, Grandgenett *et al.*, 2000, Bangs *et al.*, 2001, Cuevas *et al.*, 2003, LaCount *et al.*, 2003, Grandgenett *et al.*, 2007, Kulkarni *et al.*, 2009, Ferreira *et al.*, 2010). No genoma de *T. cruzi*, genes codificando

gp63 estão extensivamente amplificados (mais que 420 genes e pseudogenes) quando comparado ao genoma de *T. brucei* e *L. infantum*. No entanto, existe uma correlação indireta entre expansão gênica e atividade proteolítica. Por exemplo, *T. cruzi* é de longe o protozoário com a maior expansão gênica de gp63, enquanto sua atividade de metalopeptidase é de difícil detecção por SDS-PAGE-substrato. Já *Leishmania* spp. apresenta atividade de metalopeptidase facilmente detectável por SDS-PAGE-substrato mesmo possuindo um baixo número de genes *GP63*. Interessantemente, em extratos celulares do parasito *L. tarentolae*, que tem sido classificado como subgênero *Sauroleishmania* com bases em critérios biológicos e diferença de genes (Croan *et al.*, 1997; Zelazny *et al.*, 2005; Asato *et al.*, 2005; Fraga *et al.*, 2010), o gene *GP63* é altamente expandido, com 49 genes possíveis, em comparação com 29 em *L. braziliensis*, 7 em *L. infantum* e 5 em *L. major* (Raymond *et al.*, 2012). Uma vez que nenhuma atividade dessa metalopeptidase foi detectada em *L. tarentolae*, os autores hipotetizam que a alta variabilidade na sequência dos genes *GP63* nesse parasito pode afetar atividade de peptidase da gp63 (Raymond *et al.*, 2012).

Cuevas *et al.*, (2003) analisaram o genoma de *T. cruzi* e identificaram vários grupos de genes que pertencem à família da gp63, com vários membros em cada um. Neste sentido, os genes *GP63* foram agrupados em Tcgp63-I e II, que estão presentes como genes de alto número de cópias, bem como Tcgp63-III, que são os pseudogenes (Cuevas *et al.*, 2003). Pelo menos quatro RNAm de gp63, que pertencem ao Tcgp63-I, são regulados ao longo das diferentes fases do desenvolvimento do parasito, sendo mais abundante em amastigotas do que em epimastigotas ou tripomastigotas (Grandgenett *et al.*, 2000). Embora os genes Tcgp63-II sejam mais abundantes no genoma do *T. cruzi* do que os Tcgp63-I, apenas o último é detectável em nível de proteína e apresenta expressivos níveis de RNAm em todas as fases de desenvolvimento da cepa *T. cruzi* CL Brener. Tcgp63-I é uma enzima proteoliticamente ativa ligada à membrana por uma âncora de GPI e com um possível papel na infecção de células de hospedeiro, uma vez que anticorpos criados contra um peptídeo sintético derivado da sequência de Tcgp63-I parcialmente bloqueou a invasão de células Vero por tripomastigotas (Cuevas *et al.*, 2003). Em 2009, Kulkarni e colaboradores, desenvolveram um anticorpo policlonal contra a Tcgp63 recombinante. Eles viram que o tratamento de tripomastigotas com esse anticorpo conseguiu reduzir a infecção em mioblastos.

Recentemente, Ma e colaboradores (2011) reanalisaram os genes *GP63* e classificaram peptidases gp63 de *T. cruzi* em quatro grupos de acordo com características de sequência. Os autores também compararam a semelhança entre gp63 de tripanosomatídeos, insetos vetores e hospedeiros (humanos e roedores), e verificaram que a gp63 de tripanosomatídeos é mais semelhante às dos seus vetores (Ma *et al.*, 2011). O possível papel da Tcgp63 na interação do *T. cruzi* com o intestino médio de triatomíneos ainda não foi avaliado, mas é uma possibilidade em aberto, devido à sua localização superficial e expressão em epimastigotas, bem como em tripomastigotas metacíclicas. Neste sentido, o nosso grupo de pesquisa analisou os efeitos de inibidores de metalopeptidases, bem como o efeito do anticorpo produzido por Cuevas *et al.*, (2003), e ambos os tratamentos reduziram significativamente a adesão de *T. cruzi* ao intestino médio explantado de *Rhodnius prolixus* (Uehara L.A., dados não publicados).

Outro parasito que abriga genes *GP63* é o *T. brucei*, o agente causador da doença Africana do sono em seres humanos, que é transmitida pela picada da mosca tsé-tsé infectada. A superfície das formas sanguíneas desse parasito é coberta por uma abundante proteína de superfície variante ancorada por GPI (VSG). Durante a diferenciação das formas sanguíneas para as formas procíclicas, a VSG é substituída por outra glicoproteína, designada como proteína ácida repetitiva em procíclicos (PARP) ou prociclina (Gruszynski *et al.*, 2006).

Em 1993, Ziegelbauer e colaboradores, pela primeira vez, mostraram a participação de uma peptidase no processo de liberação da VSG em *T. brucei* durante essa transformação das formas sanguíneas para as formas procíclicas. Mais tarde, foi demonstrado que esta peptidase é uma metalopeptidase dependente de zinco (Bangs *et al.*, 1997), que está presente em toda a fase procíclica. No mesmo ano, El-Sayed & Donelson mostram pela primeira vez a presença em *T. brucei* de genes homólogos aos genes *GP63* de *Leishmania* (El-Sayed & Donelson 1997).

Em 2003, homólogos de *GP63* em *T. brucei* foram bem caracterizados. Eles pertencem a pelo menos três famílias de genes (TbMSP-A,-B e-C) com base em suas diferentes regiões não traduzidas (UTRs) e sua expressão diferencial durante o ciclo de vida de *T. brucei*. Todas as famílias de genes contêm aproximadamente 30% de identidade de aminoácidos com a gp63 de *Leishmania*. RNA de interferência de TbMSP-B revelou que esta molécula pode funcionar para liberar o VSG transgênico a

partir da superfície de tripanossomas procíclicos. Assim, TbMSP-B confere uma função de processamento de proteínas para a superfície de tripanossomas africanos (LaCount *et al.*, 2003). Nenhum efeito sobre a cinética de crescimento de tripanossomas em cultura quer em formas procíclicas ou sanguíneas, foi observado (LaCount *et al.*, 2003). VSGs são ativamente liberadas por duas maneiras: hidrólise de GPI e proteólise. TbMSP-B está presente nas formas sanguíneas e procíclicas e, juntamente com a fosfolipase C (GPI-PLC) atua na remoção (60%) da VSG durante a diferenciação da forma sanguínea para a forma procíclica, assim como demonstrado por análises através de deleção gênica (Grandgenett *et al.*, 2007).

Em *T. rangeli*, 13 sequências foram identificadas correspondentes aos genes *GP63* de outros tripanosomatídeos descritos (Ferreira *et al.*, 2010). Algumas das gp63 de *T. rangeli* identificadas apresentam o motivo HEXXH, que é característica do sítio catalítico de metalopeptidases; a presença de duas histidinas e um resíduo de ácido glutâmico é conservada entre todas as sequências de gp63 dos tripanosomatídeos estudados e são essenciais para a atividade proteolítica (McGwire & Chang 1996).

Transcritos de *GP63* foram detectados nas formas epimastigotas de *T. rangeli*, que mostra novas possibilidades para estudar a função dessa família de genes em um tripanossoma não patogênico (Ferreira *et al.*, 2010), incluindo na interação de *T. rangeli* com o inseto hospedeiro.

Desde a sua descoberta, devido a suas potenciais funções relevantes ao longo do ciclo de vida de *Leishmania* e outros parasitos, além de seu potencial terapêutico, a gp63 tem sido extensivamente investigada e uma grande quantidade de funções têm sido descritas para essa peptidase de *Leishmania* spp. durante a interação com o hospedeiro vertebrado. Ela está implicada na evasão da lise pelo sistema complemento, através da clivagem do componente C3 (Chaudhuri & Chang 1988), bem como a conversão do C3b à sua forma inativa, iC3b (Brittingham *et al.*, 1995); invasão tecidual pela degradação do tecido conjuntivo, por exemplo, através da hidrólise de componentes da matriz extracelular, como o colágeno tipo IV (McGwire *et al.*, 2003); promoção da fagocitose das formas promastigotas através de receptores dos macrófagos, tais como CR3 (Mosser & Edelson 1987; Russell *et al.*, 1989; Brittingham *et al.*, 1995); degradação de proteínas citosólicas relacionadas ao substrato para proteína quinase C rico em resíduos de alanina miristoladas (MARCKS) (Corradin *et al.*, 1999);

ela também contém uma sequência SRYD que é antigenicamente relacionada a sequência RGDS de fibronectina, sugerindo uma potencial interação da gp63 com receptores de fibronectina dos macrófagos (Soteriadou *et al.*, 1992); é capaz de clivar CD4 de superfície, podendo diminuir a resposta de células T (Hey *et al.*, 1994); e também pode clivar peptídeos intracelulares apresentados por moléculas MHC de classe I (Garcia *et al.*, 1997).

Curiosamente, a gp63 é expressa predominantemente na superfície de promastigotas de *Leishmania*, em vez de em amastigotas. Apesar disso, pouco se sabe sobre as funções desempenhadas por essa molécula durante a fase de vida do parasito no inseto vetor, possivelmente em função da clara e inequívoca participação do LPG neste processo (Soares *et al.*, 2010). Entretanto, outras moléculas devem participar, ou serem igualmente cruciais para esta etapa do ciclo de vida do parasito, como por exemplo, a gp63.

Existe uma enorme quantidade de informação que liga indiretamente a gp63 a uma função nesta parte do ciclo de vida dos parasitos. O estudo em tripanossomatídeos monoxênicos e tripanosomatídeos de plantas tem contribuído consideravelmente para melhorar o conhecimento sobre o papel da gp63 na interação com o inseto. Tripanosomatídeos monoxênicos desenvolvem o seu ciclo de vida limitado ao hospedeiro invertebrado, apresentando formas específicas do desenvolvimento, enquanto que tripanosomatídeos de plantas, *Phytomonas*, alternam entre uma planta e um inseto hospedeiro. Um trabalho pioneiro publicado por Etges em 1992 mostra, em parasitos monoxênicos dos gêneros *Crithidia* e *Herpetomonas*, a presença de uma metalopeptidase de superfície com características bioquímicas semelhantes a gp63. Um ano depois, Inverso *et al.*, (1993) demonstraram que o parasito *Crithidia fasciculata* contém homólogos de genes *GP63* de *Leishmania*, que são transcritos e contêm possíveis locais de adição da âncora de GPI. Mais tarde, no mesmo ano, Schneider e Glaser também demonstraram semelhanças entre gp63 de *Leishmania* e uma metalopeptidase de superfície de *Herpetomonas samuelpeessoai*, tais como a localização na superfície, incluindo uma âncora de GPI, a inibição por 1,10- fenantrolina e clivagem de um substrato nonapeptídeo demonstrado anteriormente ser hidrolisado somente por gp63 de *Leishmania* (Bouvier *et al.*, 1990). Além disso, atividades proteolíticas com propriedades bioquímicas similares as da gp63 e com reatividade cruzada com



anticorpos gerados contra a gp63 de *Leishmania* já foram previamente identificadas nos gêneros *Crithidia* (d'Avila-Levy *et al.*, 2001, 2003), *Herpetomonas* (Nogueira de Melo *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2010), *Blastocrithidia* (d'Avila-Levy *et al.*, 2005, esse gênero atualmente é conhecido como *Strigomonas*, Teixeira *et al.* 2011), *Leptomonas* (Jaffe & Dwyer 2003) e *Phytomonas* (d'Avila-Levy *et al.*, 2006a, 2006b) (Tabela 1.2).

**Tabela 1.2. Presença de homólogos da gp63 em tripanossomatídeos monoxênicos e de plantas (adaptada de d'Avila-Levy *et al.*, 2013).**

Tripanossomatídeos	Massa molecular de proteínas homólogas à gp63*	Presença de uma âncora de GPI †	Atividade (s) de metalopeptidase associada a célula ‡	Função na adesão no invertebrado	Referência(s)
<i>Strigomonas culicis</i>	50 (c, s)	+	50, 55, 76	Não determinada	d'Avila-Levy <i>et al.</i> 2005
<i>Angomonas deanei</i>	62 (c, s), 67 (c)	+	51, 58	<i>Aedes aegypti</i> (intestino)	d'Avila-Levy <i>et al.</i> 2003, 2006a, 2008
<i>Crithidia fasciculata</i>	54 (s) <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	59, 63	Não determinada	Etges 1992, Inverso <i>et al.</i> 1993, Branquinha <i>et al.</i> 1996
<i>Crithidia guilhermei</i>	62 (c, s), 67 (c)	Não determinada	57, 61	<i>Aedes aegypti</i> (intestino)	Branquinha <i>et al.</i> 1996, Nogueira de Melo <i>et al.</i> 2001, d'Avila-Levy <i>et al.</i> 2006a
<i>Crithidia lucilae</i>	75 (s), 97 (s), >100 (s)	Não determinada	55, 61	Não determinada	Branquinha <i>et al.</i> 1996, Jaffe & Dwyer 2003
<i>Herpetomonas megaseliae</i>	52 (c, s), 60 (c), 63 (c)	+	50, 60, 70	<i>Aedes aegypti</i> (intestino) e <i>Megaselia scalaris</i> (intestino)	Nogueira de Melo <i>et al.</i> 2006
<i>Herpetomonas samuelpessoai</i>	63 (c, s)	+	55–66	<i>Aedes aegypti</i> (intestino)	Schneider & Glaser 1993, Branquinha <i>et al.</i> 1996, Santos <i>et al.</i> 2003, Elias <i>et al.</i> 2006, Pereira <i>et al.</i> 2010b
<i>Leptomonas colossoma</i>	52 (c, s), 63 (c, s)	Não determinada	Não detectada	<i>Aedes albopictus</i> (linhagem celular)	Pereira <i>et al.</i> 2009
<i>Leptomonas samueli</i>	52 (c, s), 63 (c, s)	Não determinada	60, 70	<i>Aedes albopictus</i> (linhagem celular)	Pereira <i>et al.</i> 2009
<i>Leptomonas wallacei</i>	52 (c, s), 63 (c, s)	Não determinada	55	<i>Aedes albopictus</i> (linhagem celular)	Pereira <i>et al.</i> 2009
<i>Leptomonas seymouri</i>	97 (s)	Não determinada	65, 70, 78, 80	Não determinada	Jaffe & Dwyer 2003, Santos <i>et al.</i> 2005
<i>Phytomonas françai</i>	62 (c), 67 (c, s)	Não determinada	Não determinada	<i>Aedes aegypti</i> (intestino)	Almeida <i>et al.</i> 2003, d'Avila-Levy <i>et al.</i> 2006a
<i>Phytomonas serpens</i>	52 (c), 60 (c, s), 63 (c)	+	Não determinada	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (glândula salivar)	Vermelho <i>et al.</i> 2003, d'Avila-Levy <i>et al.</i> 2006b, Santos <i>et al.</i> 2007

\*A massa molecular de homólogos da gp63 (em kDa) foi determinada por comparação com o padrão de proteínas após SDS-PAGE e Western blotting utilizando anticorpos policlonais anti-gp63. As letras (c) e (s) referem-se a polipéptidos associados e secretados por células, respectivamente.

† Presença de uma âncora de GPI (+) foi avaliada por tratamento de parasitos ou polipeptídeos purificados com fosfolipase C e a marcação dos polipeptídeos com anticorpo com anti-CRD.

<sup>a</sup> Gene com elevada homologia com a gp63 foi clonado e sequenciado em *C. fasciculata*, o gene contém um local potencial para a adição de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol.

‡ Os números indicam as massas moleculares relativas em quilodaltons de metalopeptidases detectadas por SDS-PAGE-gelatina.

Após estes trabalhos, foi especulado que gp63 possa realmente executar uma função durante a fase de vida no inseto hospedeiro, considerando que esta é a única etapa compartilhada do ciclo de vida entre *Leishmania* e esses tripanossomatídeos monoxênicos e *Phytomonas*.

Nosso grupo de pesquisa vem procurando avaliar essa possível relevância da gp63 na interação parasito-inseto hospedeiro, empregando abordagens bioquímicas, tripanossomatídeos monoxênicos e tripanossomatídeos de plantas como modelo. Para isso, usamos *Aedes aegypti* como um modelo experimental para estudos sobre a interação tripanossomatídeos-insetos. De fato, *Strigomonas culicis* (anteriormente conhecido como *Blastocrithidia culicis*, Teixeira *et al.*, 2011) e *Herpetomonas samuelpessoai* podem colonizar com sucesso o intestino de *A. aegypti* (Correa-da-Silva *et al.*, 2006, Pereira *et al.*, 2010b). Além disso, *Herpetomonas* sp. é encontrado repetidamente na natureza neste inseto (Weinman & Cheong 1978). Nosso grupo de pesquisa vem demonstrando também essa adequação de *A. aegypti* como modelo experimental para estudos de interação, através da comparação entre a interação de *H. megaseliae* com seu inseto hospedeiro original *Megaselia scalaris* e com *A. aegypti*. Interessantemente, a taxa de adesão ao intestino de *A. aegypti* foi cerca de 6 vezes maior do que em *Megaselia scalaris* (Nogueira de Melo *et al.*, 2006). Esses resultados surpreendentes podem ser explicados também, pois não há uma sistemática de estudo da prevalência de tripanossomatídeos monoxênicos em populações naturais de insetos, apenas observações acidentais (Ebbert *et al.*, 2001). Em conjunto, esses resultados validam este hospedeiro invertebrado como um modelo adequado.

Um de nossos trabalhos analisou a relevância da gp63 no processo de adesão de *H. megaseliae* ao intestino explantado de *A. aegypti*. Os ensaios consistiram em: incubar os intestinos dos insetos dissecados com a gp63 purificada; e os parasitos foram pretratados com anticorpo anti-gp63 ou com a PLC. Todos os ensaios apresentaram uma reduzida adesão desses tripanossomatídeos ao intestino do inseto (Nogueira de Melo *et al.*, 2006).

Outro parasito estudado foi a *Phytomonas françai* (d'Avila-Levy *et al.*, 2006a). Este parasito está associado com uma doença conhecida como “chocamento das raízes”, caracterizada pelo pobre desenvolvimento das raízes e clorose geral da parte aérea da planta (Vainstein & Roitman 1986). *P. françai*, apresenta grande quantidade de

moléculas como a gp63 em sua superfície, comparado a outras espécies de tripanossomatídeos onde também já foram encontradas moléculas como a gp63 (*C. guilhermei* e a cepa curada de *Angomonas deanei*, anteriormente conhecida como *Crithidia deanei*, Teixeira *et al.*, 2011). Curiosamente, *P. françai* interagiu mais eficientemente do que as duas espécies de *Crithidia* com o intestino de *A. aegypti* (d'Avila-Levy *et al.*, 2006a). Similarmente, a cepa de *A. deanei* contendo um endossimbionte apresenta uma maior exposição dessas moléculas semelhantes à gp63 em sua superfície (d'Avila-Levy *et al.*, 2008) e as taxas de interação com o intestino do inseto e com linhagens celular, foram cerca de 2 vezes maior do que na cepa sem o endossimbionte (Fampa *et al.*, 2003, d'Avila-Levy *et al.*, 2005b, d'Avila-Levy *et al.*, 2008). Essa correlação entre a expressão de proteínas de superfície como a gp63 e adesão de tripanossomatídeos ao intestino, corroboram ainda mais com uma possível participação dessa molécula neste processo de adesão (Tabela 1.2).

Cepas selvagens de *A. deanei* tratadas com PLC reduzem seus níveis de moléculas como a gp63 em sua superfície a níveis similares aos das cepas curadas. Além disso, foi visto que essas cepas selvagens tratadas com a PLC tiveram taxas de adesão ao intestino de *A. aegypti* semelhantes às da cepa curada (d'Avila-Levy *et al.*, 2008).

A taxa de adesão de *P. françai*, *A. deanei* e *C. guilhermei* ao intestino de *A. aegypti*, também foi reduzida através do pré-tratamento desses parasitos com o anticorpo anti-gp63 ou do pré-tratamento do intestino com a enzima semelhante a gp63 de cada parasito purificada ou ativa proteoliticamente, inativada pela remoção de íons do seu sítio ativo (apoenzima) ou inativada por desnaturação (calor) (d'Avila-Levy *et al.*, 2006a). Esses resultados sugerem além da existência de um possível receptor para a gp63 no intestino desse inseto, a não importância da estrutura terciária da proteína para a realização da adesão ao receptor. Assim, foi identificada uma proteína de 50 kDa no extrato do intestino de *A. aegypti*, considerada o possível receptor para moléculas como a gp63 (d'Avila-Levy *et al.*, 2006a).

Outro processo de adesão analisado foi entre *P. serpens* e a glândula salivar de *Oncopeltus fasciatus*. O pré-tratamento dos parasitos com anticorpo anti-gp63 reduz significativamente a adesão à glândula salivar explantada. Além disso, foi encontrada

também uma proteína de 50 kDa no extrato dessa glândula, indicando assim, a presença de um possível receptor para a gp63 também (d'Avila-Levy *et al.*, 2006b) (Tabela 1.2).

## II. JUSTIFICATIVA

O papel da gp63 na interação de *Leishmania* spp. com o hospedeiro vertebrado já é bem estabelecido. Essa metalopeptidase é implicada em processos como a evasão da lise pelo sistema complemento (Chaudhuri & Chang 1988); invasão tecidual pela degradação do tecido conjuntivo (McGwire *et al.*, 2003); e promoção da fagocitose das formas promastigotas através de receptores dos macrófagos, tais como o CR3 (Mosser & Edelson 1987; Russell *et al.*, 1989; Brittingham *et al.*, 1995). No entanto, a gp63 é expressa predominantemente na superfície de promastigotas de *Leishmania* spp. em vez de em amastigotas. Apesar disso, pouco se sabe sobre as funções desempenhadas por essa molécula durante a fase de vida do parasito no inseto vetor, possivelmente em função da já bem caracterizada participação do LPG neste processo (Soares *et al.*, 2010). Entretanto, outras moléculas devem participar, ou serem igualmente cruciais para esta etapa do ciclo de vida do parasito, como por exemplo, a gp63.

Nesse contexto, neste projeto, pretendemos através de abordagens bioquímicas, analisar o papel dessa metalopeptidase na interação de *L. braziliensis* e *L. infantum* com seus respectivos insetos hospedeiros. A identificação de moléculas-chave na interação dos tripanossomatídeos com seus hospedeiros invertebrados é válida para melhor compreensão da bioquímica e fisiologia destes parasitos, para esclarecer alguns aspectos da interação parasito-vetor e ampliar as perspectivas para o desenvolvimento de estratégias que bloqueiem a transmissão vetorial.

### **III. OBJETIVOS**

#### **1 – Objetivo Geral**

Avaliar o papel da gp63 na interação de *L. braziliensis* e *L. infantum* com o intestino do hospedeiro invertebrado e com células embrionárias de *Lutzomyia longipalpis* (LL5).

#### **2 - Objetivos Específicos**

##### **PARTE I: ensaios de interação parasito-vetor**

- Analisar o efeito dos inibidores de metalo peptidases sobre a viabilidade de *L. braziliensis* e *L. infantum*;
- Analisar o efeito dos inibidores de metalo peptidases e do anticorpo anti-gp63 sobre a interação de *L. braziliensis* e *L. infantum* com células embrionárias de *Lu. longipalpis* (LL5);
- Analisar o efeito dos inibidores de metalo peptidases e do anticorpo anti-gp63 sobre a interação de *L. braziliensis* e *L. infantum* com os intestinos dissecados de seus respectivos hospedeiros invertebrados (*Lu. intermedia* e *Lu. longipalpis*);
- Analisar o efeito do fosfoglicano (PG) puro sobre a interação entre *L. braziliensis* e *L. infantum* com os intestinos dissecados de seus respectivos hospedeiros invertebrados (*Lu. intermedia* e *Lu. longipalpis*);

##### **PARTE II: etapas preliminares da purificação da gp63**

- Isolar uma fração enriquecida da metalo peptidase gp63 do sobrenadante de cultura de *L. braziliensis*.

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Células e cultivo

A linhagem celular LL5 (células embrionárias de *Lu. longipalpis*) cedida gentilmente pela Dra Yara Maria Traub-Csekö (Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Vetores – FIOCRUZ) foi mantida por passagens semanais em meio L15 (Sigma) suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) inativado, 10% Meio Triptose Fosfato (TBP) e 1% penicilina/estreptomicina a 28°C. O parasito *Leishmania braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2903) foi mantido por dois repiques semanais em meio 199 (GIBCO) suplementado com 10% SFB inativado, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (50 µg/ml), glutamina 12,5 mM, adenina 0,1 M, 0.0005% de hemina e HEPES 40 mM em pH 7,4 a 26 °C. O parasito *Leishmania infantum* (cepa MHOM/BR/2906) foi mantido por dois repiques semanais em meio Schneider, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (50 µg/ml) em pH 7,0 incubados a 26 °C.

### 2. Insetos

*Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia intermedia* foram capturados na Gruta da Lapinha, Sete Lagoas, MG e cedidos pela Dra. Elizabeth Ferreira Rangel (Laboratório de Transmissores de Leishmanioses - FIOCRUZ). As fêmeas são mantidas em jejum de sangue com 30% de sucrose.

### 3. Efeito de inibidores proteolíticos sobre a viabilidade dos parasitos

Para verificação do efeito dos inibidores de peptidases na viabilidade de *L. braziliensis* e de *L. infantum* o ensaio foi realizado através da incubação dos parasitos ( $2 \times 10^7$ /ml) num volume final de 100 µl contendo meio M199 ou meio Schneider, respectivamente, na presença de diferentes concentrações (10, 25 e 50 µM) de 1,10-Fenantrolina, ácido etileno-diamino tetracético (EDTA) e etileno glicol-bis (β-aminoetil éter) (EGTA). Os controles consistiram de parasitos cultivados somente em meio de cultura, na presença ou ausência de dimetilsulfóxido (DMSO), usado para solubilizar a 1,10-Fenantrolina, na concentração máxima presente nas diluições utilizadas do



inibidor. As células foram incubadas por 1 h a 26 °C e estimadas após lavagem 2 × em tampão PBS por contagem em câmara de Neubauer em triplicata. A viabilidade dos parasitos foi avaliada pela sua motilidade (d'Avila-Levy *et al.*, 2003).

Os inibidores na máxima concentração que não causava efeito na viabilidade foram posteriormente utilizados para os ensaios de interação com o intestino dissecado do inseto vetor e com as células LL5.

#### **4. Ensaios de Aglutinação**

Os parasitos ( $2 \times 10^7$  células) foram incubados em diferentes concentrações (1:500, 1:1000, 1:2000, 1:2500, 1:3000 e 1:5000) do anticorpo anti-gp63 e, posteriormente observados no microscópio invertido a fim de verificar o título aglutinante para cada anticorpo, para a sua posterior utilização nos experimentos de interação. O título aglutinante foi definido como a última diluição onde foi possível visualizar a aglutinação dos promastigotas. Ensaios controles foram conduzidos com soro normal de coelho (pré-imune). Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **5. Ensaio de interação entre *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* com linhagem celular de *Lutzomyia longipalpis* (LL5)**

Células LL5 ( $2 \times 10^5$  células por poço) foram incubadas em uma placa com 24 poços a 26 °C com 300 µl (quantidade suficiente para cobrir a lamínula em cada poço) de meio L15 completo suplementado com 10% SFB. Após 48 h de adesão ao fundo da placa, retira-se o meio velho e adiciona-se os parasitos (pré-tratados ou não com 1,10-Fenantrolina a 25 µM e com o anticorpo anti-gp63 numa diluição de 1:2500) numa razão de 10:1 parasitos/célula em meio L15 sem SFB. Após 2 h de incubação, as lamínulas foram retiradas uma a uma e lavadas (3×) com PBS. Após isso, as lamínulas foram fixadas com metanol e coradas com o kit Panótico Rápido, com posterior montagem em lâminas de vidro para contagem em microscópio óptico e obtenção do índice de associação (obtido pela multiplicação da porcentagem de células LL5 com parasitos aderidos pelo número de parasitos por célula LL5).

## **6. Ensaio de interação entre *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* com o intestino dissecado dos insetos vetores**

Fêmeas de *Lu. intermedia* e *Lu. longipalpis* em jejum de sangue e mantidas com 30% de sucrose, foram dissecados em PBS e os intestinos (6 – 13 por sistema) abertos longitudinalmente. Os intestinos individualmente foram incubados num volume final de 50 µl por 20 minutos em uma placa escavada com promastigotas ( $2 \times 10^7$  cel/ml) pré-tratados ou não por 1 h com 1,10-Fenantrolina, EDTA, EGTA e anti-gp63. Em paralelo, os intestinos foram previamente tratados por 20 min com 10 µg/ml de PG (fosfoglicano) puro, derivado do LPG extraído de formas procíclicas de *L. braziliensis* e *L. infantum* (cedido pelo Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares CPqRR-FIOCRUZ). Os intestinos foram lavados (3×) em sucessivas gotas de PBS e incubados por 20 min com o parasito sem tratamento. Após a incubação, os intestinos foram novamente lavados (3×) em sucessivas gotas de PBS, colocados individualmente em tubos de microcentrífuga contendo 30 µl de PBS e homogeneizados. Seis alíquotas de 5 µl foram retiradas e aplicadas numa lâmina de vidro. Após secagem, o material foi fixado e corado por panótico. O número de parasitos por intestino foi estimado encontrando o valor médio das alíquotas retiradas de cada tubo. Para correlacionar o número de parasitos obtidos nas médias das alíquotas de 5 µl com o volume inicial do inóculo ( $2 \times 10^7$  cel/ml) multiplicou-se o valor encontrado por 6 (que corresponde a uma gota de 5µl de um volume de 30µl onde o intestino foi colocado, multiplicado por 33,33, assim obtendo aproximadamente o n° de parasitos/ml).

## **7. Parasito e obtenção do sobrenadante da cultura contendo proteínas secretadas por *L. braziliensis***

Células de *L. braziliensis* ( $1 \times 10^9$ ) foram coletadas em fase exponencial (após 48 h de cultivo em meio 199 suplementado com 10% SFB) por centrifugação (15 min a  $1500 \times g$  a 4 °C) e lavadas (3×) com solução salina tamponada com fosfato (PBS; 150 mM NaCl, 20 mM tampão fosfato, pH 7,2). A quantificação do número total de parasitos vivos foi realizada por contagem em câmara de Neubauer. O sobrenadante de cultura foi coletado após centrifugação da alíquota de células ( $1 \times 10^9$ ) obtida na fase exponencial da cultura. Em seguida esse sobrenadante foi passado em unidade de

filtração 0,22 µm (Millipore) e transferido para um novo tubo. O sobrenadante recolhido e a massa celular foram armazenadas a -80 °C para as etapas subsequentes de purificação. Após, o sobrenadante foi concentrado por etapas de precipitação fracionada com sulfato de amônio.

### **8. Precipitação com sulfato de amônio**

O sobrenadante obtido conforme descrito acima foi precipitado com concentrações crescentes de sulfato de amônio (de 10 a 80%) durante 30 min a 4 °C, sob agitação horizontal. As proteínas precipitadas foram separadas por centrifugação (16.000 × g / 10 min a 4 °C) e ressolubilizadas em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,5.

### **9. Determinação da concentração de proteínas**

As concentrações de proteínas do sobrenadante bruto e das frações precipitadas com sulfato de amônio foram determinadas segundo o método de Lowry *et al.*, (1951), usando soro albumina bovina como padrão. Duplicatas de alíquotas de cada amostra (5, 10 µl) foram diluídas em q.s.p. 200 µl de H<sub>2</sub>O. Posteriormente, em cada tubo foi acrescentado 1 ml da mistura reativa (hidróxido de sódio 0,1 M, carbonato de sódio 0,18 M, tartarato de sódio 0,02% e sulfato de cobre 0,01%). Após 10 min de incubação com a mistura reativa, 100 µl de Follin Ciocateus (Merck) diluído 1:3 foi adicionado em cada amostra, e seguido de incubação por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, as absorbâncias foram analisadas a 617 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100–Amersham Biosciences) e a concentração protéica das amostras foi determinada com base na densidade óptica (DO) das amostras e da curva padrão obtida de BSA (estoque a 1 mg/mL) nas concentrações de 5, 10, 20, 30 e 40 µg/mL.

### **10. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e zimografia (SDS-PAGE-substrato)**

As frações das etapas de fracionamento com sulfato de amônio do sobrenadante de cultura de *L. braziliensis* foram analisadas através de SDS-PAGE (Laemmli, 1970) e SDS-PAGE-Gelatina (Heussen & Dowdle, 1980) para avaliar o perfil de proteínas e de atividade proteolítica, respectivamente. Em cada poço do gel de poliacrilamida foi

aplicado quantidades iguais de proteínas adicionadas de tampão de amostra (Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0,01% e  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM) e aquecidas a 100°C por 5 min para o gel de proteínas ou com o mesmo tampão de amostra sem  $\beta$ -mercaptoetanol e sem o aquecimento para o gel de peptidases, para então serem aplicadas em SDS-PAGE ou SDS-PAGE-Gelatina (contendo gelatina a 0,1% como substrato co-polimerizado ao gel), ambos a 12% de poliacrilamida e contendo gel de empacotamento a 3%.

A corrida eletroforética foi realizada a 80 V por 15 min para empacotamento, seguida de 200 V por cerca de 90 min em temperatura ambiente e a 12,5 mA por gel a 4 °C, para análise de proteínas e peptidases, respectivamente. O gel para peptidase (contendo gelatina) foi incubado por 60 min a temperatura ambiente em solução de Triton X-100 2,5% (v/v), seguido de lavagem em água mili-Q. Posteriormente, os géis foram incubados por 24 – 48 h a 37°C em tampão ideal (PBS 1× ou a 100 mM pH 6.0 com DTT 2 mM). O gel para proteínas foi revelado pelo método de impregnação pela prata (Gonçalves *et al.*, 1990), já o gel para peptidases foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2% em metanol-ácido acético-água (50:10:40 - v/v/v).

A descoloração foi realizada utilizando-se a mesma concentração dos reagentes sem corante. A atividade proteolítica é detectada através de bandas claras em contraste com o fundo azul, que é visualizado pela descoloração gradativa do gel no solvente do Coomassie Blue R-250. As massas moleculares das proteínas foram estimadas através da comparação da migração destes com a de proteínas padrão. As imagens dos géis foram documentadas usando densitômetro GS-800™ (Bio-Rad).

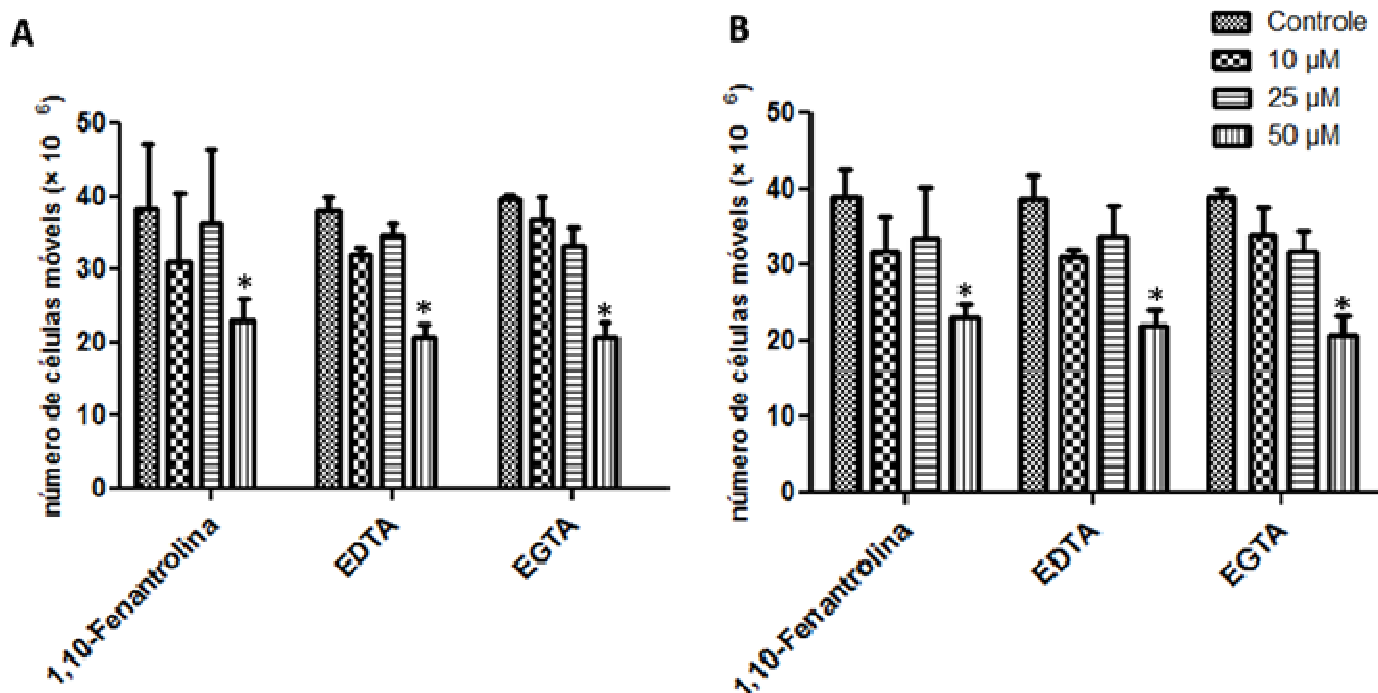
## **11. Análise estatística**

Os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata e repetidos pelo menos 2 vezes. Todos os dados obtidos foram analisados pelo teste ANOVA seguidas por teste de Tukey, utilizando o programa “GraphPad Prisma 5”. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (média  $\pm$  SEM). Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## V. RESULTADOS

### 1) Efeitos de 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA na viabilidade celular de formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum*

Inicialmente, observamos a influência dos inibidores de metalopeptidases na viabilidade celular de *L. braziliensis* e *L. infantum*, através da análise da motilidade dos parasitos. Este ensaio foi realizado incubando-se  $2 \times 10^7$  parasitos/ml por 1 h na ausência ou presença de 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA nas concentrações de 10, 25 e 50  $\mu\text{M}$ , além de um controle usando apenas DMSO, solvente utilizado na diluição de 1,10-fenantrolina. As células não tratadas ou tratadas apenas com DMSO não apresentaram alterações na viabilidade (dados não mostrados). Nas concentrações de 10 e 25  $\mu\text{M}$ , os compostos não tiveram um efeito significativo na viabilidade dos parasitos (valor de  $P > 0,05$ ). Já o pré-tratamento dos dois parasitos com todos os três inibidores na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , mostrou uma redução no número de células viáveis em relação ao controle em aproximadamente 45% (valor de  $P < 0,05$ ) (Fig. 4.1). Nesse sentido, selecionamos a maior concentração testada que não alterou a motilidade dos parasitos para os ensaios subsequentes de interação.

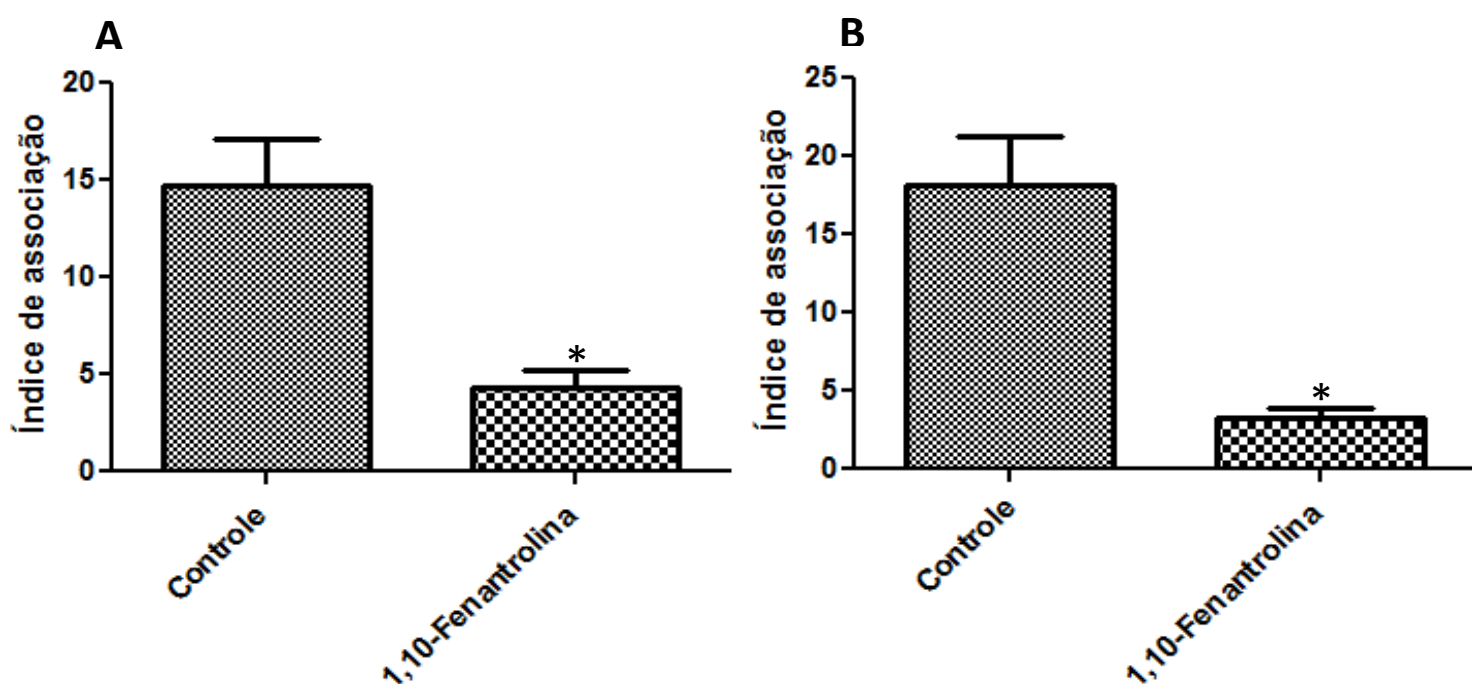


**Figura 4.1. Efeito *in vitro* de 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA sobre a viabilidade de *Leishmania braziliensis* (A) e *Leishmania infantum* (B).** As formas promastigotas ( $2 \times 10^7$ ) foram incubados na ausência (controle) ou na presença dos inibidores de metalopeptidases em diferentes concentrações (10, 25 e 50  $\mu\text{M}$ ) em meio 199 ou Schneider, respectivamente, por 1 h a 26 °C. O número de células móveis (viáveis) foi avaliado através da contagem em câmara de Neubauer. Resultado representativo da média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Tratamentos que tiveram valores significativamente diferentes ao do controle, usando o teste *t* de student (\*  $P < 0,05$ ), estão marcados com um asterisco.

## 2) Efeito do inibidor de metalopeptidases sobre o índice de associação de *L. braziliensis* e *L. infantum* às células LL5

Com o objetivo de avaliar se os inibidores de metalopeptidases têm efeito sobre o índice de associação às células embrionárias de *Lu. longipalpis* (LL5), o inibidor 1,10-fenantrolina na concentração final de 25  $\mu\text{M}$  foi adicionado às formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* ( $2 \times 10^6$  células) durante 1 h a 26 °C, condição que não altera a viabilidade das células (Fig. 4.1). Em seguida, os parasitos foram lavados e colocados para interagir por 2 h com as células LL5 ( $2 \times 10^5$ /poço previamente incubadas em placa de 24 poços para formação da monocamada). Após este processo,

muitos parasitos foram visualizados aderidos às células embrionárias pelos seus flagelos ou pelo corpo celular nos sistemas não tratados (dados não mostrados). Parasitos *L. braziliensis* e *L. infantum* pré-tratados com o inibidor de metalopeptidase apresentaram um índice de associação aproximadamente de 72% e 82%, respectivamente, menor do que o controle (Fig. 4.2A e B).

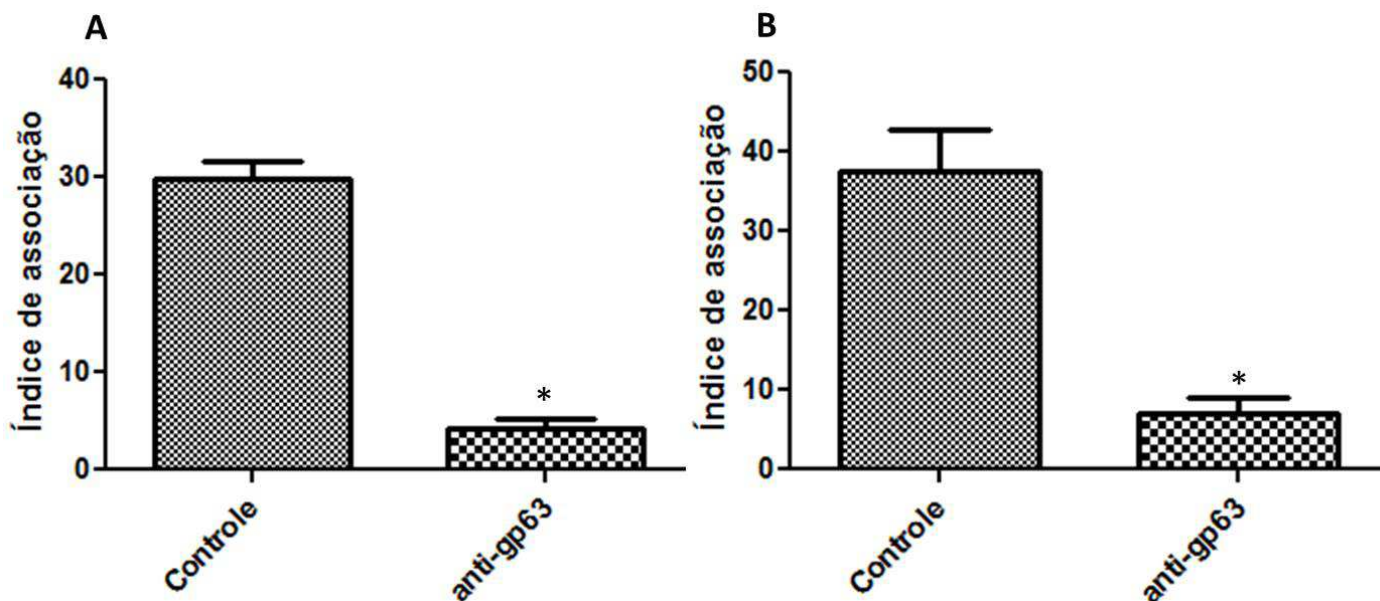


**Figura 4.2.** Efeito do inibidor de metalopeptidases, 1,10-fenantrolina, sobre o índice de associação de *L. braziliensis* (A) e *L. infantum* (B) às células LL5. Promastigotas ( $2 \times 10^6$  células) foram incubadas com o inibidor 1,10-fenantrolina na concentração final de  $25 \mu\text{M}$  por 1 h a  $26^\circ\text{C}$ . Em seguida, os parasitos foram lavados e colocados para interagir com as células LL5 ( $2 \times 10^5/\text{poço}$ ) previamente aderidas ao fundo da placa. Após 2 h de incubação, as lamínulas foram retiradas uma a uma e lavadas com PBS, com posterior montagem em lâminas de vidro, coradas com Panótico e os parasitos contados em microscópio ótico. Os asteriscos indicam valores significativamente diferentes ao do controle, usando o teste *t* (\*  $P < 0,05$ ).

### 3) Efeito do anticorpo anti-gp63 sobre o índice de associação de *L. braziliensis* e *L. infantum* às células LL5

Os parasitos *L. braziliensis* e *L. infantum* também foram pré-incubados com anticorpo anti-gp63, a fim de avaliar a participação de antígenos similares à gp63 no processo de interação dos parasitos com seu inseto hospedeiro. Inicialmente, foi realizado um teste de aglutinação para saber qual a diluição do anticorpo anti-gp63 seria usado no experimento de interação celular. Os parasitos ( $2 \times 10^7$  células) foram incubados em diferentes diluições (1:500, 1:1000, 1:2000, 1:2500, 1:3000 e 1:5000) do anticorpo anti-gp63 e posteriormente observados no microscópio invertido a fim de verificar o título aglutinante, ou seja, última diluição onde foi possível visualizar a aglutinação dos promastigotas. Observamos que os parasitos deixaram de aglutinar a partir de uma diluição de 1:2500 (dados não mostrados). Assim, os ensaios de interação com as células embrionárias LL5 foram realizados. O anticorpo anti-gp63 na diluição de 1:2500 (condição não aglutinante) foi adicionado às formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* ( $2 \times 10^6$  células) durante 2 h a 26 °C. Depois, os parasitos foram lavados e colocados para interagir por 2 h com as células LL5 ( $2 \times 10^5$ /poço) previamente aderidas ao fundo da placa. Após este processo, as lamínulas foram lavadas e os parasitos contados. Parasitos *L. braziliensis* e *L. infantum* pré-tratados com o anticorpo anti-gp63 apresentaram um índice de associação aproximadamente de 87% e 82%, respectivamente, menor do que o controle (Fig.4.3A e B).



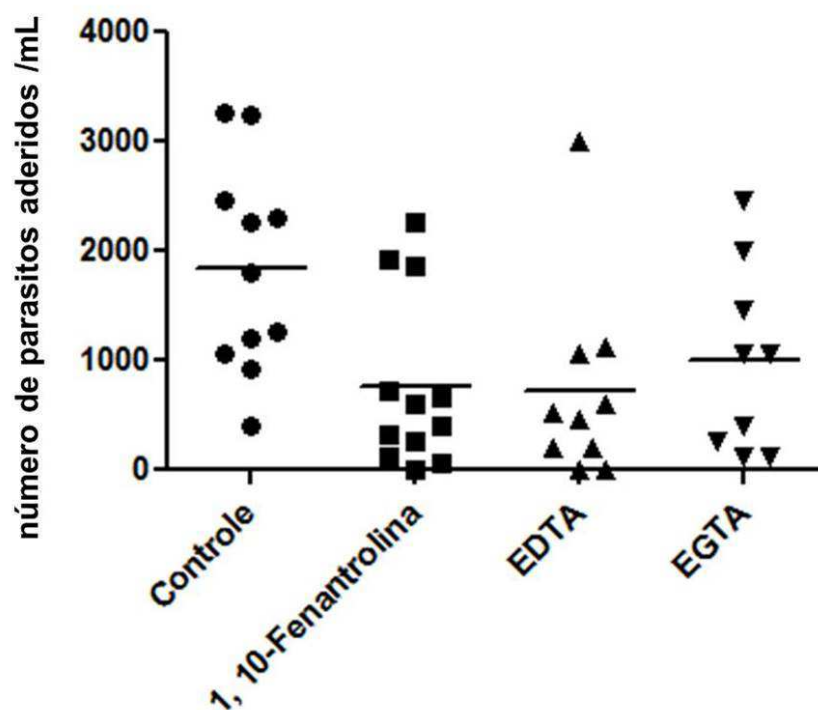


**Figura 4.3. Efeito do anticorpo anti-gp63 sobre o índice de associação de *L. braziliensis* (A) e *L. infantum* (B) às células LL5.** Promastigotas ( $2 \times 10^6$  células) foram incubadas com o anticorpo anti-gp63 (1:2500) por 2 h a 26 °C. Em seguida, os parasitos foram lavados e colocados para interagir com as células LL5 ( $2 \times 10^5$ /poço) previamente aderidas ao fundo da placa. Após 2 h de incubação, as lamínulas foram retiradas uma a uma e lavadas com PBS, com posterior montagem em lâminas de vidro, coradas com Panótico e os parasitos contados em microscópio ótico. Os asteriscos indicam valores significativamente diferentes ao do controle, usando o teste *t* (\*  $P < 0,05$ ).

#### 4) Efeitos dos inibidores de metalopeptidases sobre o índice de adesão de *Leishmania infantum* ao intestino dissecado de *Lu. longipalpis*

Tendo em vista a redução significativa no índice de associação de *L. infantum* (82%) às células embrionárias (LL5) quando tratados com 1,10-fenantrolina, procedemos com os experimentos de interação com intestinos de flebotomíneos. Os inibidores de metalopeptidases foram testados a fim de avaliar um possível efeito sobre o índice de adesão de *L. infantum* ao intestino dissecado de *Lu. longipalpis*. Os inibidores 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA na concentração final de 25  $\mu$ M foram adicionados às formas promastigotas de *L. infantum* ( $2 \times 10^7$  células) durante 1 h a 26 °C, condição que não altera a viabilidade das células (Fig. 4.1). Em seguida, os parasitos foram lavados e colocados para interagir por 20 min com os intestinos dissecados e

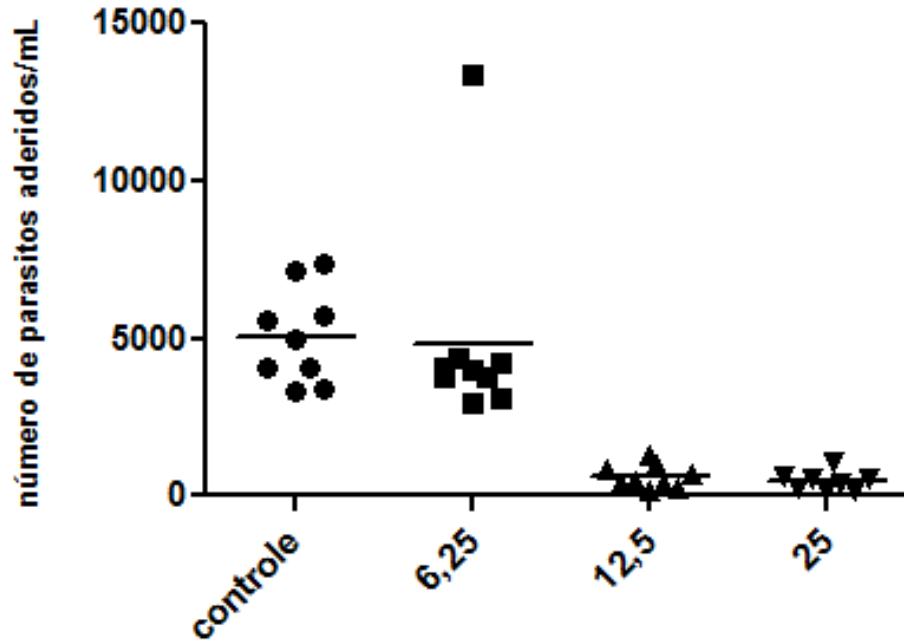
abertos longitudinalmente de *Lu. longipalpis*. Após este processo, os intestinos foram lavados um a um em PBS, colocados em tubo de microcentrífuga com PBS e homogeneizados e os parasitos liberados foram contados. Os parasitos pré-tratados com os inibidores de metalopeptidases (1,10-fenantrolina e EDTA) tiveram uma taxa de adesão significativamente diferente de células não tratadas (controle) usando o teste Tukey's ( $P < 0,05$ ), essa redução foi de aproximadamente 58% e 61%, respectivamente. O tratamento com o inibidor EGTA, mesmo não apresentando valores significativamente diferentes do controle, também demonstrou promover uma queda nessa taxa de adesão ao intestino em relação às células não tratadas, aproximadamente em 45,5% (Fig. 4.4).



**Figura 4.4. Efeitos dos inibidores de metalopeptidases sobre o número de parasitos *L. infantum* aderidos ao intestino dissecado de *Lu. longipalpis*.** Os parasitos ( $2,0 \times 10^7$  células) foram tratados durante 1 h a 26 °C com 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA a 25  $\mu$ M. A interação com os intestinos dissecados foi realizada por 20 min, os parasitos não aderidos foram removidos por lavagem, e os intestinos individualmente transferidos para tubos de 1,5 mL contendo 30  $\mu$ L de PBS, macerados e os parasitos liberados foram contados. Cada ponto no resultado representa um intestino de dois experimentos independentes realizados com 5 a 10 intestinos por tratamento. Parasitos tratados com 1,10-fenantrolina e EDTA tiveram um índice de adesão significativamente diferente de células não tratadas (controle) usando o teste Tukey's ( $P < 0,05$ ).

### **5) Efeito dose-dependente do inibidor de metalopeptidases, 1,10-fenantrolina, sobre o número de parasitos *L. infantum* aderidos ao intestino dissecado de *Lu. longipalpis***

Com o objetivo de avaliar se o inibidor de metalopeptidases, 1,10-fenantrolina, tem efeito dose-dependente sobre o índice de adesão ao intestino dissecado de *Lu. longipalpis*, o composto foi adicionado em diferentes concentrações (6,25; 12,5 e 25  $\mu\text{M}$ ) às formas promastigotas de *L. infantum* durante 1 h a 26 °C, condições que não alteram a viabilidade das células (Fig. 4.1). Em seguida, os parasitos foram lavados e colocados para interagir por 20 min com os intestinos dissecados e abertos longitudinalmente de *Lu. longipalpis*. Após este processo, os intestinos foram lavados um a um em PBS, colocados em tubo de microcentrífuga com PBS e homogeneizados e os parasitos liberados foram contados. Os parasitos pré-tratados com 1,10-fenantrolina a 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  tiveram uma taxa de adesão significativamente diferente das células não tratadas (controle) usando o teste Tukey's ( $P < 0,05$ ), essa redução foi de aproximadamente 88% e 90%, respectivamente. O tratamento com o inibidor a 6,25  $\mu\text{M}$  exibiu uma taxa de adesão semelhante ao controle (Fig. 4.5).

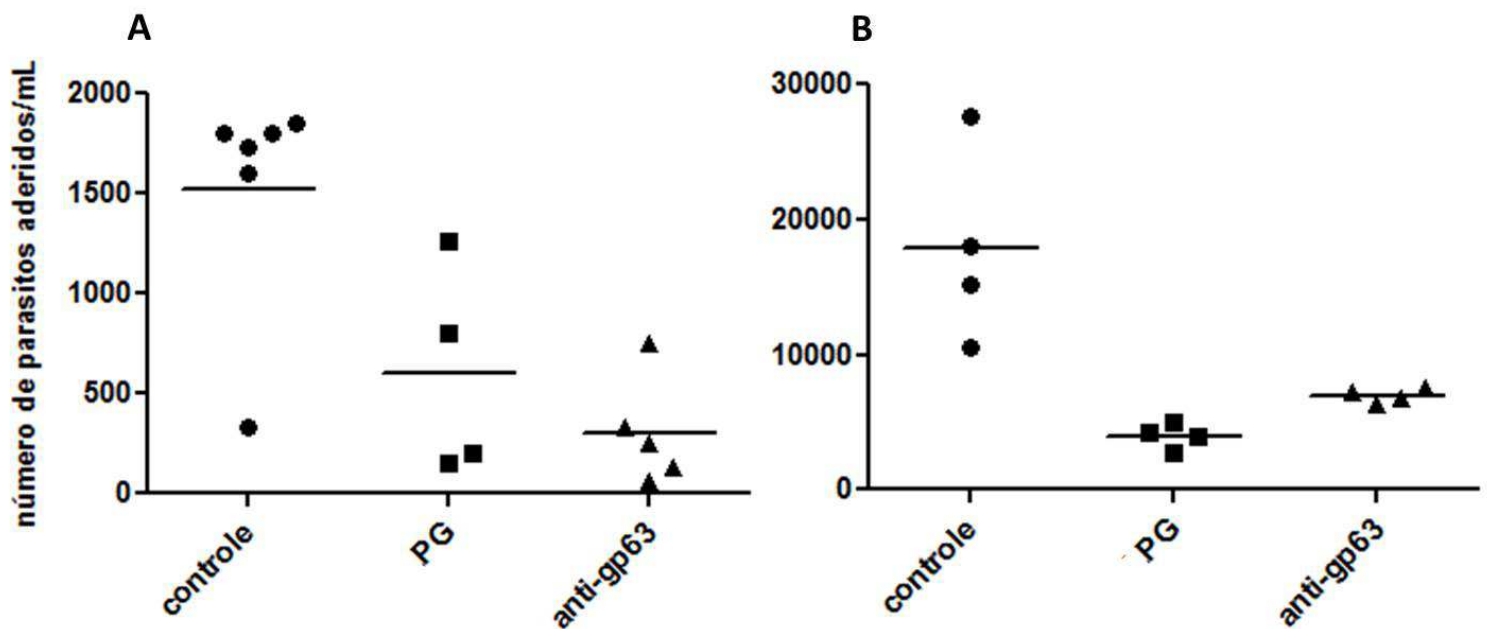


**Figura 4.5. Efeito dose-dependente do inibidor de metalopeptidases, 1,10-fenantrolina, sobre o número de parasitos *L. infantum* aderidos ao intestino dissecado de *Lu. longipalpis*.** Os parasitos ( $2,0 \times 10^7$  células) foram tratados durante 1 h a  $26^\circ\text{C}$  com 1,10-fenantrolina em diferentes concentrações (6,25; 12,5 e  $25 \mu\text{M}$ ). A interação com os intestinos dissecados foi realizada por 20 min, os parasitos não aderidos foram removidos por lavagem, e os intestinos individualmente transferidos para tubos contendo  $30 \mu\text{L}$  de PBS, macerados e os parasitos liberados foram contados. Cada ponto no resultado representa um intestino de dois experimentos independentes realizados com 5 a 6 intestinos por tratamento. Parasitos tratados com 1,10-fenantrolina a 12,5 e  $25 \mu\text{M}$  tiveram um índice de adesão significativamente diferente de células não tratadas (controle) usando o teste Tukey's ( $P < 0,05$ ).

#### 6) Efeito do anticorpo anti-gp63 sobre o índice de adesão de *L. braziliensis* e *L. infantum* ao intestino dissecado dos insetos vetores, *Lu. intermedia* e *Lu. longipalpis*, respectivamente

Para corroborar com os resultados obtidos anteriormente, os parasitos *L. braziliensis* e *L. infantum* também foram pré-incubados com anticorpo anti-gp63 antes dos ensaios de interação com o intestino dissecado do seu inseto hospedeiro. Formas promastigotas ( $2 \times 10^7$  células) foram incubados por 1 h a  $26^\circ\text{C}$  numa diluição de 1:2500 (condição não aglutinante) do anticorpo anti-gp63 e em seguida lavados. Em paralelo, os intestinos de *Lu. intermedia* e *Lu. longipalpis*, respectivamente, foram

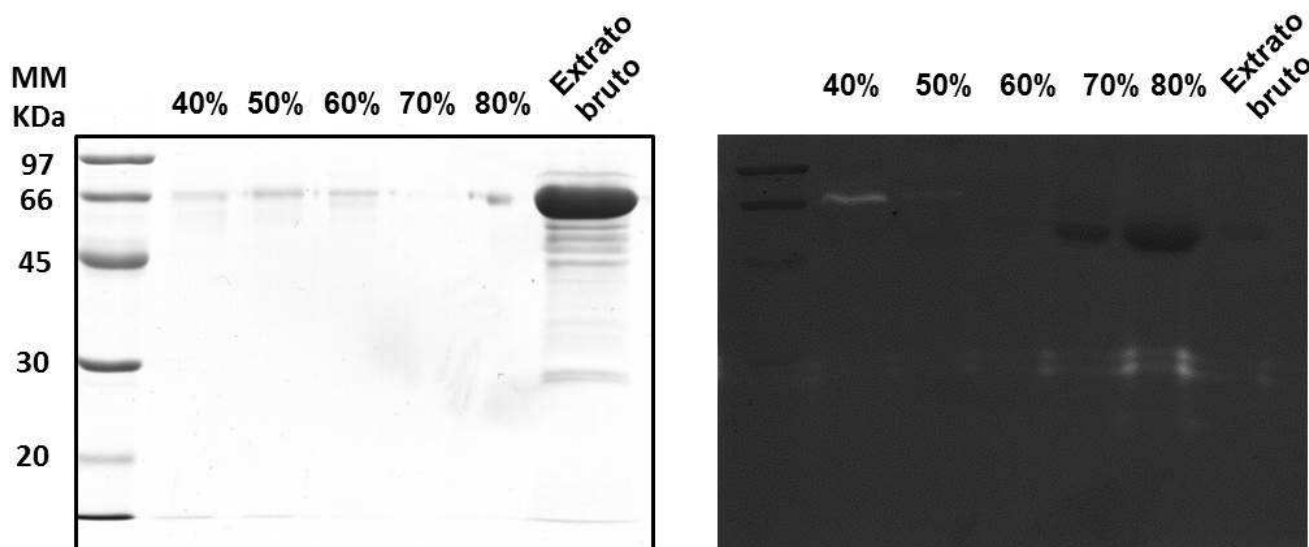
previamente tratados por 20 min com o PG puro (10 µg/ml). A interação com os intestinos dissecados foi realizada por 20 min, os parasitos não aderidos foram removidos por lavagem, e os intestinos individualmente transferidos para tubos de microcentrífuga contendo PBS, macerados e os parasitos liberados foram contados. Os ensaios de interações de *L. braziliensis* e *L. infantum* com os intestinos de *Lu. intermedia* e *Lu. longipalpis*, respectivamente, tiveram uma redução na taxa de adesão dos parasitos aos intestinos em relação ao grupo controle, de aproximadamente 60% e 78% respectivamente, quando os intestinos foram pré-tratados com o PG e de 80% e 61% respectivamente, quando os parasitos foram pré-tratados com o anti-gp63 (Fig. 4.6).



**Figura 4.6. Efeito do anticorpo anti-gp63 sobre o índice de adesão de *L. braziliensis* e *L. infantum* ao intestino dissecado dos insetos vetores.** Os parasitos ( $2,0 \times 10^7$  células) foram tratados durante 1 h a 26 °C com o anticorpo anti-gp63 (1:2500). Em paralelo os intestinos foram pré-tratados por 20 min com PG puro (10 µg/ml). A interação com os intestinos dissecados de *Lu. intermedia* (A) e *Lu. longipalpis* (B) foi realizada por 20 min, os parasitos não aderidos foram removidos por lavagem, e os intestinos individualmente transferidos para tubos de 1,5 mL contendo 30 µL de PBS, macerados e os parasitos liberados foram contados. Cada ponto no resultado representa um intestino de dois experimentos independentes realizados com 4 a 6 intestinos por tratamento. Parasitos tratados com anti-gp63 e com PG tiveram um índice de adesão significativamente diferente de células não tratadas (controle) usando o teste Tukey's ( $P < 0,05$ ).

## 7) Análise das frações enriquecidas do sobrenadante de *L. braziliensis* através de SDS-PAGE e SDS-PAGE-Gelatina

Para tentar isolar uma fração enriquecida da metalopeptidase gp63 secretada por *L. braziliensis*, o sobrenadante de cultura desse parasito (equivalente a  $1 \times 10^9$  células) obtido na fase exponencial após 48 h de cultivo por centrifugação, foi passado em unidade de filtração 0,22  $\mu\text{m}$  e concentrado por etapas de precipitação fracionada com sulfato de amônio. O perfil de proteínas e peptidases nessas frações foi analisado através de gel de poliacrilamida a 12% sem ou com gelatina co-polimerizada como substrato, respectivamente. Nossos resultados mostraram que na concentração de 40% de sulfato de amônio, conseguimos observar uma banda de proteína consideravelmente enriquecida (Fig. 4.7A) e provavelmente com atividade proteolítica (Fig. 4.7B), migrando em torno de 63 kDa.



**Figura 4.7.** Análise das etapas preliminares de purificação da peptidase extracelular (gp63) de *Leishmania braziliensis* por SDS-PAGE corado por prata (A) e SDS-PAGE-gelatina corado com Coomassie Blue (B). A quantidade de sulfato de amônio empregada em cada etapa da precipitação é mostrada em porcentagem acima do gel. O marcador de massa molecular está representado à esquerda do gel (em kiloDaltons). A análise do extrato bruto também está representada acima do gel. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

## VI. DISCUSSÃO

Além de sua importância para a patogenicidade de diversos parasitos, as peptidases também estão envolvidas em eventos cruciais do ciclo de vida destes microorganismos, tais como remodelação do parasito durante a transição de um estágio de vida para outro e ativação ou degradação de enzimas ou proteínas regulatórias do parasito, além de participarem no processamento de proteínas para fins nutricionais (Sajid & McKerrow, 2002). No entanto, um aspecto muito interessante das peptidases, mas que ainda não foi muito estudado é sua possível participação durante o processo de interação parasito-vetor.

Um representante do grupo das peptidases que tem sido analisado durante a interação do parasito com seu hospedeiro invertebrado, é a família das calpaínas. São cisteína peptidases dependentes de cálcio presentes em diversos organismos como os seres humanos, *T. brucei*, *L. major*, *T. cruzi*, *A. deanei* (previamente classificado como *Crithidia deanei*, Teixeira *et al.*, 2011) e *H. samulpeessoai* (Ersfeld *et al.*, 2005; d'Avila-Levy *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2009). Nosso grupo de pesquisa também tem descrito a presença de moléculas como as calpaínas nas formas epimastigotas de *T. cruzi* e nas formas promastigotas de *L. amazonensis*. Além disso, foi visto também que o inibidor de calpaínas, MDL28170, afeta o crescimento, viabilidade e infectividade desses parasitos (d'Avila-Levy *et al.*, 2006; Sangenito *et al.*, 2009; Ennes-Vidal *et al.*, 2010). Como a forma epimastigota de *T. cruzi* está presente durante as etapas de vida deste parasito dentro do hospedeiro invertebrado, nosso grupo (Ennes-Vidal *et al.*, 2011) verificou que epimastigotas tratados com MDL28170 ou com anticorpo anti-calpaína tem uma taxa de adesão ao intestino dissecado de *R. prolixus* bastante reduzida em relação ao controle.

Outro membro do grupo das cisteína peptidases estudado por nosso grupo é a cruzipaína. Ela faz parte da superfamília das papaínas e tem sido vista como um importante fator de virulência em *T. cruzi* (Bonaldo *et al.*, 1988; Souto-Padrón *et al.*, 1990; Meirelles *et al.*, 1992; Harth *et al.*, 1993; Scharfstein *et al.*, 2000; Aparicio *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2005; Tomas *et al.*, 1997; Bonaldo *et al.*, 1991). Essa peptidase também é abundantemente expressa na forma epimastigota desse parasito e assim, nosso grupo conseguiu observar que, através do uso de diferentes inibidores de cisteína

peptidases como E-64 e Cistatina, do anticorpo anti-cruzipaína e de linhagem transgênica de *T. cruzi* (super expressando um inibidor endógeno da cruzipaína, a chagasina), a adesão ao intestino dissecado de *R. prolixus* também é significativamente menor do que com os ensaios feitos com parasitos não tratados (Uehara *et al.*, 2012).

Assim, neste trabalho, nós iniciamos a investigação sobre a relevância de outra peptidase, metalopeptidase gp63, durante a interação *Leishmania*-hospedeiro intermediário. Como uma primeira abordagem para tentar demonstrar essa possível função, nós analisamos a participação da gp63 na viabilidade celular dos parasitos *L. braziliensis* e *L. infantum*. A incubação por 1 h com inibidores de metalopeptidases, 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA nas concentrações de 10 e 25 não provocou redução na viabilidade desses parasitos, porém na concentração de 50  $\mu$ M, ocorreu uma redução nessa viabilidade com alteração na forma do corpo, que se apresentou arredondada e com volume celular alterado.

A relevância de inibidores de metalopeptidases para o ciclo de vida de alguns tripanossomatídeos patogênicos já foi demonstrada por outros autores (Bangs *et al.*, 2001; Seay *et al.*, 1996; Bonaldo *et al.*, 1991). Em *T. cruzi*, o inibidor de metalopeptidase 1,10-fenantrolina inibe a atividade de uma peptidase de 65 kDa e bloqueia a diferenciação celular do parasito de forma dose-dependente (Bonaldo *et al.*, 1991). Em *L. mexicana*, a provável inibição da atividade da gp63 dentro de macrófagos infectados com *Leishmania* pela ação de 1,10-fenantrolina eliminou as formas amastigotas intracelulares, sugerindo uma possível importância desta peptidase na sobrevivência fagolisossomal do parasito (Seay *et al.*, 1996).

O mecanismo inibitório de 1,10-fenantrolina e de outros inibidores de metalopeptidases é geralmente atribuído à sua capacidade como um poderoso agente quelante. Esse composto é capaz de sequestrar íons zinco do sítio ativo da gp63, resultando na incapacidade da enzima de degradar substratos proteicos, impedindo, possivelmente, processos como a captação de nutrientes, interação com possíveis receptores presentes em células intestinais do hospedeiro invertebrado, macrófagos e/ou moléculas de superfície ligantes dos parasitos. Porém é preciso cuidado na interpretação desses resultados, pois esses agentes quelantes de íons, como a 1,10-fenantrolina, podem ter uma ação inespecífica sobre processos celulares dependentes de íons.



Em um recente estudo (Lima, 2012) foi detectado e caracterizado o perfil proteolítico do extrato celular, fração enriquecida de membrana e sobrenadante de cultivo de *L. braziliensis*. Este perfil (migração em torno de 45 a 120 kDa) foi totalmente inibido por 1,10-fenantrolina, sugerindo a atividade de metalopeptidases, provavelmente zinco-dependentes, sendo a de 66 kDa possivelmente referente a gp63, enzima já identificada e caracterizada em várias espécies de *Leishmania* (Yao *et al.*, 2003). Além disso, o anticorpo anti-gp63 também foi capaz de reconhecer essa proteína de 66 kDa. Compostos derivados da 1,10-fenantrolina (phendio, [Cu(phendio)2], [Ag(phendio)2]) também foram testados por esse grupo afim de avaliar aspectos da biologia celular e virulência de *L. braziliensis*. Eles demonstram que 1,10-fenantrolina e todos os derivados são capazes de inibir de modo significativo a atividade proteolítica associada à membrana e secretada por *L. braziliensis*, afetando também a viabilidade celular de formas promastigotas de *L. braziliensis* de maneira dose-dependente.

Outros trabalhos também mostram uma ação similar sobre processos vitais, como crescimento e replicação celular, em outros micro-organismos, tais como fungos e bactérias (McCann *et al.*, 2012b; Silva *et al.*, 2011; Silva, 2009; Santos *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2008; Crichton & Ward, 1994; Neilands, 1994). Além disso, o mesmo grupo de pesquisa (Lima, 2012) observa também que o pré-tratamento dos parasitos com 1,10-fenantrolina e seus derivados é capaz de modular o processo de interação de *L. braziliensis* com macrófagos de hamster, reduzindo o número de amastigotas por macrófagos.

Neste contexto, apesar de somente em concentrações muito altas os inibidores de metalopeptidases apresentarem um efeito significativo sobre a viabilidade dos parasitos (50 µM) e existirem alguns dados conflitantes sobre o papel da gp63 nesta adesão, como observado por Joshi e colaboradores em 2002, onde a deleção dos genes codificantes da gp63, em *L. major*, não altera seu desenvolvimento no interior do inseto *Phlebotomus dubosqui*, nosso grupo prosseguiu com a busca da possível participação dessa metalopeptidase no ciclo de vida de *Leishmania*, em particular na sua adesão ao intestino do inseto vetor.

Um de nossos trabalhos analisou a relevância da gp63 no processo de adesão de *H. megaseliae* ao intestino explantado de *A. aegypti*. A incubação dos intestinos dos insetos dissecados com a gp63 purificada ou do parasito com anticorpo anti-gp63 ou

com a PLC, demonstraram uma queda na taxa de adesão desses tripanossomatídeos ao intestino do inseto (Nogueira de Melo *et al.*, 2006).

Outro parasito estudado foi a *P. françai* (d'Avila-Levy *et al.*, 2006a). Este parasito apresenta grande quantidade de moléculas como a gp63 em sua superfície, comparado a outras espécies de tripanossomatídeos onde também já foram encontradas moléculas como a gp63 (*C. guilhermei* e a cepa curada de *A. deanei*). Curiosamente, *P. françai* interagiu mais eficientemente do que as espécies *Crithidia* e *Angomonas* com o intestino de *A. aegypti* (d'Avila-Levy *et al.*, 2006a). Similarmente, a cepa de *A. deanei* contendo um endosimbionte apresenta uma maior exposição dessas moléculas semelhantes à gp63 em sua superfície (d'Avila-Levy *et al.*, 2008) e as taxas de interação com o intestino do inseto e com linhagens celular, foram cerca de 2 vezes maior do que na cepa sem o endosimbionte (Fampa *et al.*, 2003; d'Avila-Levy *et al.* 2005b; d'Avila-Levy *et al.*, 2008). Além disso, foi visto que essas cepas selvagens de *A. deanei* tratadas com a PLC apresentaram níveis de gp63 na superfície similares à cepa curada, e tiveram taxas de adesão ao intestino de *A. aegypti* semelhantes às da cepa curada também (d'Avila-Levy *et al.*, 2008).

A taxa de adesão de *P. françai*, *A. deanei* e *C. guilhermei* ao intestino de *A. aegypti*, também foi reduzida através do pré-tratamento desses parasitos com o anticorpo anti-gp63 ou do pré-tratamento do intestino com a enzima semelhante a gp63 de cada parasito purificada ou ativa proteoliticamente, inativada pela remoção de íons do seu sítio ativo (apoenzima) ou inativada por desnaturação (calor) (d'Avila-Levy *et al.*, 2006a). Assim, nós especulamos que gp63 possa realmente executar uma função durante a fase de vida no inseto hospedeiro, considerando que esta é a única etapa compartilhada do ciclo de vida entre *Leishmania* e esses tripanosomatídeos monoxênicos e *Phytomonas*.

Homólogos de gp63 também têm sido identificados em outros organismos patogênicos, como o *T. cruzi*. Neste parasito, elas são conhecidas como Tcgp63 (Bangs *et al.*, 1997; El-Sayed & Donelson 1997; Grandgenett *et al.*, 2000; Bangs *et al.*, 2001; Cuevas *et al.*, 2003; LaCount *et al.*, 2003, Grandgenett *et al.*, 2007, Kulkarni *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2010). O possível papel da Tcgp63 na interação do *T. cruzi* com o intestino médio de triatomíneos, devido à sua localização superficial e expressão em epimastigotas, bem como em tripomastigotas metacíclicos, tem sido avaliado por nosso

grupo de pesquisa. Os inibidores de metalopeptidases, assim como o anticorpo produzido por Cuevas *et al.*, (2003), reduziram significativamente a adesão de *T. cruzi* ao intestino médio explantado de *R. prolixus* (Uehara L.A., dados não publicados).

No gênero *Leishmania*, existe um trabalho (Hajmová *et al.*, 2004) mostrando essa possível participação na interação parasito-vetor. Neste trabalho, foi demonstrado que para *L. amazonensis*, cuja expressão dessa peptidase foi diminuída usando um vetor contendo o gene da gp63 em orientação reversa, houve uma baixa colonização em *Lu. longipalpis*.

Esses resultados em conjunto, assemelham-se aos resultados obtidos neste trabalho. Parasitos *L. infantum*, pré-tratados com os inibidores de metalopeptidases 1,10-fenantrolina, EDTA, EGTA e anticorpo anti-gp63 tiveram um índice de associação às células embrionárias de *Lu. longipalpis* (LL5) e ao intestino dissecado de *Lu. longipalpis* bastante reduzido quando comparados ao grupo controle. Os parasitos *L. braziliensis* também pré-tratados com o inibidor 1,10-fenantrolina e com o anticorpo anti-gp63 também tiveram uma redução bastante significativa na sua taxa de adesão ao intestino dissecado do inseto vetor *Lu. intermedia* e às células LL5.

Esses resultados são interessantes, pois mostram um perfil de adesão e inibição ao intestino do inseto vetor semelhante entre essas duas espécies *L. braziliensis* e *L. infantum*, as quais são representantes de dois subgêneros de *Leishmania*, respectivamente, o *Viannia*, na qual os parasitos estabelecem uma infecção inicial na região posterior do trato digestivo, na região pilórica e no intestino médio abdominal, migrando para as porções mais anteriores durante o seu desenvolvimento (peripilárico) e o *Leishmania*, onde o desenvolvimento do parasito é restrito à porção do trato digestivo anterior ao piloro, sobretudo nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio (suprapilárico) (Fig. 1.3) (Lainson & Shaw, 1987). Esses resultados similares sugerem uma ação ubíqua da gp63 que independe dessas diferenças entre esses dois subgêneros.

Já foi visto que no subgênero *Leishmania* existem fortes evidências bioquímicas e genéticas que o LPG é uma molécula fundamental para o processo de fixação ao intestino médio de flebótomos. No entanto, para *L. braziliensis*, que tem menos LPG (Soares *et al.*, 2005), esta molécula parece ser necessária, pelo menos, durante a passagem transitória do parasito pelo intestino. O termo metacíclico refere-se à fase do

parasito infecciosa para o hospedeiro vertebrado, sendo capaz de se destacar do intestino, sendo observada em espécies do subgênero *Leishmania*. No entanto, no subgênero *Viannia*, encontram-se dois padrões de aderência para o estágio metacíclico: (1) semelhante ao subgênero *Leishmania* como observada para *Lu. whitmani*, um vetor muito competente e (2) muito baixa, como observado em *Lu. intermedia*, onde LPG parece ter uma função menos importante (Soares *et al.*, 2010). Assim, o incomum padrão de fixação de *L. braziliensis* no intestino pode ser um resultado de seu comportamento peripilárico relacionado com a sensibilidade/especificidade ao vetor. No entanto, ainda é necessário ser elucidado como outros glicoconjugados podem ser críticos na migração do parasito para região anterior do trato digestivo do vetor. Nas espécies do subgênero *Viannia*, o padrão de glicoconjugados de membrana é diferente daqueles do subgênero *Leishmania*, o que resulta em maior expressão, por exemplo, de GIPLs em *L. braziliensis* e *L. panamensis* (Zawadzki *et al.*, 1998). No entanto, esse estudo reforça que o LPG, gp63, GIPLs e outras moléculas em conjunto, podem desempenhar um papel chave na interação com esses vetores.

A possível participação de gp63 neste processo de interação ao epitélio intestinal do vetor pode ser explicada pela presença de um potencial receptor para a gp63 nas células deste epitélio. Foi identificada uma proteína de 50 kDa no extrato do intestino de *A. aegypti*, considerada o possível receptor para moléculas como a gp63 (d'Avila-Levy *et al.*, 2006a). Outra importante observação, é que este efeito na adesão independe da atividade proteolítica na gp63 ou de sua estrutura terciária, pois modelos de inibição similar foram observados entre a gp63 proteoliticamente ativa, a enzima inativada pelo calor ou pela apoenzima, que mantém as estrutura terciária, mas perde a atividade catalítica devido à remoção dos íons do seu sítio ativo (d'Avila-Levy *et al.*, 2006a).

Adicionalmente, nós avaliamos então a presença dessa metalopeptidase no sobrenadante de cultura de *L. braziliensis* para posterior análise de sua possível participação nesse processo de interação. A presença da gp63 no meio extracelular já foi detectada em várias espécies de *Leishmania*, e a secreção desta molécula pode auxiliar na disseminação do parasito uma vez que a gp63 é capaz de clivar proteínas de matriz extracelular (Yao *et al.*, 2003; Cuervo *et al.*, 2006). Estas proteínas liberadas podem desempenhar um importante papel na relação parasito-hospedeiro, visto que elas apresentam potencial de agir à distância e, por conseguinte, alterar a fisiologia do

hospedeiro sem entrar em contato direto com o parasito. Um dos objetivos do presente trabalho consiste em avaliar o envolvimento da peptidase extracelular de *L. braziliensis* na interação com o hospedeiro invertebrado. A gp63 purificada consiste numa ferramenta importante para alcançar este objetivo.

Nesse contexto, o sobrenadante da cultura de *L. braziliensis* obtido na fase exponencial foi concentrado por etapas de precipitação fracionada com sulfato de amônio. O perfil de proteínas e peptidases nessas frações foi analisado através de gel de poliacrilamida com ou sem gelatina co-polimerizada como substrato, respectivamente. Nossos resultados mostraram que na concentração de 40% de sulfato de amônio, conseguimos observar uma banda de proteína consideravelmente enriquecida, provavelmente com atividade proteolítica, migrando em torno de 63 kDa, massa correspondente à massa da enzima gp63 já identificada e caracterizada em várias espécies de *Leishmania* (Yao *et al.*, 2003), e que apresenta homólogos em vários tripanossomatídeos, tais como *T. cruzi* (Cuevas *et al.*, 2003), *T. brucei* (Lacount *et al.*, 2003), *A. deanei* (d'Avila-Levy *et al.*, 2003), *C. guilhermei* (Nogueira de Melo *et al.*, 2001) e *P. françai* (Almeida *et al.*, 2003).

O mecanismo pelo qual a *L. braziliensis* secreta a gp63 ainda não é conhecido. A gp63 caracterizada em tripanossomatídeos, na sua grande totalidade, está ancorada à superfície celular via uma âncora de GPI (Hsiao *et al.*, 2008; Egtes, 1992). Embora a âncora de GPI possa ser passível de clivagem por uma fosfolipase C (PLC), foi demonstrado em *L. amazonensis* que a molécula da gp63 presente na superfície é liberada da membrana após autoproteólise e não após fosfolipólise (McGwire *et al.*, 2002). Entretanto, não podemos esquecer a hipótese de que a gp63, também presente no citosol, possa ser liberada para o meio externo através de processos como exocitose (McGwire *et al.*, 2002).

A exposição do parasito a diferentes ambientes em condições adversas (trato digestório do inseto vetor e fora e dentro das células do hospedeiro mamífero) influencia a expressão de proteínas específicas que auxiliam a sua sobrevivência na nova condição a qual é submetido (Smith *et al.*, 2007). Assim, já que no gênero *Leishmania* é visto a maior abundância da gp63 na forma promastigota, presente no inseto vetor, é válido considerar que esta peptidase assumirá um papel fundamental durante essa etapa do ciclo de vida deste parasito, como demonstrado aqui neste estudo.

O melhor conhecimento dessas moléculas faz-se cada vez mais necessário para uma melhor compreensão do parasito em si, além de gerar possibilidades para futuros alvos para controle da leishmaniose, principalmente no que diz respeito ao controle da transmissão vetorial.

## VII. CONCLUSÕES

Com a análise dos resultados obtidos neste trabalho vimos que a metalopeptidase gp63 de *L. braziliensis* e *L. infantum* parece participar do processo de interação ao epitélio intestinal do inseto vetor, pois:

- o inibidor de metalopeptidases (1,10-fenantrolina) a 25  $\mu\text{M}$  e o anticorpo anti-gp63 (1:2500) diminuíram significativamente o índice de associação de *L. braziliensis* e *L. infantum* à linhagem celular embrionária de *Lu. longipalpis* (LL5);
- o tratamento de *L. infantum* com 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA a 25  $\mu\text{M}$ , significativamente reduziu (58%, 61% e 45,5%, respectivamente) a adesão ao intestino dissecado de *Lu. longipalpis*;
- no ensaio de dose-dependência com o inibidor 1,10-fenantrolina, já na concentração de 12,5  $\mu\text{M}$ , observou-se uma redução bastante acentuada da adesão de *L. infantum* ao intestino dissecado de *Lu. longipalpis*;
- o tratamento de *L. braziliensis* e *L. infantum* com anticorpo anti-gp63 também provocou uma redução (80% e 61%, respectivamente) na adesão aos intestinos dissecados dos hospedeiros invertebrados.

Além disso, com o intuito de iniciar um processo de purificação da metalopeptidase gp63 de *L. braziliensis* para buscar um possível receptor no intestino do inseto vetor, conseguimos observar que:

- na concentração de 40% de sulfato de amônio, observamos uma banda de proteína consideravelmente enriquecida e provavelmente com atividade proteolítica migrando em torno de 63 kDa.

Esses resultados em conjunto nos estimulam a continuar estudando o papel da gp63 na interação com o hospedeiro invertebrado.

## VIII. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS ASSOCIADAS À DISSERTAÇÃO

### 1. Apresentação de pôster na XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia/XL Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas (2013, Caxambu)

#### Involvement of gp63 from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* in the interaction with the invertebrate host

Altoé, E.C.F.; Garcia-Gomes, A.S.; Silva, V.C.; Souza, N.A.; Rangel, E.F.; Soares, R.P.; & d'Avila-Levy, C.M.

#### Abstract

The highly abundant surface metallopeptidase of *Leishmania*, gp63, contributes to a myriad of well-established functions for *Leishmania* in the interaction with the mammalian host. However, despite this molecule being abundantly expressed on the surface of promastigote forms, found in the insect vector, little is known about the functions performed by this molecule in the phlebotomine sandfly. Molecular analysis revealed conflicting and inconclusive data about the possible role of this glycoprotein in the interaction of *Leishmania* with the invertebrate host. Our research group, using biochemical approaches, has demonstrated that gp63 molecules from several trypanosomatids are implicated in the adhesion to the insect epithelial cells. Here, we analyzed the role of gp63 in the interaction of *L. braziliensis* and *L. infantum* with their respective insect hosts, *L. intermedia* and *L. longipalpis*. The dissected insect guts, opened longitudinally, were pretreated with PG and placed to bind with the parasites. In parallel, promastigotes of *L. infantum* were pretreated with anti-gp63 antibodies or with metallopeptidase inhibitors, while promastigotes of *L. braziliensis* were subjected only to the anti-gp63 treatment. Thereafter, the parasites were placed to interact with dissected insect guts. As expected, PG virtually abolished *Leishmania* ability to bind to the insect guts. Interestingly, we observed that all treatments related to gp63 also provoked a pronounced decrease in this binding assay. Moreover, the culture supernatant of *L. braziliensis* was concentrated by precipitation with ammonium sulfate and analyzed by SDS-PAGE. We observed a proteolytic degradation around 63 kDa, which corresponds to the gp63 enzyme already identified and characterized in several



*Leishmania* species. The determination of the functions and characterization of gp63 of these parasites can contribute to the understanding of the physiological role played by this peptidase in *Leishmania*.

**2. Produção de capítulo do livro: Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma*. Subcellular Biochemistry. 74ed.: Springer Netherlands, 2014, p. 253-270.**

Capítulo: GP63 function in the interaction of trypanosomatids with the invertebrate host – facts and prospects

Claudia M. d'Avila-Levy, Ellen C. F. Altoé, Livia A. Uehara, Marta H. Branquinha, André L. S. Santos

Abstract

The GP63 of the protozoan parasite *Leishmania* is a highly abundant zinc metallopeptidase, mainly glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored to the parasite surface, which contributes to a myriad of well-established functions for *Leishmania* in the interaction with the mammalian host. However, the role of GP63 in the *Leishmania*-insect vector interplay is still a matter of controversy. Data from GP63 homologues in insect and plant trypanosomatids strongly suggest a participation of GP63 in this interface, either through nutrient acquisition or through binding to the insect gut receptors. GP63 has also been described in the developmental forms of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma rangeli* that deal with the vector. Here, the available data from GP63 will be analyzed from the perspective of the interaction of trypanosomatids with the invertebrate host.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander J, Coombs GH, Mottram JC. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol.* 1998; 161: 6794- 801.
- Alphey MS, Williams RA, Mottram JC, Coombs GH, Hunter WN. The crystal structure of *Leishmania major* 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase: a three-domain architecture with a serine proteaselike triad at the active site. *J Biol Chem.* 2003; 278: 48219-27.
- Almeida FV, Branquinha MH, Giovanni-De-Simone S, Vermelho AB. Extracellular metalloproteinase activity in *Phytomonas françai*. *Parasitol Res.* 2003; 89: 320-2.
- Almeida-Campos FR, Horta MF. Proteolytic activation of leishporin: evidence that *Leishmania amazonensis* and *Leishmania guyanensis* have distinct inactive forms. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; 111: 363-75.
- Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MC, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KB. On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post-colombian historical source. *Hist Cienc Saude Manguinhos.* 2003; 10(3): 852-882.
- Alves CR, Marzochi MC, Giovanni-De-Simone. Heterogeneity of cysteine proteinases in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major*. *Braz J Med Biol Res.* 1993; 26: 167-71.
- Alves CR, Corte-Real S, Bourguignon SC, Chaves CS, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote to amastigote differentiation in vitro. *Exp. Parasitol.* 2005; 109: 38-48.
- Alves JL, Mendonca-Lima FW, Alves CR. The use of metal chelate affinity chromatography on the isolation of *Leishmania chagasi* promastigote hydrophobic proteinases. *Veterinary Parasitology.* 2004; 119: 137-145.
- Amela C, Lopez-Gay D, Alberdi JC, Castilla J. Injecting drug use as risk factor for visceral leishmaniasis in AIDS patients. *European Journal of Epidemiology.* 1996; 12: 91-92.
- Andrade Filho JD. Morfologia do complexo *Nyssomyia intermedia* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). 2003; 152 p. [Tese]. Universidade de São Paulo (USP).
- Aparicio IM, Scharfstein J, Lima AP. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes. *Infect Immun.* 2004; 72: 5892-902.

- Asato Y, Oshiro M, Myint CK, Yamamoto Y, Kato H, Marco JD, Mimori T, Gomez EA, Hashiguchi Y, Uezato H. Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. *Exp Parasitol*. 2009; 121: 352-361.
- Ashford RW. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*. 2000; 30: 1269-1281.
- Assis RR, Ibraim IC, Noronha FS, Turco SJ, Soares RP. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(2): e1543. doi:10.1371/journal.pntd.0001543
- Bangs JD, Ransom DM, McDowell MA, Brouch EM. Expression of bloodstream variant surface glycoproteins in procyclic stage *Trypanosoma brucei*: role of GPI anchors in secretion. *EMBO J*. 1997; 16: 4285-94.
- Bangs JD, Ransom DM, Nimick M, Christie G, Hooper NM . In vitro cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. *Mol Biochem Parasitol*. 2001; 114: 111-117.
- Barret AJ, Tolle DP, Rawlings ND. Managing peptidases in the genomic era. *Biol. Chem*. 2003; 384: 873-882.
- Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA. The MEROPS database as a protease information system. *Journal of Structural Biology*. 2001; 134: 95-102.
- Basano AS, Camargo LMA. Leishmaniose Tegumentar Americana: históricos epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. Bras. Epidemiol*. 2004; 7(3): 328-337.
- Bastos IMD, Motta FN, Grellier P, Santana JM. Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas Disease, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*. 2013; 20: 3103-3115.
- Bates PA, Rogers ME. New insights into the development biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med*. 2004; 4: 601-609.
- Benes P, Vetvicka V, Funsek M. Cathepsin D - many functions of aspartic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2008; 68: 12-28.
- Berman JD. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniases. *Clinical Dermatology*. 1996; 14: 519-522.
- Besteiro S, Eilliams RAM, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 2007; 37: 1063-1075.

- Beynon RJ, Bond JS. Proteolytic enzymes: A practical approach. Academic press. Oxford. 1989; pp 259.
- Beynon RJ, Bond JS. Proteolytic Enzymes: A Practical Approach, 2nd ed.; Oxford University Press: London. 2001.
- Bonaldo MC, d'Escoffier LN, Salles JM, Goldenberg S. Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Exp Parasitol.* 1991; 73: 44-51.
- Bonaldo MC, Souto-Padro'n T, De Souza W, Goldenberg S. Cellsubstrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol.* 1988; 106: 349-1358.
- Bond JS, Butler PE. Endopeptidase-24.5 is not a metallo-endopeptidase. *Biochemistry Journal.* 1987; 246 (2): 559.
- Bordier C, Etges RJ, Ward J, Turner MJ, Cardoso De Almeida ML. *Leishmania* and *Trypanosoma* surface glycoproteins have a common glycopospholipid membrane anchor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83 (16): 5988-5991.
- Bouvier J, Etges RJ, Bordier C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. *J Biol Chem.* 1985; 260:15504-15509
- Bouvier J, Schneider P, Etges R, Bordier C. Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. *Biochemistry.* 1990; 29: 10113-10119.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. 1ª ED. Brasília-DF, 2006.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª ed. Brasília-DF, 2007.
- Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunology.* 1995; 155: 3102-3111.
- Butcher BA, Turco SJ, Hilty BA, Pimenta PF, Panunzio M, Sacks DL. Deficiency in b1,3-Galactosyltransferase of a *Leishmania* major lipophosphoglycan mutant adversely influences the *Leishmania*- sand fly interaction. *J Biol Chem.* 1996; 271: 20573-9.

- Campbell-Lendrum D, Dujardin JP, Martinez E, Feliciangeli MD, Perez JE, Passerat De Silans LNM, Desjeux P. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96: 159-62.
- Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995; 53: 273-277.
- Casanova C, Mayo RC, Mascarini LM, Pignati MG, Galati EAB, Gomes AC. Natural *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) infection in the Valley of Mogi Guaçu river, State of São Paulo, Brazil. *Bol Dir Malariol Y San Amb*. 1995; 35: 77-84.
- Chang KP, Nacy CA, Pearson RD. Intracellular parasitism of macrophages in leishmaniasis: in vitro systems and their applications. *Methods in Enzymology*. 1986; 132: 603-626.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews*. 2007; 5: 873-882.
- Chaudhuri G, Chang KP. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1988; 27: 43-52.
- Choudhury R, Bhaumik SK, De T, Chakraborti T. Identification, purification, and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem*. 2009; 320: 1-14.
- Coetzer THT, Goldring JPD, Huson LEJ. Oligopeptidase B: a processing peptidase involved in pathogenesis. *Biochimie*. 2008; 90: 336-344. PubMed: 18029266
- Cohen C, Corazza F, De Mol P, Brasseur D. Leishmaniasis acquired in Belgium. *Lancet*. 1991; 338: 128.
- Convit J, Kerdel-Vegas F. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis; Inoculation to Laboratory Animals, Electron Microscopy and Fluorescent Antibodies Studies. *Archives of Dermatology*. 1965; 91: 439-447.
- Coombs GH, Goldberg DE, Klemba M, Berry C, Kay J, Mottram JC. Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* and other parasitic protozoa as drug targets. *Trends Parasitol*. 2001; 17: 532-537.
- Cooper JB. Aspartic proteinases in disease: a structural perspective. *Curr. Drug Targets*. 2002; 3: 155-173.

- Corradin S, Ransijn A, Corradin G, Roggero MA, Schmitz AA, Schneider P, Mauël J, Vergères G. MARCKS-related protein [MRP] is a substrate for the *Leishmania major* surface protease leishmanolysin [gp63]. *J Biol Chem*. 1999; 274: 25411-8.
- Correa JR, Brazil RP, Soares MJ. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus. A mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 587-592.
- Corrêa-da-Silva MS, Fampa P, Lessa LP, Silva E dos R, dos Santos Mallet JR, Saraiva EM, Motta MC. Colonization of *Aedes aegypti* midgut by the endosymbiont-bearing trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*. *Parasitol Res*. 2006; 99(4): 384-91.
- Costa JM, Saldanha AC, de Melo e Silva AC, Serra Neto A, Galvao CE, Pedroso e Silva C de M, da Silva AR. The current status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhao. II. The epidemiological and clinico-evolutionary aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1992; 25: 115-123.
- Crichton RR, Ward RJ. In *Iron and disease* (Lauffer, R.B., ed.), CRC Press. 1994; 23-76.
- Croan DG, Morrison DA, Ellis JT. "Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences". *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1997; 89: 149-159.
- Cuervo P, Saboia-Vahia L, Costa Silva-Filho F, Fernandes O, Cupolillo E, Jesus JB. A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Parasitology*. 2006; 132: 177-185.
- Cuevas IC, Cazzulo JJ, Sanchez DO. Gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. *Infect Immun*. 2003; 71: 5739-5749.
- da Silva-López RE, dos Santos TR, Morgado-Díaz JA, Tanaka MN, de Simone SG. Serine protease activities in *Leishmania (Leishmania) chagasi* promastigotes. *Parasitol Res*. Epub 2010 Jul 29; Oct, 107(5): 1151-62. doi: 10.1007/s00436-010-1983-y.
- Da-Cruz AM, Azevedo-Coutinho KB. Leishmaniose Tegumentar Americana, In: Batista LM, Igreja RP, Gomes AC, Huggins DW. (Eds.) *Medicina Tropical - Abordagem atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Cultura Médica, Rio de Janeiro. 2001; 131-140.
- Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006a; 101: 117–118; discussion 118.

- Dantas-Torres F. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006b; 101: 929-930.
- Dash C, Kulkarni A, Dunn B, Rao M. Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2003; 38: 89-119.
- Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. BMJ. 2003; 326: 377-382.
- d'Avila-Levy CM, Nogueira De Melo AC, Vermelho AB, Branquinha MH. Differential expression of proteolytic enzymes in endosymbiontharboring *Crithidia* species. FEMS Microbiol. 2001; Lett 202: 73-77.
- d'Avila-Levy CM, Souza RF, Gomes RC, Vermelho AB, Branquinha MH. A metalloproteinase extracellularly released by *Crithidia deanei*. Can J Microbiol. 2003; 49: 625-632.
- d'Avila-Levy CM, Araújo FM, Vermelho AB, Soares RM, Santos AL, Branquinha MH. Proteolytic expression in *Blastocrithidia culicis*: influence of the endosymbiont and similarities with virulence factors of pathogenic trypanosomatids. Parasitology. 2005;130: 413-420.
- d'Avila-Levy CM, Silva BA, Hayashi EA, Vermelho AB, Alviano CS, Saraiva EM, Branquinha MH, Santos ALS. Influence of the endosymbiont of *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia deanei* on the glycoconjugate expression and on *Aedes aegypti* interaction. FEMS Microbiol Lett. 2005b; 252: 279-286.
- d'Avila-Levy CM, Dias FA, Nogueira de Melo AC, Martins JL, De Carvalho Santos Lopes AH, Souza Dos Santos AL, Vermelho AB, Branquinha MH.. Insights into the role of gp63-like proteins in insect trypanosomatids. FEMS Microbiol Lett. 2006a; 254: 149-156.
- d'Avila-Levy CM, Santos LO, Marinho FA, Dias FA, Lopes AH, Santos AL, Branquinha MH. Gp63-like molecules in *Phytomonas serpens*: possible role on the insect interaction. Curr Microbiol. 2006b; 52: 439-444.
- d'Avila-Levy CM, Marinho FA, Santos LO, Martins JL, Santos ALS, Branquinha MH. Antileishmanial activity of MDL 28170, a potent calpain inhibitor. Int J Antimicrob Agents. 2006c; 28: 138- 42.
- d'Avila-Levy CM, Santos LO, Marinho FA, Matteoli FP, Lopes AH, Motta MC, Santos AL, Branquinha MH.. *Crithidia deanei*: influence of parasite gp63 homologue on the interaction of endosymbiont-harboring and aposymbiotic strains with *Aedes aegypti* midgut. Exp Parasitol. 2008; 118: 345-53.

- d'Avila-Levy CM, Santos ALS, Cuervo P, de Jesus JB, Branquinha MH. Applications of Zymography (Substrate-SDS-PAGE) for Peptidase Screening in a Post-Genomic Era. In: Magdeldin, S (Org) Gel Electrophoresis - Advanced Techniques, 1ed. Rijeka, Croatia: In Tech. 2012.
- d'Avila-Levy CM, Altoé ECF, Uehara LA, Branquinha MH, Santos ALS. GP63 function in the interaction of trypanosomatids with the invertebrate host – facts and prospects. *Subcellular Biochemistry*. 2013; 74.
- de Araujo Soares RM, dos Santos AL, Bonaldo MC, de Andrade AF, Alviano CS, Angluster J, Goldenberg S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. *Experimental Parasitology*. 2003; 104: 104-112.
- de Assis RR, Ibraim IC, Nogueira PM. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts, *Biochim. Biophys. Acta*. 2011; doi:10.1016/j.bbagen.2011.11.001
- de Matos Guedes HL, Carneiro MP, Gomes DC, Rossi-Bergmann B, de Simone SG. Oligopeptidase B from *L. amazonensis*: molecular cloning, gene expression analysis and molecular model. *Parasitol Res*. 2007; 101: 853-863. PubMed: 17530480.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2004; 27: 305-318.
- Dey A, Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2006; 24: 165-170.
- Di Blasi T. Papel das moléculas FLAG de *Leishmania* e TGF- $\beta$  de *Lutzomyia longipalpis* na interação parasita-vetor. 2012. 69 pp. Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz.
- Dominguez DI, Hartmann D, De Strooper B. BACE1 and presenilin: two unusual aspartic proteases involved in Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis*. 2004; 1: 168-174.
- Dujardin JC, Henriksson J, Victoir K, Brisse S, Gamboa D, Arevalo J, Le Ray D. Genomic Rearrangements in Trypanosomatids: an Alternative to the 'One Gene' Evolutionary Hypotheses? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000; 95: 527-534.
- Ebbert MA, Burkholder JJ, Marlowe JL. Trypanosomatid prevalence and host habit choice in woodland *Drosophila*. *J Invertebr Pathol*. 2001; 77: 27-32.



- El-Sayed NM, Donelson JE. African trypanosomes have differentially expressed genes encoding homologues of the *Leishmania* GP63 surface protease. *J Biol Chem.* 1997; 272: 26742-8.
- Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos AL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 1395-1398.
- Ennes-Vidal V, Menna-Barreto RF, Santos ALS, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. MDL28170, a calpain inhibitor, affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis, ultrastructure and attachment to *Rhodnius prolixus* midgut. *PLoS One.* 2011; 6: e18371.
- Ersfeld K, Barraclough H, Gull K. Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. *J Mol Evol.* 2005; 61: 742-57.
- Etges RJ, Bouvier J, Bordier C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem.* 1986; 261: 9099-9101.
- Etges R. Identification of a surface metalloproteinase on 13 species of *Leishmania* isolated from humans, *Crithidia fasciculata*, and *Herpetomonas samuelpessoai*. *Acta Tropica.* 1992; 50: 205-217.
- Fampa P, Corrê A-Da-Silva MS, Lima DC, Oliveira SMP, Motta MCM, Saraiva EMB. Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, and fly and the respective insect cell lines. *Int J Parasitol.* 2003; 33: 1019-1026.
- Ferreira KA, Ruiz JC, Dias FC, Lages-Silva E, Tosi LR, Ramírez LE, Pedrosa AL. Genome survey sequence analysis and identification of homologs of major surface protease (gp63) genes in *Trypanosoma rangeli*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10: 847-53.
- Fong D, Chang KP. Surface antigenic change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: identification by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79: 7366-7370.
- Forattini OP. *Entomologia Médica.* 4º volume, Editora Blücher Ltda., São Paulo, IX+pp. 1973; 658p.
- Fraga J, Montalvo AM, de Doncker S, Dujardin JC, der Auwera GV. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol.* 2010; 10: 238-245.
- Frame MJ, Mottram JC, Coombs GH. Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. *Parasitology.* 2000; 121: 367-77.

- Freitas VC, Parreiras KP, Duarte APM, Secundino NFC, Pimenta PFP. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. Apr 1. 2012; 86 (4): 606-612.
- Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br>. Acesso em: 02 mar 2013.
- Galati EAB, Nunes VLB, Rego Júnior FA, Oshiro ET, Chang MR. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), em foco de leishmaniose visceral, no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Saúde Públ. 1997; 31: 378-390.
- Gamboa D, Van Eys G, Victoir K, Torres K, Adauí V, Arevalo J, Dujardin JC. Putative markers of infective life stages in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Parasitology. 2007; 134: 1689-1698. PubMed: 17897481.
- Garami A, Mehlert A, Ilg T. Glycosylation defects and virulence phenotypes of *Leishmania mexicana* phosphomannomutase and dolicholphosphate-mannose synthase gene deletion mutants. Mol. Cell. Biol. 2001; 21: 8168-8183.
- Garcia MR, Graham S, Harris RA, Beverley SM, Kayne PM. Epitope cleavage by *Leishmania* endopeptidases[s] limits the efficiency of the exogenous pathway of major histocompatibility complex class I-associated antigen presentation. Eur J Immunol. 1997; 27: 1005-13.
- Goncalves AM, Nehme NS, Morel CM. An improved silver staining procedure for schizodeme analysis in polyacrylamide gradient gels. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1990; 85: 101-106.
- Gontijo B, de Carvalho M de L. American cutaneous leishmaniasis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2003; 36: 71-80.
- Gontijo MF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol. 2004; v. 7 n. 3, p. 338-348.
- Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. Int J Parasitol. 2003; 33: 1027-1034.
- Gouveia C. Condições Particulares de Transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana em Localidades do Campus FIOCRUZ da Mata Atlântica (Jacarepaguá, Rio de Janeiro/RJ). 2008. [Dissertação de Mestrado] - Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz.
- Grandgenett PM, Coughlin BC, Kirchhoff LV, Donelson JE. Differential expression of GP63 genes in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 2000; 110: 409-15.

- Grandgenett PM, Otsu K, Wilson HR, Wilson ME, Donelson JE.. A function for a specific zinc metalloprotease of African trypanosomes. *PLoS Pathog.* 2007; 3: 1432-1445.
- Gruszynski AE, Van Deursen FJ, Albareda MC, Best A, Chaudhary K, Cliffe LJ, del Rio L, Dunn JD, Ellis L, Evans KJ, Figueiredo JM, Malmquist NA, Omosun Y, Palenchar JB, Prickett S, Punkosdy GA, van Dooren G, Wang Q, Menon AK, Matthews KR, Bangs JD. Regulation of surface coat exchange by differentiating African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 2006. 147: 211-223.
- Guedes HL, Rezende JM, Fonseca MA, Salles CM, Rossi-Bergmann B, De-Simone SG. Identification of serine proteases from *Leishmania braziliensis*. *Zeitschrift fur Naturforschung.* 2007; 62: 373-381.
- Guerra JAO, Barbosa MG, Loureiro ACS, Coelho CP, Rosa GG, Coelho LIACR. Leishmaniose tegumentar americana em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2007; 23(9): 2215-23.
- Hajmová M, Chang KP, Kolli B, Volf P. Down-regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis*. *Microb Infect.* 2004; 6: 646-649.
- Harth G, Andrews N, Mills AA, Engel JC, Smith R, McKerrow JH. Peptidefluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 58: 17-24.
- Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry.* 1980; 102: 196-202.
- Hey AS, Theander TG, Hviid L, Hazrati SM, Kemp M, Kharazmi A. The major surface glycoprotein [gp63] from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. *J Immunol.* 1994; 152: 4542-8.
- Hill J, Phylip L. Bacterial aspartic proteinases. *FEBS Lett.* 1997; 409: 357- 360.
- Holzer TR, McMaster WR, Forney JD. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; 146: 198-218. PubMed: 16430978.
- Hsiao CHC, Yao C, Storlie P, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2008; 157: 148-159.

- Hu G, Leger RJ. A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. *J Evol Biol.* 2004; Nov, 17(6): 1204-14.
- Ilg T, Harbecke D, Overath P. The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum. *FEBS Lett.* 1993; Jul 19, 327(1): 103-7.
- Ilg T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitology Today.* 2000; 16: 489-497.
- Ilg T, Craik D, Currie G, Multhaupt G, Bacic A. Stage-specific proteophosphoglycan from *Leishmania mexicana* amastigotes. Structural characterization of novel mono-, di-, and triphosphorylated phosphodiester-linked oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry.* 1998; 273: 13509-13523.
- Ilg T, Montgomery J, Stierhof YD, Handman E. Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania major* gene, ppg1, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. *Journal of Biological Chemistry.* 1999b; 274: 31410-31420.
- Ilgutz SC, Zawadzki JL, Ralton JE, McConville MJ. Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of *Leishmania mexicana*, *EMBO J.* 1999; 18: 2746-2755.
- Inverso JA, Medina-Acosta E, O'Connor J, Russell DG, Cross GA. *Crithidia fasciculata* contains a transcribed leishmanial surface peptidase (gp63) gene homologue. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 57: 47-54.
- Ismach R, Cianci CM, Caulfield JP, Langer PJ, Hein A, McMahon-Pratt D. Flagellar membrane and paraxial rod proteins of *Leishmania*: characterization employing monoclonal antibodies. *J Protozool.* 1989; Nov-Dec, 36(6): 617-24.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarlioni L, *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science.* 2005; 309: 436-442. PubMed: 16020728.
- Jaffe CL, Dwyer DM. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. *Parasitology Research.* 2003; 91: 229-237.
- James M. In: *Structure and Function of Aspartic Protease: Retroviral and Cellular Enzymes*, Plenum Press: New York. 1998; 436: 1-481.
- Munday JC, McLuskey K, Brown E, Coombs GH, Mottram JC. Oligopeptidase B deficient mutants of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol.* 2011; January, 175(1): 49-57. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.09.003.

- Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL, McMaster WR. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol.* 2002; 120: 33-40.
- Kamhawi S. *Phlebotomine* sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology.* 2006; 22: 439-445.
- Killick-kendrick R. Biology of *Leishmania* in phlebotomine sandflies. *Biology of Kinetoplastida.* (Edited by Lumsden, W.H.R. and Evans, D.A.), Academic Press, London. 1979; 2: 395-460.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Rioux JA, Lanotte G, Leaney AJ. Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1980; 74: 563-565.
- Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schönian G.. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(6): e1155. doi:10.1371/journal.pntd.0001155.
- Kulkarni MM, Olson CL, Engman DM, McGwire BS. *Trypanosoma cruzi* GP63 proteins undergo stage-specific differential posttranslational modification and are important for host cell infection. *Infect Immun.* 2009; 77: 2193-2200.
- LaCount DJ, Gruszynski AE, Grandgenett PM, Bangs JD, Donelson JE. Expression and function of the *Trypanosoma brucei* major surface protease (Gp63) genes. *J Biol Chem.* 2003; 278: 24658-24664.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
- Lainson R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina.* 1997; 11(1): 29-40.
- Lainson R, Rangel EF. Flebotomíneos do Brasil. *Ecologia das leishmanioses*, Editora FIOCRUZ. 2003; 311-336.
- Lainson R. Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Phil Trans R Soc Lond.B.* 1988; 321: 389-404.
- Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983; 77: 569-596.
- Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of New World: taxonomic problems. *British Medical Bulletin.* 1972; 28: 44-48.
- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W & Killick-Kendrick R e. (Ed.) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine.* Academic Press, London. 1987a; 1-119.

- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AA.A, Braga RR, Ishikawa EAY. The dermal Leishmaniasis of Brazil, with Special Reference to the Ecoepidemiology of the Disease in Amazônia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89: 435-443.
- Lainson R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. Rev Pan-Amaz Saude. 2010; 1(2): 13-32.
- Lanfranco MF, Loayza-Muro R, Clark D, Núñez R, Zavaleta AI, Jimenez M, Meldal M, Coombs GH, Mottram JC, Izidoro M, Juliano MA, Juliano L, Arévalo J. Expression and substrate specificity of a recombinant cysteine proteinase B of *Leishmania braziliensis*. Mol Biochem Parasitol. 2008; 161: 91-100.
- Lawyer PG, Ngumbi PM, Anjili CO, Odongo SO, Mebrahtu YB, Githure JI, Koech DK, Roberts CR. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1990; 43: 31-43.
- Leblois R, Kuhls K, François O, Schönian G, Wirth T. Guns, germs and dogs: On the origin of *Leishmania chagasi*. Infect. Genet. Evol. 2011. doi:10.1016/j.meegid.2011.04.004
- Leng YJ. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, south-west China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. Ann Trop Med Parasitol. 1987; 81(3): 311-7.
- Lepay DA, Nogueira N, Cohn Z. Surface antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. J Exp Med. 1983; 157: 1562-1572.
- Lima AK, Elias CG, Souza JE, Santos ALS, Dutra PM. Dissimilar peptidase production by avirulent and virulent promastigotes of *Leishmania braziliensis*: inference on the parasite proliferation and interaction with macrophages. Parasitology. 2009; 136: 1179-91.
- Lima AKC. Efeito da 1,10-fenantrolina e seus derivados complexados em metal na atividade proteolítica de *Leishmania braziliensis* [tese]. Rio de Janeiro: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2012; 137pp.
- Lopez-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. J. Biol. Chem. 2008; 283: 30433-30437.
- Lopes AH, Souto-Pradrón T, Dias FA, Gomes TM, Rodrigues GC, Zimmermann LT, Alves & Silva TL, Vermelho AB. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. The Open Parasitol. J. 2010; 4: 30-59.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry. 1951; 193: 265-275.

- Luz KG, da Silva VO, Gomes EM, Machado FC, Araujo MA, Fonseca HE, Freire TC, d'Almeida JB, Palatnik M, Palatnik-de Sousa CB. Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1997; 57: 168-171.
- Ma L, Chen K, Meng Q, Liu Q, Tang P, Hu S, Yu J. An evolutionary analysis of trypanosomatid GP63 proteases. *Parasitol Res*. 2011; 109:1075-1084.
- Macdonald MH, Morrison CJ, McMaster WR. Analysis of the active site and activation mechanism of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1253: 199-207.
- Marsden PD, Nonata RR. Mucocutaneous leishmaniasis - A review of clinical aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1975; 9: 309-326.
- Marsden PD. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XIV. Leishmaniasis. *Reviews of Infective Diseases*. 1984; 6: 736-744.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escemel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1986; 80: 859-876.
- Marzochi MC. Leishmaniose no Brasil. *Jornal Brasileiro de Medicina*. 1992; 63: 82-104.
- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*. 2000; 16: 188-189.
- Mccann M, Santos ALS, Silva BAS, Romanos MTV, Pyrrho AS, Devereux M, Kavanagh K, Fichtnerg I, Kelleth A. In vitro and in vivo studies into the biological activities of 1,10-phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its copper(II) and silver(I) complexes. *Tox. Research*. 2012b; 00: 1-8.
- McConville MJ, Bacic A, Mitchell GF, Handman E. Lipophosphoglycan of *Leishmania* major that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84: 8941-5.
- McConville MJ, Blackwell JM. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem*. 1991; 266(23): 15170-9.
- McConville MJ, Handman E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *Int J Parasitol*. 2007; 37: 1047-1051.
- McGwire BS, Chang KP. Posttranslational regulation of a *Leishmania* HEXXH metalloprotease (gp63). The effects of sitespecific mutagenesis of catalytic, zinc

binding, N-glycosylation, and glycosyl phosphatidylinositol addition sites on N-terminal end cleavage, intracellular stability, and extracellular exit. *J Biol Chem.* 1996; 271: 7903-7909.

McGwire BS, O'Connell WA, Chang KP, Engman DM. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *The Journal of Biological Chemistry.* 2002; 277: 8802-8809.

McGwire BS, Chang KP, Engman DM. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect. Immun.* 2003; 71: 1008-1010.

McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ, Bouvier J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annual Reviews of Microbiology.* 1993; 47: 821-853.

Medina-Acosta E, Karess RE, Russell DG. Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 57: 31-46.

Medina-Acosta E, Karess RE, Schwartz H, Russell DG. The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989; 37: 263-273.

Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L, Fleischer B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala-azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics.* 1999; 104 (5): e 65.

Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, Murta AC, Scharfstein J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *J Mol Biochem Parasitol.* 1992; 52: 175-184.

Mensa-Wilmot K, Garg N, McGwire BS, Lu HG, Zhong L, Armah DA, LeBowitz JH, Chang KP. Roles of free GPIs in amastigotes of *Leishmania*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 1999; 99: 103-116.

MEROPS - The peptidase database: Release 9.6. <http://merops.sanger.ac.uk/> (Accessed June 26, 2012).

Momen H, Pacheco RS, Cupolillo E, Grimaldi Junior G. Molecular evidence for the importation of Old World *Leishmania* into the Americas. *Biol Res.* 1993; 26: 249-255.

Momen H, Grimaldi Júnior G, Deane LM. *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1987; 82: 447-448.



- Momen H, Cupolillo E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2000; 95(4): 583-588.
- Monteiro EM, Silva JCF, Costa RT, Costa DC, Barata RA, De Paula EV, Machado-Coelho GLL, Rocha MF, Fortes-Dias CL, Dias ES. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38(2): 147-52.
- Morgado-Díaz JA, Silva-Lopez RE, Alves CR, Soares MJ, Corte-Real S, De Simone SG. Subcellular localization of an intracellular serine protease of 68 kDa in *Leishmania [Leishmania] amazonensis* promastigotes. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100: 377-83.
- Morty RE, Authie E, Troeberg L, Lonsdale-Eccles JD, Coetzer TH. Purification and characterisation of a trypsin-like serine oligopeptidase from *Trypanosoma congolense*. Mol Biochem Parasitol. 1999; 102: 145-155. PubMed: 10477183.
- Mosser D, Edelson PJ. The third component of complement [C3] is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. Nature. 1987; 327: 329-31.
- Mottram JC, Souza AE, Hutchison JE, Carter R, Frame MJ, Coombs GH. Evidence from disruption of the *lmcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93: 6008-13.
- Mottram JC, Coombs GH, Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. Current Opinion in Microbiology. 2004; 7: 375-381.
- Mundodi V, Kucknoor AS, Gedamu L. Role of *Leishmania [Leishmania] chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. BMC Mol Biol. 2005; 6: 3.
- Mundodi V, Somanna A, Farreli PJ, Gedamu L. Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. Gene. 2002; 282: 257-65.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005; 366: 1561-1577.
- Musa AM, Khalil EA, Mahgoub FA, Elgawi SH, Modabber F, Elkadaru AE, Aboud MH, Noazin S, Ghalib HW, El-Hassan AM. Immunochemotherapy of persistent post-kala-azar dermal leishmaniasis: a novel approach to treatment. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2008; 102(1): 58-63.
- Muskus C, Segura I, Oddone R, Turco SJ, Leiby DA, Toro L, Robledo S, Saravia NG. Carbohydrate and LPG expression in *Leishmania Viannia* subgenus. J. Parasitol. 1997; 83: 671-678.

- Muskus CE, Marin Villa M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica*. 2002; 22: 167-177.
- Neilands JB. in The development of iron chelators for clinical use (Bergeron, R.J. and Brittenham, G.M., eds.). 1994; 151-168, CRC Press.
- Nieves E, Pimenta PFP. Development of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. 2000; 37(1): 134-140.
- Nogueira de Melo AC, d'Avila-Levy CM, Dias FA, Armada JL, Silva HD, Lopes AH, Santos AL, Branquinha MH, Vermelho AB. Peptidases and gp63-like proteins in *Herpetomonas megaseliae*: possible involvement in the adhesion to the invertebrate host. *Int J Parasitol*. 2006; 36: 415-422.
- Nogueira de Melo AC, Giovanni-De-Simone S, Branquinha MH, Vermelho AB. *Crithidia guilhermei*: purification and partial characterization of a 62-kDa extracellular metalloproteinase. *Exp Parasitol*. 2001; 97: 1-8.
- Omara-Opyene AL, Gedamu L. Molecular cloning, characterization and overexpression of two distinct cysteine protease cDNAs from *Leishmania donovani chagasi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997; 90: 247-67.
- Orlando TC, Rubio MA, Sturm NR, Campbell DA, Floeter-Winter LM: Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting *Leishmania*: molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting *Leishmania* in the subgenus *Leishmania*(*Leishmania*). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97: 695-701.
- Ouakad M, Chenik M, Ben Achour-Chenik Y, Louzir H, Dellagi K. Gene expression analysis of wild *Leishmania major* isolates: identification of genes preferentially expressed in amastigotes. *Parasitol Res*. 2007; 100: 255-264. PubMed: 17016728.
- Page MJ, Di Cera E. Evolution of peptidase diversity. *J Biol Chem*. 2008; 283: 30010-30014.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, *et al*. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet*. 2007; 39: 839-847.
- Pereira FM, Bernardo PS, Dias Junior PF, Silva BA, Romanos MT, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH, Santos AL. Differential influence of gp63-like molecules in three distinct *Leptomonas* species on the adhesion to insect cells. *Parasitol Res*. 2009; 104: 347-53.

- Pereira FM, Dias FA, Elias CG, d'Avila-Levy CM, Silva CS, Santos-Mallet JR, Branquinha MH, Santos AL. Leishmanolysin-like molecules in *Herpetomonas samuelpessoai* mediate hydrolysis of protein substrates and interaction with insect. *Protist*. 2010b; Oct, 161(4): 589-602.
- Peters C, Kawakami M, Kaul M, Ilg T, Overath P, Aebischer T. Secreted proteophosphoglycan of *Leishmania mexicana* amastigotes activates complement by triggering the mannan binding lectin pathway. *European Journal of Immunology*. 1997a; 27: 2666-2672.
- Peters C, Stierhof YD, Ilg T. Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages. *Infect Immunology*. 1997b; 65: 783-786.
- Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*. 1997; 115 ( Pt 4): 359-369.
- Pimenta PFP, de Freitas VC, Secundino NFC. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT – EM, capítulo 12. 2012.
- Portal da Fiocruz. Agência Fiocruz de Notícias. Disponível em: [www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=355&sid=6](http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=355&sid=6). Acesso em: 24 fev. 2013.
- Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *European Journal of Immunology*. 1995; 25: 745-750.
- Ralton JE, Naderer T, Piraino HL, Bashtannyk TA, Callaghan JM, McConville MJ. Evidence that intracellular beta1-2mannan is a virulence factor in *Leishmania* parasites, *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 40757-40763.
- Ramesh V, Mukherjee A. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*. 1995; 34: 85-91.
- Ramesh V, Singh R, Salotra P. Short communication: Post-kala-azar dermal leishmaniasis - an appraisal. *Tropical Medicine International Health*. 2007; 12: 848-851.
- Rangel EF, Lainson R. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In EF Rangel, R Lainson (eds), *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro. 2003; 291-310.

- Rangel EF. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. Tropical Diseases, Society and the Environment, Technical Report. 1995; 103-110.
- Rawling ND, Barrett AJ. Families of cysteine peptidases. Meth. Enzymol. 1994; 244: 461-486.
- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res. 2012; 40: D343-350.
- Raymond F, Boisvert S, Roy G, Ritt JF, Légaré D, Isnard A, Stanke M, Olivier M, Tremblay MJ, Papadopoulou B, Ouellette M, Corbeil J. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. Nucleic Acids Res. 2012; 40: 1131-1147.
- Rebello KM, Côrtes LM, Pereira BA, Pascarelli BM, Côrte-Real S, Finkelstein LC, Pinho RT, d'Avila-Levy CM, Alves CR. Cysteine proteinases from promastigotes of *Leishmania [Viannia] braziliensis*. Parasitol Res. 2009; Dec, 106(1): 95-104.
- Rebello KM. Cisteína-proteinases em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. in Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular p 84. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2008.
- Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Parasitology. 2002; 124: 498-507.
- Rojas JLC. Biological, biochemical and molecular characterization of FLAG-1, a *Leishmania* membrane-associated flagellar protein: Yale University. 1997.
- Rosenzweig D, Smith D, Opperdoes F, Stern S, Olafson RW, Zilberstein D. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. The FASEB Journal. 2008; 22.
- Russell DG, Alexander J. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. J Immunol. 1988; Feb 15, 140(4): 1274-9.
- Russell DG, Talamas-Rohana P, Zelechowski J. Antibodies raised against synthetic peptides from the Arg-Gly-Asp-containing region of the *Leishmania* surface protein gp63 cross-react with human C3 and interfere with gp63-mediated binding to macrophages. Infect Immun. 1989; 57: 630-2.
- Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Experimental Parasitology. 1989; 69: 100-103.
- Sacks DL. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. Cell Microbiology. 2001; 3: 189-196.

- Sacks DL, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55: 453-483.
- Sacks DL, Modi G, Rowton E, Spath G, Epstein L, Turco SJ, Beverley SM. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proceedings of the National Academic Sciences USA.* 2000; 97: 406-411.
- Saf'janova V. Classification of the genus *Leishmania* Ross, In: Academy of Sciences, U.A.U.S.o.P. (Ed.) *The Leishmaniasis.* Protozoology. 1982; 95-101.
- Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 2002; 120: 1-21.
- Sangenito LS, Ennes-Vidal V, Marinho FA, Da Mota FF, Santos ALS, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH. Arrested growth of *Trypanosoma cruzi* by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms. *Parasitology.* 2009; 136: 433-41.
- Sangiorgi B, Miranda DN, Oliveira DF, Santos EP, Gomes FR, Santos EO, Barral A, Miranda JC. Natural breeding places for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a semiarid region of Bahia state, Brazil. *J Trop Med.* 2012; 1-5.
- Santos AL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *An Acad Bras Cienc.* 2006; 78: 687-714.
- Santos CC, Sant'anna C, Terres A, Cunha-e-Silva NL, Scharfstein J, de A Lima AP. Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *J Cell Sci.* 2005; 118: 901-915.
- Santos LO, Garcia-Gomes AS, Catanho M, Sodre CL, Santos AL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Aspartic peptidases of human pathogenic trypanosomatids: perspectives and trends for chemotherapy. *Curr Med Chem.* 2013; 20(25): 3116-33.
- Santos ALS, Bittencourt VCB, Pinto MR, Barreto-Bergter E. Biochemical characterization of potential virulence markers in the human fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. 2009.
- Santos LO, Marinho FA, Altoé EF, Vitória BS, Alves CR, Britto C, Motta MC, Branquinha MH, Santos ALS, d'Avila-Levy CM. HIV aspartic peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. *PLoS One.* 2009; 4(3): e4918.
- Santos RV, Coimbra Jr CEA. *Saúde e Povos Indígenas Ed.* FIOCRUZ (Rio de Janeiro). 1994; 119-211.

- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, Hoffmann MP, Freitas RA, Malacco MAF. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American Visceral Leishmaniasis. *Med Vet Entomol.* 1998; 12: 315-317.
- Saraiva EM, Pinto-da-Silva LH, Wanderley JL, Bonomo AC, Barcinski MA, Moreira ME. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. *Experimental Parasitology.* 2005; 110: 39-47.
- Saxena A, Worthey EA, Yan S, Leland A, Stuart KD, Myler PJ. Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 129: 103-14.
- Scharfstein J, Schmitz V, Morandi V, Capella MM, Lima AP, Morrot A, Juliano L, Müller-Esterl W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med.* 2000; 192: 1289-300.
- Schonian G, Cupolillo E, Maurício I. Molecular Evolution and Phylogeny of *Leishmania*. In: Ponte-Sucré, A.; Diaz, E.; Padrón-Nieves, M. (eds.). *Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments.* [S.l.]: Springer. 2012; 459. ISBN 9783709111253
- Schneider P, Glaser TA. Characterization of a surface metalloprotease from *Herpetomonas samuelpeesoai* and comparison with *Leishmania major* promastigote surface protease. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 58: 277-282.
- Schneider P, Rosat JP, Bouvier J, Louis J, Bordier C. *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol.* 1992; Sep, 75(2): 196-206.
- Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL, Pacheco RS, Momen H, Conceicao-Silva F, Coutinho SG, Marzochi KB. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1998; 58: 824-827.
- Scott BB, McGeehan GM, Harrison RK. Development of inhibitors of the aspartic protease renin for the treatment of hypertension. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2006; 7: 241-254.
- Seay MB, Heard PL, Chaudhuri G. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotas against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect. Immun.* 1996; 64: 5129-5137.

- Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Tripathi G, Bandyopadhyay S, Rakshit S, Sen T, Majumder HK. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death Differ*. 2004; 11: 924-936.
- Sereno D, Cavaleyra M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A, Lemesre JL. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; Dec, 42(12): 3097-102.
- Shaha C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis, *Indian J. Med. Res*. 2006; 123: 233-244.
- Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89: 471-478.
- Shaw JJ. New World leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in Central and South America. In: Farrell J, ed. *World Class Parasites: Leishmania*. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers. 2002; 11-31.
- Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101: 577-579.
- Shaw J, Lainson R. Ecology and epidemiology: New World. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London, UK: Academic Press. 1987; 292-363.
- Silva BA. Efeito de 1,10-fenantroline e seus derivados sobre aspectos múltiplos da bioquímica e biologia celular do fungo *Pseudallescheria boydii*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.
- Silva BA, Souza-Gonçalves AL, Pinto MR, Barreto-Bergter E, Santos ALS. Metalloprotease inhibitors arrest vital biological processes in the fungal pathogen *Scedosporium apiospermum*. *Mycoses*. 2011; 54(2): 105-112.
- Silva-Lopez RE, Morgado-Díaz JA, Alves CR, Côrte-Real S, Giovanni-De-Simone S. Subcellular localization of an extracellular serine protease in *Leishmania [Leishmania] amazonensis*. *Parasitol Res*. 2004a; 93: 328-31.
- Silva-Lopez RE, Giovanni-De-Simone S. *Leishmania [Leishmania] amazonensis*: purification and characterization of a promastigote serine protease. *Exp Parasitol*. 2004b; 107: 173-82.
- Silva-Lopez RE, De Simone SG. A serine protease from a detergent-soluble extract of *Leishmania [Leishmania] amazonensis*. *Z Naturforsch C*. 2004c; 59: 590-8.

- Silva-Lopez RE, Coelho MG, De Simone SG. Characterization of an extracellular serine protease of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology*. 2005; Jul, 131(Pt 1): 85-96.
- Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, Dwyer DM, Nandan D, Foster LJ, Reiner NE. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol*. 2008; 9: R35.
- Sistema de Informação de Agravos De Notificação (SINANWEB). Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude>. 2010. Acesso em: 04 mar. 2013, 18:00:00.
- Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*. 2007; 37: 1173-1186.
- Soares GC, Silva BA, Dos Santos MH, da Costa AF, Santos ALS, Morandi V, Nagao PE. Metalloproteases produced by group B *Streptococcus*: influence of proteolytic inhibitors on growth and on interaction with human cell lineages. *Int. J. Mol. Med*. 2008; 22(1): 119-25.
- Soares RP, Macedo ME, Ropert C, Gontijo NF, Almeida IC, Gazzinelli RT, Pimenta PF, Turco SJ. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 2002; 121: 213-224.
- Soares RP, Cardoso TL, Barron T, Araujo MS, Pimenta PF, Turco SJ. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International Journal for Parasitology*. 2005; 35: 245-253.
- Soares RP, Margonari C, Secundino NC, Macedo ME, da Costa SM, Rangel EF, Pimenta PF, Turco SJ. Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *J. Biomed. Biotechnol*. 2010; 439174.
- Soteriadou KP, Remoundos MS, Katsikas MC, Tzinia AK, Tsikaris V, Sakarellos C, Tzartos SJ. The Ser-Arg- Tyr-Asp region of the major surface glycoprotein of *Leishmania* mimics the Arg-Gly-Asp-Ser cell attachment region of fibronectin. *J Biol Chem*. 1992; 267: 13980-5.
- Souto-Padro'n T, Campetella OE, Cazzulo JJ, de Souza W. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J Cell Sci*. 1990; 96: 485-90.
- Souza NA. Aspectos da ecologia de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), no Distrito de Posse, área de ocorrência de Leishmaniose tegumentar americana no Município de Petrópolis, Estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz. 2003; 110.



- Souza NA, Andrade-Coelho CA, Barbosa AF, Vilela ML, Rangel EF, Deane MP. The Influence of Sugars and Amino Acids on the Blood-feeding Behaviour, Oviposition and Longevity of Laboratory Colony of *Lutzomyia longipalis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995; 90: 751-757.
- Stierhof YD, Ilg T, Russell DG, Hohenberg H, Overath P. Characterization of polymer release from the flagellar pocket of *Leishmania mexicana* promastigotes. Journal Cell Biology. 1994; 125: 321-331.
- Svensjö E, Batista PR, Brodskyn CI, Silva R, Lima AP, Schmitz V, Saraiva E, Pesquero JB, Mori MA, Müller-Esterl W, Scharfstein J. Interplay between parasite cysteine proteases and the host kinin system modulates microvascular leakage and macrophage infection by promastigotes of the *Leishmania donovani* complex. Microbes Infect. 2006; 8: 206-20.
- Symmers WS. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. Lancet. 1960; 1: 127-132.
- Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M, Nunes VL, Milder RV, de Souza W, Camargo EP. Phylogenetic validation of the genera *Angomonas* and *Strigomonas* of trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of trypanosomatids and of proteobacterial symbionts. Protist. 2011; Jul, 162(3): 503-24. doi: 10.1016/j.protis.2011.01.001.
- Tomas AM, Miles MA, Kelly JM. Overexpression of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, is associated with enhanced metacyclogenesis. Eur J Biochem. 1997; 244: 596-603.
- Tull D, Vince JE, Callaghan JM, Naderer T, Spurck T, McFadden GI, Currie G, Ferguson K, Bacic A, McConville MJ. SMP-1, a member of a new family of small myristoylated proteins in kinetoplastid parasites, is targeted to the flagellum membrane in *Leishmania*. Mol Biol Cell. 2004; Nov, 15(11): 4775-86.
- Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. Annual Reviews of Microbiology. 1992; 46: 65-94.
- Uehara LA, Moreira OC, Oliveira AC, Azambuja P, Lima APCA, Britto C, dos Santos AL, Branquinho MH, d'Avila-Levy CM. Cruzipain Promotes *Trypanosoma cruzi* Adhesion to *Rhodnius prolixus* Midgut. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6(12): e1958. doi:10.1371/journal.pntd.0001958.
- Vainstein MH, Roitman I. Cultivation of *Phytomonas françai* associated with poor development of root system of cassava. J Protozool. 1986; 33: 511-513.

- Valdivieso E, Dagger F, Rascon A. *Leishmania mexicana*: identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. *Experimental Parasitology*. 2007; 116: 77-82.
- Vassar R. Beta-Secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 1589-1602.
- Vermelho AB, Melo ACN, Branquinha MHS, Santos ALS, d'Ávila-Levy CM, Couri S, Bom EPS. In: *Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado*, Ed.; Interciência: Rio de Janeiro. 2008; 1: 273-287.
- Walsh JF, Molyneux DH, Birley MH. Deforestation: effects on vector-borne disease. *Parasitol.* 1993; 106: 55-75.
- Walters LL. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sand fly hosts. *J Eukaryot Microbiol.* 1993; 40: 196-206.
- Walters LL, Chaplin GL, Modi GB, Tesh RB. Ultrastructural biology of *Leishmania (Viannia) panamensis (Leishmania braziliensis panamensis)* in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1989; 40: 19-39.
- Walters LL, Irons KP, Modi GB, Tesh RB. Refractory barriers in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1992; 46: 211-228.
- Weinman D, Cheong WH. *Herpetomonas*, with bacterium-like inclusions, in Malaysian *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *J Protozool.* 1978; 25: 167-169.
- Weise F, Stierhof YD, Kuhn C, Wiese M, Overath P. Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using highpressure frozen cells. *J Cell Sci.* 2000; 113: 4587-603.
- Williams RA, Tetley L, Mottram JC, Coombs GH. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol.* 2006; 61: 655-74.
- World Health Organization. Leishmaniasis – Burden of disease. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Acesso em: 05 mar. 2013, 19:44:00.
- Yao C. Major Surface Protease of Trypanosomatids: One Size Fits All? *Infect Immun.* 2010; 78: 22-31.
- Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 2003; 132: 1-16.

- Yao C, Donelson JE, Wilson ME. Internal and surfacelocalized MSP of *Leishmania* and their differential release from promastigotes. *Eukaryot. Cell.* 2007; 6: 1905-1912.
- Young DG, Duncan MA. Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Ann Entomol.* 1994; 54: 1-881.
- Zawadzki J, Scholz C, Currie G, Coombs GH, McConville MJ. The glycoinositolphospholipids from *Leishmania panamensis* contain unusual glycan and lipid moieties. *Journal of Molecular Biology.* 1998; 282 (2): 287-299.
- Zelazny AM, Fedorko DP, Li L, Neva FA, Fisher SH. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 72: 415-420.
- Ziegelbauer K, Stahl B, Karas M, Stierhof YD, Overath P. Proteolytic release of cell surface proteins during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Biochemistry.* 1993; 32: 3737-42.
- Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EA, el-Hassan IM, el-Hassan AM. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases.* 2003; 3: 87-98.
- Zufferey R, Allen S, Barron T, Sullivan DR, Denny PW, Almeida IC, Smith DF, Turco SJ, Ferguson MA, Beverley SM. Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*. *Journal of Biological Chemistry.* 2003; 278: 44708-44718.