

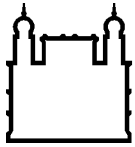
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária

**DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO GÊNICA E NA FORMA DE DIRECIONAMENTO
DA REGIÃO COOH-TERMINAL DE CÍSTEINA-PROTEINASE B DE *Leishmania*
(*Leishmania*) *amazonensis***

RAQUEL SANTOS DE SOUZA

Rio de Janeiro
Maio de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Raquel Santos de Souza

Diferenças na expressão gênica e na forma de direcionamento da região COOH-terminal de cisteína-proteinase B de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Alves

RIO DE JANEIRO

Maio de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S731 Souza, Raquel Santos de

Diferenças na expressão gênica e na forma de direcionamento da região COOH-terminal de cisteína-proteinase B de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* / Raquel Santos de Souza. – Rio de Janeiro, 2015.

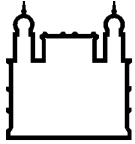
ix, 104 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Bibliografia: f. 77-92

1. Leishmania. 2. Cisteína proteinase B. 3. Surface plasmon resonance. 4. Fracionamento subcelular. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: RAQUEL SANTOS DE SOUZA

**Diferenças na expressão gênica e na forma de direcionamento da região
COOH-terminal de cisteína-proteinase B de *Leishmania (Leishmania)*
*amazonensis***

ORIENTADOR : Prof. Dr. Carlos Roberto Alves

Aprovada em: 19/05/2015

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Leonor Laura Leon (Revisor e Presidente)

Prof^a. Dr^a. Suzana Corte Real Faria (Membro interno)

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Madeira (Membro externo)

Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Suplente)

Prof^a. Dr^a. Raquel Elisa da Silva López (Suplente)

Rio de Janeiro, 19 de Maio de 2015

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Jorge e Menilde, que sempre se esforçaram para me dar a melhor educação possível e incentivo para lutar pelos meus sonhos; ao meu irmão Thiago pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me indicado o caminho a ser seguido e por sempre estar ao meu lado.

Agradeço a meus pais, Jorge dos santos de Souza e Menilde Batista dos Santos, e irmão Thiago Santos de Souza pelo apoio e conselhos valiosos.

A todos meus familiares, tios e primos, por terem me apoiado, me animado e me ensinado a ser quem sou hoje. Agradeço também aqueles que mesmo não sendo da minha família de sangue torcem e apoiam tornando-se minha família do coração.

Ao meu querido orientador Dr. Carlos Roberto Alves, pela oportunidade e grande incentivo da busca pelo conhecimento. Obrigada pela confiança, pelas lições de vida, otimismo e amizade.

Aos meus queridos amigos do grupo Biomarcadores: Dr^a Luzia Monteiro, Dr. Franklin Silva, Dr^a Mariana Almeida, Dr. Bernardo Acacio, Dr^a Michelle Lopes, Msc Cinthia Bernardes, Tairine Silva, Msc Luiz Felipe Oliveira e Barbara Albuquerque.

A doutora Dr^a Léa Cysne Finkelstein do LIP/IOC pelo apoio e amizade nos momentos difíceis. Sua amizade foi um presente para mim.

Aos amigos, pesquisadores e alunos, do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, em especial às amigas Msc. Natália Lins, Msc. Myllena Mello e Cristiane Mendes. Obrigada a todos por proporcionar momentos de descontração e um ambiente agradável para trabalhar.

À chefe do laboratório Dr^a. Constança Britto pelo apoio e liberdade para a realização deste trabalho.

Aos amigos da Biomedicina UFF, que mesmo distantes se fizeram presentes em todos os momentos. Agradeço por esta família que nos tornamos.

Aos amigos da minha turma de mestrado, pelo carinho e incentivo de sempre. Em especial a Aline Moreira, Monica Alcon e Amanda Tucci.

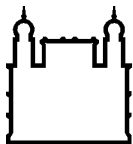
Aos amigos da minha querida Igreja Projeto Vida Nova de Irajá, em especial aos Pastores Ricardo e Erica Teixeira pelo apoio e orações. Agradeço também a todos líderes e Pastores desta Igreja por me inspirarem a ser cada dia uma pessoa melhor.

A todos os membros da Pós-graduação em Biologia Parasitária.

Aos integrantes da banca: revisor, titulares e suplentes pelo aceite em fazer parte deste momento importante na minha vida.

Às agências de fomento e fontes de financiamento: Papes IV (Fiocruz/CNPq)
e em especial a CAPES pela bolsa de mestrado.

**“Não to mandei eu? Sê forte e corajoso; não temas, nem te espantes, porque o Senhor, teu Deus, é contigo por onde quer que andares.”
Josué 1.9**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

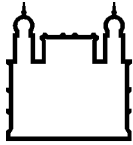
Diferenças na expressão gênica e na forma de direcionamento da região COOH-terminal de cisteína-proteinase B de *Leishmania (Leishmania)* *amazonensis*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Raquel Santos de Souza

A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* apresenta mecanismos de adaptação guiados por suas proteinases. Neste contexto, destacam-se as cisteína proteinases (CPs) onde a cisteína proteinase B (CPB) é a CP mais estudada dentre as CPs deste parasito. O foco deste trabalho é a região COOH-terminal da CPB (cyspep), gerada a partir do processamento final desta proteinase. O estudo foi conduzido em cinco fases: obtenção da cyspep recombinante (rcyspep); avaliação da antigenicidade da rcyspep em camundongos experimentalmente infectados com *L.(L.) amazonensis*; diferenciação *in vitro* dos promastigotas em amastigotas; avaliação da expressão do gene *cpb* ao longo da diferenciação do parasito; e detecção da cyspep nas formas promastigotas e amastigotas do parasito. O polipeptídeo rcyspep, de 14 kDa, foi obtida em sistema pET28-a e purificado para posterior produção de anticorpos policlonais específicos em camundongos. Observou-se que, durante a infecção em camundongos, há uma resposta imune humoral contra o rcyspep, caracterizada por um aumento da detecção de anti-cyspep quando comparado com animais de controle ($p < 0,05$). Nos ensaios de diferenciação constatamos três padrões morfológicos ao logo de 96 horas de análise, em uma cinética temporal: formas alongadas com flagelo livre, arredondados com flagelo e arredondadas sem flagelo por microscopia. Adicionalmente a cultura foi analisada por citometria de fluxo demonstrando uma migração gradual da população da região R1 para região R2 do *dotplot* indicando uma diminuição no tamanho e aumento da granulosidade celular. Observamos que ao longo desta diferenciação ocorre um aumento da quantidade de transcritos do gene *cpb*, nos tempos de 48 horas (1,3 x), 72 horas (3,2 x) e 96 horas (3,4 x) nas preparações de cDNA dos parasitos, quando comparada com os resultados de quantificação realizados com preparações de cDNA dos promastigotas. Na continuidade deste trabalho, o anti-rcyspep foi utilizado como ferramenta nos estudos de detecção da proteína em preparações de promastigotas e amastigotas obtidas por fracionamento subcelular e no sobrenadante de cultivo por ensaios de ressonância plasmônica de superfície. Os sensorgramas obtidos nestes ensaios revelaram valores de RU de dissociação, indicativos do reconhecimento do anti-rcyspep em todas as preparações do parasito. Constatamos que as proteínas das preparações de membrana e flagelo de ambas as formas têm menor propriedade de ligar a IgG anti-rcyspep. Dentre estas, as preparações de proteína de membrana de amastigota apresentaram os menores valores de K_{sat} . Por outro lado, os sobrenadantes de cultivo dos promastigotas e amastigotas apresentaram menores quantidades de proteínas reagentes a IgG anti-rcyspep. Adicionalmente, constatamos que as proteínas do parasito reconhecidas pela IgG anti-rcyspep que ligam ao E-64 foram melhor detectadas nas preparações de sobrenadante de cultura de promastigotas ($1,4 \times 10^{-2}$ ng/mm²). O conjunto dos resultados deste trabalho indica que amastigotas de *L. (L.) amazonensis* apresentam maior expressão de gene *cpb* do que promastigota e que ambas as formas lançam o polipeptídeo cyspep para o meio extracelular, porém apenas os promastigotas lançam este polipeptídeo ainda associada à enzima CPB.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Differences in gene expression and direction of the COOH-Terminal region of cysteine proteinase B of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Raquel Santos de Souza

Leishmania (Leishmania) amazonensis presents adaptive mechanisms guided by their proteinases. In this context, we highlight the cysteine proteinases (CPs) where the cysteine proteinase B (CPB) is the most studied CP among these parasites. The focus of this work is the COOH-terminal region of CPB (cyspep), generated during the final processing stage of this proteinase. Our study comprises five main phases: obtaining of a recombinant cyspep polypeptide (rcyspep); evaluation of the antigenicity of rcyspep in mice experimentally infected with *L. (L.) amazonensis*; in vitro differentiation of promastigotes into amastigotes; evaluation of cpb gene expression throughout morphological differentiation of the parasite; and detection of cyspep in promastigotes and amastigotes of *L. (L.) amazonensis*. The rcyspep polypeptide, with 14 kDa, was obtained using a pET28-a system and, subsequently, specific polyclonal antibodies were produced by inoculation in mice. We observed that, during mice infection, there is a humoral immune response against rcyspep, characterized by an increase in detection of anti-cyspep when compared to control animals ($p < 0.05$). During differentiation assays three morphological patterns could be observed over 96 hours of observation: elongated shapes with free flagellum, rounded shapes with free flagellum and rounded shapes without visible flagellum. The data point to a gradual migration of the population of parasites from region R1 to region R2 into the dotplot indicating a decrease in size and increase in cell granularity. We observed that alongside the morphological differentiation there is an increase in the amount of cpb gene transcripts, in time of 48 hours (1.3 x), 72 hours (3.2 x) and 96 hours (x 3.4), compared with quantitation results obtained with cDNA of promastigotes. Purified anti-rcyspep IgGs were lately used as a tool to detect cyspep in subcellular fractions and culture supernatants of promastigote and amastigote by surface plasmon resonance assays. The sensorgram obtained from these assays indicate RU dissociation values that detect the recognition of anti-parasite rcyspep in all preparations. We noticed that membrane and flagellum protein extracts of both parasite forms present lower capacity to interact with anti-rcyspep IgG. The interaction coefficients of each sample with anti-rcyspep IgG were analyzed and we could observe that amastigote membrane protein preparations have lower Ksat values. Comparatively, the culture supernatants of amastigotes and promastigotes exhibited lower proportions of rcyspep anti-IgG-binding proteins. Additionally, we found that parasite proteins were recognized by anti-IgG rcyspep that bind to E-64 were best detected in promastigote culture supernatant preparations, 1.4×10^{-2} ng/mm² on the chip. Collectively the results indicate that amastigotes of *L. (L.) amazonensis* exhibit higher expression of cpb gene that promastigote and that both forms releases the polypeptide cyspep to the extracellular environment, but only promastigotes releases that polypeptide still associated with CPB enzyme.

ÍNDICE

RESUMO		Vii
ABSTRACT		viii
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O parasito e o seu ciclo biológico	2
1.2	A doença – Leishmaniose Tegumentar	5
1.3	Considerações gerais – Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	7
1.4	Breve histórico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	8
1.5	Visão Geral dos Fatores de virulência	12
1.6	Proteinases como fator de virulência em <i>Leishmania</i> spp	15
1.7	Cisteína proteinases como fatores de virulência	17
1.8	Região COOH-terminal da CPB	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	24
2.2	Objetivos Específicos	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Cepa utilizada e manutenção do parasito em laboratório	26
3.2	Infecção experimental com <i>L.(L.) amazonensis</i>	26
3.3	Estratégia para diferenciação dos parasitos <i>in vitro</i>	27
3.4	Acompanhamento das etapas de diferenciação	27
3.5	Citometria de fluxo	28
3.6	Fracionamento subcelular de <i>L. (L.) amazonensis</i>	28
3.7	Clonagem, expressão e purificação da região COOH-terminal da CPB de <i>L. (L.) amazonensis</i> em <i>Escherichia coli</i>	28
3.8	Determinação da concentração de proteína	29

3.9	Obtenção de anti-soro rcyspep	31
3.10	Purificação de imunoglobulinas G de camundongo	31
3.11	Imuno-ensaio Enzimático	31
3.12	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio	32
3.13	Ensaio de Ressonância plasmônica de superfície (SPR)	32
3.14	Extração do RNA total de <i>L.(L.) amazonensis</i>	33
3.15	Tratamento do RNA com DNase	34
3.16	Síntese de cDNA a partir das amostras de RNA	35
3.17	PCR convencional	35
3.18	Ensaio de PCR em tempo real	36
3.19	Determinação da expressão relativa de genes	37
3.20	Análise dos dados	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Obtenção da rcyspep e produção de IgG de camundongo anti-rcyspep	40
4.2	Antigenicidade do rcyspep frente a soros de camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	40
4.3	Diferenciação <i>in vitro</i> dos promastigotas em amastigotas	44
4.4	Verificação da expressão relativa do gene <i>cpb</i> ao longo da diferenciação da <i>L. (L.) amazonensis in vitro</i>	48
4.5	Reatividade do anti-rcyspep contra as proteínas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	52
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÕES	74
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8	ANEXO	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de vida das <i>Leishmania</i> spp.	11
Figura 2.	Ilustração representativa do vetor pET-28a(+)	30
Figura 3.	Purificação da porção COOH-terminal da CPB de <i>L.(L.) amazonensis</i> .	41
Figura 4.	Titulação do anticorpo IgG rcysPep produzidos em camundongos BALB/c	42
Figura 5.	Detecção de anticorpo anti-cyspep no soro de camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	43
Figura 6.	Quantificação das formas dos parasitos submetidos à diferenciação <i>in vitro</i>	45
Figura 7	Análise morfológica da diferenciação de formas promastigotas em amastigotas <i>in vitro</i>	46
Figura 8.	Análise por citometria de fluxo da população de parasitos durante a diferenciação de formas promastigotas em amastigotas <i>in vitro</i>	47
Figura 9.	Análise dos produtos amplificados dos genes de <i>L.(L.) amazonensis</i>	49
Figura 10.	Curvas de dissociação da PCR em tempo real para genes de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	50
Figura 11.	Quantificação do gene de cisteína proteinase B (cpb) de <i>L. (L.) amazonensis</i> por PCR em Tempo Real	51
Figura 12.	Sensorgrama de imobilização da IgG anti-rcyspep na superfície do <i>sensor chip</i>	55
Figura 13.	Sensorgrama de ligação da IgG anti-rcyspep com a rcyspep na superfície do <i>sensor chip</i>	56
Figura 14.	Análise das interações entre IgG específica e rcyspep	57
Figura 15.	Análise da interação entre IgG anti-rcyspep e albumina sérica bovina (BSA)	58
Figura 16.	Sensorgramas de interação entre o IgG anti-rcyspep e as proteínas dos promastigotas	59
Figura 17.	Sensorgramas de interação entre o IgG anti-rcyspep e as proteínas dos amastigotas	60
Figura 18.	Análise das interações entre IgG anti-rcyspep e as proteínas do parasito	61
Figura 19.	Sensorgramas de detecção da ligação do E-64 às proteínas dos promastigotas	63

Figura 20.	Sensorgramas de detecção da ligação do E-64 às proteínas dos amastigotas	64
Figura 21	Sensorgramas de detecção da ligação do E-64 às rcyssep.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela I.	Principais espécies relacionadas aos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana	10
Tabela II.	Principais fatores de virulência em <i>Leishmania</i> spp. e suas atuações nos hospedeiros	14
Tabela III.	Análise quantitativa dos dados de detecção das proteínas de <i>L. (L.) amazonensis</i> pela IgG anti-rcyspep	62
Tabela IV.	Análise quantitativa dos dados de detecção da ligação do E-64 às proteínas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

BHI - *Brain heart infusion*

CP - cisteína proteinase

CPA – cisteína proteinase A

CPB – cisteína proteinase B

CPC – cisteína proteinase C

Ct – *threshold cycle*

cyspep – Região COOH-terminal da cisteína proteinase B

DABCO - 1'4-diazabicyclo-(2.2.2)-octano

DAPI - 4'6'-diamidino-2-fenilindol

DEPC – dietil pirocarbonato

DNA – *deoxyribonucleic acid*

DNase I - *Deoxyribonuclease I*

DNase I - Deoxyribonuclease I

dNTPs - dextrorribonucleotídeos fosfatados

dNTPs – dextrorribonucleotídeos fosfatados

E64 - N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida

EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético

FF - Fração de flagelo

FM - Fração de membrana

FSC - *Forward Angle Light Scatter*

gp63 – glicoproteína 63

GPI – glicosilfosfatidilinositol

LCD - leishmaniose cutânea difusa

LCL - leishmaniose cutânea localizada

LMC - leishmaniose mucocutânea

LT - Leishmaniose Tegumentar

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LV - Leishmaniose Visceral

MgCl₂ - cloreto de magnésio

OPB - Oligopeptidase B

PBS – *Phosphate buffered saline*

PCR – *Polymerase chain reaction*

PFA – Paraformolaldeído

RU – *Resonance unit*

SFB - Soro Fetal Bovino

SPR –*surface plasmon resonance*

SSC - *side scatter*

1.Introdução

1.1. O parasito e o seu ciclo biológico

As Leishmanioses são doenças causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania*. A transmissão é feita por fêmeas infectadas de diversas espécies de insetos Flebotomíneos, podendo provocar a forma tegumentar ou a forma visceral da doença, de acordo com o parasito envolvido na infecção (OMS, 2014). São doenças de grande interesse na Saúde Pública, devido à sua ampla distribuição e, no caso da manifestação tegumentar, ter capacidade de produzir deformidades, refletindo no campo social e econômico (Ministério da Saúde, 2010).

A *Leishmania* spp são definidas pelo conjunto de características semelhantes dentro de um subgênero como: morfologia na microscopia ótica e eletrônica, o comportamento nos hospedeiros, a identificação tanto por anticorpos monoclonais como por isoenzimas e a análise de DNA (Lainson, 1983).

O gênero *Leishmania* é dividido em três subgêneros: *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania*. Os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* reúnem espécies que infectam mamíferos enquanto o subgênero *Sauroleishmania* reúne espécies que infectam apenas répteis. Por infectarem mamíferos, os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* são os considerados de importância médica. Assim, esta classificação baseia-se no local de adesão e multiplicação dos parasitos no tubo digestório do inseto vetor. Os parasitos do subgênero *Viannia*, desenvolvem-se primeiramente no intestino posterior dos vetores e depois migram para a porção média e anterior (Lainson *et al.*, 1987). Já os parasitos do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se apenas no intestino anterior e médio do flebotomíneo (Castilho *et al.*, 2003).

Para uma melhor identificação das espécies destes parasitos, ressaltam-se os estudos de sequenciamento dos genomas completos de algumas espécies (<http://www.genedb.org/>). Tais estudos foram realizados para três espécies do subgênero *Leishmania* como [*L. (L.) donovani*: 8195 genes, 36 cromossomos e 8032 proteínas; *L. (L.) infantum*: 8383 genes, 36 cromossomos e 8150 proteínas; *L. (L.) major*: 36 genes, 9686 cromossomos e 8316 proteínas; *L. (L.) mexicana*: 8249 genes, 34 cromossomos] e apenas uma espécie do subgênero *Viannia* [*L. (V.) braziliensis*; 35 genes; 7837 cromossomos e 7555 proteínas].

Uma visão geral destes dados indica que o número de cromossomos se mantém nas espécies do Velho Mundo e estão diminuídos nas espécies de Novo Mundo. Ainda não é possível estabelecer uma relação exata entre ambos os subgêneros e a quantidade de genes, cromossomos e proteínas preditas. Com certeza estes estudos contribuem com a identificação de genes que são espécie - específicos ou estão sob pressão seletiva, fornecendo recursos para a identificação de fatores intrínsecos do parasito que influenciam a infecção, como os genes de proteases (Silva-Almeida *et al.*, 2014a). Além disso, pode-se considerar que o genoma das *Leishmania* spp é expresso constitutivamente com um número limitado de genes estágio-específicos (Papadopoulou *et al.*, 2003; Cohen-Freue *et al.*, 2007).

Leishmania (Leishmania) amazonensis é a espécie na qual este estudo está focado, pertence ao complexo *Leishmania mexicana* e possui a seguinte classificação taxonômica (OMS, 1990):

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Ordem: Kinetoplastida

Família: Trypanosomatidae

Gênero: *Leishmania*

Subgênero: *Leishmania*

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam ciclo biológico heteroxênico, alternando-se entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Os hospedeiros invertebrados incluem fêmeas de flebotomíneos hematófagos do gênero *Lutzomyia* nas Américas, e *Phlebotomus*, na Europa, Ásia e África (Roberts & Janovy, 2000). Os hospedeiros vertebrados consistem em uma ampla variedade de mamíferos como marsupiais, roedores e canídeos que podem atuar como reservatórios.

O parasito passa por estágios morfológicos distintos no seu ciclo de vida, apresentando duas formas principais: promastigota extracelular e amastigota intracelular (figura 1). A forma promastigota, com tamanho 1,5 - 3 µm de largura x 16 -40 µm de comprimento, possui um aspecto alongado com um flagelo livre

emergindo da região anterior e está presente no tubo digestório do inseto vetor. Possui um núcleo arredondado ou oval localizado na região mediana da célula e um cinetoplasto situado entre a extremidade anterior e o núcleo, próximo à bolsa flagelar. A forma amastigota, com tamanho entre 1,5 - 3 µm x 3 - 6,5 µm de diâmetro de acordo com a espécie do parasito, é geralmente encontrada no interior de macrófagos e neutrófilos de mamíferos (Laskay *et al.*, 2008), que possui um aspecto tipicamente ovóide ou esférico, além de serem imóveis com pequeno flagelo restrito à bolsa flagelar (Kamhawi, 2006; Bates, 2008).

Durante o repasto sanguíneo dos insetos fêmeas da ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Young & Duncan, 1994) no vertebrado parasitado, o inseto adquire a linfa e sangue contendo células do sistema mononuclear fagocítico parasitadas (Handman & Bullen, 2002). Neste ambiente, o parasito se diferencia e se desenvolve no interior do tubo digestório do inseto como forma promastigota procíclicos que migram em direção à porção anterior do estômago (Pimenta *et al.*, 1997; Soares *et al.*, 2005). Divide-se por fissão binária formando aglomerados com aspecto de rosáceas, em geral aderidos à parede do intestino do inseto. Neste local, a forma promastigota apresenta várias formas de transição até se diferenciarem completamente em promastigotas metacíclicos, formas também flageladas que possuem mobilidade intensa e são altamente infecciosas para o hospedeiro mamífero. A presença dos protozoários no aparelho bucal do inseto provoca uma irritação e o induz a tentar se livrar do incômodo. Enquanto se alimenta, em um novo repasto sanguíneo, o vetor inocula as formas promastigotas metacíclicos em novos hospedeiros (Bates & Rogers, 2004).

No hospedeiro vertebrado, os parasitos têm como *habitat* as células do sistema fagocítico mononuclear (monócitos, macrófagos, histiócitos, entre outras) (Laskay *et al.*, 2008). Contudo, essas células fagocitárias não conseguem destruir os parasitos que as infectam os quais diferenciam-se da forma promastigota para amastigota e se reproduzem por divisão binária, no interior dos vacúolos dos macrófagos até a completa lise da célula e a consequente liberação dos amastigotas. Os amastigotas liberados podem infectar novas células, ampliando a infecção no hospedeiro vertebrado.

Atualmente as duas formas do parasito podem ser mantidas em cultivo *in vitro*. O meio de cultura mais comumente empregado para o isolamento de parasitos de lesão é o ágar sangue de Novy e McNeal, modificado por Nicolle (NNN), onde os promastigotas são mantidos a 24-28°C (Gontijo & Carvalho, 2003). As formas amastigotas podem ser obtidas, por diferenciação *in vitro* usando cultura de macrófagos humanos e murinos (Gantt *et al.*, 2001), macrófagos J774 (Chang *et al.*, 2003; Wanderley *et al.*, 2009), fibroblastos (Corte-Real *et al.*, 1995; Bogdan *et al.*, 2000; Pessotti *et al.*, 2004; Hespanhol *et al.*, 2005), e células dendríticas (Jebbari *et al.*, 2002, Colmenares *et al.*, 2004).

Também é possível diferenciar e cultivar amastigotas axênicas, *in vitro*. Estudos demonstraram que a elevação da temperatura acarreta mudanças na morfologia dos parasitos (Hunter *et al.*, 1982; Darling & Blum, 1987; Bates *et al.*, 1992). Em meio de cultura no pH ácido é possível diferenciar as formas promastigotas metacíclicas de *L. (L.) mexicana* em amastigotas (Bates, 1994). Além disso, a condição de cultivo em meio ácido à 32°C, é possível obter formas amastigotas a partir promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Cysne-Finkelstein *et al.*, 1998).

1.2. A doença – Leishmaniose Tegumentar

As manifestações clínicas das leishmanioses podem ser agrupadas em duas formas definidas pela localização do parasito no hospedeiro vertebrado: nos tecidos de revestimento, a Leishmaniose Tegumentar (LT) e nos órgãos internos do indivíduo, a Leishmaniose Visceral (LV) (Marzochi & Marzochi, 1994). A infecção por parasitos do gênero *Leishmania* apresenta-se bastante diversa e complexa, variando de casos benignos de lesões cutâneas com cura espontânea a casos fatais de infecção visceralizada (Herwaldt, 1999).

Esta organização é generalista e as características da patologia em cada um desses grupos podem variar de acordo com a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção (Reithinger *et al.*, 2007). Independente da forma que a doença assuma, a infecção apresenta as seguintes características: macrófagos

são os principais alvos para a replicação intracelular do parasito e a infecção tecidual persistente é característica (Murray *et al.*, 2005).

Além disso, as Leishmanioses também podem ser organizadas em quatro grupos, tendo por base as características de localização das manifestações clínicas durante a infecção: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e, por fim, a leishmaniose visceral (LV).

A LCL apresenta como característica o surgimento de uma ou múltiplas lesões ulceradas espalhadas pelo corpo, podendo, em alguns poucos casos, também causar outros tipos de manifestações cutâneas como lesões verrucosas, pápulas, nódulos e infiltrações na pele (Reithinger *et al.*, 2007; Neuber, 2008; David & Craft, 2009). Esse tipo de leishmaniose pode ser causado por diversas espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, sendo que as características das lesões podem variar de acordo com a espécie de *Leishmania* causadora da infecção. As causadas por *L. (L.) amazonensis*, na maioria das vezes, apresenta lesões únicas, ulceradas, que podem exibir borda mais infiltrada que as demais úlceras causadas por outras espécies (Silveira *et al.*, 2004).

A LCD é uma forma relativamente rara de manifestação clínica, estando associada a espécies do subgênero *Leishmania*. As características desse tipo de leishmaniose são: presença de um infiltrado difuso sob o tecido cutâneo e surgimento de um grande número de nódulos e pápulas, que raramente apresentam ulceração (Silveira *et al.*, 2004). Lesões ósseas como osteopenia, lesões osteolíticas ou osteomielite podem também ocorrer (Costa *et al.*, 2005). A única espécie responsável por esta manifestação no Brasil é *L. (L.) amazonensis*, de difícil cura com qualquer forma de quimioterapia (Lainson & Shaw, 1987; Marzochi & Marzochi, 1994)

Na LMC, observa-se a necrose do tecido da mucosa nasofaríngeal, que pode progredir para a destruição das estruturas cartilaginosas associadas formando lesões desfigurantes e mutilações na face. Na maioria dos casos, a LMC resulta da LT de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado (Goto & Lindoso, 2010). Pode ser observada também a presença de um abundante infiltrado de linfócitos (Silveira *et al.*, 2004) associada

a obstruções e sangramentos na região oronasal. A principal espécie associada a este tipo de leishmaniose, no Brasil é a *L. (V.) braziliensis* (Herwaldt *et al.*, 1992), embora já tenham casos na literatura atribuídos à *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (MS, 2010).

1.3. Considerações gerais – Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

Devido à sua capacidade de circular entre humanos e animais domésticos e/ou silvestres encontrados em áreas domiciliares ou peridomiciliares, a leishmaniose é classificada como uma antropozoonose. Portanto, mamíferos como roedores, felinos, caninos, equinos, macacos e preguiças podem servir de reservatórios para parasitos do gênero *Leishmania* (Gramicci & Gradoni, 2005).

Os dados mais recentes apontam um total de 98 países e três territórios endêmicos para a transmissão das leishmanioses, totalizando 220 mil casos por ano de leishmaniose tegumentar americana (LTA) (OMS, 2014). Os dez países mais afetados, que juntos são responsáveis por 70 a 75% de incidência de LT global, são: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (Alvar *et al.*, 2012).

A LTA pode ser subdividida em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose difusa. O Brasil é o país da América do Sul que apresenta o maior número de casos de LTA. Até os anos de 1950, a maioria dos casos estava concentrada no estado de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Pernambuco, associados ao desmatamento e novas ocupações territoriais. Porém, com a extensão das atividades rurais, a doença se expandiu para outras regiões, incluindo a região metropolitana de Belo Horizonte (Passos *et al.* 1993; Brandão-Filho *et al.*; 1999). A incidência da LTA no Brasil não apresenta dados fidedignos e muito provavelmente está defasada da realidade, embora tenham sido feitas várias estimativas, dentre elas no período de 1980 a 1990, aonde se chegou a um total de 154.103 casos (OMS,1990).

No período entre 1988 e 2007, 554.475 casos foram notificados, com uma média anual de 27.723 casos autóctones e uma incidência média de 17,3 casos por 100.000 habitantes. Durante os anos de 1980, a LC e a LMC foram

registradas em 19 estados, e em 2003, foram confirmados casos autóctones em 27 estados. Apesar disso, a incidência tem reduzido de 20.3 em 2000 para 10.5 casos por 10.000 habitantes em 2008 (Alvar *et al.*, 2012). A taxa de LMC é menor do que 5% podendo variar de acordo com as regiões. A prevalência mais alta está correlacionada às áreas onde a LC foi recentemente introduzida e com distribuições locais (Marsden *et al.*, 1986; Castellucci *et al.*, 2005; Bedoya-Pacheco *et al.*, 2011). No Brasil a LTA apresentou de 1985 a 2005 uma média de 28.568 novos casos anuais (Ministério da Saúde, 2010), e entre 2007 a 2011 uma incidência anual de 11,3 casos a cada 100 mil habitantes (Data SUS, 2014).

Estudos epidemiológicos e dados experimentais indicam que a proteção contra as leishmanioses pode ser bem sucedida (Kumar & Engwerda, 2014). No entanto, até o presente momento, não existe uma vacina eficaz, o que nos estimula a prosseguir com estudos de caracterização de proteínas com potencial de influenciar na adaptação do parasito aos seus hospedeiros vertebrados, como as proteases (Silva-Almeida *et al.*, 2012).

1.4. Breve histórico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA é uma doença que acompanha o homem desde a Antiguidade. Em uma revisão de Basano & Camargo (2004) foram ressaltados pontos relevantes do histórico da LTA. Os autores relatam que há registros de casos de LTA na espécie humana datados do séc. I d.C. (Lainson, 1997; Camargo, 2003). No Novo Mundo, esculturas de cerâmica de civilizações pré-colombianas anteriores aos Incas no Equador e Peru (séc. I d. C.), sugerem lesões na pele e deformidades faciais similares a LTA (Léon & Léon, 1976; Oumeish, 1999), como mutilações de lábios e narizes, características da leishmaniose cutânea-mucosa (Lainson & Shaw, 1988). Para a civilização Inca, a marca da lesão cutânea (denominada uta) era considerada uma marca benigna e seus portadores podiam se converter em xamãs ou curandeiros, enquanto os casos de leishmaniose mucocutânea (ou espúndia) eram considerados malignos e destrutivos (Léon & Léon, 1976; Altamirano-Enciso *et al.*, 2003).

Além disso, manuscritos de missionários espanhóis do século XVI também relatam possíveis casos da doença (Léon & Léon, 1976; Cox, 2002). Achados de

múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose foram os indícios mais contundentes da ocorrência da LTA em humanos antigos do Novo Mundo (Santos & Coimbra, 1994).

No Brasil, a primeira referência de LTA pode ser identificada no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827 (citado no livro de Tello intitulado “Antigüedad de la Syphilis en el Peru”), em um relato sobre a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga (AM) até o Peru nas as regiões do vale amazônico (Paraguassu-Chaves, 2001).

Um dos primeiros casos clínicos no Brasil da LTA foi descrito por Cerqueira em 1855, quando relata uma lesão de pele denominada botão de Biskra. Entretanto, a natureza morfológica das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foi confirmada, em 1909, por Lindenberg, que encontrou amastigotas do parasito em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo.

Em uma revisão de 1925, dos Annaes Brasileiros de Dermatologia e Syphilographia, intitulada “Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil”, Eduardo Rabello dividiu a história da LTA no Brasil em três períodos: (i) o primeiro tem a origem incerta e vai até 1895 e corresponde à observação clínica do “botão da Bahia” e sua associação ao “botão do Oriente” como era descrita a forma tegumentar no Velho Mundo; (ii) o segundo vai até 1909 quando o agente etiológico é descrito por Adolpho Lindenberg em São Paulo (Lindenberg, 1909); (iii) e o terceiro com início em 1910 destaca a associação do parasito à forma mucosa devido ao achado de lesões deste tipo, até publicação do artigo com descrição da *Leishmania (V.) braziliensis* por Gaspar Vianna, em 1911 (Vale & Furtado, 2005).

No Brasil, até a década de setenta, todos os casos de LTA eram atribuídos a *Leishmania (V.) braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de tipagem dos isolados e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas, sendo registradas até o momento sete espécies causadoras da LTA (Tabela I).

Tabela I: Principais espécies relacionadas aos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana do Brasil.

Espécies	Vetor	Reservatório	Ocorrência	Tipo de lesão	Referências
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	<i>Lutzomyia whitman</i> <i>Lu. Wellcomei</i> <i>Lu. intermedia</i>	Animais domésticos	Em todas as zonas endêmicas do País, desde o norte até o sul	Lesões cutâneas e mucosas	Lainson & Shaw, 1987
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	<i>Lu. umbratilis</i> <i>Lu. Anduzei</i> <i>Lu. Whitmani</i>	Desdentados e marsupiais	Na margem norte do Rio Amazonas	Lesões cutâneas	Lainson & Shaw, 1987
<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	<i>Lu. ubiquitous</i>	Paca	Região Amazônica Pará e Rondônia	Lesões cutâneas	Shaw & Lainson, 1975
<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	<i>Psychodopigius paraensis</i> , <i>Ps. Ayrozai</i> <i>Ps. aquamiventris</i>	Tatu	Estados do Amazonas e Pará, e na Guiana Francesa	Lesões cutâneas	Shaw, 1999
<i>Leishmania (Viannia) shawi</i>	<i>Lu. whitmani</i>	Macacos, preguiças e procionídeos	Pará	Lesões cutâneas	Shaw & Lainson, 1975
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	<i>Lu. flaviscutellata</i>	Roedores e marsupiais	Bacia amazônica, Bahia, e Minas Gerais e em Goiás	Lesões cutâneas, cutâneo-mucosa, cutânea difusa anérgica	Shaw & Lainson, 1975

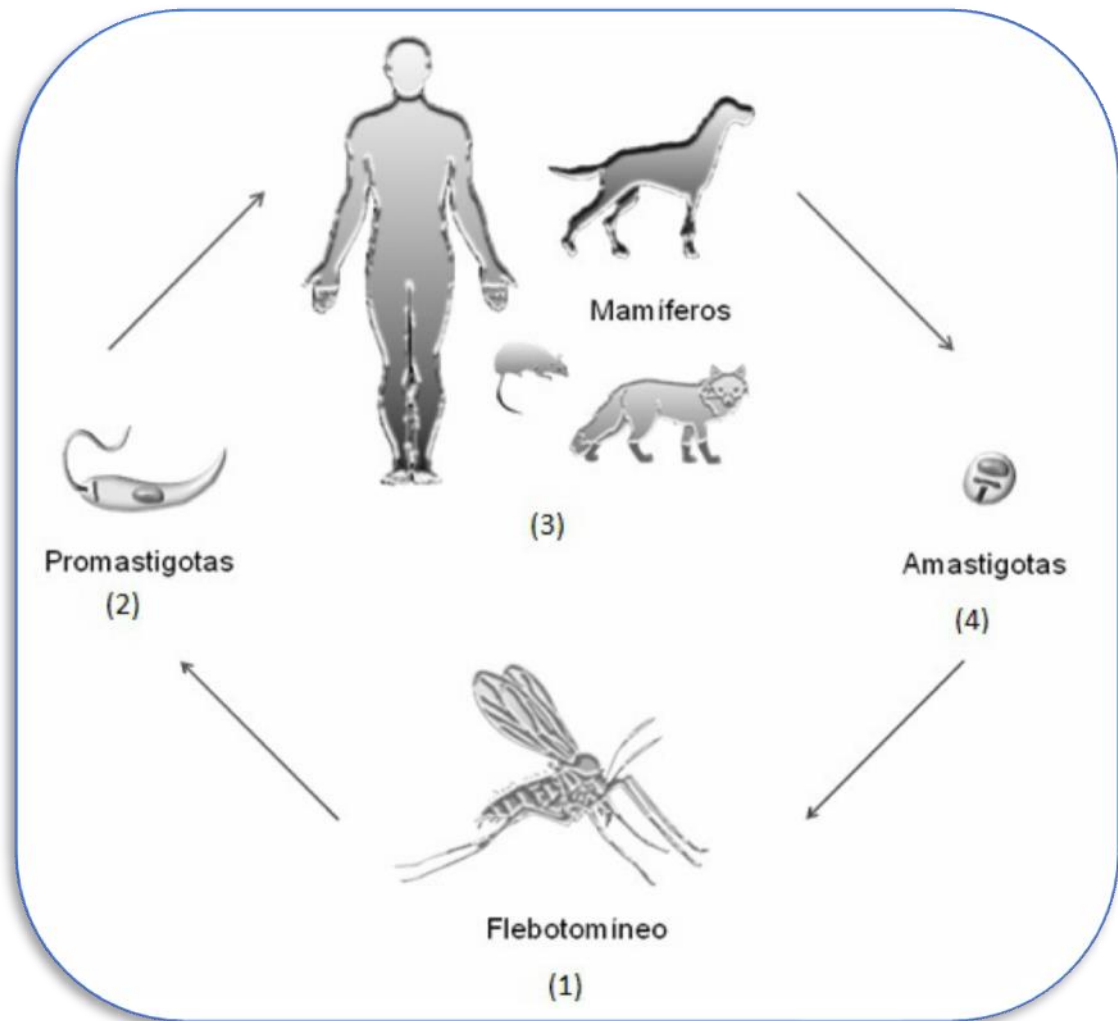


Figura 1: Ciclo de vida do gênero *Leishmania*. Os parasitos deste gênero são transmitidos durante o repasto sanguíneo das fêmeas de flebótomos (1) infectadas com as formas promastigotas (2). Os principais hospedeiros são mamíferos (3), principalmente roedores, canídeos e humanos. Nos hospedeiros vertebrados, os promastigotas infectam as células do sistema fagocítico mononucleares onde se diferenciam em amastigotas (4).

1.5. Visão Geral dos Fatores de virulência

Os fatores de virulência são características que conferem ao parasito a capacidade de invadir e sobreviver em um hospedeiro (Casadevall & Pirofski, 1999; Chang *et al.*, 2003). De forma geral, a virulência de *Leishmania* spp pode ser modulada por fatores ambientais e genéticos relacionados aos hospedeiros mamíferos e vetores (Rivas *et al.*, 2004). Estes parasitos possuem a capacidade de controlar ou subverter a ação de diversos componentes do sistema imune de seus hospedeiros uma vez que apresentam proteínas, conjugada a lipídios e/ou açúcares e enzimas voltadas para suas interações com o hospedeiro (Alves *et al.*, 2014).

Dentre os fatores de virulência que têm suas ações descritas durante o ciclo destes parasitos destacam-se a glicoproteína de superfície principal (gp63), o lipofosofoglicano (LPG), ecto-ATPases, a proteína KMP-11, Proteína A2 e as proteases (Mendonça *et al.*, 1991; Tolson *et al.*, 1994; Berberich *et al.*, 1997; Beverley & Turco, 1998; Matlashewski, 2001; Zambrano-Villa *et al.*, 2002; Maioli *et al.*, 2004; Degrossoli *et al.*, 2007).

As ecto-ATPases, presentes em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* atuam degradando o ATP produzido durante dano tecidual em ADP e posteriormente em AMP, o qual seria convertido em adenosina. Esta, por sua vez teria papel antiinflamatório na infecção por diminuir a produção de citocinas inflamatórias e estimular a liberação de IL-10 (Maioli *et al.*, 2004).

A proteína KMP-11 é uma potente indutora da produção de IL-10 (Azeredo-Coutinho, 2008), pode induzir a produção de IL-4 (Jensen *et al.*, 1998). Quando diminuída promove perda de virulência do parasito (Mukhopadhyay *et al.*, 1998), podendo desta forma ser considerada como um fator de virulência.

Há descrições de que a gp63 e o LPG apresentam ações complementares, através da ativação de proteína quinase C, ocasionando a inibição da explosão respiratória, promovendo assim a sobrevivência do parasito no interior da célula (Zambrano-Villa *et al.*, 2002). A gp63 apresenta atividade de proteção dos parasitos contra a ação de enzimas do intestino médio nos insetos vetores e dos fagolisossomas de macrófagos e fatores do sistema complemento no hospedeiro mamífero. Já o LPG, conhecido como o mais abundante componente da

superfície de promastigotas, ao sofrer alteração em sua glicosilação, promove o aumento da infectividade destes parasitos (Beverley & Turco, 1998), desempenhando, ainda, papéis na fagocitose dos promastigotas por macrófagos e na proteção do parasito contra os processos de lise celular no interior destes.

Destacam-se também as proteases de superfície com importantes atuações no hospedeiro mamífero, como nas funções de macrófagos, e no inseto vetor, como proteger os promastigotas da ação de proteases do inseto. Estas proteases são fundamentais na interação parasito-hospedeiro, favorecendo o sucesso da infecção. (Tabela II)

Tabela II: Principais fatores de virulência em *Leishmania* spp. e suas atuações nos hospedeiros.

Componentes	Função
LPG	Ligante de macrófagos; Inibe a atividade da PKC de macrófagos; Em metacíclicos: (a) inibe a formação do complexo de ataque a membrana; e (b) ativa complemento proporcionando a ligação ao macrófago via C3bi; Atua na resposta imune inata via células NK e células dendríticas através do receptor <i>toll-like 2</i> e pelo aumento de INF- γ e TNF- α ; Fixa promastigotas procíclicas ao epitélio intestinal do inseto
GIPLs	Inibe síntese de óxido nítrico em macrófagos; Inibe atividade de PKC; Influencia a taxa de infecção de macrófagos;
Proteínas e enzimas:	
KMP-11	Imunomodulação
HASP	Imunomodulação
Amastina	Invasão e multiplicação intracelular
Receptor de adenil ciclase	Indução de mudança de estágio de promastigota a amastigota e Induz a mudança de estágio de amastigota a promastigota
gp46/M-2	FNd
PPG	mPPG - Ligante de receptores de macrófagos e ligante de células do tubo digestório do inseto
	aPPG - contribuir para manutenção do vacúolo parasitóforo
	aPPG - ativa complemento via proteína ligadora de manose
	fPPG – dificulta ingestão de alimento do flebótomo
AcPs	MAcPs/SAcPs - interferem na produção de metabólitos oxidativos (H ₂ O ₂ , OH ⁻ , O ²⁻)
3'-nucleotidase e 5'-nucleotidase	Papel nutricional – hidrólise de nucleotídeos a ácidos nucléicos (3'-AMP e 5'-AMP)
Ca ²⁺ - ATPase	Manutenção dos níveis de Ca ²⁺ citoplasmático e do fagossomo; Manutenção dos níveis de Ca ²⁺ citoplasmático nos promastigotas
Mg ²⁺ - ATPases	Função de bomba de extrusão de H ⁺ ; Acumulação de glicose e potássio Pré-adaptação dos promastigotas no macrófago
Metaloproteinase	Hidrólise e inativação de imunoglobulinas G; Inativação do fator C3b em C3bi do complemento; Adesão e interiorização nos macrófagos; Protege os promastigotas da ação de tripsina e quimiotripsina do intestino do inseto;
Cisteína proteinase	Imunorregulador na leishmaniose cutânea: com atividade enzimática sobre componentes do sistema imune e pela atuação da região C-terminal na indução resposta Th2.
PLH	Ligação dos promastigotas aos macrófagos; Ligação dos promastigotas ao trato digestório de flebótomos

Tabela adaptada (Alves *et al.*, 2014)

1.6. Proteinases como fator de virulência em *Leishmania* spp.

As proteases de *Leishmania* spp. são estudadas há mais de quatro décadas (Coombs, 1982). Sua importância vem sendo confirmada através da descoberta dos inibidores específicos de proteases que têm capacidade de eliminar o parasito e ainda reduzir a progressão da lesão (Pereira *et al.*, 2014). Estas enzimas possuem um papel crucial na interação parasito-hospedeiro, atuando na modulação do sistema imunológico, na invasão e destruição dos tecidos e células do hospedeiro, auxiliam na disseminação dos parasitos e na aquisição de nutrientes essenciais (Klemba & Goldberg, 2002) que asseguram a sobrevivência do parasito e consequentemente a infecção (Sajid & McKerrow, 2002; Silva- Almeida *et al.*, 2012).

Quatro classes de proteases são amplamente descritas em *Leishmania* spp.: metalo proteinases, cisteína proteinases, aspártico proteinases e serino proteinases (Jaffe & Dwyer, 2003; Mottram *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2005; Guedes *et al.*, 2007; Valdivieso *et al.*, 2007). Além das metalo proteinases como gp63, outras proteinases como serino, aspártico e cisteína proteinase, vem sendo apontadas como potentes fatores de virulência nestes parasitos uma vez que foram relacionadas com a transformação de promastigotas a amastigotas (Silva- Almeida *et al.*, 2012).

Durante o ciclo biológico deste parasito, as formas promastigotas são expostas ao microambiente da derme que é composto por proteínas da matriz extracelular (Rogers, 2012). Em recente publicação foi demonstrado que os parasitos podem interagir com as fibras de colágeno do tipo I remodelando a organização de uma cultura de matriz 3D (Petropolis *et al.*, 2014). O estudo concluiu que pelo menos duas classes de proteases, metalo e cisteína-proteinases, estão envolvidas na degradação das fibras, uma vez que o tratamento com inibidores de proteases reduziu significativamente a invasão e a migração do parasito através da matriz.

As metalo proteinases são as proteínas mais abundantemente expressas na superfície da *Leishmania* (Bouvier *et al.*, 1985; Etges *et al.*, 1985 ;1986; Schlagenhauf *et al.*, 1998). Sua atividade biológica está associada à proteção dos

parasitos contra a ação de enzimas do intestino do inseto vetor e dos fagolisossomos dos macrófagos. Além disso, a gp63 está relacionada com a resistência dos promastigotas a lise mediada pelo Sistema Complemento no hospedeiro mamífero. A presença desta proteinase ativa na superfície do parasito reduz a fixação dos componentes terminais do complemento no parasito, além de aumentar a conversão de C3b na forma inativa C3bi (Yao *et al.*, 2003; Yao C, 2010).

Alguns estudos sobre o efeito direto das metalo-proteinases no sistema imune do mamífero mostram que a gp63 é importante durante a infecção do macrófago e modulação da expressão de citocinas. A redução da expressão de gp63 no parasito promove o aumento da susceptibilidade à lise dependente do Complemento e provoca uma resposta de TH1 ao sítio de inoculação e sua consequente drenagem ao linfonodo (Thiakaki *et al.*, 2006).

As serino proteases (SP) também têm mostrado ação de fator de virulência e influência sobre o sistema imune do hospedeiro durante a infecção, porém diferente da CPB para as cisteína proteinases e a gp63 para as metalo-proteinases, não há uma SP específica que se mostre ser responsável por esses efeitos (Choudhury *et al.*, 2010).

Uma SP de *Leishmania*, Oligopeptidase B (OPB), foi identificada e caracterizada por espectrometria de massa e deleção gênica. Durante a diferenciação dos amastigotas a expressão de OPB é regulada positivamente, favorecendo o revestimento da superfície do parasito com plasminogênio e enolase. Assim, os amastigotas conseguem se replicar sem ser detectados dentro dos macrófagos (Swenerton *et al.*, 2011).

Outra classe de SP, a subtilisina, foi clonada e mostrou a presença de uma tríade catalítica. Quando o gene da SP é removido, a habilidade do parasito de se diferenciar *in vitro* é reduzida. Além disso, a atividade desta SP de *Leishmania* spp é aumentada em amastigotas quando comparado com as promastigotas, sugerindo que esta enzima é importante para o estágio do parasito que habita o hospedeiro vertebrado (Swenerton *et al.*, 2010).

Outra evidência da modulação imunológica mediada por SPs foi observada por meio da imunização com a fração solúvel de proteases isoladas do extrato de

L. (L.) amazonensis que demonstrou um aumento da susceptibilidade de camundongos a uma subsequente infecção experimental. Este efeito foi eliminado pelo pré-tratamento da fração enriquecida de proteases com inibidores de SP, mas não com inibidores de cisteína-proteases (Pinheiro *et al.*, 2005).

1.7. Cisteína proteinases como fatores de virulência

Os fatores de virulência que atuam na adaptação do parasito a seus hospedeiros apontam as cisteína proteinases (CPs) com importantes atividades durante o ciclo biológico do parasito. As CPs de *Leishmania* são agrupadas nas subfamílias das catepsinas B e L, integrantes da família C1 (papaínas), que por sua vez pertence ao clã CA (Robertson & Coombs, 1993; Sakanari *et al.*, 1997). Estudos com a *L. (L.) mexicana* mostram a eficiência do uso de inibidores de CPs para controlar a infecção pode ser uma evidência importante da ação desta proteína durante o estabelecimento da infecção (Selzer *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2014). Estas enzimas estão envolvidas em mecanismos de sobrevivência e multiplicação de amastigotas no interior de macrófagos (North *et al.*, 1990), e também na degradação intracelular de proteínas. As enzimas caracterizam-se pelo seu mecanismo de ação hidrolítica através de um grupamento tiol nucleofílico de um resíduo de cisteína em uma tríade catalítica, e estão presentes em alta concentração nas formas amastigotas com localização em megassomas (Pral *et al.*, 2003) e na superfície celular dos promastigotas (Alves *et al.*, 1993; 2001; 2005; Rebello *et al.*, 2009).

Majoritariamente são estudadas nas diversas espécies de *Leishmania* três tipos de cisteína proteinase: CPA, CPB e CPC. Tais grupos são constituídos por diversas isoformas das enzimas (Robertson & Coombs, 1990) e cada um deles apresenta características que lhes são próprias:

O grupo da CPA é constituído por enzimas da subfamília das catepsinas L. Este grupo caracteriza-se por ser codificado por um gene de cópia única e pela ausência de uma longa extensão COOH-terminal antes de seu processamento final (Mottram *et al.*, 1992; 1998); o grupo da CPB, por sua vez é constituído por enzimas da subfamília das catepsina L e caracteriza-se por uma longa extensão

COOH-terminal nas formas das enzimas antes de seu processamento final. Além disso, as enzimas CPB são expressas por genes com múltiplas cópias, organizados em sequências em tandem. Estas isoformas possuem variações entre suas especificidades por substratos e propriedades catalíticas (Brooks *et al.*, 2001); Já o grupo da CPC constitui-se por enzimas da subfamília das catepsinas B e de forma similar ao grupo CPA é codificado por um gene em cópia única e não apresenta uma extensão COOH-terminal como as enzimas CPB (Bart *et al.*, 1995). Contudo, o seqüenciamento completo do genoma da *L. (L.) major* indicou a existência de diversas outras CPs distintas de CPA, CPB e CPC: encontrou-se genes capazes de codificar 56 CPs distintas, podendo ser organizadas em 13 famílias dentro de 4 clãs (Mottram *et al.*, 2004).

A maioria dos estudos sobre CPs vem sendo realizados com as espécies pertencentes ao complexo *L. (Leishmania) mexicana*, especialmente no modelo de infecção murino. Análises de genes de uma espécie deste complexo, a *L. (L.) mexicana*, indicam a existência de 19 genes distintos codificadores para enzimas CPB. Dois dentre estes genes apresentam expressão predominante em promastigotas metacíclicas, divergindo dos demais (Mottram *et al.*, 1997). Além disso, as pequenas mudanças nestes genes refletem nas diferenças de afinidade por substrato observadas entre as diversas isoformas da CPB (Juliano *et al.*, 2004). Em outra espécie como *L. (L.) pifanoi*, os genes *cys1* e *cys2* que codificam CPs já foram descritos. O gene *cys1* apresenta-se em cópia única, enquanto *cys2* integra uma família repetitiva de genes (indicando-o como codificador de CPB) (Traub-Cseko *et al.*, 1993).

Ainda em outra espécie do mesmo complexo, a *L. (L.) amazonensis* também já foi descrito um gene codificador de CPs: *cys1*, sendo que este apresenta similaridades com a CPA de *L. (L.) mexicana* (Lasakosvitsch *et al.*, 2003). CPs dos três grupos foram descritas em *L. (L.) major* (Mottram *et al.*, 1998) e têm servido como base para a identificação destes mesmos grupos em outras espécies de *Leishmania*, como a *L. (L.) guyanensis* (Pascalis *et al.*, 2003).

Estudos utilizando camundongos BALB/c e cepas de parasitos geneticamente modificadas, através da supressão de genes das enzimas CPA, CPB e CPC (Δcpa , Δcpb e Δcpc) apontaram para efeitos discretos na capacidade infectiva dos parasitos Δcpa e Δcpc , enquanto, os parasitos Δcpb tiveram sua

capacidade infectiva fortemente reduzida, promovendo menos lesões nos camundongos do que os parasitos da cepa selvagem, evidenciando a importância da CPB na virulência da *L. mexicana* (Mottram *et al.*, 1997; Alexander *et al.*, 1998).

Ensaio com parasitos contendo uma combinação de genes de CPs suprimidos (Δ cpa/ Δ cpb) foram realizados para avaliar a existência de uma sinergia entre as CPs, o que poderia contribuir para a virulência de *L. (L.) mexicana*. Os resultados do estudo revelaram que estes mutantes apresentaram nível de infectividade ainda mais baixo em camundongos BALB/c do que as cepas com apenas um dos tipos de CPs suprimidas, indicando a complementariedade destas CPs para a virulência dos parasitos (Alexander *et al.*, 1998).

Dados da literatura apontam que parasitos *Leishmania* utilizam a CPB para subverter diversas funções do sistema imune dos hospedeiros mamíferos, estando tais efeitos melhor descritos também para parasitos do complexo *L. (L.) mexicana*. Esta ação sobre o sistema imune ocorre no sentido de alterar o equilíbrio entre as respostas Th1/Th2, a fim de favorecer o tipo de resposta que é mais vantajoso para a sobrevivência dos parasitos e disseminação da infecção: a resposta Th2 (Alexander & Bryson, 2005).

Estudos sugerem que, por atividade proteolítica, a CPB de *Leishmania (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* cliva MHC classe II no vacúolo parasitóforo do hospedeiro, inibindo a apresentação de antígenos. Desta forma, a resposta imune do hospedeiro poderia ser parcialmente inibida ou conduzida por outros componentes, como MHC classe I (De Souza Leão *et al.*, 1995).

A atividade da CPB sobre o sistema imune de camundongos já foi testada em um sistema sem a presença de infecção por *Leishmania*. Neste caso, uma forma recombinante de CPB, que se apresentava enzimaticamente ativa, foi inoculada subcutaneamente no coxim plantar de camundongos BALB/c. Os resultados indicaram que, mesmo sem parasitos presentes, os animais apresentavam aumento na expressão de IL-4 e IL-5, indicando a organização de uma resposta Th2, e também nos níveis de IgE circulantes. Estes efeitos podem ser parcialmente explicados pela capacidade desta enzima em clivar CD23

(receptor de IgE de baixa afinidade) e CD25 (receptor de IL-2), uma vez que o uso de enzimas recombinantes sem atividade proteolítica não apresentou esses mesmos efeitos (Pollock *et al.*, 2003).

O uso de CPs purificadas e de peptídeos sintéticos derivados destas enzimas de *Leishmania* spp. em ensaios de infecções experimentais pode ser útil na compreensão do balanço entre as respostas de células T auxiliares, podendo levar a um maior entendimento dos fatores que determinam a resistência ou susceptibilidade às infecções por *Leishmania*. Desta forma, como o processamento das CPs, para gerar a forma madura da enzima, prevê a hidrólise da extensão COOH-terminal (Mottram *et al.*, 2004), esse fragmento liberado também pode exercer algum papel na relação entre o parasito e o hospedeiro.

1.8. Região COOH-terminal da CPB

A extensão COOH-terminal, corresponde a uma seqüência com cerca de 100 aminoácidos, conforme descrito anteriormente. A mesma é liberada da CPB, após um processo de hidrólise (Duboise *et al.*, 1994), que ocorre durante o amadurecimento da enzima. Uma vez hidrolisado, este polipeptídeo é secretado para o ambiente extracelular (Traub-Cseko *et al.*, 1993) e pode ser observado no citoplasma de células do hospedeiro (Alves *et al.*, 2005), podendo então, neste ambiente, ser processado e interagir com o sistema imune do hospedeiro, exercendo algum papel na relação parasito-hospedeiro.

A extensão COOH-terminal já foi descrita como sendo altamente imunogênica e com potencial de influenciar a evolução da infecção por *L. (L.) amazonensis* (Alves *et al.*, 2004), por *L. (L.) infantum* (Nakhaee *et al.*, 2004) e por *L. (L.) donovani* (Hide & Bañuls, 2004). Nosso grupo de pesquisa vem estudando a extensão COOH-terminal da CPB, focando em parasitos do complexo *L. (L.) mexicana* como realizado mais recentemente em *L. (V.) amazonensis* (Pereira *et al.*, 2011).

Em um estudo anterior de nosso grupo, foi realizada uma reconstrução tridimensional da extensão COOH-terminal de CPB da *L. amazonensis* pelo uso de técnicas de modelagem molecular. Devido ao alto grau de similaridade desta enzima com as CPs de *Leishmania*, um modelo estrutural de papaína foi

construído *in silico*, combinando um modelo da extensão COOH-terminal, construído a partir das seqüências primárias das extensões COOH-terminal de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) pifanoi*. O modelo final demonstrou a existência de porções organizadas em α -hélice e de porções com estrutura linear, indicando a possibilidade de existência de epítomos lineares de linfócitos T na estrutura do fragmento COOH-terminal, que passou a ser denominado cyspep (Alves *et al.*, 2001).

Um estudo subsequente permitiu a descrição de três seqüências de aminoácidos derivadas das mesmas extensões COOH-terminal de CPB utilizadas no estudo anterior cujas características físico-químicas, como carga elétrica, hidrofobicidade e ponto isoelétrico, as tornavam adequadas para interação com moléculas de antígeno leucocitário humano (HLA – *human leukocyte antigen*) classe II (pI: aminoácidos 361 a 370 VMVEQVICFD; pII: 415-422 VGGGLCFE e pIII: 431-444 PYFLGSIMNTCHYT). Estes peptídeos preditos foram sintetizados e utilizados em ensaios *in vitro* com células mononucleares da circulação periférica de pacientes com leishmaniose e, de fato, demonstraram a capacidade de estimular a proliferação destas células em cultura (Alves *et al.*, 2001).

Os três peptídeos descritos anteriormente (pI, pII e pIII) foram utilizados em ensaios com camundongos BALB/c e CBA infectados por *L. (L.) amazonensis*. Resultados deste estudo mostraram a capacidade de um deles (pI: VMVEQVICFD) em induzir uma resposta imune com perfil Th2 em camundongos BALB/c e com perfil misto Th1/Th2 em camundongos CBA. Os camundongos BALB/c demonstraram aumento das lesões quando vacinados com pI previamente a um desafio de infecção, o que não ocorria em animais da outra linhagem testada. Além disso, enquanto as células de linfonodo de camundongos BALB/c infectados respondiam à incubação *in vitro* com pI aumentando a produção, apenas, de IL-4, as células provenientes de CBA respondiam aumentando a produção de IL-4 e IFN- γ , além de produzirem NO. Entretanto, houve também respostas similares entre as culturas de células das duas linhagens: pI estimulou a proliferação em ambas, sendo os linfócitos T CD8+ o fenótipo predominante (Alves *et al.*, 2004).

Estudos de *docking* molecular, ainda, com os peptídeos preditos por Pereira e colaboradores (2011) indicaram que o modo de interação entre o MHC e

os peptídeos pode estar relacionado com os efeitos imunomoduladores sobre as citocinas, apontando para padrões de interação peptídeos-MHC associados a padrões de indução da expressão de citocinas. Mais estudos precisam ser feitos para compreender o papel da cyspep na sobrevivência e/ou replicação do parasito na célula hospedeira, sendo assim um futuro alvo para o controle da infecção.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Agregar novos conhecimentos sobre a expressão de genes de cisteína proteinase B de *L. (L.) amazonensis* assim como o direcionamento da região COOH-terminal desta enzima.

2.2 Objetivos específicos

1. Obter uma proteína recombinante correspondente à porção COOH-terminal da cisteína proteinase B de *L. (L.) amazonensis* – rcyssep;
2. Investigar a antigenicidade da proteína recombinante rcyssep na infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*;
3. Avaliar a transformação *in vitro* dos promastigotas em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* induzida por choque de temperatura e de pH;
4. Avaliar a expressão gênica da proteína CPB de *L. (L.) amazonensis* durante transformação *in vitro* dos promastigotas em amastigotas.
5. Determinar a distribuição da cyssep em frações de membrana e de flagelo dos promastigotas e dos amastigotas de *L. (L.) amazonensis*;
6. Avaliar se a cyssep pode ser encontrada no sobrenadante de cultivo da *L. (L.) amazonensis*.

3.Material e Métodos

3.1. Cepa utilizada e manutenção do parasito em laboratório

A espécie *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) foi utilizada nesse estudo. Os protozoários foram obtidos da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) e mantidos em meio semi-sólido Novy, McNeal & Nicolle (NNN) e Meio Schneider a 28 °C. Quando necessária a ampliação da massa dos parasitos, os mesmos foram transferidos para o meio líquido BHI suplementado com 10 % de SFB e mantidos a 28°C por 4 dias. Somente promastigotas de até a 4ª passagem semanal foram usadas para infecção experimental dos animais.

A infectividade dos parasitos foi mantida por infecção experimental em camundongos fêmea, entre seis a oito semanas de idade (\pm 22 gramas) das linhagens BALB/c. Os animais experimentais foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz (CECAL/Fiocruz). Nas infecções experimentais os camundongos foram inoculados com 10^6 promastigotas de *L. (L.) amazonensis* suspensos em PBS, no coxim plantar do membro posterior esquerdo de camundongos.

3.2. Infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*

Todos os ensaios com o uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Fiocruz (Licença: L-0006/07). No presente estudo foram utilizados camundongos fêmeas livres de patógenos específicos da linhagem isogênica BALB/c (H-2^d), considerada suscetível à infecção.

Para os ensaios de infecção experimental, camundongos de 5 a 7 semanas de idade (\pm 20 gramas), obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/Fiocruz) foram inoculados subcutaneamente no coxim plantar do membro posterior esquerdo com 10^6 promastigotas infectantes suspensas em PBS (50 μ L – $2,0 \times 10^7$ céls/mL). Para controle dos experimentos um grupo de animais foi inoculado com PBS, pela mesma via. Após a eutanásia dos animais em câmara de CO₂, a coleta do sangue foi realizada por punção cardíaca e este foi centrifugado a 3 000 xg a 10 min.

3.3. Estratégia para diferenciação dos parasitos *in vitro*

Amastigotas de *L. (L.) amazonensis* recém-isolados de camundongo foram recuperados e cultivados em meio Schneider pH 7,2 (suplementado com 10 % de SFB, 200 UI de penicilina, 200 µg/mL de estreptomicina) e mantidos a temperatura de 28 °C por quatro dias, para diferenciação em promastigotas e estabilizar a curva de crescimento. Cerca de 10⁹ promastigotas/mL (10 mL) em fase estacionária (quarto dia) de crescimento foram cultivados em meio Schneider, pH 5,5 (suplementado com 20 % SFB, 200 UI de penicilina, 200 µg/mL de estreptomicina) a 32 °C, choque pH e temperatura (Cysne-Finkelstein *et al.*, 1998) A diferenciação dos promastigotas a amastigotas foram conduzidas em frasco para cultivo de células 25 mL (Corning Culture Flasks – Sigma Aldrich.com) e acompanhada em intervalos de 0,6, 24, 48, 72 e 96 h. Os sobrenadantes destas culturas foram obtidos após centrifugação (3 000 xg, 15 minutos, 4°C), seguido de filtração em membrana milipore (0,22 µm).

3.4. Acompanhamento das etapas de diferenciação

A diferenciação foi seguida por três procedimentos de análise de morfologia: contagem em câmara de Neubauer, citometria de fluxo e microscopia de contraste. Logo após os tempos selecionados da diferenciação, as amostras foram analisadas por contagem em câmara de Neubauer considerando três formas: alongado com flagelo livre, arredondado com flagelo livre e arredondado sem flagelo livre à microscopia optica. Em seguida, as amostras foram lavadas (3 000xg, 15 min, 4°C), ressuspensas e mantidas em 4% PFA em PBS, pH 7,2, por 5 min a 4°C, até as análises em citômetro de fluxo EPICS ALTRA Cell Sorter (Beckman Coulter, FL, EUA).

Em seguida, os parasitos foram corados com 10 µg/mL DAPI, para marcação do DNA. Após 3 lavagens em PBS estes foram aderidos em lamínulas de vidro, previamente recobertas com 1% de poli-L-lisina. As amostras foram montadas em 2,5% de DABCO (Sigma- Aldrich Co., USA) em PBS contendo 50% de glicerol e seladas com esmalte. Posteriormente, as amostras foram visualizadas por contraste interferencial de nomarski (DIC) e microscopia de fluorescência utilizando o microscópio de epifluorescência Zeiss Axio-Imager M1 equipado com o software de processamento de imagem digital AxioVision (Zeiss).

3.5. Citometria de fluxo

Para análise de citometria de fluxo, os parasitos foram processados como descrito acima e analisados utilizando o FACSCalibur, BD Bioscience, USA. As análises foram realizadas adquirindo 40.000 eventos totais para cada amostra referente a 0, 48, 72 e 96h. A determinação e análise da população de interesse foram realizadas utilizando os parâmetros morfológicos (tamanho e granulosidade). Os dados obtidos no citômetro de fluxo foram analisados utilizando o programa CellQuest versão 4.2 (Becton & Dickinson).

3.6. Fracionamento subcelular de *Leishmania (L.) amazonensis*

As frações enriquecidas com membrana e com flagelo dos promastigotas e amastigotas foram obtidas usando os procedimentos descritos previamente (Cortês *et al.*, 2011; 2012). Cerca de 10^{10} parasitos (promastigotas /amastigotas) /mL foram ressuspensos em solução tampão (1 M NaCl, 0,2 M $K_2 HPO_4$, 0,5 M $MgCl_2$ pH 7,2) e centrifugado (3 500 xg, 10 minutos, 4 °C). O precipitado resultante foi ressuspensão no tampão (10 mM Tris-HCl pH 7,5 ,50 mM de sacarose) e lisado com 1% de Triton X-100. As condições isotônicas foram restabelecidas com adição de 0,5 M sacarose e centrifugado (3 000 xg, 3 minutos, 4 °C). Para obter a fração de flagelo (FF), os sobrenadantes (S1) foram centrifugados duas vezes (5. 000 xg, 10 minutos, 4°C) e os dois precipitados foram fracionados em 25% de sacarose (10. 000 xg, 15minutos, 4°C) e mantidos em tampão de solubilização (PBS pH 7,2 com 0,5% CHAPS). Para obter a fração de membrana (FM), o S1 foi centrifugado (12 000xg, 30 min, 4°C) e o *pellet* mantido em tampão de solubilização tampão fosfato de sódio pH 7,2. As amostras utilizadas para este ensaio são referentes aos pontos 0 e 96 h da diferenciação.

3.7. Clonagem, expressão e purificação da região COOH-terminal da CPB de *L. (L.) amazonensis* em *Escherichia coli*

O fragmento de 264 pb correspondente à porção COOH-terminal da CPB de *L. (L.) amazonensis* (rcyspep) foi clonado no vetor pUC57 no sitio da endonuclease EcoRV e subclonado no vetor pET-28a(+) (GenScript USA Inc.) entre os sítios de BamHI-NotI. Este sistema utilizou a cepa de *E. coli* – BL21 que é protease deficiente produzindo uma proteína recombinante de cerca de 14 kDa. A rcysPep foi purificada em resina Ni-NTA (Quiagen Brasil) e analisada por ensaios de eletroforese e western blot.

3.8. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método de Lowry e colaboradores. (1951), usando albumina de soro bovino como padrão.

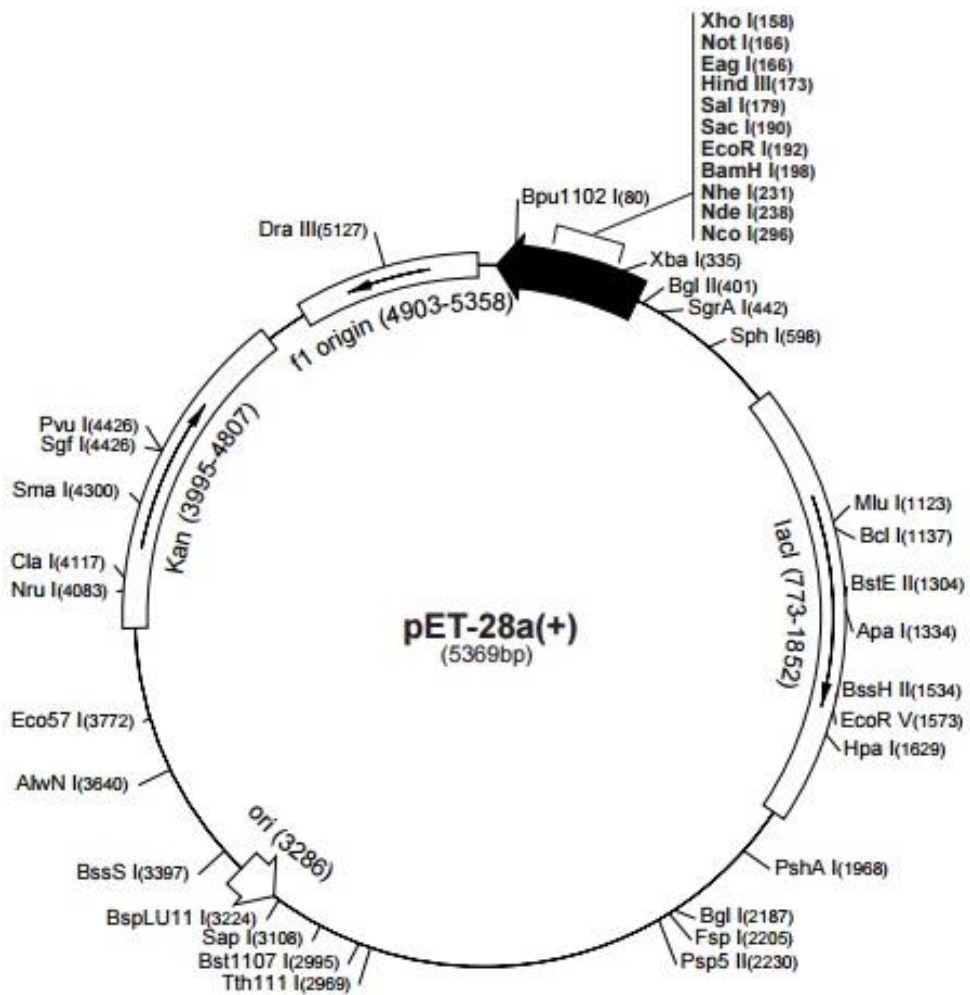


Figura 2 – Ilustração representativa do vetor pET-28a(+) (Genescript), utilizado nos ensaios de expressão da extensão COOH-terminal da CPB de *L. (L.) amazonensis*.

3.9. Obtenção de anti-soro rcyspep

Anticorpo policlonal contra a rcyspep foi produzido em três camundongos da linhagem isogênica BALB/c (H-2^d). Os mesmos foram submetidos a inoculações semanais sucessivas (100 µg cada) durante quatro semanas. A via de inoculação foi subcutânea dorsal: a primeira inoculação foi realizada com 100 µg de proteína com adjuvante de Freund completo, a segunda foi realizada com 100 µg de proteína com adjuvante de Freund incompleto, a terceira e a quarta inoculação foram realizadas com 100 µg de proteína, cada. As inoculações foram conduzidas com seringas de 1 mL e agulhas 25x7 descartáveis. A assepsia das áreas de inoculação foi feita com álcool a 70%. Após a eutanásia dos animais em câmara de CO₂, a coleta do sangue foi realizada por punção cardíaca e foi centrifugado a 3 000 xg a 10 min (Alves *et al.*, 2004).

3.10. Purificação de imunoglobulinas G de camundongo

As imunoglobulinas G (IgG) foram purificadas por cromatografia de afinidade. Os soros de camundongo, pré e pós-imunização com rcyspep, foram submetidos à cromatografia em coluna de Proteína A-Sepharose (BioVision's) previamente equilibrada com tampão de ligação (PBS contendo 50 mM de borato de sódio, pH 8.0). As IgGs ligadas à Proteína A foram eluídas da coluna usando tampão de eluição (0.1 M Ácido cítrico, pH 2.75), e posteriormente dialisadas com PBS e concentradas utilizando um dispositivo de filtro Centriprep.

3.11. Imuno-ensaio Enzimático

Para o imuno-ensaio enzimático (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay* - ELISA), placas de microtitulação de poliestireno (96 poços, Corning Costar 3590, USA) foram sensibilizadas com 100µL (0,5µg/poço) da rcyspep em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6), por 16 horas, a 4°C. Posteriormente os poços da placa foram lavados (3X) com tampão de lavagem (0,01M de tampão fosfato, pH7,4; 0,15M de cloreto de sódio; e 0,05% de Tween: PBS-T) e incubados (2 horas, 25^oC) com 200µL tampão de bloqueio (PBS-T contendo 5% de leite desnatado). As placas foram lavadas com PBS-T e incubadas (1 h, 25^oC) com 100µL de diluições seriadas do soro anti-rcyspep produzido em camundongo. Após novo ciclo de lavagem em PBS-T, os poços foram incubados (1 hora, 25^oC) com proteína A conjugada a peroxidase. Posteriormente, o reconhecimento

antigênico foi detectado com um tampão citrato-fosfato (0,2M de citrato de sódio e 0,1M de fosfato de sódio, pH 5,1), contendo 0,4mg/mL de OPD e 0,03% de peróxido de hidrogênio, por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ e as densidades óticas foram medidas em leitor de ELISA (Anthos 2010, Austria) com filtro de 492 nm (Pereira, 2001).

3.12. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

Os ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) foram realizados em condições redutoras, utilizando o procedimento descrito por (Laemmli, 1970). Para estes ensaios as amostras de proteínas foram previamente tratadas com tampão da amostra (80 mM Tris HCl, pH 6,8; 2 % SDS (p/v); 12 % glicerol (v/v); 5 % β-mercaptoetanol (v/v) e 0,05 % azul de bromofenol (p/v) e fervidas por 3 minutos. Após a eletroforese (150V a 15mA), as proteínas foram reveladas pelo método de impregnação pela prata (Proteo Silver™ Silver Stain kit – Sigma- Aldrich Co., USA). Como marcador de massa molecular foi usado o kit *full-range rainbow™*, 12 a 225 kDa (RPN800E; GE Healthcare Lifes Sciences).

Nestes ensaios, proteínas solúveis das amostras das etapas de purificação da rcyspep, foram previamente resolvidos por SDS-PAGE e eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose. Após incubação (4 horas, 4 C) com tampão bloqueio (PBS pH 7,2 acrescidos de 0,5 % de Tween 20 e 5 % de leite desnatado), as membranas foram incubadas (16 hora, 4°C) com anticorpo primário (anti-cauda de histidina). Posteriormente, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS pH 7,2 contendo 0,05% de Tween 20) e seguindo-se a outra incubação (1 hora, 25 °C) com anti-IgG de camundongo conjugada a peroxidase (1:3000). Após mais uma etapa de lavagem das membranas, os complexos imunes foram revelados por quimioluminescência, usando o Kit SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

3.13. Ensaios de Ressonância plasmônica de superfície (SPR)

Esses ensaios foram realizados para quantificar as cyspep produzidas no sobrenadante de cultivo e nas frações de membrana e flagelo das formas

amastigotas e promastigotas. As análises foram feitas com um *sensor chip* de superfície carboxilada, no qual foi adsorvido 0,5 µg de IgG anti-rcyssep purificada, usando a metodologia de acoplamento EDC/NHS, em um fluxo contínuo de 10 µL/min. Primeiramente, foi construída uma curva de calibração com diferentes concentrações de rcyssep (0,01 -100 µg). Em seguida, diferentes concentrações (0,01 -100 µg) da cyssep do sobrenadante do cultivo, fração de membrana e fração de flagelo foram submetidas a interação com a IgG anti-rcyssep previamente imobilizada no chip. Como controle negativo foram utilizadas as mesmas concentrações de BSA (0,01 µg - 100 µg). Todas as análises foram avaliadas em um fluxo de 5 µL/min. Adicionalmente, foram realizados ensaios para avaliar ligação E-64 às proteínas complexada à IgG anti-rcyssep. Diferentes concentrações dos E-64 (0,001µM - 10µM) foram submetidas a um segundo ciclo de interação logo após a etapa de captura da rcyssep e/ou as proteínas do parasito.

Nos ensaios de SPR, as interações ocorreram em presença de solução tampão 10 mM fosfato pH 7.4 (volume total de 100 µL com fluxo de 10 µL/min). Após cada ciclo de interação o chip foi submetido a um ciclo de regeneração com tampão 0,2 M glicina pH 3,0 (volume total de 200 µL com fluxo de 50 µL/min) seguido de um ciclo de equilíbrio com tampão fosfato (10 mM fosfato pH 7.4; total de 200 µL com fluxo de 10 µL/min).

Os ensaios foram registrados em um sensorgrama, sendo conduzidos em um biosensor de transdução óptica SensiQ® Pioneer (Nomadics, Lnc. an ICx company). A taxa inicial de interação foi calculada e determinada as constantes cinéticas de formação de complexos. As taxas de associação e dissociação para a formação de complexos foram calculadas com base na análise dos gráficos sensorgrama obtidos nos ensaios. Os valores cinéticos foram obtidos após análise de ensaios SPR utilizando software Qdat (ICX Nomadics, USA).

3.14. Extração do RNA total de *L.(L.) amazonensis*

As amostras referentes a cada ponto (0, 6, 24, 48, 72 e 96 h) da diferenciação da forma promastigota para a amastigota de *L. (L.) amazonensis* foram recolhidas em Trizol (Invitrogen, LifeTechnologies, EUA) e conservadas a -70 °C até o momento da extração de RNA total.

O protocolo do Trizol foi modificado e adaptado para o uso de um kit de extração de RNA comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen). Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas em Trizol então misturados com clorofórmio puro (Merck, Brasil) na proporção de 1:5, agitadas vigorosamente por 20s e incubadas por 3 min à temperatura ambiente, sendo então centrifugadas (10.000 xg, 18min, 4°C) para permitir a separação de fases.

A fase superior, aquosa, foi reservada, adicionada a etanol 100% (Merck, Brasil) na proporção de 1:1 e homogeneizada imediatamente com a pipeta, 700µL da mistura foram transferidos para uma coluna *RNeasy* acoplada a um tubo coletor de 2mL e centrifugado (8000 xg, 1min, 4°C). O filtrado foi descartado, 700µL do tampão RW1 foi adicionado à coluna seguido de centrifugação (8000 xg, 1min, 4°C), o filtrado foi descartado. Adicionou-se à coluna 500µL de tampão RPE e centrifugou-se (8 000 xg, 1min, 4°C), o filtrado foi novamente descartado. Foram adicionados 500µL de tampão RPE à coluna, seguido de centrifugação (8000 xg, 2min, 4°C) e descarte do filtrado. Acoplou-se a coluna a um novo tubo e foi centrifugado novamente (8 000 xg, 1min, 4°C) para secar a membrana. Finalmente, com um novo tubo de 1,5mL, foi adicionado 30µL de H₂O livre de RNase à coluna no centro da membrana seguido de centrifugação (8000 xg, 1min, 4°C) para eluir o RNA. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e imediatamente armazenado a -80°C. Uma alíquota de 3µL foi retirada para dosar o RNA em um espectrofotômetro para microvolumes (Nanodrop, Nova Analítica). O rendimento da extração foi calculado pela absorbância a 260nm. A pureza foi determinada calculando a razão das absorbâncias a 260/280nm, o RNA puro possui esta razão entre 1,8 e 2,0.

3.15. Tratamento do RNA com DNase

Antes da síntese de cDNA as amostras de RNA foram tratadas com *DNase I, Amplification Grade* (Invitrogen, Life Technologies, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, a um tubo de 0,5mL livre de RNase foi adicionado 1µg da amostra de RNA, 1µL de tampão de reação (10X) e 1µL DNase I, Amp Grade (1U/µL) e 10µL de água tratada com DEPC. Foram preparados dois tubos, um não foi tratado com transcriptase reversa. Foi misturado gentilmente e incubado por 20min em temperatura ambiente, seguido

da adição de 1 µL de solução de EDTA (25mM) e aquecida a 65°C por 10min e posteriormente resfriado em gelo para síntese do cDNA.

3.16. Síntese de cDNA a partir das amostras de RNA

Para a síntese de cDNA foi realizada reação de transcriptase reversa (RT – *reverse transcriptase*), com o kit *SuperScript III first-strand cDNA synthesis for reverse transcriptase-PCR* (Invitrogen, Life Technologies, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, alíquotas de 20 µL das misturas de RT [constituídas por 2,5 ng/µL de iniciadores hexaméricos aleatórios, 0,5 mM de solução de dNTPs, tampão de RT a 1x, 5mM de MgCl₂, 0.01 M de ditioneitol (DTT), 2 U/µL da enzima *RNase OUT*, 10 U/µL da enzima *SuperScript II RT* e 5µg de amostra de RNA total em água tratada com DEPC] foram incubadas na seguinte sequência: 25°C por 10min, 50°C por 50min, 85°C por 5min e, enfim, resfriadas em banho de gelo. Adicionou-se então 2U da enzima *RNase H* a cada alíquota, que foram incubadas a 37°C por 20min e, então, armazenadas a -20°C até uso nos ensaios de PCR. A quantidade de cDNA das preparações foi determinada usando o kit *Qubit® ssDNA Assay* (Qubit® Fluorometric Quantitation, Life Technologies).

3.17. PCR convencional

Ensaio de PCR convencional foram realizados para se definir aplicabilidade dos iniciadores selecionados com as amostras selecionadas para análise. Os iniciadores utilizados foram proteína S8 do ribossomo 40S (Silva-Almeida, 2014), GAPDH (Condello *et al.*, 2015) e Cisteína Proteinase B (Pereira *et al.*, 2012), previamente avaliados em publicações anteriores.

Para a realização desses ensaios foram utilizadas misturas de PCR constituídas por: tampão para PCR Platinum Taq (Invitrogen, Life Technologies, EUA) a 1x, 4 mM de MgCl₂ (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA), 0,2 mM de solução de dNTPs (Invitrogen, Life Technologies, EUA), 4 ng/µL do par de iniciadores e 0,025 UI/µL da enzima Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies, EUA) em q.s.p. 45 µL de água tratada com DEPC.

A estas misturas foram adicionados 5 μL de cada amostra de cDNA (nãodiluídas ou diluídas 1:50 em água tratada com DEPC) no momento dos ensaios de PCR. As amostras foram ensaiadas em duplicata em cada experimento.

As condições estabelecidas para os ensaios de PCR foram: etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 3 min (1 ciclo); 40 ciclos de: desnaturação (95 °C por 20 seg), hibridização (56 °C por 30 seg) e extensão (72 °C por 30 seg); e, uma etapa final de extensão a 72 °C por 5 min. Os ensaios de PCR foram realizados utilizando-se um termociclador Mastercycler (Eppendorf International, EUA).

Após as PCR, os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado por Nancy-520 (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA) e, então, fotografados utilizando-se o sistema de foto documentação EasyDoc 100 (Bioagency Biotecnologia, Brasil).

3.18. Ensaios de PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados em um termociclador 7500 Fast Real Time PCR System e analisados pelo uso dos softwares SDS 7500 v. 2.3 e Exxpression Suite v 1.0.3 (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA). Para a realização desses ensaios foram compostas misturas de PCR em tempo real (10 μL) constituídas de mix 'SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) a 1x e 0.4 μM do par de iniciadores em água tratada com DEPC. A estas misturas foram adicionados 2,5 μL das amostras de cDNA (diluídas em água tratada com DEPC a 3,5 ng/ μL). As amostras foram ensaiadas em triplicata em cada experimento.

As condições de termociclagem utilizadas nos ensaios de PCR em tempo real foram similares às condições estabelecidas nos ensaios de PCR convencional, com as condições padrão do software SDS 7500 sendo mantidas para as curvas de dissociação.

Ao final de cada ensaio, foi executada uma etapa de construção de curva de dissociação dos produtos (*continous melting curve*), a fim de se verificar a especificidade da amplificação no ensaio. Durante os ciclos de amplificação, os dados de fluorescência foram coletados durante a etapa de extensão (72 °C).

A eficiência dos ensaios de PCR em tempo real, para cada combinação de amostras e pares de iniciadores, foi determinada pela análise de curvas de diluição seriada (1:10) das amostras de cDNA. Amostras de cDNA de promastigotas na fase logarítmica da cepa de origem *L. (L.) amazonensis*, foram utilizadas para a determinação das curvas de amplificação dos iniciadores de *Leishmania*.

O valor do ciclo de limiar da fluorescência (Ct - *threshold cycle*) foi obtido e aplicado em um gráfico de semi-log (escala log 10) para o cálculo dos valores de coeficiente angular (slope) e de determinação (R²). Somente experimentos cujas linhas de tendência apresentavam R² ≥ 0,98 foram utilizados nas análises de eficiência.

Para o cálculo da eficiência da amplificação (E), a seguinte fórmula foi utilizada:

$$E = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$$

Os valores de eficiência calculados foram utilizados para ajustar os valores de Ct das amostras analisadas nos ensaios de cinética de expressão ao longo da infecção pela seguinte fórmula (Hellemans *et al.*, 2014):

$$Ct_{E=100\%} = Ct_{E=X\%} \times [\log(1 + E) / \log 2]$$

3.19. Determinação da expressão relativa de genes

O método do Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$) foi utilizado para determinar os níveis de expressão do gene da CPB. O calibrador utilizado para a análise da expressão dos genes de *Leishmania* foi a amostra de cDNA de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* no tempo “0” da diferenciação fase estacionária.

Os controles endógenos (genes de referência) utilizados foram genes de GAPDH e a proteína S8 do ribossomo 40S. Os valores de quantidade relativa ou níveis de expressão normalizados (RQ) foram calculados com o auxílio do

software SDS 7500, e foram obtidos da média geométrica dos genes de referência.

3.20. Análise dos dados

Durante este estudo os dados quantitativos foram apresentados na forma de média \pm desvio padrão. A confiabilidade dos dados de SPR foi confirmada por regressão linear considerando as concentrações de proteínas e do E-64 testados, para definir os coeficientes de resposta no sensor (R^2). Com este procedimento também foram obtidos os valores da quantidade de proteína necessária para a saturação do chip (RU_{max}) e a quantidade de proteínas necessária para atingir $\frac{1}{2}$ RU_{max} , constante de saturação (K_{sat}).

4.Resultados

4.1. Obtenção da rcyspep e produção de IgG de camundongo anti-rcyspep

O processo de obtenção da proteína recombinante rcyspep precedeu a uma etapa inicial na qual a clonagem do inserto correspondente a região a COOH-terminal da cisteína proteinase B de *L. (L.) amazonensis* no vetor pET28a (+) foi realizada pela empresa GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ, USA). Após a indução da expressão protéica das bactérias transformadas com os plasmídeos recombinantes (rcyspep-pET28a), o extrato celular total das mesmas foi analisado por *immunoblot* indicando a presença da proteína rcyspep nas preparações solúveis das colônias selecionadas (Figura 3). A proteína rcyspep de aproximadamente 14 k Da foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel a partir desta fração solúvel, como indicado pela coloração por impregnação pela prata e *immunoblot* com anticorpo anti-cauda de histidina (Figura 3).

Na continuidade desta etapa do estudo investimos na produção de soros hiperimunes contendo anticorpos policlonais específicos IgG anti-cyspep, em camundongos BALB/c. O esquema de imunização assumido neste trabalho proporcionou preparações de soros capazes de detectar a rcyspep em ensaio de ELISA (Figura 4). Adicionalmente, as IgGs foram purificadas destas preparações de soro, por coluna de afinidade. Ambas as preparações, soro e IgG purificada, foram utilizadas nos ensaios de reconhecimento imunológico deste trabalho.

4.2. Antigenicidade do rcyspep frente a soros de camundongos infectados por *L. (L.) amazonensis*

Em um estudo adicional a este trabalho, foi possível a avaliar o potencial antigênico da rcyspep durante a infecção experimental em camundongos BALB/c ao longo de 18 semanas de infecção (Figura 5). Os soros dos camundongos não-infectados foram utilizados como controle para determinar a linha de base dos testes de ELISA. Os nossos resultados indicam que, durante a infecção dos camundongos ocorre uma resposta imune humoral contra a rcyspep quando comparado com animais controle ($p < 0,05$). O alto título de IgG detectado ao longo do tempo da infecção é um indicativo de que a resposta humoral contra rcyspep permanece ativa mesmo na fase crônica da infecção. Além disso, estes resultados indicam a conservação dos motivos antigênicos relacionados com linfócitos B na rcyspep, que foi expressa num sistema procariótico.

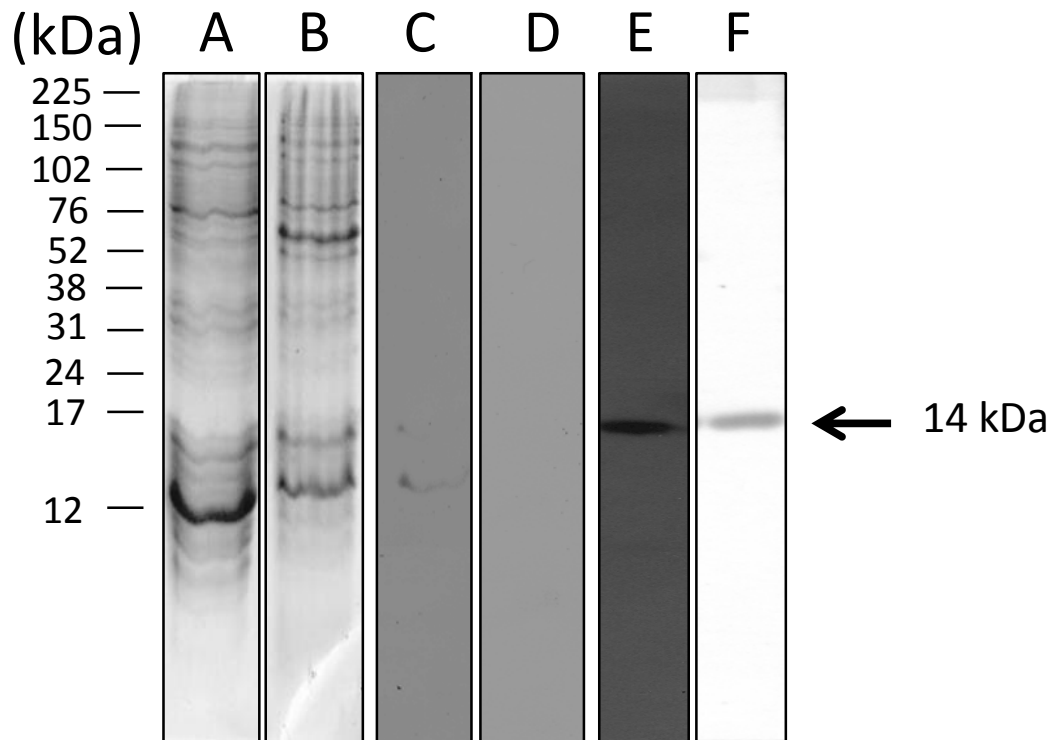


Figura 3: Purificação da porção COOH-terminal da CPB de *L. (L.) amazonensis*. As etapas de purificação da proteína rcyssep foram resolvidas por SDS-PAGE e reveladas por Comassie blue (A e B), *western blot* (C, D e E) e pela prata (F). Durante a purificação, a proteína de 14 kDa foi detectada na fração solúvel do tampão de extração (A e C) e após eluída da coluna de Ni-NTA (E e F). Os ensaios de *western blot* com o anticorpo policlonal anti-His 1:3.000, indicaram que a proteína eluída contém cauda de histidina, o que confirma a purificação da rcyssep. Os marcadores de massa molecular estão indicados à esquerda (kDa). Estes resultados são representativos de quadro experimentos independentes.

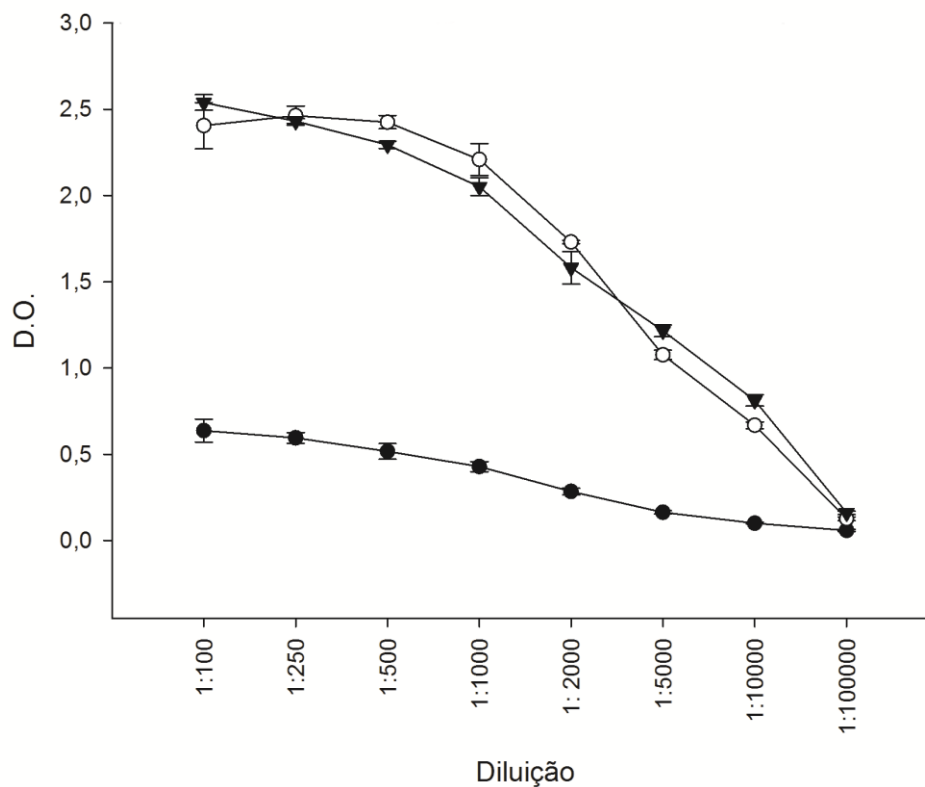


Figura 4: Titulação do anticorpo IgG anti-rcyspep produzidos em camundongos BALB/c. O título do anticorpo foi determinado por ELISA a partir de amostras de soro de três camundongos BALB/c previamente inoculados com 100 µg de rcyspep cada: animal 1 (●), animal 2 (○) e animal 3. A avaliação foi realizada ao final da 4ª semana de inoculação. A reatividade das diferentes diluições dos soros (abscissa) foi determinada após detecção do complexo imune com anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase. A densidade ótica (DO) foi medida a 490nm. Os resultados correspondem a média e ao desvio padrão das triplicatas de um ensaio.

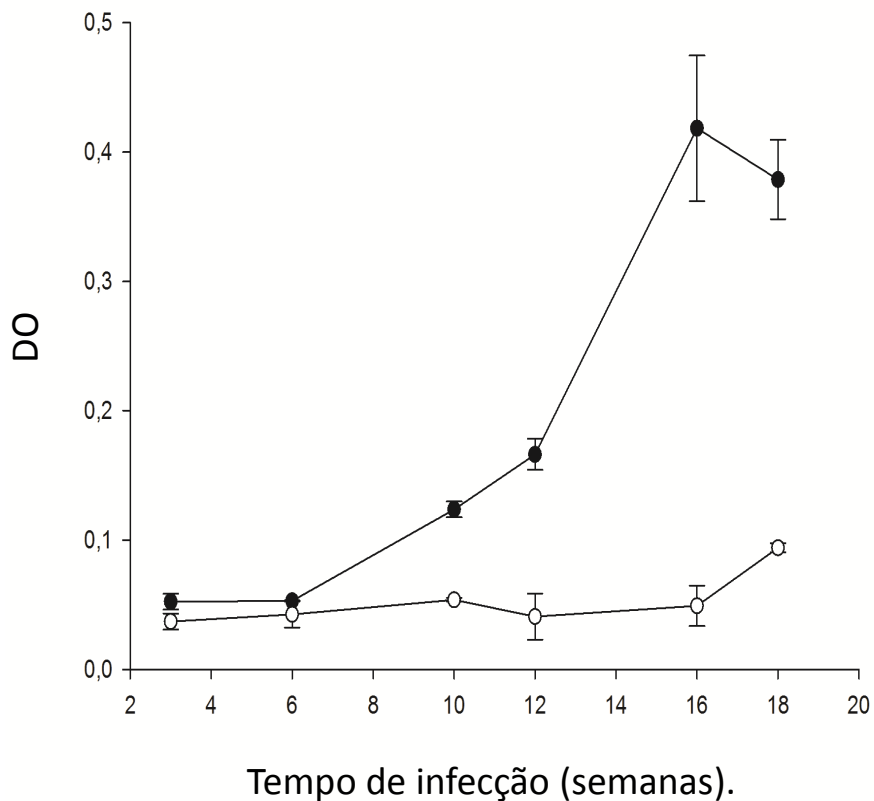


Figura 5: Detecção de anticorpo anti-cyspep no soro de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Soros de 3 camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* foram utilizados para avaliar a antigenicidade contra cyspep ao longo da infecção (semanas). Foram realizados testes de ELISA em placas de 96 poços previamente sensibilizadas com rcyspep (5 µg/poço). Após incubação dos soros (1:250) de animais infectados (●) ou não (○) com *L. (L.) amazonensis*, o complexo imune foi revelado com anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. Os dados indicam que durante a infecção os camundongos desencadeiam uma resposta imune humoral contra a rcyspep com produção de IgG. O sinal de detecção de IgG aumenta a medida que a lesão plantar aumenta. Neste ensaio a densidade óptica (DO) foi medida a 490 nm. Estes resultados correspondem à média das triplicatas de um ensaio.

4.3. Diferenciação *in vitro* dos promastigotas em amastigotas

A diferenciação do parasito foi observada durante 96 horas por contagem diferencial dos mesmos, por microscopia. Nestas análises foi possível constatar três padrões morfológicos predominantes durante a diferenciação: formas alongadas com flagelo livre, arredondados com flagelo e arredondadas sem flagelo. Os resultados indicaram uma tendência de mudança morfológica caracterizada pelo arredondamento e posterior desaparecimento do flagelo dos parasitos em 96 horas de incubação, nas condições de diferenciação adotadas neste estudo. Os dados quantitativos e qualitativos deste achado estão representados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

Adicionalmente preparações de parasitos das etapas da diferenciação foram analisadas por citometria de fluxo. Considerando os parâmetros de tamanho (FSC - *Forward Angle Light Scatter*) e granulosidade (SSC - *side scatter*), que se correlaciona com a morfologia dos parasitos (Figura 8), foi possível confirmar a gradativa mudança do padrão morfológico das formas alongadas (promastigotas) em formas arredondadas (amastigotas). Nossos dados apontam que ao longo do tempo de incubação dos parasitos, nas condições para diferenciação, há uma migração gradual da população de parasitos da região na R1 e para região R2 do *dotplot* indicando uma diminuição no tamanho e aumento da granulosidade celular. Desta forma, detectamos a predominância de uma população com 60,4% das formas apresentando menor tamanho e maior granulosidade (região R2) em 96 horas de incubação quando comparado com a quantidade de 43,0% da população com tamanho e a granulosidade localizados na região R1 não submetidos à diferenciação, promastigotas da fase estacionária de crescimento em cultura.

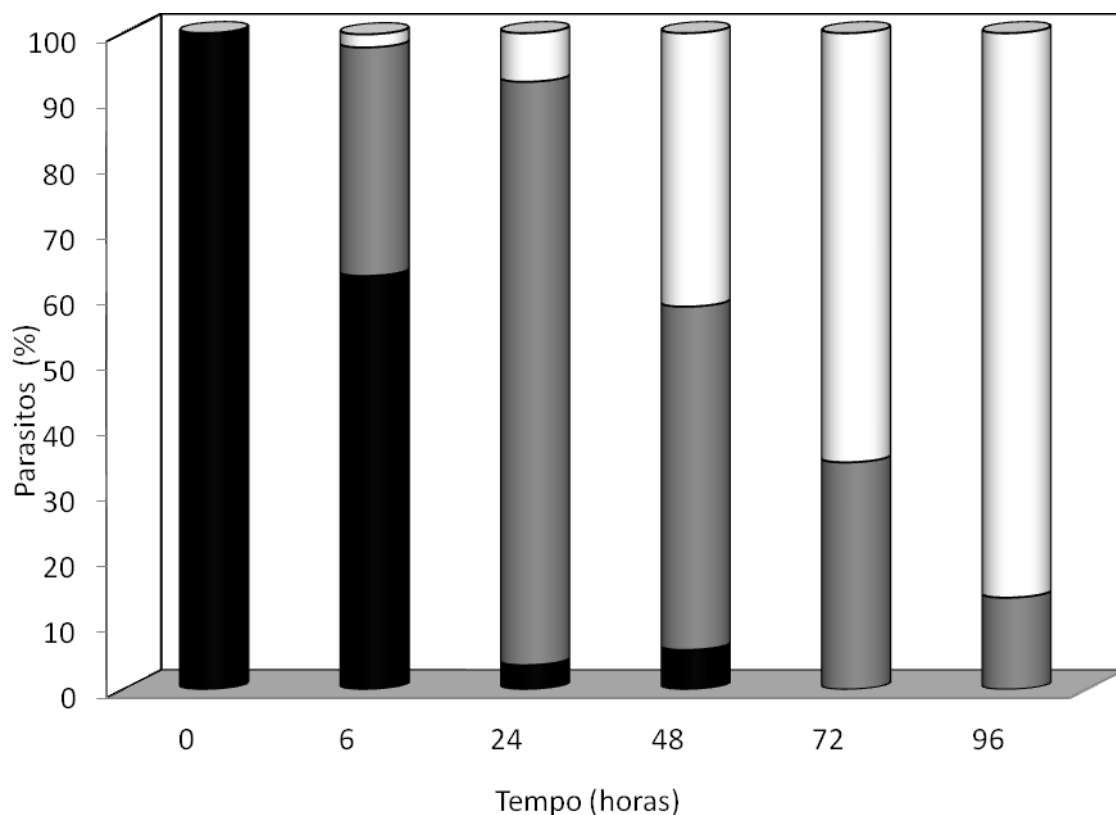


Figura 6: Quantificação das formas dos parasitos submetidos à diferenciação *in vitro*. Promastigotas com alto teor de formas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis* foram incubadas em condições de diferenciação, como previamente descrito na metodologia. A transformação do parasito foi acompanhada durante 96 horas por contagem diferencial em microscópio óptico sendo constatados três padrões morfológicos predominantes durante a diferenciação: formas alongadas com flagelo livre (■), arredondadas com flagelo (▣) e arredondadas sem flagelo (□). Estes resultados são representativos de quadro experimentos independentes.

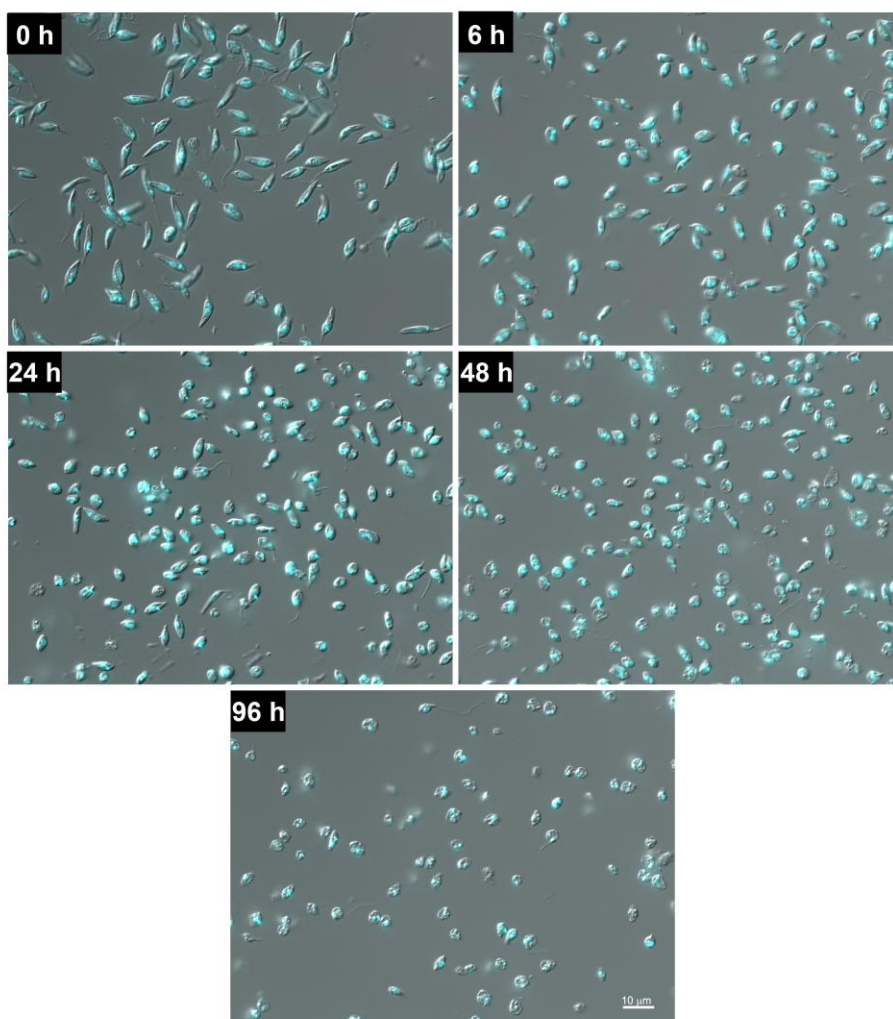


Figura 7: Análise morfológica da diferenciação de formas promastigotas em amastigotas *in vitro*. Promastigotas metacíclicas de *L. (L.) amazonensis* foram incubadas em condições de diferenciação e a transformação do parasito foi acompanhada durante 96 horas, como previamente descrito na metodologia. Os promastigotas metacíclicos da fase estacionária de cultivo *in vitro* (tempo 0) e dos diferentes tempos da diferenciação (6 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h), foram corados com DAPI e visualizadas por contraste interferencial de Nomarski. Estes resultados são representativos de quadro experimentos independentes.

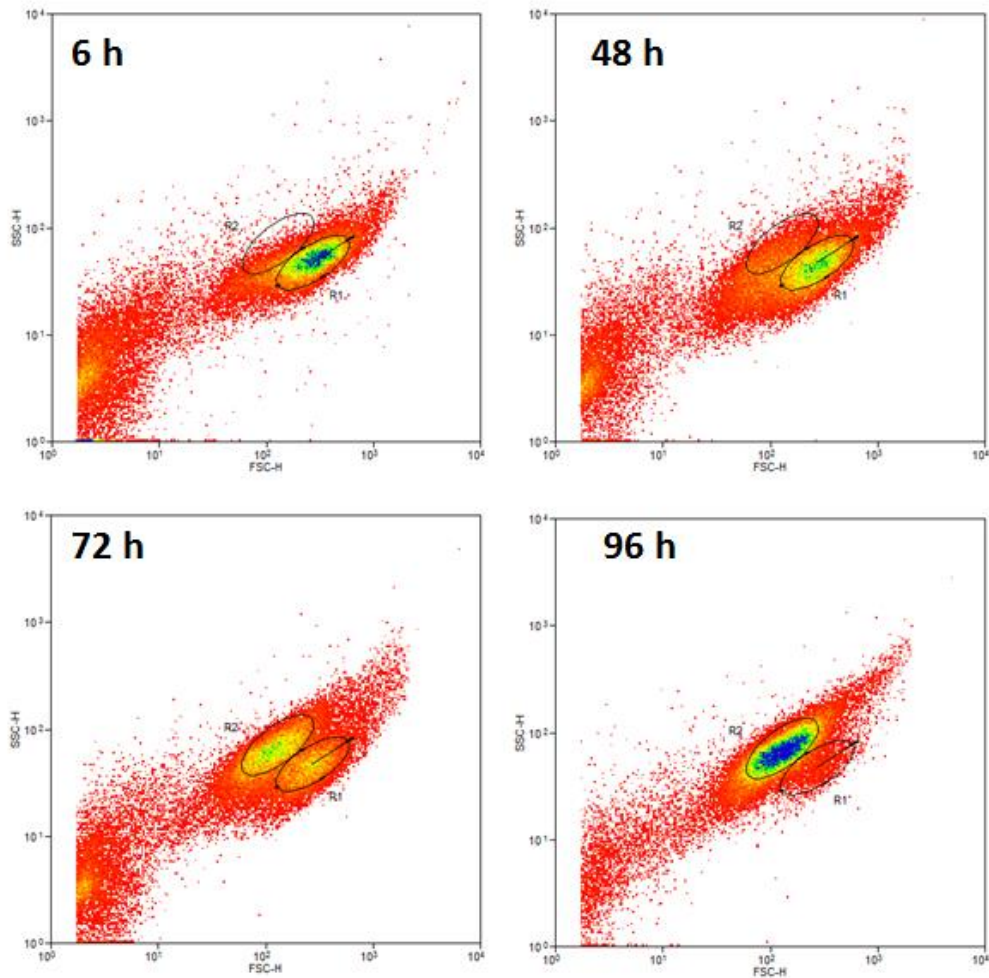


Figura 8: Análise por citometria de fluxo da população de parasitos durante a diferenciação de formas promastigotas em amastigotas *in vitro*. Promastigotas metacíclicas (tempo 0) de *L. (L.) amazonensis* foram incubadas em condições de diferenciação (48 h, 72 h e 96 h), como previamente descrito da metodologia. A seleção da região de interesse foi baseada em aspectos morfométricos; tamanho (FSC – dispersão lateral de luz) versus granulosidade (SSC – dispersão frontal de luz). A região demarcada em vermelho identifica homogeneidade da população de interesse. O gráfico é representativo dos experimentos realizados com promastigotas.

4.4. Verificação da expressão relativa do gene *cpb* ao longo da diferenciação da *L. (L.) amazonensis* *in vitro*

Na continuidade do nosso estudo foi avaliada a expressão do gene *cpb* ao longo da diferenciação de promastigotas a amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, a partir do RNA total das amostras convertidos em cDNA, utilizando protocolo de transcriptase reversa. A eficiência dos iniciadores usados para amplificar os genes alvos deste estudo indicou uma eficiência adequada (em torno de 100%, com variação abaixo de 10%), bem como boa especificidade: os pares de iniciadores amplificaram um único fragmento de gene com 100, 93 e 84 pb, respectivamente (figura 9).

A especificidade dos ensaios foi avaliada por curvas de dissociação ao final das reações, uma vez que foi utilizada a metodologia do reagente SYBR. Os resultados para os três genes indicaram um único pico de temperatura de dissociação para o produto amplificado pelos iniciadores utilizados ($T_m = 81,2$ °C para S8, $T_m = 78,7$ °C para GAPDH e $T_m = 84,8$ °C para CPB), sugerindo que os ensaios de PCR em tempo real foram genes específicos e que os resultados não foram comprometidos por ampliações inespecíficas ou dímeros de iniciadores (Figura 10).

Observamos que ao longo da diferenciação do parasito em cultura ocorre um aumento da quantidade de transcritos do gene *cpb*, quando comparado com os promastigotas obtidos da fase estacionária. Utilizamos a média geométrica dos ciclos de quantificação ($C_t = cycle\ threshold$) dos genes que codificam a proteína S8 do ribossomo 40S e a enzima GAPDH como normalizadores da reação.

A Figura 11 apresenta a média dos valores da expressão normalizada (RQ) do gene *cpb* de promastigotas utilizando a média geométrica dos genes de referência (constitutivos). Com estes dados foi possível constatar que a expressão do gene *cpb* estava aumentada em 48 horas (1,3 x), 72 horas (3,2 x) e 96 horas (3,4 x) nas preparações de cDNA dos parasitos submetidos a diferenciação para amastigota, quando comparada com os resultados de quantificação realizados com preparações de cDNA de promastigotas referentes ao tempo 0.

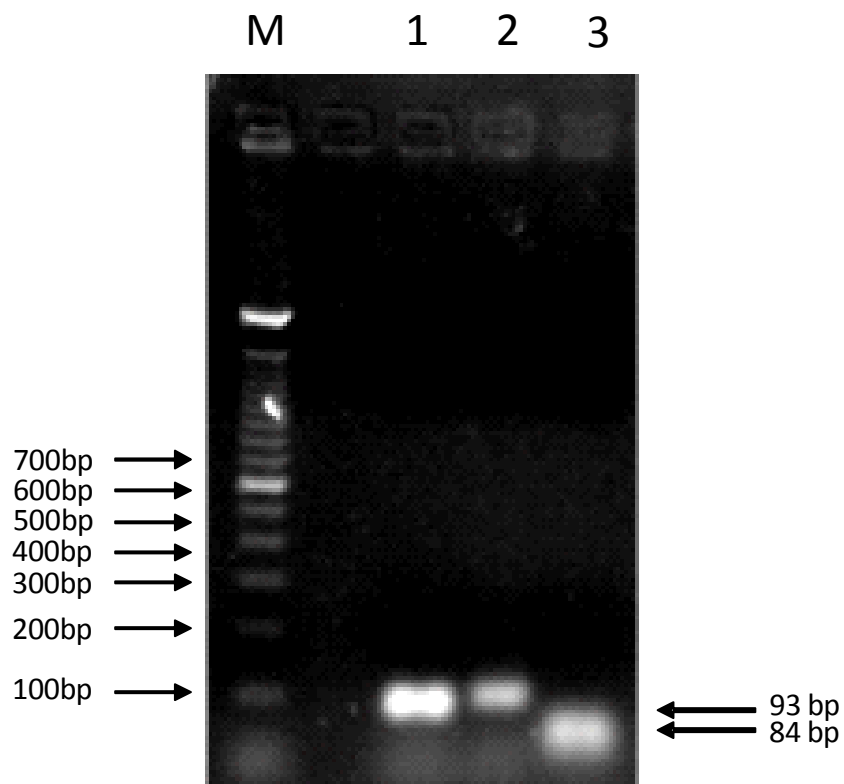


Figura 9: Análise dos produtos amplificados dos genes de *L. (L.) amazonensis*. As amostras de cDNA obtidas de promastigotas da fase estacionária foram submetidas a reação de PCR e os produtos amplificados foram visualizados em gel de 2,0%, de agarose e corado com Nancy-520. (1): Proteína S8 do ribossomo 40S, (2): GAPDH e (3): CPB:. O marcador de massa molecular DNA Ladder 100 bp está indicado a direita (M)

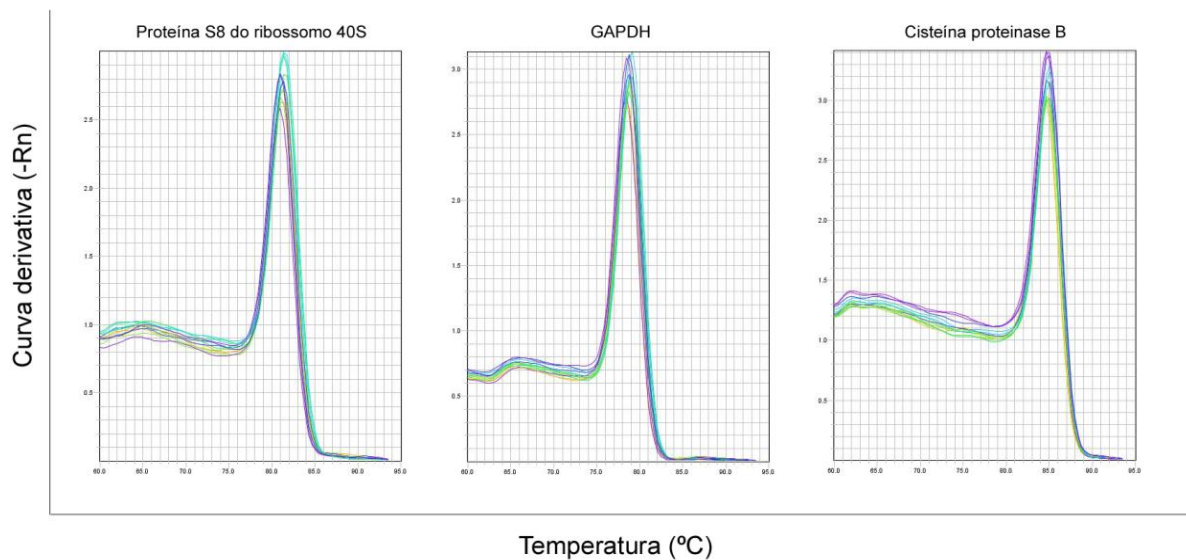


Figura 10: Curvas de dissociação da PCR em tempo real utilizando SYBR green para genes de *L. (L.) amazonensis* obtidas a partir da temperatura de desnaturação dos produtos amplificados. O gráfico expressa a derivativa da curva de dissociação (-Rn) dos produtos amplificados a partir dos iniciadores para os genes da proteína S8 do ribossomo 40S, GAPDH e Cisteína Proteinase B demonstrando um único pico na temperatura ($^{\circ}\text{C}$), o que corresponde à amplificação de um único produto: $T_m = 81,2$ $^{\circ}\text{C}$, $T_m = 78,7$ $^{\circ}\text{C}$, $T_m = 84,8$ $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Esses resultados são representativos de três experimentos independentes em duplicata.

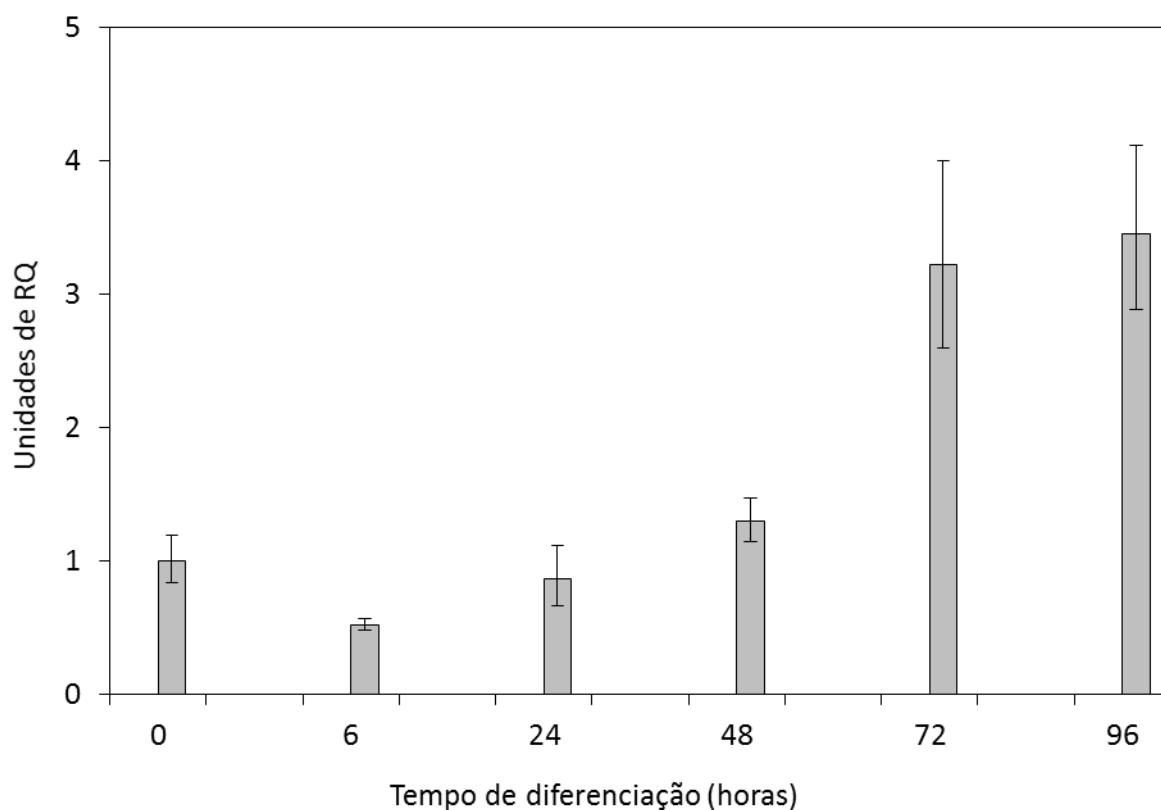


Figura 11: Quantificação do gene de cisteína proteinase B (cpb) de *Leishmania (L) amazonensis* por PCR em Tempo Real. Os produtos amplificados da reação de PCR quantitativo foram obtidos a partir dos cDNAs dos parasitos promastigotas (tempo 0) e nos diferentes tempos da diferenciação (6 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h). A reação foi normalizada utilizando-se a média geométrica da expressão dos genes da proteína S8 do cromossomo 40S e GAPDH, sendo os dados apresentados como expressão relativa dos mesmos genes em promastigotas. Os resultados estão expressos em unidades de quantidade relativa (RQ). Estes resultados correspondem a média e os desvios padrão de três experimentos independentes ($p < 0.05$).

4.5. Reatividade do anti-rcyspep contra as proteínas de *L. (L.) amazonensis*

A distribuição celular da reatividade do soro anti-rcyspep também foi avaliada neste estudo. A proposta destes ensaios foi uma avaliação quantitativa desta reatividade em frações de membrana e de flagelo dos promastigotas da fase estacionária e dos amastigotas obtidos por diferenciação *in vitro* pelo choque de temperatura e pH, assim como dos sobrenadantes de cultivo destes parasitos. Esta quantificação foi feita por análises de biossensoriamento de superfície usando como ferramenta de captura das proteínas dos parasitos, IgG específicas contra a proteína rcyspep.

Uma etapa preliminar destes experimentos foi a funcionalização do *sensor chip* de superfície carboxilada com IgG anti-rcyspep purificada por coluna de afinidade. As condições de imobilização de 0,5 µg da IgG usando o método de acoplamento EDC/NHS indicou uma RU de 520 ± 54 , equivalente a 0,52 ng de proteínas/mm² do chip (Figura 12). O sistema foi calibrado com rcyspep purificada, e para tal foi traçada uma curva dose resposta para extrapolação quantitativa da cyspep presente nas preparações de proteínas dos parasitos.

As análises de biossensoriamento de superfície realizadas aqui foram úteis para provar a propriedade de ligação rcyspep com a IgG específica produzida durante a imunização do camundongo (Figura 13). A proteína rcyspep foi analisada utilizando uma série de concentrações que mostra um aumento no sinal de ressonância por minuto (RU/s), o que indica ligação da IgG a rcyspep de um modo dependente da concentração, com RU_{max} de 200,06, ($R^2 = 0,9939$). A linearização da reta gerou uma constante de saturação do chip de cerca de $0,95 \times 10^{-2}$ µg (Figura 14).

De maneira geral, os sensorgramas obtidos nos ensaios de antigenicidade das frações subcelulares e dos sobrenadantes de cultivo dos parasitos indicaram a valores de RU de dissociação (RU_d) acima da linha de base, o que foi indicativo da propriedade de reconhecimento do anti-rcyspep em todas as preparações do parasito, dependente da concentração de proteínas (Figuras 16, 17 e 18). Estes dados foram comparados com os testes usando BSA como controle negativo da reatividade deste anticorpo que indicaram não haver reconhecimento aleatório pelo anticorpo (Figura 15).

Considerando os valores de RU_d como interação efetiva, foi possível inferir a quantidade proteína reagente ao anticorpo nas preparações das proteínas de promastigotas e amastigotas. Os dados foram analisados por regressão linear considerando as cinco concentrações de proteínas testadas, cujos coeficientes de

determinação da massa de proteína que induz uma resposta no sensor (R^2) indicaram uma tendência de ligação ao anticorpo, concentração dependente: promastigotas [proteínas solúveis do sobrenadante de cultivo ($R^2 = 0,84$), da fração de membrana ($R^2 = 0,93$) e da fração de flagelo ($R^2 = 0,87$)] e amastigotas [proteínas solúveis do sobrenadante de cultivo ($R^2 = 0,93$), da fração de membrana ($R^2 = 0,70$) e da fração de flagelo ($R^2 = 0,98$)], (Figura 18).

A partir destas análises foi possível constatar que os menores valores K_{sat} estavam relacionadas com preparações de membrana e flagelo de ambas as formas do parasito, indicando que as proteínas destas frações têm menor propriedade de ligar a IgG anti-rcyspep que reveste o chip. Dentre estas, as preparações de proteína de membrana de amastigota apresentaram valor de K_{sat} na ordem de 10x menor (Tabela III).

Por outro lado, não obstante os maiores valores de RU_{max} estarem relacionados com os sobrenadantes de cultivo dos promastigotas e amastigotas, estas preparações apresentaram as menores quantidades de proteínas reagentes a IgG anti-rcyspep, devido aos seus maiores valores de constante de saturação do chip (Tabela III).

Na continuidade deste estudo, foram realizados ensaios de SPR para avaliar o potencial das proteínas do parasito reconhecidas pela IgG anti-rcyspep ligarem ao E-64, um típico inibidor irreversível de cisteína proteinases. Com estes ensaios foi possível medir se o fragmento da região COOH-terminal da CPB é direcionado íntegro ou associado à forma não processada da CPB ao sobrenadante de cultivo, a membrana e flagelo do parasito.

Os resultados destes experimentos indicaram que o complexo imune formado na superfície entre chip ainda é capaz de ligar ao E-64, tendo os valores de RU como interação efetiva em algumas das preparações de proteínas testada (Figuras 19 e 20). Nestes experimentos o sinal de RU para as proteínas da fração de flagelo e do sobrenadante de cultura mantiveram-se na faixa de $52 \pm 8,7$ a $40 \pm 2,9$, enquanto que as frações de membrana na faixa de $14,0 \pm 1,1$ a $10,0 \pm 1,5$, para ambos promastigotas e amastigotas (Figura 19 e 20; e Tabela IV).

Ainda que os resultados destes experimentos não indicassem uma tendência de ligação ao E-64 em curva dose resposta de ressonância, foi possível detectar um sinal de RU_{E-64} acima do sinal de RU para formação do complexo IgG anti-rcyspep nas preparações de proteínas de promastigotas (1,4x para fração de membrana; 1,3x para

sobrenadante de cultivo) e amastigotas (1,3x frações de flagelo) (Tabela IV). Desta forma, foi possível inferir que a quantidade proteína reagente ao anticorpo que ainda mantinham a propriedade de ligar ao E-64 foi melhor detectada nas preparações de sobrenadante de cultura de promastigotas ($1,4 \times 10^{-2}$ ng/mm²) seguido das frações de membrana de promastigotas e de flagelo de amastigotas ($0,2 \times 10^{-2}$ ng/mm²) e da fração de membrana de amastigotas ($0,1 \times 10^{-2}$ ng/mm²).

Estes dados foram comparados com os testes controles, quando os complexos IgG anti-rcyspep foram submetidos a ensaios de SPR com diferentes concentrações de E-64. Nestes ensaios, não houve alteração do sinal de ressonância em presença do E-64, indicando não haver ligação deste inibidor com complexo (Figura 21).

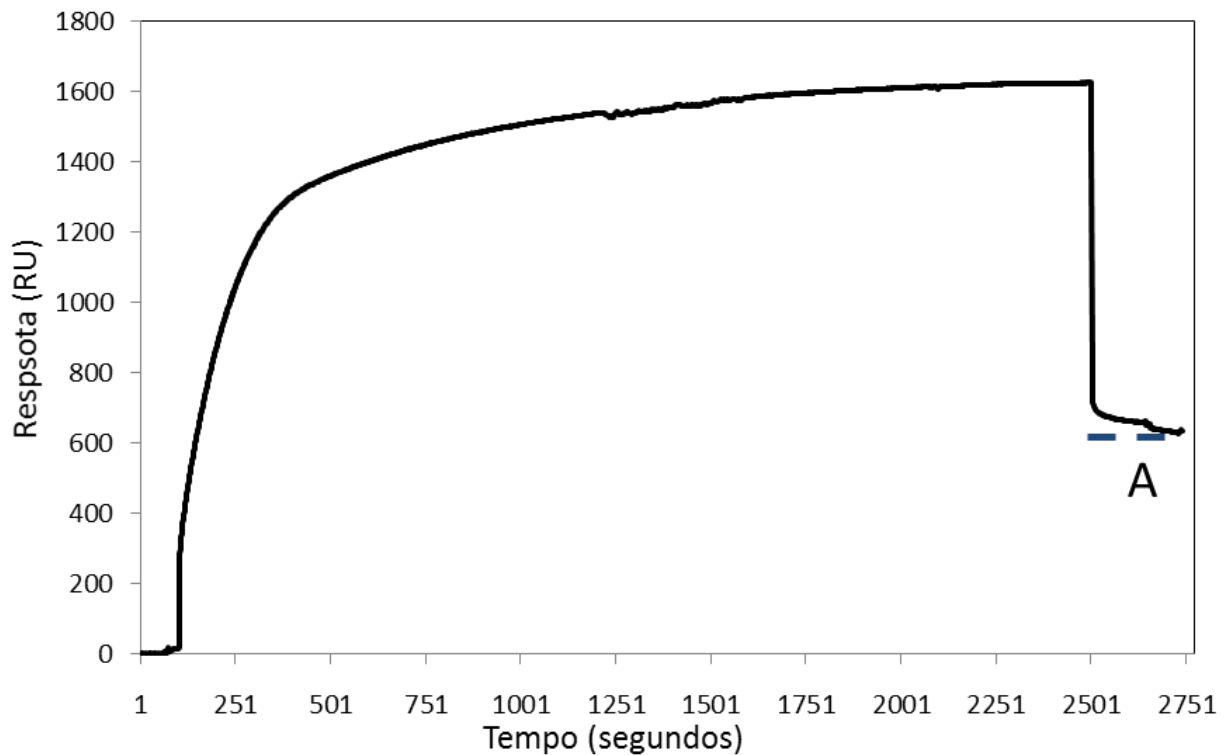


Figura 12: Sensorgrama de imobilização da IgG anti-rcyspep na superfície do *sensor chip*. Os valores de 640 RU durante o tempo e 224 segundos de dissociação (A) destes ensaios foram considerados como referência para definir as interações da IgG com a rcyspep. Estes ensaios de imobilização no *sensor chip* são representativos de duas repetições.

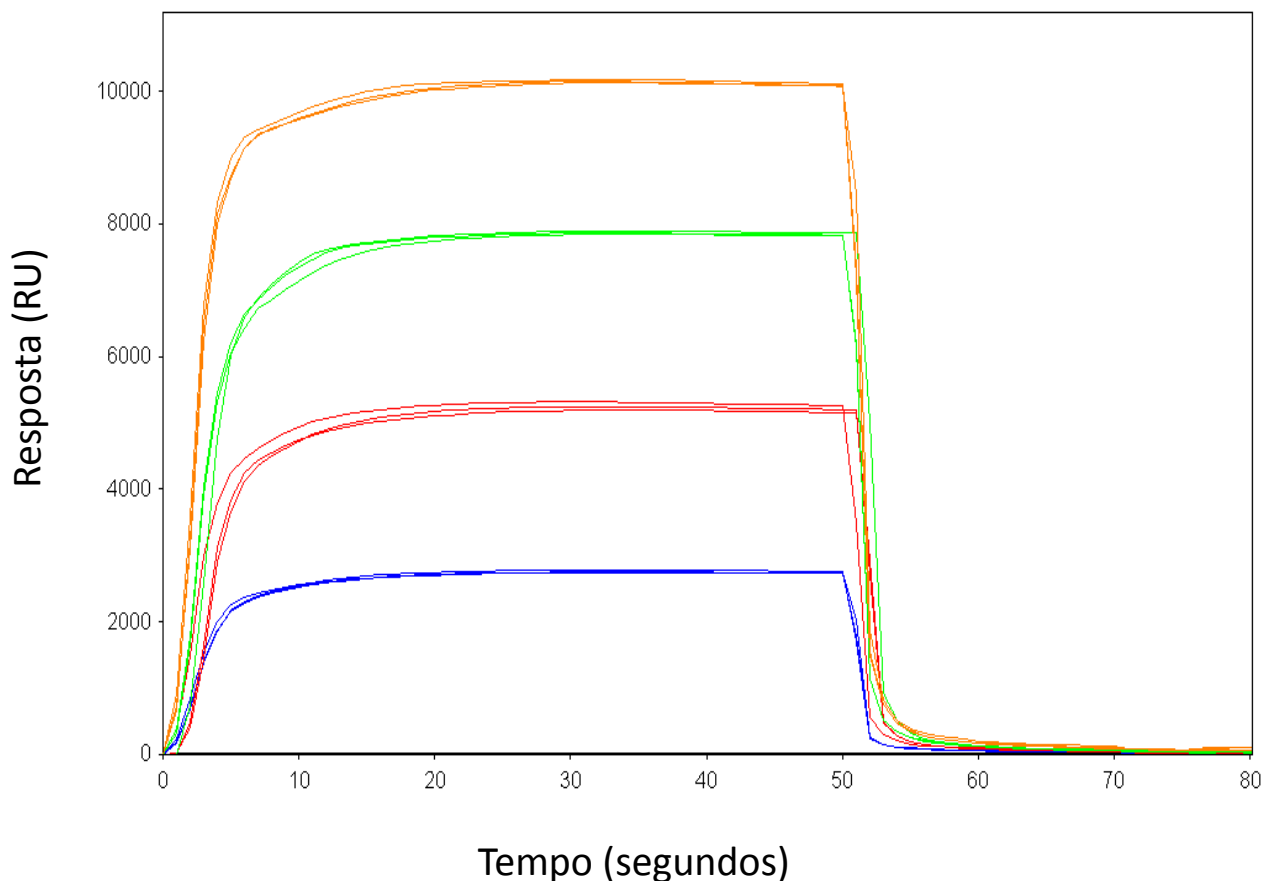


Figura 13: Sensorgrama de ligação da IgG anti-rcyspep com a rcyspep na superfície do *sensor chip*. Após imobilização da IgG específica no chip a diferentes concentrações (— 0,01 µg; — 0,1 µg; — 1,0 µg; — 10 µg; — 100 µg) da rcyspep foram testados no microfluxo de 10 µL/min. Os dados da interação estão representados como unidade de resposta de ressonância (RU) durante o tempo de 80 segundos. Estes ensaios de imobilização no *sensor chip* são representativos de três repetições.

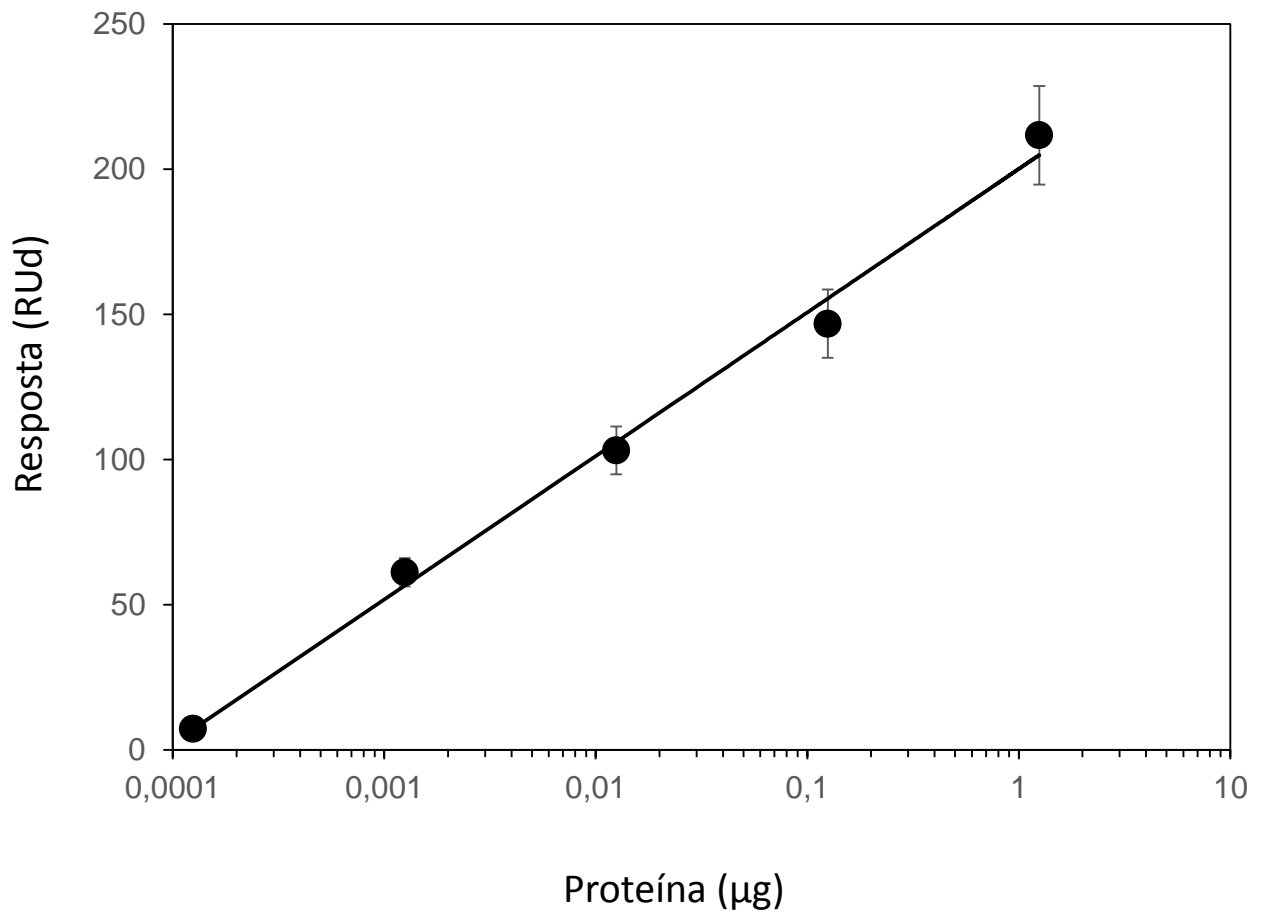


Figura 14: Análise das interações entre IgG específica e rcyssep. Os experimentos foram conduzidos com diferentes concentrações de proteína recombinante rcyssep. Os dados de unidades de ressonância de dissociação (RUd) e da concentração de proteínas (µg) foram analisados por regressão linear. Estes dados são representativos de três experimentos.

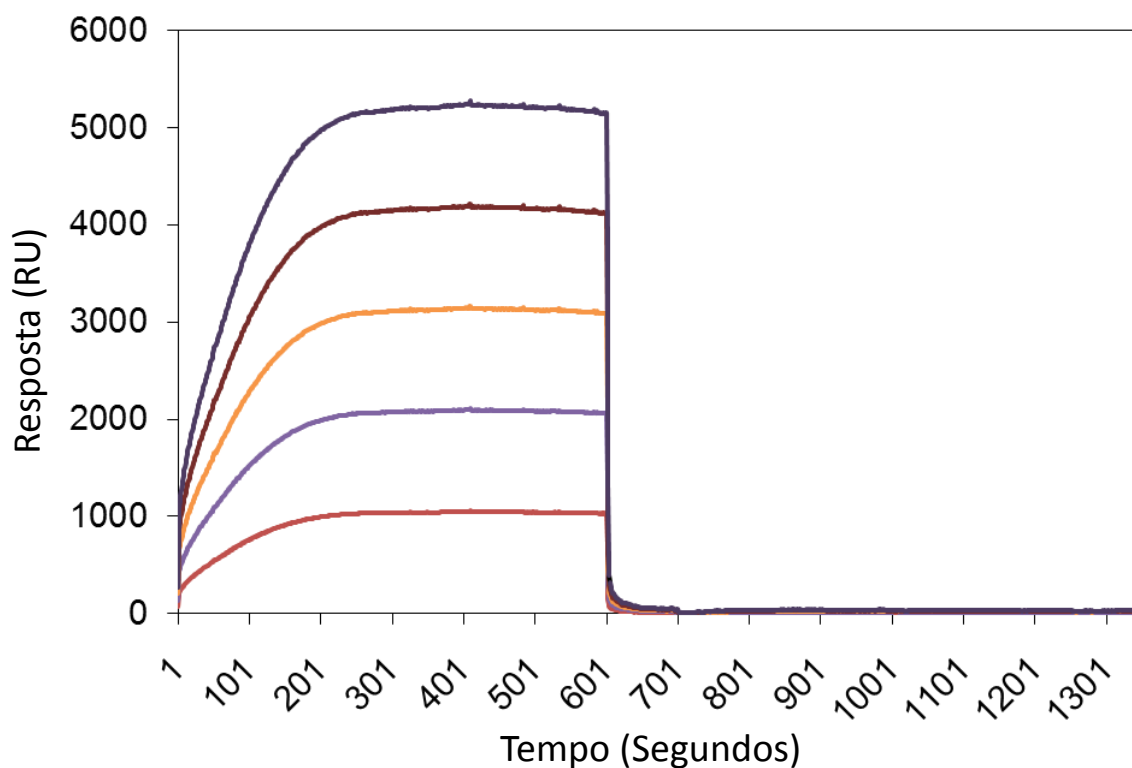


Figura 15: Análise da interação entre IgG anti-rcyspep e albumina sérica bovina (BSA). Os experimentos foram conduzidos com diferentes concentrações de BSA: (— 0,01 µg; — 0,1 µg; — 1,0 µg; — 10 µg; — 100 µg) em um microfluxo de 10 µL/min. Os dados da interação estão representados como unidade de resposta de ressonância (RU). Estes ensaios são representativos de três repetições.

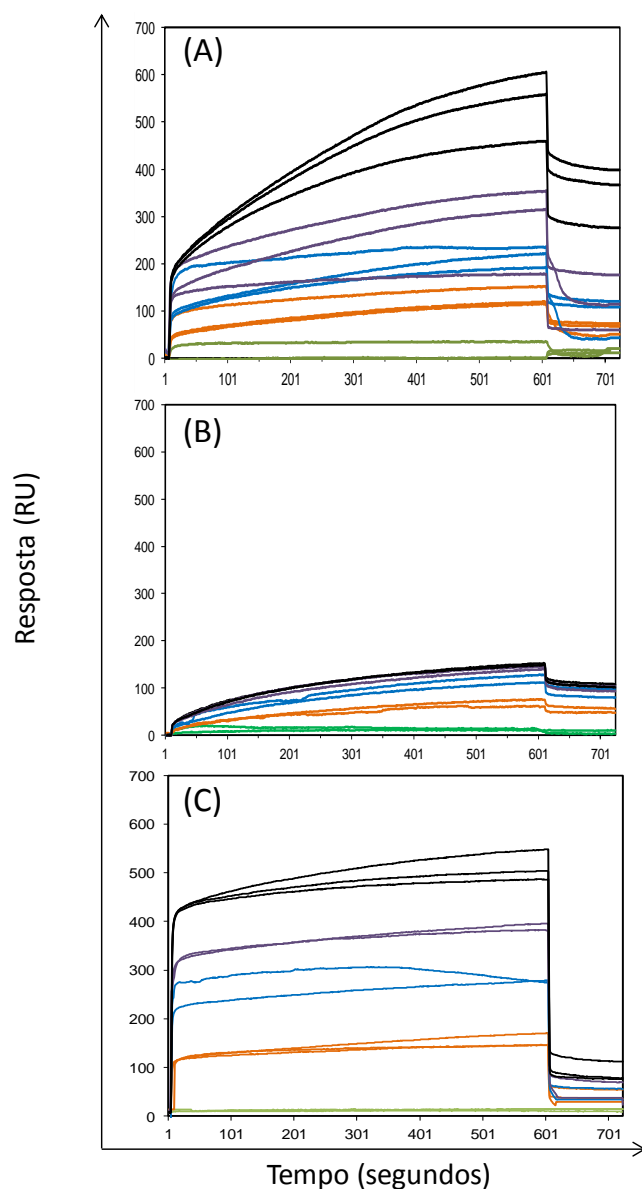


Figura 16: Sensorgramas de interação entre o IgG anti-rcyspep e as proteínas dos promastigotas. Os experimentos foram conduzidos com diferentes concentrações (— 0,01 µg; — 0,1 µg; — 1,0 µg; — 10 µg; — 100 µg) de proteínas solúveis do sobrenadante de cultivo (A), da fração de membrana (B) e da fração de flagelo (C) das promastigotas *de L.(L.) amazonensis*. Os gráficos mostram o perfil das interações durante 724 segundos de uma triplicata dos experimentos.

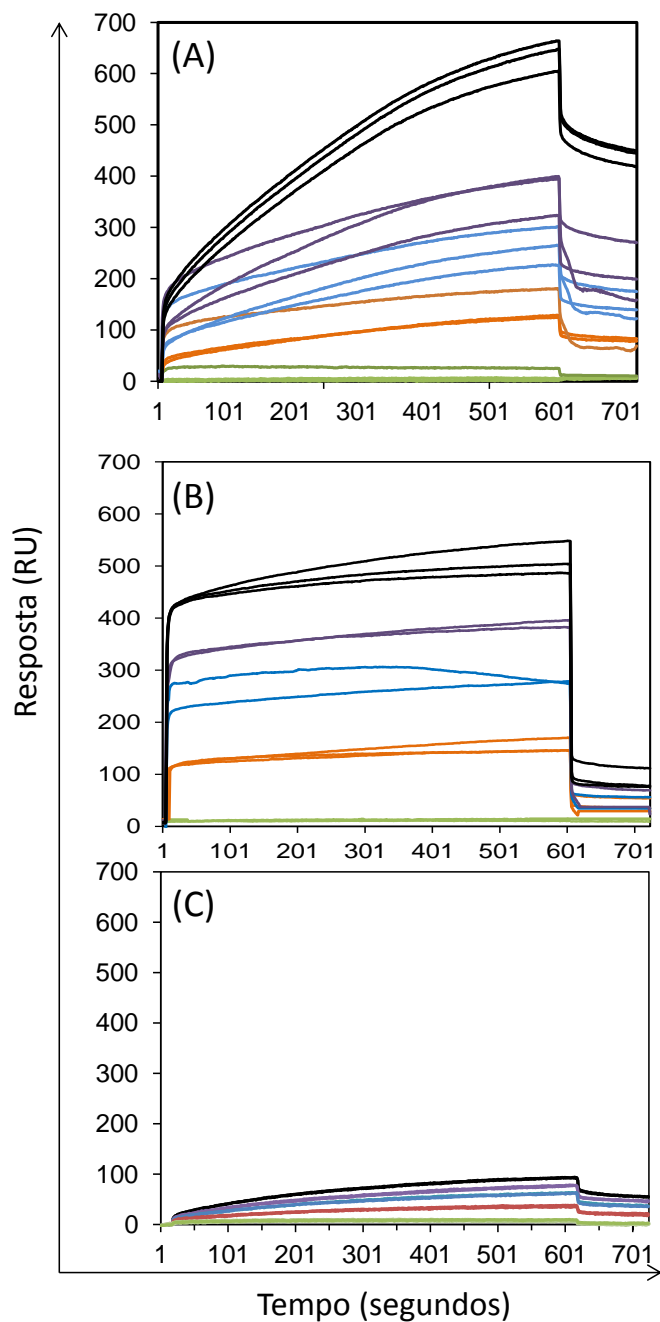


Figura 17: Sensorgramas de interação entre o IgG anti-rcyspep e as proteínas dos amastigotas. Os experimentos foram conduzidos com diferentes concentrações (— 0,01 µg; — 0,1 µg; — 1,0 µg; — 10 µg; — 100 µg) de proteínas solúveis do sobrenadante de cultivo (A), da fração de membrana (B) e da fração de flagelo (C) das amastigotas de *L.(L.) amazonensis*. Os gráficos mostram o perfil das interações durante 724 segundos de uma triplicata dos experimentos.

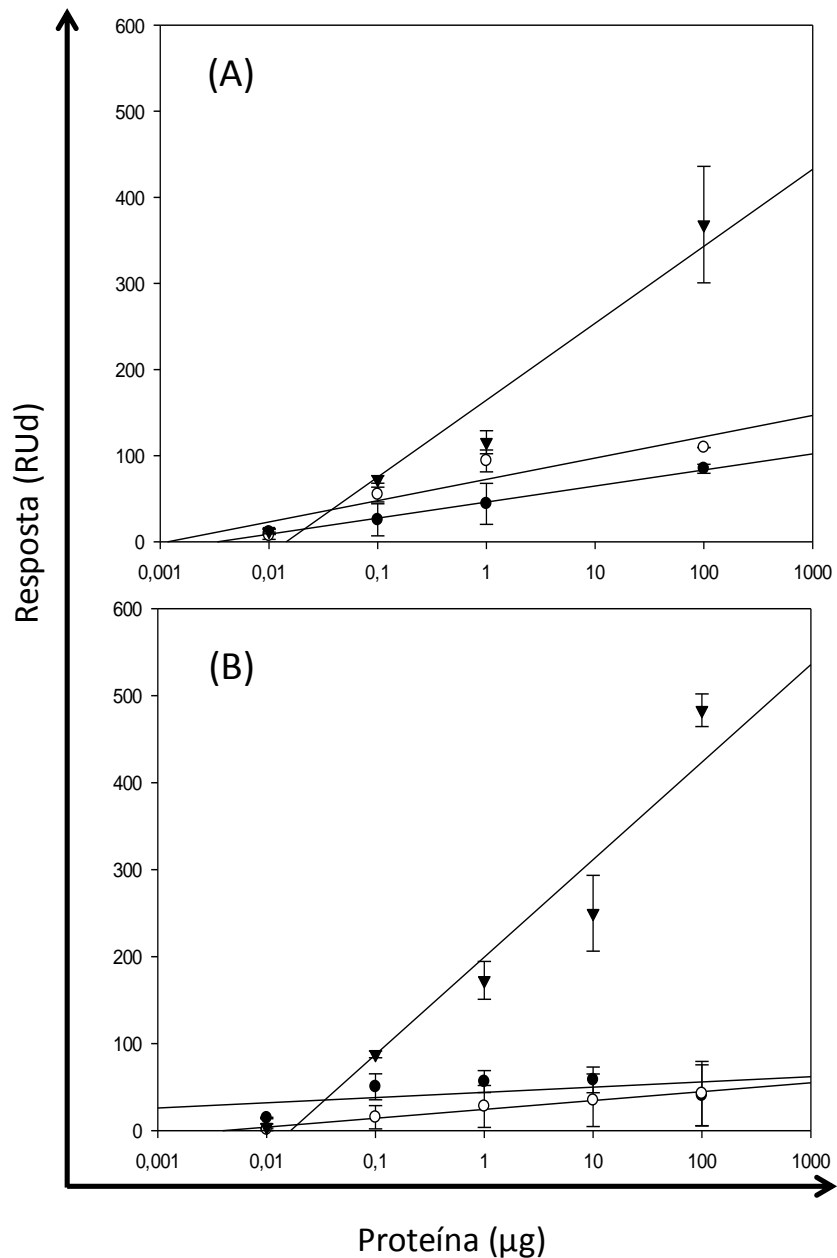


Figura 18: Análise das interações entre IgG anti-rcyspep e as proteínas do parasito. Os experimentos foram conduzidos com diferentes concentrações de proteínas solúveis do sobrenadante de cultivo (▼), da fração de membrana (●) e da fração de flagelo (○) das promastigotas (A) e amastigotas (B) de *L.(L.) amazonensis*. Os dados de unidades de ressonância de dissociação (RU_d) e da concentração de proteínas (µg) foram analisados por regressão linear. Estes dados são representativos de três experimentos

Tabela III: Análise quantitativa dos dados de detecção das proteínas de *L.(L.) amazonensis* pela IgG anti-rcyssep.

Frações de Proteínas		*RU _{max}	** Proteína (ng/mm ²)	*** Ksat (x10 ⁻² µg)
Promastigotas	Fração de Membrana	61,0 ± 5,0	0,06 ± 0,005	6,0 ± 0,5
	Fração de Flagelo	74,6 ± 6,0	0,08 ± 0,006	4,0 ± 0,4
	Sobrenadante de cultura	142,6 ± 15,0	0,14 ± 0,015	12,0 ± 1,2
Amastigotas	Fração de Membrana	48,0 ± 6,0	0,05 ± 0,006	0,4 ± 0,06
	Fração de Flagelo	36,7 ± 4,0	0,04 ± 0,004	6,0 ± 0,40
	Sobrenadante de cultura	199,4 ± 2,0	0,20 ± 0,020	13,0 ± 1,3

(*) Resposta de dissociação na saturação do chip sensor (Ru_{max});

(**) Quantidade de proteína ligada a área de superfície do chip sensor (ng/mm²);

(***) Coeficiente de ligação do chip (ksat)

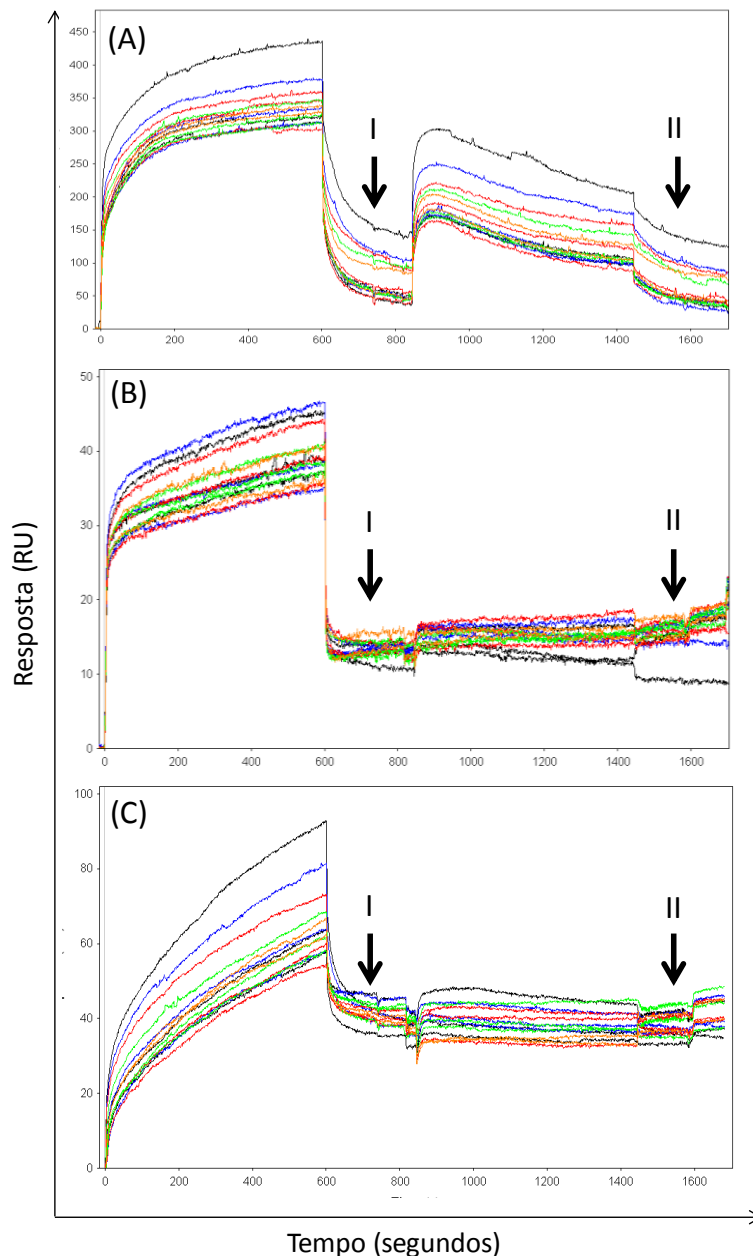


Figura 19: Sensorgramas de detecção da ligação do E-64 às proteínas dos promastigotas. Nestes ensaios após revestir o sensor chip com IgG específica, as proteínas do parasito [sobrenadante de cultivo (A), da fração de membrana (B) e da fração de flagelo (C)] foram capturadas (I) e submetidas um ciclo de interação com diferentes concentrações de E-64 (— 10,0 μM ; — 1,0 μM ; — 0,1 μM ; — 0,01 μM ; — 0,001 μM) cuja interação (II) é descrito como sinal ressonância (RU). Os gráficos mostram o perfil das interações representadas pelo RU ao longo do tempo (segundos), de uma das triplicatas dos experimentos.

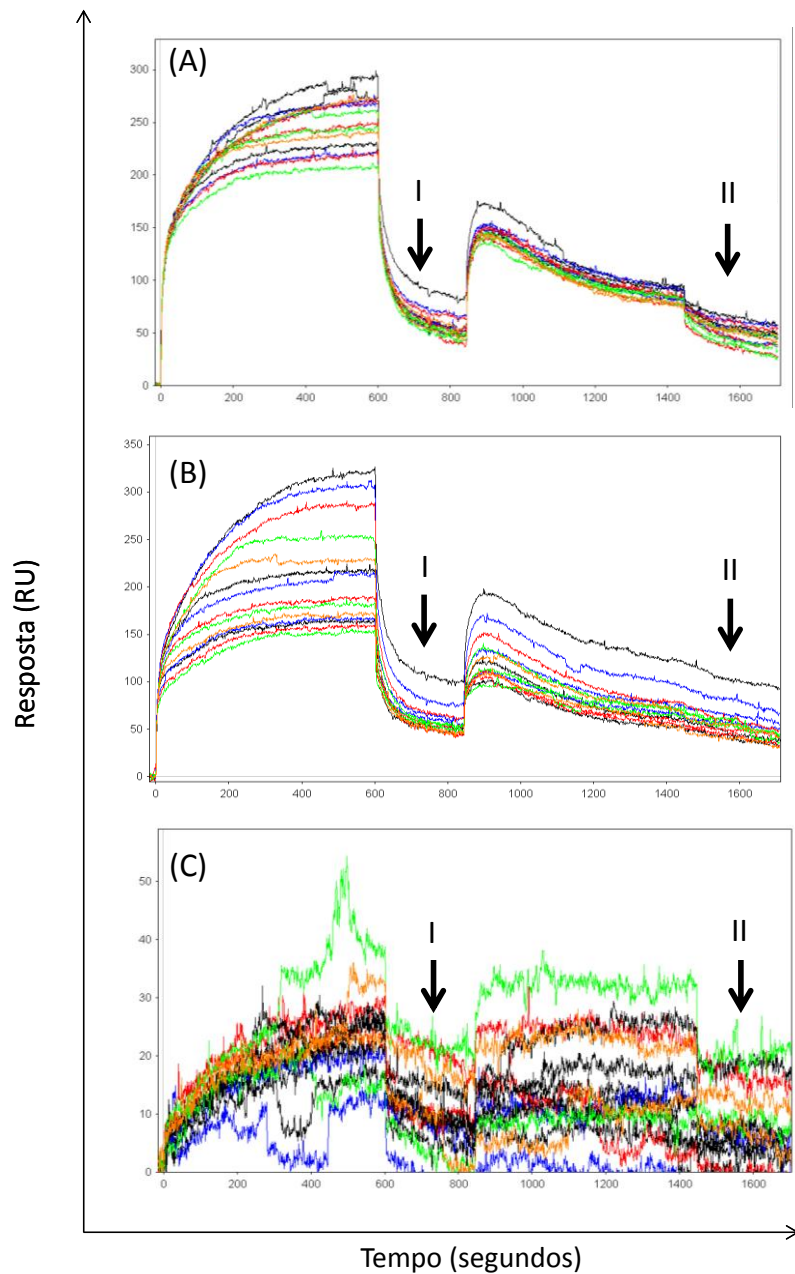


Figura 20: Sensorgramas de detecção da ligação do E-64 às proteínas dos amastigotas. Nestes ensaios após revestir o sensor chip com IgG específica, as proteínas do parasito [sobrenadante de cultivo (A), da fração de membrana (B) e da fração de flagelo (C)] foram capturadas (I) e submetidas um ciclo de interação com diferentes concentrações de E-64 (— 10,0 μM ; — 1,0 μM ; — 0,1 μM ; — 0,01 μM ; — 0,001 μM) cuja interação (II) é descrito como sinal ressonância (RU). Os gráficos mostram o perfil das interações representadas pelo RU ao longo do tempo (segundos), de uma das triplicatas dos experimentos.

Tabela IV: Análise quantitativa dos dados de detecção da ligação do E-64 às proteínas de *L.(L.) amazonensis*.

Frações de Proteínas		*RU	**ng/mm ² (×10 ⁻²)	***RU _{E-64}	ng/mm ² (×10 ⁻²)	***RU _{E-64} - Ru	**ng/mm ² (×10 ⁻²)
Promastigotas	Fração de Membrana	14,0 ± 1,1	1,4 ± 0,1	16,0 ± 1,1	1,60 ± 0,01	2,0 ± 1,1	0,20 ± 0,11
	Fração de Flagelo	40,0 ± 2,9	4,0 ± 0,3	40,6 ± 0,5	4,00 ± 0,05	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00
	Sobrenadante de cultura	49,0 ± 5,7	4,9 ± 0,6	63,0 ± 6,8	6,3 ± 0,098	14,1 ± 1,1	1,4 ± 0,11
Amastigotas	Fração de Membrana	10,0 ± 1,5	1,0 ± 0,06	09,0 ± 1,5	9,0 ± 0,0015	1,0 ± 1,5	0,10 ± 0,15
	Fração de Flagelo	52,0 ± 8,7	5,2 ± 0,09	54,0 ± 9,2	5,4 ± 0,009	2,0 ± 1,5	0,20 ± 0,15
	Sobrenadante de cultura	50,0 ± 2,5	5,0 ± 0,02	50,0 ± 2,8	5,0 ± 0,003	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00

(*) Resposta de dissociação da ligação da proteína no chip sensor na ausência do inibidor (RU);

(**) Quantidade de proteína ligada a área de superfície do chip sensor (ng/mm²);

(***) Resposta de dissociação da ligação da proteína no chip sensor na presença do E-64 (RU_{E-64});

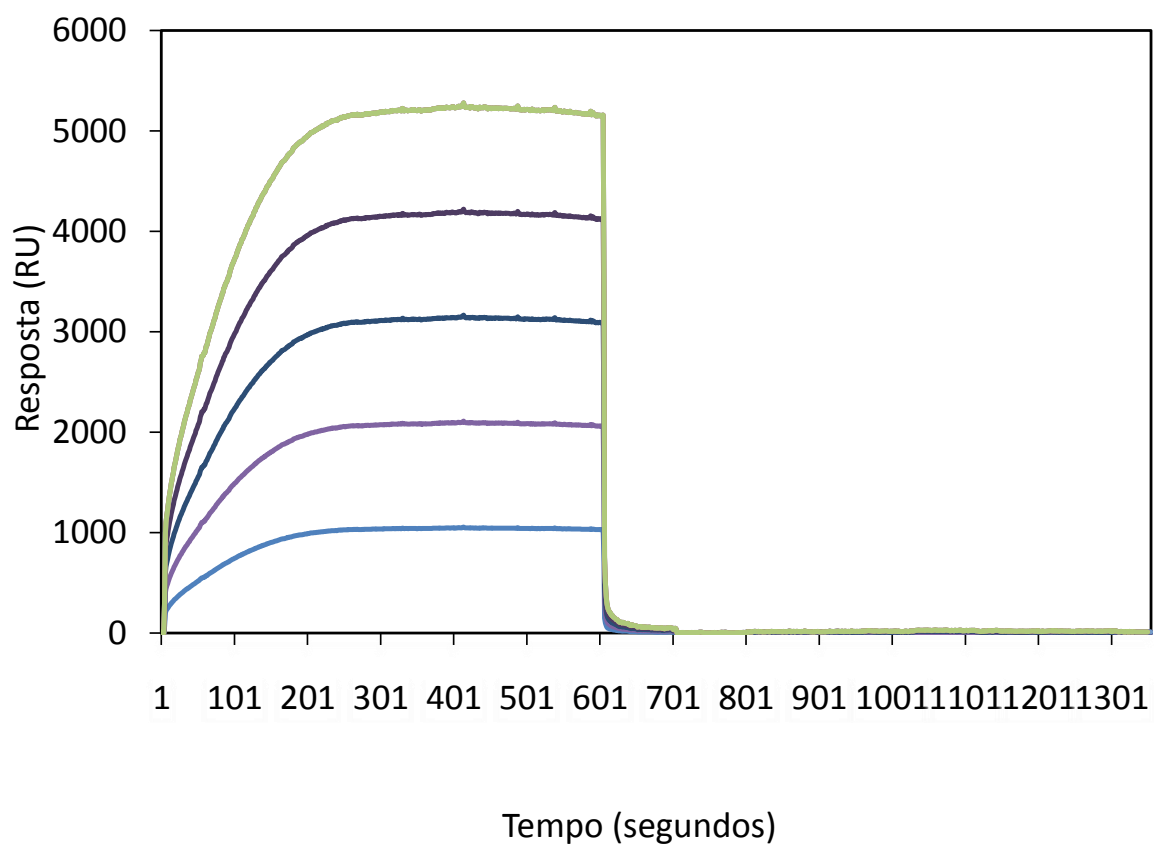


Figura 21: Sensorgramas de detecção da ligação do E-64 às rcyspep. Nestes ensaios após revestir o sensor chip com IgG específica, a rcyspep foram capturadas e submetidas um ciclo de interação com diferentes concentrações de E-64 (— 10,0 μM ; — 1,0 μM ; — 0,1 μM ; — 0,01 μM ; — 0,001 μM) cuja interação (II) é descrita como sinal ressonância (RU). Os gráficos mostram o perfil das interações representadas pelo RU ao longo do tempo (segundos), de uma das triplicatas dos experimentos.

5. Discussão

A motivação deste estudo foi ampliar estudos sobre a função das proteinases no protozoário parasito *L. (L.) amazonensis*, em sentido amplo. As cisteína proteinases deste parasito têm um potencial funcional destacável (revisado por Silva-Almeida *et al.*, 2014) e um aspecto importante a ser considerado na estrutura das enzimas CPBs é a sua extensão COOH-terminal, apenas descritas nestas proteínas antes de seu processamento final (Duboise *et al.*, 1994). A proteína COOH-terminal de aproximadamente 100 aa, aqui denominada cyspep, ainda não tem sua função no ciclo de vida do parasito devidamente estudada. Desta forma, estudos sobre a proteína CPB tornam-se importantes uma vez que já foi demonstrado que sua expressão está aumentada na *L. (L.) amazonensis* (Alves *et al.*, 2005).

Além da ação proteolítica da CPB sobre componentes no sistema imune, a região cyspep também demonstrou influência na interação parasito-hospedeiro, em mamíferos. A cyspep é removida durante o processamento da CPB na forma madura e foi observada dentro da célula do hospedeiro (Alves *et al.*, 2005). Este fato é um indicativo funcional na resposta imune do hospedeiro vertebrado, como demonstrado na indução da expressão de citocinas relacionadas com as respostas do tipo 1 e tipo 2 (Alves *et al.*, 2004; Pereira & Alves, 2008). De certa forma o potencial da cyspep em atuar no sistema imune foi demonstrado neste trabalho de dissertação, uma vez que na infecção experimental por *L. (L.) amazonensis*, camundongos BALB/c desenvolvem uma resposta humoral contra esta proteína. Este fato reforça a hipótese de que a cyspep é liberada por *L. (L.) amazonensis* no ambiente extracelular deste parasito, o que nos estimulou a investigar a localização desta proteína. As informações obtidas nestes estudos podem subsidiar o entendimento de eventos importantes na relação do parasito com seus hospedeiros. Neste trabalho visamos agregar novos dados sobre a localização da cyspep que é gerada a partir da CPB pelas formas promastigotas e amastigotas do parasito *L. (L.) amazonensis*.

Na primeira etapa deste trabalho focamos em estudos de diferenciação *in vitro* como um recurso para simular os eventos bioquímicos relacionados à adaptação da *L. (L.) amazonensis* em seus diferentes ambientes: hospedeiro vertebrado e invertebrado. Como descrito na literatura, o método de choque de temperatura e pH possui a propriedade de induzir mudança morfológica do parasito durante a transição de promastigota a amastigota (Bates, 1994; Cysne-Finkelstein *et*

al., 1998; Alves *et al.*, 2005). Além disso, o parasito é capaz de manter a secreção dos fatores de virulência como, por exemplo, os componentes proteicos. Alguns destes fatores são detectáveis na forma promastigota e sua concentração é aumentada durante a transformação para amastigotas, confirmando a manutenção da virulência dos parasitos (Leon *et al.*, 1994; Alves *et al.*, 2005).

Nossos resultados revelaram que o acompanhamento da diferenciação *in vitro* por microscopia mostrou-se uma ferramenta útil ao permitir observar o comportamento em cultura das formas intermediárias do parasito até a diferenciação total. Um fato interessante observado foi o progressivo desaparecimento da população de parasitos com flagelo, ao longo da diferenciação. De certa forma este é um fato já descrito, mas até o presente momento são raros os registros do acompanhamento das populações de *L. (L.) amazonensis* durante as primeiras horas da transformação *in vitro* (Alves *et al.*, 2005). No início da indução da diferenciação há predomínio das formas metacíclicas no perfil da população, que são descritas como formas promastigotas delgadas com flagelo relativamente longo, na maior parte da população da fase estacionária (Sacks & Perkins, 1984; Franke *et al.* 1985; Da Silva & Sacks, 1987; Sacks, 1989; Grimm *et al.* 1991; Cysne-Finkelstein *et al.*, 1998); as quais tornam-se indetectáveis no final de 96 horas de diferenciação dando lugar a um segundo perfil de população, sem flagelo livre e arredondada.

Durante o ciclo de vida de flagelados digenético como *Leishmania* spp, ocorre alternância entre promastigotas e amastigotas que diferem significativamente na morfologia celular e comprimento do flagelo. Estudos recentes têm gerado novas propostas sobre os mecanismos pelos quais as *Leishmania* spp regulam a expressão de genes necessários para a montagem do flagelo, e os mecanismos utilizados para modificar o seu comprimento. Enquanto o papel crítico do flagelo na biologia dos promastigotas tem sido muito investigado, como adesão e motilidade (Zenian *et al.*, 1979; Bates & Rogers, 2004), o mesmo não pode ser afirmado para o flagelo de amastigotas. No entanto, trabalhos recentes sugerem que um flagelo rudimentar em amastigota pode atuar na organização celular e/ou percepção sensorial, que são fundamentais para a sobrevivência da *Leishmania* sp. no interior dos macrófagos (Gluezn *et al.*, 2010). A descrição gradativa da mudança do perfil da população de *L. (L.) amazonensis*, quanto à ocorrência de flagelo livre, possivelmente é um fenômeno decorrente das pressões do ambiente impostas ao parasito durante a diferenciação. Além disso, esta mudança de perfil estaria

associada à expressão de fatores de virulência como cisteína proteinases, que aqui foi oportuno investigar.

O aumento da expressão da CPB de *L. (L.) amazonensis* ao longo da diferenciação parece ser importante para o fenômeno da autofagia, para que as formas promastigotas metacíclicas se diferenciem em amastigotas. Em *L. (L.) mexicana*, o aumento do número de autofagolisossomos durante a transformação foi relacionada com a remodelagem da arquitetura celular. Estudos mostram que a inibição das proteinases lisossômicas CPA e CPB, ou remoção de seus genes, não só interfere na via autofágica, mas também impede a metaciclogênese e a transformação para amastigotas, dando suporte a hipótese de que a autofagia é necessária à diferenciação celular (Williams *et al.*, 2006). Neste contexto, é possível afirmar que a expressão da CPB ao longo da diferenciação influencia no sucesso da adaptação do parasito ao ambiente intracelular, mostrando-se como um importante fator de virulência envolvido no processo de diferenciação da *L. (L.) amazonensis*.

A capacidade de adaptação de um parasito é um requisito para o sucesso da relação com seu hospedeiro, que se dá por seleção natural, em um determinado ambiente. Esse fenômeno, em parasitos do gênero *Leishmania*, pode ser atribuído a necessidade de diferenciação dos protozoários parasitos quando alternam de hospedeiros. A cyspep quando eliminada pelo parasito para os ambientes onde vivem teriam um significado relevante em sua adaptação durante o ciclo de vida. Até o presente momento essa proteína foi verificada apenas quanto à ação de seus peptídeos na modulação da resposta imune do hospedeiro vertebrado (Alves *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2010). No entanto, também existe a possibilidade da cyspep atuar diretamente sobre as células dos hospedeiros vertebrado e invertebrado, influenciando em vários eventos do ciclo biológico. Desta forma, oportuno se faz definir se este fragmento da CPB é direcionado íntegro ou associado à forma nativa da enzima para o meio extracelular do parasito.

A abordagem de localização da cyspep aplicada neste trabalho baseou-se na possibilidade de rastrear a presença da proteína no sobrenadante de cultura e em frações de membrana e de flagelo, usando um anticorpo policlonal como uma ferramenta de captura em um sistema de biossensoriamento de superfície. Este enfoque vem sendo aplicado na detecção de estruturas bioativas e vias de reconhecimento celular (Velasco-Garcia, 2009), no rastreamento de ligantes na

superfície de células osteogênicas (Kuo *et al.*, 2011), no reconhecimento entre ligantes e receptores no modelo *Leishmania* spp como ligantes de heparina (Côrtes *et al.*, 2011) e da proteína H-2 (Silva-Souza *et al.*, 2014). Neste contexto, nossos estudos com esta abordagem físico-química, revelando a formação do complexo antígeno anticorpo, foram satisfatórios para indicar a presença da cyspep em *L. (L.) amazonensis*.

Uma das vantagens da metodologia de biossensoriamento de superfície utilizada em nossos estudos é a possibilidade de análise do fenômeno de ligação diretamente em ambientes complexos, mistura de proteínas, em tempo real, levando-se em conta a quarta dimensão no estabelecimento da interação molecular (Van Regenmortel, 1996). Assim, os resultados de SPR que apresentamos são dinâmicos e fidedignos a realidade do fenômeno de interação que está sendo pesquisado: formação do complexo entre anticorpo anti-rcyspep e o antígeno cyspep presente no sobrenadante de cultura, em frações de membrana e de flagelo do parasito *L. (L.) amazonensis*.

A estratégia de fracionamento celular usada neste trabalho foi favorável a concentração de proteínas das membranas de *L.(L.) amazonensis*, as quais incluem as membranas de superfície, de organelas e de flagelo (Morgado Diaz *et al.*, 2005; Côrtes *et al.*, 2011). Interessantemente, apesar da detecção dos complexos imunes indicarem o direcionamento celular da cyspep, nossos resultados não permitem afirmar que esta proteína está associada à membrana do parasito. No entanto, achados anteriores demonstram que cisteína proteinases de *L. (L.) amazonensis* tem características estruturais hidrofóbicas e estão localizadas na membrana de superfície deste parasito (Alves *et al.*, 1993; 2000; 2005). Além disso, também foi demonstrado que homólogos de CPBs estão localizados na superfície de *L. (V.) braziliensis* ancoradas via glicosilfosfatidilinositol (Rebello *et al.*, 2009). Estamos certos que estudos adicionais são necessários para melhor entender a detecção deste complexo imune com a cyspep nas membranas do parasito de *L. (L.) amazonensis*.

O desenho experimental proposto neste estudo nos garante que somente CPBs o foram detectadas em nossos experimentos de SPR. Importante se faz lembrar, que existem 87 famílias de cisteína proteinases organizadas com base na composição de organização estrutural (<http://merops.sanger.ac.uk/>), significando uma preferência de catálise e da ação de inibidores sobre os diferentes membros

das famílias. Classicamente o E-64 é um inibidor irreversível específico de CPs como catepsina K, catepsina B, catepsina H, actinidina, calpaína entre outras (Lecaille *et al.*, 2002). No entanto, alguns ortólogos de CPs são fracamente inibidos, ou ainda, não são inibidos pelo E-64 como a bromelina (Harrach, 1998) e a falcipaína 1 (Goh, 2005), respectivamente. Assim, algumas isoformas de CPs podem realizar ligações covalentes com as enzimas e outras não, e este fato é dependente de variações dos aminoácidos que constituem o centro ativo. Portanto, como a cyspep é uma região exclusiva das enzimas CPB a captura da cyspep com anticorpo policlonal nos garante que apenas CPB estão sendo detectadas e com propriedade de ligar ao E-64.

Nosso esforço em rastrear a presença da cyspep de *L. (L) amazonensis* associando a técnica de fracionamento para a obtenção das frações subcelulares e biossensoriamento de superfície foi determinante para indicar que o parasito lança a cyspep no meio extracelular de amastigotas e promastigotas de forma diferente. Reunimos evidências de que em promastigotas, a cyspep é direcionada ao meio extracelular ainda associada a CPB, sugerindo que o processamento desta enzima até a sua forma madura continua no meio extracelular dos promastigotas. Este achado pode significar que as CPBs presentes no sobrenadante de promastigotas são preservadas em sua forma não processada para algum efeito biológico ainda não descoberto. Um passo fundamental à compreensão deste fenômeno seria a proposição de um estudo para confirmar a estrutura das isoformas de CPBs presentes no sobrenadante de cultivo deste parasito e ainda um estudo sobre os efeitos da cyspep recombinante no microambiente do tecido da glândula salivar do inseto vetor.

De maneira geral, bactérias usam uma série de diferentes mecanismos para regular e produzir peptídeos ativos e proteínas. A maioria das bacteriocinas são produzidas como peptídeos precursores, que são modificados pós-síntese dentro ou no exterior da célula durante a exportação para gerar as suas formas biologicamente ativas (Jack *et al.*, 1995). Peptídeos antimicrobianos de bactérias (Pütsep *et al.*, 1999a; 1999b) e de organismos superiores (Schindler *et al.*, 1964; Park *et al.*, 1998) podem ser produzidos a partir da degradação de proteínas maiores. A existência de processamento extracelular de proteínas representa uma possibilidade para um micro-organismo gerar peptídeos antimicrobianos, como descrito em *Propionibacterium jensenii* (Faye *et al.*, 2002). Provavelmente, o processamento

extracelular da pró-CPB de promastigotas metacíclicas pode ser interpretado como uma forma do parasito gerar a cyspep, ou seus fragmentos, estruturalmente estáveis que atuariam como peptídeos bioativos na glândula salivar do inseto vetor.

Adicionalmente, a maioria das proteínas que tem sua função biológica no meio extracelular contém ligações dissulfeto. Essas ligações influenciam na termodinâmica de enovelamento de proteínas, estabilizam a conformação nativa, mantêm a integridade da proteína frente a agentes oxidantes e enzimas proteolíticas no ambiente extracelular. Ou seja, ao estabilizar a estrutura da proteína, ligações dissulfeto podem proteger as proteínas contra danos e aumentar sua meia-vida (Hogg, 2003). A cyspep possui nove resíduos de cisteína que têm o potencial de formar ligações dissulfeto (Alves *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2011; Santos, 2014), este fato fortalece a hipótese de que cyspep pode manter sua estabilidade estrutural no meio extracelular. Experimentos futuros são necessários para confirmar esta hipótese.

Além disso, o fato da cyspep ser encontrada livre no sobrenadante de cultivo de amastigotas vem ao encontro com os achados biológicos sobre esta proteína na modulação da resposta imune desencadeada pela *L. (L.) amazonensis* durante a infecção experimental em BALB/c. Desta forma, no interior dos macrófagos, a cyspep de amastigotas é liberada durante a maturação da pró-CPB e direcionada às vias de processamento intracelular do sistema MHC de camundongo. Estes fatos, em conjunto, nos permite refletir que o parasito pode utilizar produtos do processamento de suas proteínas para atuarem no hospedeiro vertebrado induzindo um resposta imune do tipo 1 ou do tipo 2 (Alves *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2010).

O ciclo de vida de protozoários parasitos do gênero *Leishmania* demanda destes micro-organismos uma capacidade adaptativa devido às adversidades dos microambientes a que estão sujeitos, hospedeiro invertebrado e vertebrado. A modulação da expressão de fatores de virulência durante a alternância de hospedeiros sugere um recurso evolutivo da *L. (L.) amazonensis* que contribui na estruturação do estilo de vida deste parasito. Como a cyspep é detectada em promastigota e amastigota, provavelmente as atuações desta proteína pode representar uma das possibilidades que a *L. (L.) amazonensis* dispõe para escapar das agressões que sofrem nos hospedeiros invertebrado e vertebrado, favorecendo sua existência.

6. Conclusões

1. Uma proteína de 14 kDa foi obtida em sistema heterólogo pET28-a contendo um inserto correspondente a sequência gênica da porção COOH-terminal da CPB de *L. (L.) amazonensis*, denominada rcyspep.
2. Ao longo da infecção de camundongos BALB/c por *L. (L.) amazonensis* ocorre uma resposta imune humoral direcionada a epítomos preservados na proteína recombinante rcyspep.
3. Com os ensaios propostos para indução da diferenciação dos promastigotas em amastigotas de *L. (L.) amazonensis in vitro*, foi constatada uma gradual mudança do padrão morfológico da população de parasitos, em uma cinética temporal. Com predominância de formas alongadas e arredondadas com flagelo livre nas primeiras horas (0h a 48h) e de formas arredondadas sem flagelo livre no final da diferenciação (96h).
4. Os parasitos submetidos às condições de diferenciação *in vitro* apresentaram aumento da quantidade de transcritos do gene *cpb*, quando comparados com a quantidade dos transcritos destes genes em promastigotas obtidos na fase estacionária de cultivo *in vitro*. Adicionalmente, a quantidade relativa dos transcritos do gene *cpb* manteve-se constante após 72h de diferenciação.
5. Anticorpos anti-rcyspep produzido em camundongos sensibilizados foram capazes de reconhecer a proteína rcyspep no sistema de fase sólida proposto neste estudo, ressonância plasmônica de superfície (SPR) com micro chip de ouro de superfície carboxilada. Isto indica que a antigenicidade e especificidade destas imunoglobulinas é preservada após purificação.
6. Com os ensaios de SPR propostos foi possível detectar proteínas com reatividade aos anticorpos anti-rcyspep em preparações de promastigotas e amastigotas obtidas por fracionamento subcelular e do sobrenadante de cultivo de *L. (L.) amazonensis*.

7. Os complexos imunes destacados por SPR foram úteis para determinar a distribuição da cyspep em frações de membrana e de flagelo e no sobrenadante de cultivo dos promastigotas e dos amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.
8. Os maiores valores de K_{sat} detectados neste trabalho foram relevantes para indicar que os sobrenadantes de cultivo dos promastigotas e amastigotas apresentaram as menores quantidades de proteínas reagentes a IgG anti-rcyspep. Ao contrário das preparações de proteína de membrana de amastigota que apresentaram os menores valores de K_{sat} .
9. Promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* lançam proteínas reconhecidas pela IgG anti-rcyspep para o meio extracelular.
10. Sobrenadante de cultura de promastigotas *L. (L.) amazonensis* contém proteínas reagentes a IgG anti-rcyspep que ainda são capazes ligar ao E-64, sugerindo a presença de pró-CBPs nestas preparações.

7. Referências Bibliográficas

- Alexander J, Bryson K. T helper(h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. Immunol Lett 2005; 99:17-23.
- 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; 161:6794-6801.
- Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MC, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KB. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. Hist Cienc Saúde Manguinhos. 2003; 10:852-882 .
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Plos one, 2012; 7(5): e35671.
- Alves CR, Benévolo-De-Andrade TC, Alves JL, Pirmez C. Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. Parasite Immunol. 2004; 26(3):127-135.
- Alves CR, Corte-Real S, Bourguignon SC, Chaves CS, Saraiva EM. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. Exp Parasitol, 2005; 109: 38-48.
- Alves CR, Marzochi MC, Giovanni-de-Simone S. Heterogeneity of cysteine proteinases in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major*. Braz J Med Biol Res. 1993;26(2):167-171.
- Alves CR, Pontes de Carvalho LC, Souza AL, De Simone SG. A strategy for the identification of T-cell epitopes on *Leishmania* cysteine proteinases. Cytobios. 2001;104(405):33-41.
- Alves CR, Silva-Almeida M, Souza-Silva F, Pereira BAS, Azevedo-Pereira RL, Côrtes LMC. Componentes de Superfície do Parasito e o Papel na Interação Parasito-Hospedeiro. In: Fátima Conceição Silva & Carlos Roberto Alves. (Org.). Leishmanioses do Continente Americano. 1ed.Rio de Janeiro: FIOCRUZ EDITORA, 2014, v. 1, p. 139-157.
- Azevedo-coutinho RB. Caracterização da resposta imune de células humanas às proteínas recombinantes LACK e KMP-11 de *Leishmania amazonensis*. 171p. Tese

- (Doutorado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.
- Bart G, Coombs GH, Mottram JC. Isolation of *Imcpc*, a gene encoding a *Leishmania mexicana* cathepsin-B-like cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 73:271-274.
- Basano S.A, Camargo LMA American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2004; 7: 328 -337.
- Bates PA, Robertson CD, Tetley L, Coombs GH .Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology.* 1992; 105 (Pt 2):193-202.
- Bates PA, Rogers ME. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med.* 2004; 4(6):601- 609.
- Bates PA. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology.* 1994; 108:1-9.
- Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol.* 2008; 11(4):340- 344.
- Bedoya-Pacheco SJ, Araujo-Melo MH, Valete-Rosalino CM, Pimentel MI, Conceição-Silva F, Schubach AO, Marzochi MC. Endemic Tegumentary Leishmaniasis in Brazil: Correlation between Level of Endemicity and Number of Cases of Mucosal Disease. *Am J Trop Med Hyg,* 2011; 84(6):901-905.
- Berberich C, Requena JM, Alonso C. Cloning of genes and expression and antigenicity analysis of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein. *Exp. Parasitol.* 1997; 85 (1): 105-108.
- Beverley SM, Turco SJ. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. *Trends Microbiol.* 1998; 6 (1): 35-40.
- Bogdan C, Donhauser N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med.* 2000; 191:2121-2130.
- 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(29): 15504–15509.

- Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum DH, Brito MEF, Shaw JJ, Davies CR. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93:488-494.
- Brooks DR, Denise H, Westrop GD, Coombs GH, Mottram JC. The stage-regulated expression of *Leishmania mexicana* CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element. *J Biol Chem*. 2001; 14;276(50):47061-47069.
- Camargo LMA, Barcinski MA. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura* 2003, 1:34-37.
- Casadevall A, Pirofski LA. Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity. *Infect. Immun*. 1999; 67 (8): 3703-3713.
- Castellucci L, Cheng LH, Araújo C, Guimarães LH, Lessa H, Machado P, Almeida MF, Oliveira A, Ko A, Johnson WD, Wilson ME, Carvalho EM, DE Jesus AR. Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 2005; 73(1):69-73.
- Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (2), 540-546.
- Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop*. 2003; 85:375-390.
- Choudhury R, Das P, Bhaumik SK, De T, Chakraborti T: In situ immunolocalization and stage-dependent expression of a secretory serine protease in *Leishmania donovani* and its role as a vaccine candidate. *Clin Vaccine Immunol* 2010, 17(4):660–667.
- Cohen-Freue G, Holzer TR, Forney JD, McMaster WR. Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 2007;37(10):1077-1086.
- Colmenares M, Corbi AL, Turco SJ, Rivas J. The dendritic cells receptor DCSIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. *J Immunol*. 2004;172:1186-1190.
- Condello HS, Souza-Silva F, Silva-Gomes NL, Ribeiro-guimarães ML, Vasconcelos EG, Cysne-Finkelstein L, Moreira OC. Identification and characterization of Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-1 (LaNTPDase-1) expression in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. (artigo submetido)

- Coombs GH. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. *Parasitology*. 1982; 84, :149-155.
- Corte-Real S, Santos CB, Meirelles MN. Differential expression of the plasma membrane Mg²⁺ ATPase and Ca²⁺ ATPase activity during adhesion and interiorization of *Leishmania amazonensis* in fibroblasts in vitro. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1995; 27: 359-366.
- Côrtes LM, Silva RM, Pereira BA, Guerra C, Zapata AC, Bello FJ, Finkelstein LC, Madeira MF, Brazil RP, Corte-Real S, Alves CR. Lulo cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae): a novel model to assay *Leishmania* spp. and vector interaction. *Parasit Vectors*. 2011; 14; 4:216.
- Costa CH, Werneck GL, Rodrigues L Jr, Santos MV, Araújo IB, Moura LS, Moreira S, Gomes RB, Lima SS. Household structure and urban services: neglected targets in the control of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 2005; 99(3):229-236.
- Cox FE. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 595-612.
- Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon LL. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp Parasitol*. 1998; 89(1):58-62.
- Da Silva R, Sacks DL. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun*. 1987;55(11):2802-2806.
- Darling TN, Blum JJ. In vitro reversible transformation of *Leishmania brasiliensis* panamensis between promastigote and ellipsoidal forms. *J Protozool*. 1987;34:166-168.
- DATASUS [homepage na internet]. Indicadores e Dados Básicos Disponível em < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2012/matriz.htm#mort> > acessado em 24 abr 2014.
- David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* 2009; 22 (6), 491-502.
- De Souza Leão S, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci* 1995; 108:3219-3231.

- Degrossoli A, Bosetto MC, Lima CBC, Giorgio S. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania amazonensis*. *Immunol. Lett.* 2007; 114 (2): 119-125.
- Duboise SM, Vannier-Santos MA, Costa-Pinto D, Rivas L, Pan AA, Traub-Cseko Y, De Souza W, McMahon-Pratt D. The biosynthesis, processing, and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinases. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 68:119-132.
- Etges R, Bouvier J, Bordier C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem.* 1986;261(20):9098–9101.
- Etges RJ, Bouvier J, Hoffman R, Bordier C. Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related. *Mol Biochem Parasitol.* 1985;14(2):141–149.
- Franke ED, McGreevy PB, Katz SP, Sacks DL. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. *J Immunol.* 1985; 134(4):2713-2718.
- Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SMB, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol.* 2001; 167:893-901.
- Gluezn E, Ginger ML, McKean PG. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Curr Opin Microbiol.* 2010; 13(4):473-479.
- Goh SL, Goh LL, Sim TS. Cysteine protease falcipain 1 in *Plasmodium falciparum* is biochemically distinct from its isozymes. *Parasitol Res* 2005; 97:295-301.
- Gomes CM, Goto H, Ribeiro Da Matta VL, Laurenti MD, Gidlund M, Corbett CE. Insulin-like growth factor (IGF)-I affects parasite growth and host cell migration in experimental cutaneous leishmaniasis. *Int J Exp Pathol.* 2000; 81 (4): 249-255.
- Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Brasileira Med Trop.* 2003; 36(1):71-80.
- Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010 8 (4), 419-433.
- Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005; 35(11-12):1169 – 1180.

- Grimm F, Brun R, Jenni L. Promastigote infectivity in *Leishmania infantum*. Parasitol Res. 1991; 77(3):185-191.
- Guedes HL, Rezende JM, Fonseca MA, Salles CM, Rossi-Bergmann B, De-Simone SG. Guedes, H.L., Rezende, J.M., Fonseca, M.A., Salles, C.M., Rossi-Bergmann, B., De-Simone, S.G., Identification of serine proteases from *Leishmania braziliensis*. Zeitschrift fur Naturforschung. 2007; 62:, 373-381.
- Handman E, Bullen DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. Trends Parasitol. 2002; 18(8):332- 334.
- Harrach T, Eckert K, Maurer HR, Machleidt I, Machleidt W, Nuck R. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. J Prot Chem, 1998.17(4):351-361.
- Herwaldt BL, Arana BA, Navin TR. The natural history of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. J Infect Dis 1992; 165:518-527.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet. 1999; 2; 354(9185):1191-1199.
- Hespanhol RC, de Nazaré C Soeiro M, Meuser MB, de Nazareth SL Meirelles M, Corte-Real S. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. J Histochem Cytochem. 2005; 53:35-44.
- Hide M, Bañuls AL. Polymorphisms of cpb multicopy genes in the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008. 102:105-106.
- Hogg PJ. "Disulfide bonds as switches for protein function." Trends Biochem Sci 2003; 28(4): 210-214.
- Hunter KW, Cook CL, Hensen SA. Temperature induced *in vitro* transformation of *Leishmania mexicana*. I ultrastructural comparison of culture-transformed and intracellular amastigotes. Acta Trop. 1982;39:143-150.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol Rev. 1995; 59:171-200.
- Jaffe CL, Dwyer DM Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. Parasitol Res 2003; 91, 229-237.
- Jebbari H, Stagg AJ, Davidson RN, Knight SC. *Leishmania major* promastigotes inhibit dendritic cell motility in vitro. Infect Immun 2002; 70:1023-1026.

- Jensen AT, Gasim S, Ismail A, Gaafar A, Kurtzhals JA, Kemp M *et al.* Humoral and cellular immune responses to synthetic peptides of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. *Scand. J. Immunol.* 1998; 48(1): 103 – 109.
- Juliano MA, Brooks DR, Selzer PM, Pandolfo HL, Judice WA, Juliano L, Meldal M, Sanderson SJ, Mottram JC, Coombs GH. Differences in substrate specificities between cysteine protease CPB isoforms of *Leishmania mexicana* are mediated by a few amino acid changes. *Eur J Biochem* 2004; 271:3704-3714.
- Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 2006; 22(9):439- 445.
- Klemba M, Goldberg DE. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Ann Rev Biochem.* 2002; 71: 275-305.
- Kumar R, Engwerda C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Trans Immunol.* 2014; 14;3(3):e13.
- Kuo Y-C, Ho JH, Yen T-J, Chen H-F, Lee OK-S. Development of a Surface Plasmon Resonance Biosensor for Real-Time Detection of Osteogenic Differentiation in Live Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE* 2011, 6: e22382.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680–685.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987; 81(3):517.
- Lainson R, Shaw JJ. New world Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. *Microbiology and Microbial Infections* (9 a ed). London: Ed. Feg Cox; 1988.
- Lainson R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. *Revista Paraense de Medicina* 1997; 11(1): 29-40.
- Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983; 77(5):569-596.
- Lasakosvitsch F, Gentil LG, dos Santos MR, da Silveira JF, Barbiéri CL. Cloning and characterisation of a cysteine proteinase gene expressed in amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis*. *Int J Parasitol* 2003; 33:445-454.

- Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*. 2008; 213(3-4):183- 191.
- Laskay T, Zandbergen G, Slobach W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*. 2003; 11:210-214.
- Lecaille F, Kaleta J, Bromme D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev*. 2002;102, 4459-4488.
- Leon LL, Temporal RM, Soares MJ, Grimaldi Júnior G. Proteinase activities during temperature-induced stage differentiation of species complexes of *Leishmania*. *Acta Trop*. 1994 ;56(4):289-98.
- León LA, León R. Las rinopatias en las leishmaniasis tegumentar americana. In: Publicación de la Asociación para el Estudio de Patología Tropical y las Ciencias Naturales. Kasmera. Universidad del Zulia: Maracaibo-Venezuela, 1976; 315-333.
- Lindenberg A. A úlcera de Bauru e o seu micróbio. *Comunicação preventiva. Rev Méd de S Paulo* 1909; 12:116-120.
- Maioli TU, Takane E, Arantes RME, Fietto JLR, Afonso LCC. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. *Parasitol. Res*. 2004; 94 (3): 207-212.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1986; 80:859.
- Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 1994; 10:359-375.
- Matlashewski G. *Leishmania* infection and virulence. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190:37-42.
- Mendonça SC, Russell DG, Coutinho SG. Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp63). *Clin Exp Immunol*. 1991; 83(3): 472 – 478.

- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- Morgado-Diaz 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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2005; 100: 377-383.
- Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. Curr Opin Microbiol. 1998; 1(4):455-460.
- Mottram JC, Coombs GH, Alexander J Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. Curr Opin Microbiol 2004; 7:375-381.
- Mottram JC, Frame MJ, Brooks DR, Tetley L, Hutchison JE, Souza AE, Coombs GH. The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. J Biol Chem. 1997; 272(22):14285–14293.
- Mottram JC, Robertson CD, Coombs GH, Barry JD. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. Mol Microbiol. 1992; 6(14):1925-1932.
- Mottram JC, Coombs GH, Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. Curr Opin Microbiol. 2004; 7: 375-381.
- Mukhopadhyay S, Sen P, Majumder HK, Roy S. Reduced expression of lipophosphoglycan (LPG) and kinetoplastid membrane protein (KMP)-11 in *Leishmania donovani* promastigotes in axenic culture. J. Parasitol. 1998; 84 (3): 644-647.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet 2005; 366:1561-1577.
- Nakhaee A, Taheri T, Taghikhani M, Mohebbali M, Salmanian AH, Fasel N, Rafati S. Humoral and cellular immune responses against Type I cysteine proteinase of *Leishmania infantum* are higher in asymptomatic than symptomatic dogs selected from a naturally infected population. Vet Parasitol 2004; 119:107-123.
- Neuber H. Leishmaniasis. J Dtsch Dermatol Ges 2008 6 (9), 754-765.

- North MJ, Mottram JC, Coombs GH. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol Today*. 1990; 6(8):270-275.
- OMS (World Health Organization/ WHO). Control of leishmaniasis: Report of WHO expert committee. Technical report series 793. Geneva; 1990.
- Organização mundial da saúde (World Health Organization/ WHO), 2014. Leishmaniasis. Disponível em < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> > Acessado em: 6 Dez 2014.
- Oumeish OY. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. *Clin Dermatol* 1999; 17:249-254.
- Papadopoulou B, Huang XF, Boucher N, McNicoll F. Stage-specific regulation of gene expression in *Leishmania*. *ASM News*. 2003; 69 (6), 282–288.
- Paraguassu-Chaves CA. Geografia Médica ou da Saúde (Espaço e doença na Amazônia Ocidental). Rondônia: Edufro; 2001.
- Park IY, Park CB, Kim MS, Kim SC. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett*. 1998; 437:258-262.
- Pascalis H, Lavergne A, Bourreau E, Prévot-Linguet G, Kariminia A, Pradinaud R, Rafati S, Launois P. Th1 cell development induced by cysteine proteinases A and B in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun* 2003; 71:2924-2926.
- Passos VM, Falcão AL, Marzochi MC, Gontijo CM, Dias ES, Barbosa-Santos EGO, Guerra HL, Katz N. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1993; 88(1):1031- 1110.
- Pereira BA, Alves CR. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol*. 2008; 20;158(4):239-255.
- Pereira BA, Britto C, Alves CR. Expression of infection-related genes in parasites and host during murine experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Microb Pathog*. 2012; 52(2):101-108.
- Pereira BA, Silva FS, Rebello KM, Marín-Villa M, Traub-Cseko YM, Andrade TC, Bertho ÁL, Caffarena ER, Alves CR. In silico predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during

- Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection. BMC Immunol. 2011; 8;12:44.
- Pereira BA, Souza-Silva F, Silva-Almeida M, Santos-de-Souza R, Gonçalves de Oliveira LF, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Proteinase inhibitors: a promising drug class for treating leishmaniasis. Curr Drug Targets. 2014; 15(12):1121-1131.
- Pereira JM. Isolamento e antigenicidade de duas frações de proteínas obtidas de *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) chagasi*. Tese [Doutorado em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz; 2001.
- Pessôa SM. Parasitologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.
- Pessotti JH, Zaverucha Do Valle T, Corte-Real S, Conçalves da Costa SC. Interaction of *Leishmania (L.) chagasi* with the vero cell line. Parasite. 2004; 11:99-102.
- Petropolis DB, Rodrigues JC, Viana NB, Pontes B, Pereira CF, Silva-Filho FC. *Leishmania amazonensis* promastigotes in 3D Collagen I culture: an in vitro physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. Peer J. 2014; 3;2:e317.
- 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; 115:359- 369.
- Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JR, Guedes HL, Fentanes RF, Rossi-Bergmann B: TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. Microbes Infect 2005, 7(13):1317–1323.
- Pollock KG, McNeil KS, Mottram JC, Lyons RE, Brewer JM, Scott P, Coombs GH, Alexander J. The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. J Immunol 2003; 170:1746-1753.
- Pütsep K, Bränden CI, Boman HG, Normark S. Antibacterial peptide from *H. pylori*. Nature 1999; 398:671-672.
- Pütsep K, Normark S, Boman HG. The origin of cecropins; implications from synthetic peptides derived from ribosomal protein L1. FEBS Lett. 1999; 451:249-252.
- 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; 106(1):95-104.

- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7:581-596.
- Rivas L, Moreno J, Cañavate C, Alvar J. Virulence and disease in Leishmaniasis: what is relevant for the patient? *Trends Parasitol.* 2004 jul; 20 (7): 297-301.
- Roberts LS, Janovy JJ. Foundations of parasitology. In: New York: McGraw-Hill, cap. Kinetoplastida: Trypanosomes and their kin, 2000; p 55-81.
- Robertson CD, Coombs GH. Cathepsin B-like cysteine proteases of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62:271-279.
- Robertson CD, Coombs GH. Characterisation of three groups of cysteine proteinases in the amastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* 1990; 42(2):269-276.
- Rogers ME. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Frontiers in Microbiology.* 2012; 3:223.
- Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science.* 1984; 30;223(4643):1417-1419.
- Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol*, 1989; 69: 100-103.
- Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol.* 2002; 120(1):1-21.
- Sakanari JA, Nadler SA, Chan VJ, Engel JC, Leptak C, Bouvier J. *Leishmania major*: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. *Exp Parasitol* 1997; 85:63-76
- Santos DA. Proposição de modelos tridimensionais da região cooh-terminal da cisteíno-protease b de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Dissertação [Mestrado em Biologia Computacional e de Sistemas] – Instituto Oswaldo Cruz; 2014.
- Schindler CA, Schuhardt VT. Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the *Staphylococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1964; 51:414-421.
- Schlagenhauf E, Etges R, Metcalf P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63) Structure. 1998;6(8):1035–1046.

- Selzer PM, Pingel S, Hsieh I, Ugele B, Chan VJ, Engel JC, Bogyo M, Russell DG, Sakanari JA, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(20):11015–11022.
- Silva-Almeida M, Pereira BA, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasit Vectors*. 2012; 7;5:160.
- Silva-Almeida M, Souza-Silva F, Pereira BA, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. *Parasit Vectors*. 2014; 20;7:387.
- Silva-Almeida M. *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cepa mcan/br/1998/r619: variabilidade no perfil biológico e expressão gênica de proteases. Tese [Doutorado em Biologia Parasitária] – Instituto Oswaldo Cruz; 2014.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and Immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – a Review. *Mem Instituto Oswaldo Cruz*. 2004; 99(3): 239-251.
- Soares RP, Cardoso TL, Barron T, Araújo MS, Pimenta PF, Turco SJ. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int J Parasitol*. 2005; 35(3):245- 253.
- Souza-Silva F, Pereira BA, Finkelstein LC, Zucolotto V, Caffarena ER, Alves CR. Dynamic identification of H2 epitopes from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cysteine proteinase B with potential immune activity during murine infection. *J Mol Recognit*. 2014 ;27(2):98-105.
- Swenerton RK, Knudsen GM, Sajid M, Kelly BL, McKerrow JH: *Leishmania* subtilisin is a maturase for the trypanothione reductase system and contributes to disease pathology. *J Biol Chem* 2010, 285(41): 31120–31129.
- Swenerton RK, Zhang S, Sajid M, Medzihradzsky KF, Craik CS, Kelly BL, McKerrow JH: The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem* 2011; 286(1):429–440.
- Thiakaki M, Kolli B, Chang KP, Soteriadou K. Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes Infect*. 2006;8(6):1455–1463.

- Tolson DL, Jardim A, Schnur LF, Stebeck C, Tuckey C, Beecroft RP, et al. The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infect. Immun.* 1994; 62 (11): 4893-4899.
- Traub-Cseko YM, Duboise M, Boukai LK, McMahon-Pratt D. Identification of two distinct cysteine proteinase genes of *Leishmania pifanoi* axenic amastigotes using the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 57:101-115.
- Valdivieso E, Dagger F, Rascón A. *Leishmania mexicana*: identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. *Exp Parasitol.* 2007; 116(1):77-82.
- Vale ECS, Furtado T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. *An Bras Dermatol.* 2005;80(4):421- 428.
- Van Regenmortel MHV. Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. *Methods.* 1996; 9(3):465-472.
- Velasco-Garcia MN. Optical biosensors for probing at the cellular level: a review of recent progress and future prospects. *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20:27-33.
- Wanderley JL, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VW, Prates DB, de Souza AP, Barral A, Balanco JM, do Nascimento MT, Saraiva EM, Barcinski MA. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of leishmaniasis. *PLoS One.* 2009; 4:e5733.
- 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(3):655-674.
- Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;132(1):1–16.
- Yao C. Major Surface Protease of Trypanosomatids: One Size Fits All? *Infect Immun.* 2010;78(1):22–31.
- Young DG, Duncan NA. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: *Psychodidae*). *Mem Am Entomol Inst.* 1994; 54:1-881.

Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol.* 2002; 18 (6): 272-278.

Zenian A , Rowtes P, Gingell D. Scanning electronmicroscopic study of the uptake of Leishmania parasite by macrophages. *J Cell Sci* 1979,39: 187-199.

8. Anexo

Proteinase Inhibitors: A Promising Drug Class for Treating Leishmaniasis

Bernardo Acácio Santini Pereira[#], Franklin Souza-Silva[#], Mariana Silva-Almeida, Raquel Santos-de-Souza, Luiz Filipe Gonçalves de Oliveira, Michelle Lopes Ribeiro-Guimarães, and Carlos Roberto Alves^{*}

Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, Avenida Brasil, 4365 Pavilhão Leonidas Deane, sala 209A, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ - CEP: 21040-900, Brasil

Abstract: This review presents and discusses the current status and perspectives of leishmaniasis treatment, with a special focus on the use of proteinase inhibitors. The history of treatment development, the first- and second-choice modern drugs and the advantages and disadvantages of using proteinases inhibitors as leishmanicidal treatments are presented and discussed. The reports gathered herein confirm the potential usefulness of proteinases inhibitors as an alternative or complement to the current leishmaniasis treatments. They also support the hypothesis that a combined treatment with multiple proteinase inhibitors may be efficient against *Leishmania* infections in vertebrate hosts.

Keywords: Leishmaniasis, *Leishmania*, proteinases, proteinase inhibitors, treatment, virulence factors.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is considered an endemic disease in 88 countries and is found in the Americas, Africa, Asia, Eastern Europe and Oceania [1, 2]. It is a tropical disease that primarily affects populations in poor or emerging countries. The World Health Organization estimates that the incidence of this disease, considering all clinical forms, is approximately 1.5 million new cases/year; however, this number is likely underestimated due to difficulties in identifying all cases and the occurrence of asymptomatic infections [2].

This parasitic disease is caused by species of the genus *Leishmania* and is acquired by a vertebrate host during the blood meal of phlebotomine sandflies. After entering the host as promastigotes, the parasites undergo morphological changes into amastigotes and become able to infect cells in the skin, mucosa or cartilage, thus causing the cutaneous form of the disease (CL). Depending on the parasite species and strain, the amastigotes may colonize cells in internal organs, including the liver, spleen and bone marrow, to cause the visceral form of the disease (VL) [3]. In contrast to extracellular promastigotes that possess a visible flagellum, amastigotes are intracellular round-shaped forms that preferentially inhabit cells of the mononuclear phagocyte system. This last morphological stage of the parasite is the preferred target for the development of novel chemotherapies because it is the parasite stage that inhabits vertebrate hosts.

However, despite the high incidence rate and the commitment of researchers working to develop new drugs for leishmaniasis treatment, little success has been achieved. The current drugs used in the treatment of leishmaniasis have limitations regarding their use, such as high cost, difficulty

of administration, toxicity or the occasional development of resistant parasite strains, which represent obstacles to successful therapies [4]. For this reason, there is a dire need to identify novel and specific drugs to treat *Leishmania* infections.

HISTORY AND CURRENT STATUS OF LEISHMANIASIS TREATMENT WITH ANTIMONIALS

Despite the length of time that the *Leishmania* parasites have been known (the first report dates back to 1885 by David D. Cunningham) [5], leishmaniasis remains a major cause of suffering for many millions of people in the tropical and subtropical regions of the world. This situation is due to the absence of effective treatment options, inadequate control practices and little to none interest of the major pharmaceutical industries to research for novel treatment alternatives. This lack of interest characterizes leishmaniasis as a tropical neglected disease.

The current treatment for leishmaniasis is based on that proposed by Gaspar Vianna in 1912, who was able to effectively treat cutaneous leishmaniasis patients by intravenously injecting emetic tartar [6]. His approach was inspired by the then promising microbicidal effects that antimonials presented against other trypanosomatid species [7].

In 1915, Vianna's treatment has also been shown to be effective against visceral leishmaniasis, as reported by Cristina and Caronia in Italy [8] and by Rogers in India [9]. However, the treatment has disadvantages, as the drug is highly toxic to the patients and is very unstable in the tropical climate. Antimony has even been reported to have no beneficial effect in other studies [10, 11].

This controversy led to further studies and, in 1920, to the development of a new antimonial compound to treat kala-azar: urea stibamine by Upendranath Brahmachari [12]. The next developments in leishmaniasis treatment were achieved only decades later with the advent of the pentavalent antimonials: sodium antimonyl (V) gluconate in 1937

^{*}Address correspondence to this author at the Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz, Avenida Brasil, 4365 Pavilhão Leonidas Deane, sala 209A, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ - CEP: 21040-900, Brasil; Tel: +55 21 38658191; Fax: +55 21 38658200; E-mail: calves@ioc.fiocruz.br

[#]These authors have equally contributed to this review paper.

[13] and sodium stibogluconate in 1945 [14]. These drugs are associated with fewer toxic effects for the patients.

Currently, these pentavalent antimonials (Sb^{5+}) that have been in use since the 1940s and remain the first-choice drugs for the treatment of all leishmaniasis clinical forms. The longevity of this treatment course is explained by the higher risks of toxicity associated with other antileishmanial drugs (amphotericin B and pentamidine). These drugs are only recommended in cases in which there is a contraindication, intolerance or resistance to the pentavalent antimonials [15].

The following two pentavalent antimonials formulations are currently available: sodium stibogluconate (SSG; PentostamTM) and meglumine antimoniate (MA; GlucantimeTM). While SSG is used mainly in English-speaking countries, MA is prevalently marketed in French-, Spanish- and Portuguese-speaking countries [11]. Both the efficacy and toxicity of these compounds are related to their Sb^{5+} content and, despite their structural differences, they are considered therapeutically similar, even though the Pentostam formulation contains nearly 20% more Sb^{5+} per ml than Glucantime [16, 17].

To date, the precise mechanism of action of the pentavalent antimonials against the parasite remains largely unknown. However, it appears to be multifactorial, as observed for other heavy metal-based compounds, rather than being due a specific pathway. At the molecular level, it is believed that the antimony binds to the sulfhydryl groups of certain proteins, causing alterations in their structures and, eventually, impairing their function [18].

There is evidence suggesting that the biologically active form of the heavy metal in the compound is, in fact, the trivalent antimony (Sb^{3+}). Thus, the pentavalent antimony may be a pro-drug, as proposed by Goodwin and Page in 1943 [19]. Other authors have supported this hypothesis, as Miekley *et al.* (2002) that observed the bioreduction of Sb^{5+} into Sb^{3+} after the intramuscular administration of MA in patients with leishmaniasis [20]. In this case, the bioreductive agent implicated in the transformation was glutathione (GSH), a thiol present in high quantities in the intracellular environment [21-23].

In the search to understand how antimonials exert their antileishmanial effect, it has been reported that these compounds inhibit certain stages of the energy metabolism cycle in amastigotes. Experimental observations indicated that *in vitro* exposure of *Leishmania (Leishmania) mexicana* to SSG resulted in a dose-dependent decrease in both cell viability and CO_2 production derived from [6-C] glucose and [C]palmitate in the parasite cultures. Thus, it can be inferred from these data that the glycolytic enzymes and the components of the fatty acid oxidation pathway are inhibited by SSG, although the hexose monophosphate pathway and the citric acid cycle are not, leading to a depletion of intracellular ATP levels [11, 24].

Wyllie *et al.* (2004) showed that Sb^{3+} inhibits trypanothione reductase (TR) activity in *Leishmania (Leishmania) donovani*, an enzyme essential for the survival of the parasite inside macrophages [25]. Later, Baiocco *et al.* (2009) demonstrated that Sb^{5+} also binds, with high affinity, to the active

site of *Leishmania (Leishmania) infantum* TR and inhibits its enzymatic activity. The inhibition of TR by antimonials has been described as a pivotal step for the antileishmanial activity of these compounds [26].

The additional microbicidal effects of the antimonial compounds include the following: the induction of apoptosis in amastigotes by Sb^{3+} , as observed by DNA fragmentation and exposure of phosphatidylserines on the outer surface of plasma membrane in parasites exposed to antimonials [27]; the inhibition of topoisomerases [28]; the formation of complexes with ribonucleosides [29]; and, interference in the translocation of preformed purines [30].

Regarding the current treatment posology, the WHO recommends a dose of Sb^{5+} of 10 to 20 mg/kg/day intramuscularly or intravenously with a maximum total daily dose of 810 mg of Sb^{5+} . The treatments generally continue for 20 days but may be reduced to a minimum of two weeks if the anticipated parasitological cure is observed. In cases in which systemic use of Sb^{5+} is contraindicated, 0.2 to 1 ml of the antimonial solution may be administered directly into the lesions [11, 31, 32].

The use of antimony is characterized by a broad spectrum of mild to moderate adverse effects. The most common of these adverse effects are myalgia, arthralgia, nausea, vomiting, fever, headache, abdominal pain, pain at the site of application and edema. Nevertheless, these side effects are seldom considered severe enough to necessitate treatment discontinuation. The most hazardous side effect associated with antimonials is undoubtedly cardiotoxicity. This effect is markedly increased when Sb^{3+} is used, but it may also occur with high doses of Sb^{5+} . The cardiotoxicity associated with antimonials is characterized by several changes in the cardiovascular system, particularly altered ventricular repolarization [32, 33].

SECOND-CHOICE DRUGS FOR LEISHMANIASIS TREATMENT

In cases where there are contraindications for antimonial-based treatments, when patients present intolerance or due to emergence of resistant parasite strains, the use another set of drugs is recommended, as Amphotericin B, Pentamidine, Miltefosine or Paromomycin. Therefore, those are classified as second-choice drugs [15].

Amphotericin B

Amphotericin B deoxycholate is a polyene antibiotic obtained from *Streptomyces nodosus*, with well-known antifungal activity and reported to be effective against *Leishmania* promastigotes and amastigotes both *in vitro* and *in vivo* [34]. This drug has been applied for the treatment of VL in India and Brazil for many years and has proven to be an effective yet difficult treatment. Amphotericin B has also been shown to be effective against the mucosal form of leishmaniasis, in which relapses are common [35-38]. Attempts to reduce the side effects of amphotericin B led to the development of lipid formulations of this drug that encapsulate it in micelles. The lipid particles are quickly removed from patient circulation by mononuclear phagocytes that then deliver large quantities of the drug inside the infected cells, thus enhancing its antiparasitic effects.

Currently, the following three lipid formulations are available: liposomal amphotericin B (AmBisome; Nexstar, USA); amphotericin B lipid complex (Abelcet, ABLC; Liposome Co., USA); and amphotericin B colloidal dispersion (Amphocil, Amphotec; Sequus, USA) [35, 37, 39]. These formulations are similar to amphotericin B deoxycholate in their efficacy but are significantly less toxic. The liposomal formulation of amphotericin B is used for the treatment of VL only in Europe due to its very high cost, which precludes its use in developing countries [40, 41].

The mechanism of action of amphotericin B is due to its reaction with sterols that contain a methyl substitution in C-24 (episterol and ergosterol) in the parasite cell membrane, thus forming pores that alter the ionic balance, cell permeability and, eventually, cause cell death. However, this drug can also bind to cholesterol molecules present in the cell membrane of host cells, thus causing toxic side effects in the patients [17, 35, 40, 42]. This drug is highly effective against *Leishmania*; in assays with hamsters or monkeys infected with *L. (L.) donovani*, it was described to be 400 times more potent than pentavalent antimonials against the parasite.

In Brazil, the recommended dose of amphotericin B for VL or CL treatment is 1 mg/kg/day on alternate days for 20 days. The recommended total dose ranges from 1.0-1.5 g for CL treatment and 2.5-3.0 g for VL [16, 40, 43].

Despite its high effectiveness, amphotericin B is used as a second-choice drug due to its serious adverse effects and many treatment drawbacks, including the need for parenteral administration, long-term therapy and constant clinical monitoring. Thus, it is usually only used in cases where treatment with pentavalent antimonials did not produce an adequate response, however it is considered the first-choice drug for the treatment of pregnant women [17, 35, 37, 40, 42].

Pentamidine

Pentamidine is an aromatic diamine used for the treatment of patients who are unresponsive to therapy with antimonials. This drug is also applied in the treatment of incipient cases of Rhodesian or Gambia trypanosomiasis. It was first introduced as an antileishmanial agent in 1952 and has been used in the treatment of various clinical forms of leishmaniasis. However, its high toxicity and low effectiveness compared with other treatment options led to a suspension of its use in several countries [44-47].

Pentamidine's mechanism of action appears to be related to its ability to bind kinetoplast DNA in the parasites and thus affect their survival. However, this hypothesis requires further investigation, and other potential effects of pentamidine on the parasites must be addressed [41, 48, 49].

Pentamidine isothionate is preferably administered by intravenous infusion or, alternatively, intramuscularly, as it is readily absorbed and exits the circulation rapidly. The recommended dose is 7 mg/kg (corresponding to 4 mg of pentamidine base) in 48-hour intervals. Alternatively, a dose of 2 mg/kg of pentamidine base may be administered in seven injections. The total dose of pentamidine base in the treatment should not exceed 2 g [16, 43].

The most common adverse effects related to the use of pentamidine isothionate are pain and sterile abscesses at the

injection site, nausea, vomiting, dizziness, malaise, myalgia, arthralgia, headache, hypotension, syncope, cytolysis of pancreatic beta cells, hypoglycemia and hyperglycemia. In extreme cases, cardiotoxicity may occur, leading to fatal arrhythmia. Another major toxic effect of pentamidine is the development of insulin-dependent diabetes in treated patients; this effect has an incidence rate of 12.5% in cases in which the total dose of treatment nears 1 g [17, 35, 40, 50].

Miltefosine

Miltefosine, a hexadecylphosphocholine, was originally developed as an oral antineoplastic agent (for cutaneous cancer treatment). After a series of clinical studies between 1997 and 2000, it was approved under the commercial name Imipavido™, becoming, in some countries, the first available oral treatment for leishmaniasis [51].

Its mechanism of action against the *Leishmania* parasites appears to be via the modulation of cell surface receptors that affect many relevant cell processes, including calcium homeostasis, ether-lipid remodeling mechanisms, the synthesis of phosphatidylcholine, signal transduction, inositol metabolism, phospholipase activation and protein kinase C, as well as other mitogenic and apoptotic pathways. Miltefosine also increases macrophage cytotoxicity by increasing oxidative stress and stimulating cellular glucose consumption (by the production of reactive oxygen species such as H₂O₂ and superoxide O₂), eventually leading to the death of the parasites inhabiting these cells [52-57].

Miltefosine has been used at doses of 2-2.5 mg/kg/day or 50 mg twice a day for 28 days. It is noteworthy that the efficacy of this drug in the treatment of CL in the New World is limited [16, 43, 58].

The most common adverse effects observed with miltefosine are related to the gastrointestinal tract and include diarrhea and vomiting. These effects occur in more than 30% of the treated patients, and its use is contraindicated during pregnancy because it has known teratogenic effects. Severe symptoms may occur when doses as high as 200 mg per day are used [35, 59, 60].

Paromomycin

Paromomycin, also known as aminosidine, is the only aminoglycoside with clinically important antileishmanial activity; both the visceral and cutaneous forms can be treated with this antibiotic. Due its poor oral absorption, a parenteral formulation for VL treatment and a topical formulation for CL treatment have been developed [61-63]. Paromomycin has been tested against VL at dose of 15-20 mg/kg of paromomycin sulfate for 21 days [16]. The following three topical formulations have been used for cutaneous leishmaniasis: 15% paromomycin with 12% methylbenzethonium chloride; 15% paromomycin with 10% urea; and 15% paromomycin with 0.5% gentamicin. All of these formulations are administered twice a day for up to 20 days. These formulations have shown varying results depending on the species of *Leishmania* involved [43]. A notable advantage of paromomycin is observed when it is applied in combination with antimonials; in this case, paromomycin aids in reducing the therapy duration from 30 days to 17-21 days.

The exact mechanism of action of paromomycin requires further elucidation, but it has been reported to inhibit protein synthesis in protozoans by binding to the 30S ribosomal subunit and causing an accumulation of abnormal initiation complexes [64].

Similar to other aminoglycosides, paromomycin has several adverse effects, including ototoxicity, nephrotoxicity, eighth cranial nerve disease and liver function abnormalities [62].

Azoles

The many azole compounds have been widely used as oral antifungal agents as they are well tolerated by the patients and efficient to treat these infections [65, 66]. They have been suggested for clinical treatment of leishmaniasis, as these drugs have shown antileishmanial activity *in vitro* and *in vivo*, by inhibiting ergosterol biosynthesis in the parasites and thereby affecting their cell membrane.

Fluconazole has been reported to show promising results in the treatment of cutaneous or visceral leishmaniasis caused by parasites of both subgenera [67-69], although its efficiency, applicability or required dosage are still in debate [70-73].

Itraconazole presents similar contradictory data in the literature: there are reports of clinical cases where patients have been successfully treated for cutaneous leishmaniasis with this azole [74, 75]; but, in a larger clinical trial, it was noted that the cure rates of patients with cutaneous leishmaniasis were similar between the placebo group and the group treated with itraconazole [76].

Ketoconazole has also been used in studies with small patient numbers infected with species from both the Old and New Worlds and presented an acceptable cure rate [77-79]. However, these results still require confirmation by further larger studies.

PROTEINASES AS POTENTIAL TARGETS FOR NOVEL LEISHMANIASIS TREATMENTS

Proteolysis is a common mechanism of activation or inactivation of enzymes involved in an array of biological processes, such as digestion, blood clotting, cell differentiation and apoptosis [80].

Peptide bond hydrolysis can occur at the amino or carboxyl-terminal position of a polypeptide chain (exopeptidase activity) or within the polypeptide (endopeptidase or proteinase activity). The proteinases are classified based on the amino acid residues present in their catalytic site. The most common proteinase classes are serine, cysteine, aspartyl, metallo, threonine and glutamine proteinases. Among these, four classes have already been described in *Leishmania* parasites: serine, cysteine, aspartyl and metallo proteinases [81, 82].

Serine proteinases (SPs) contain a characteristic catalytic triad (histidine, serine and aspartic acid) in their active site. The hydrolytic activity of this triad occurs when the histidine and the aspartic residues interact with a serine residue and deprotonate a hydroxyl group. The enzyme then performs a nucleophilic attack on a carbonyl carbon of the substrate and hydrolyzes it [83].

Cysteine proteinases (CPs) have a hydrolytic mechanism similar to that of SPs; however, the active nucleophile radical is the thiol group of a cysteine residue rather than a hydroxyl group of a serine residue [83].

Aspartyl proteinases contain two aspartic acid residues in their active site that can act similar to an acid/base mechanism. In these enzymes, a water molecule coordinated between the two aspartic residues is activated by deprotonation and then attacks a carbonyl group in the substrate [83].

Metalloproteinases (MPs) contain a coordinated metal atom in their structure, usually zinc, which stabilizes the oxyanion hole. In many MPs, such as thermolysin and matrix MPs, two or three histidine residues and an acidic side chain perform the coordination of the metal ion. A water molecule is deprotonated by the coordinated metal ion and serves as the agent of hydrolytic activity against the substrate [83].

Despite their distinct and specific mechanisms of action, proteinases from these classes have been reported, in different studies and to variable degrees, to be virulence factors with relevant activity during the processes of *Leishmania* infection establishment and evolution in the vertebrate hosts.

Proteinases of *Leishmania* spp. as Virulence Factors and Targets for Novel Treatments

In the mammalian host cell, especially those of the mononuclear-phagocytic system, *Leishmania* parasites inhabit the parasitophorous vacuole (PV), which is originated by the fusion of a parasite-containing phagosome with other organelles, such as lysosomes and endosomes, characterized by an acidic environment (pH 4.7-5.2) with a great diversity of macromolecules [84, 85].

This potentially hostile environment is also the site where the metacyclic promastigotes that entered the mammal host differentiate into amastigotes, and must be able to adapt to the PV conditions [86]. In addition to this pivotal adaptation to the PV, the amastigotes must also be able to avoid or subvert the host's immune responses to further infect other cells.

It is in such conditions that the proteinases of *Leishmania* develop their activities and participate in nutrients acquisition, metabolic turnover and, as previously mentioned, host-parasite interactions.

Our group has previously extensively reviewed the data currently available in the literature regarding the roles of proteinases as virulence factors in *Leishmania* infections [82].

CPs are currently the protein class with the most reports of activity as virulence factors in *Leishmania* and are prevalent in species that belong to the *L. (L.) mexicana* complex [86]. Of all of the distinct CPs of these parasites, three papain-like CPs have been most thoroughly analyzed (CPA, CPB and CPC) [87].

CP activity is higher in *L. (L.) amazonensis* amastigotes, the evolutive form that infects mammals, than in promastigotes [88], which inhabit the gut of sandflies, and there is a correlation between the levels of CP expression and the infectivity of the parasite [89]. Thus, these proteinases have potential to influence the outcome of the infection.

Studies of CP gene suppression in *Leishmania* spp. have further demonstrated the important role of these proteinases. The suppression of CP expression diminishes the infectivity of *Leishmania (Leishmania) infantum* in hamsters [90] and that of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in human cell cultures [91]. In addition, suppressing the multiple copies of the CPB genes in *L. (L.) mexicana* reduces the capacity of the parasites to infect and induce lesions in the hosts [92, 93].

CPB has been reported to be the most relevant CP for parasites of the *L. (L.) mexicana* complex, as it exerts an extensive array of effects on the vertebrate host. This enzyme promotes interleukin (IL)-4 expression [94], inhibit IL-12 expression [95], affect the transcription factors STAT-1, AP-1 and NF- κ B, impair nitric oxide (NO) production [96] and cleave major histocompatibility complex (MHC) class I proteins [97].

A specific portion of CPB, the COOH-terminal extension, is not observed in other CPs and has been implicated in the infection process in the vertebrate host. This domain of CPB influences the production of cytokines and NO by the host and affects the capacity of parasites to survive inside macrophages [98-100].

Both CPA and CPC have been reported to play roles in the parasite-host interaction; however, these enzymes are less relevant to infection than CPB. Their suppression leads to fewer significant effects. *L. (L.) mexicana* parasites with a suppressed CPC gene are more susceptible to killing by host cells [101, 102], and *L. (L.) infantum* parasites with a suppressed CPA gene are less able to infect mammalian hosts [103].

Regarding MPs, the major surface protein (MSP or gp63) is abundantly expressed on the surface of *Leishmania* parasites [104] and has known roles as a virulence factor. GP63 is required for the promastigotes to survive complement-mediated lysis in the mammalian host [105, 106], it modulates certain cytokine responses in the host [107], and it affects the proliferation of natural killer cells during the infection [108]. This MP also affects transcription factors and signal transduction cascades and can cleave c-Jun (the central component of the transcription complex AP-1) [109] and NF- κ B [110], and it also activates tyrosine phosphatases in macrophages [108]. Interestingly, GP63 also affects the host immune responses by cleaving CD4 glycoprotein, as observed in assays with human T cells [111].

Some studies have also identified roles of SPs as virulence factors. In attenuated strains of *L. (L.) donovani*, the surface SP levels are decreased, and the presence of a 115 kDa SP affects the ability of parasites to infect their hosts [112]. Moreover, the expression of oligopeptidase B appears necessary for *Leishmania* parasites to remain undetected in macrophages during infection [113].

As the above data indicate, proteinases are highly relevant factors for many species of *Leishmania* and participate in pivotal processes of the parasite life cycle. Understanding the distinct mechanisms of proteinase action and their importance in the biology of the parasites are necessary to adequately define the potential of proteinase inhibitors for infection treatment.

Effects of Proteinase Inhibitors on *Leishmania* Parasites in Culture

Previous studies have reported the inhibitory effects of different classes of proteinases on the survival and/or proliferation of *Leishmania* parasites. These studies often describe the use of viral proteinase inhibitors, especially those targeted to HIV proteinases [114-117].

Certain HIV aspartyl proteinase inhibitors, including Ac-Leu-Val-Phenylalaninal, saquinavir mesylate and nelfinavir, impair *Leishmania* cell division. In addition, these drugs have been shown to decrease the number of monocytes co-infected by HIV/*Leishmania* in culture, in a dose-dependent fashion [118]. Together, these reports indicate the potential of using these drugs for leishmaniasis treatment and underline the need to develop drug design studies to increase their affinity for the *Leishmania* proteinases.

Another promising front for the search of new antileishmanial drugs is research into natural compounds obtained from plants or other organisms. Interestingly, the mechanism of action of some of these compounds is through proteinase inhibition.

The bio avonoid fukugetin is a compound isolated from the fruits of *Garcinia brasiliensis* by ethyl-acetate extraction, and it has been shown to inhibit the activity of *L. (L.) amazonensis* cysteine and serine proteinases. However, this compound showed no activity against promastigotes or amastigotes *in vitro* [119].

A Kunitz-type serine proteinase inhibitor obtained from a sea anemone, named ShPI-I, was able to affect SP activity in promastigotes of *L. (L.) amazonensis* and, also, to reduce parasites viability in culture, inducing morphological alterations to the cells [120]. This inhibitor's effects on parasites viability and morphology were more pronounced than those of classic SP inhibitors (N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone and benzamidine) at the same time point but in lower concentration, suggesting an effective antileishmanial activity.

In addition, chemically synthesized compounds with proteinase-inhibiting properties that have not been previously studied for the treatment of other diseases have been analyzed with regard to their effects on *Leishmania* parasites. MP-inhibiting synthetic compounds have been selected through *in silico* analysis from databanks, and these compounds were able to block *L. (L.) donovani* proliferation *in vitro*. Specifically, these compounds inhibit parasite dipeptidyl carboxypeptidase, which has been established as a putative target for antileishmanial chemotherapy [121].

By applying a similar strategy, the virtual screening of the ChemBridge databank for inhibitors of parasitic cysteine proteinases led to the identification of five non-peptide inhibitors with antileishmanial activity against *L. (L.) donovani* promastigotes *in vitro*. These inhibitors were selected by their potential capacity to bind to falcipain-2 and 3 from *Plasmodium* parasites, as measured through *in silico* assays, and their binding to *Leishmania* CPs can be explained by the high conservation of the CP binding pocket structure across these protozoans [122].

The small molecule thiocarbazate (PubChem SID 26681509) is another synthetic inhibitor that was discovered

by analyzing the NIH Molecular Libraries Small Molecule Repository. It is a potent inhibitor of human cathepsin L and has demonstrated toxicity against *L. (L.) major* promastigotes, although it is safe to human aortic endothelial cells even at high concentrations [123].

A potent synthetic inhibitor of calpains, carbobezoxy-valinyl-phenylalaninal (commercial name, MDL 28170), also presents antileishmanial activity. MDL 28170 induces *L. (L.) amazonensis* parasite death in culture and promotes alterations in the cell morphology. Possible targets for this inhibitor are the calpain-like molecules present on the cell surface of the promastigotes [124].

Effects of Proteinase Inhibitors in the Treatment of Experimental *Leishmania* Infection

Presently, little data are available in the literature regarding the outcome of using proteinase inhibitors targeting parasite enzymes to treat experimental *Leishmania* infections in experimental animal infections or in host cell cultures.

Nevertheless, CP inhibitors have been reported to have promising results when applied in a chemotherapeutic context in experimental animal infection models. Two derivatives of oxalic bis[(2-hydroxy-1-naphthyl) methylene]hydrazide (named ZLIII43A and ZLIII115A), both reversible CP inhibitors, and the pseudopeptide substrate analogue morpholine urea-phenylalanine-homophenylalanine-vinylsulfonyl-benzene (K11002, Arris Pharmaceuticals), an irreversible inhibitor of CP, were shown to interfere in *L. (L.) major* infections *in vitro* and *in vivo* [86]. These compounds prevented parasite replication and infection of mouse macrophages (cell line J774) challenged in culture with *L. (L.) major* promastigotes. However, none of these compounds affected the host cells (as assessed by analysis of morphological changes).

These same compounds delayed lesion progression and reduced the parasite burden in infected BALB/c mice, without toxic effects to the treated animals. Contrary to the mechanism of action previously suggested for another CP inhibitor (CA074, a cathepsin B-specific inhibitor) that was also able to cure *L. (L.) major*-infected BALB/c mice [125], these inhibitors were not able to alter the T lymphocyte response of the host and appeared to act directly on the *Leishmania* CPs.

A distinct CP inhibitor, N-benzoyloxycarbonyl-phe-aladiazomethylketone (Z-FA-DMK, Sigma), also impaired the parasite infection of host cells [126]. In this case, it has been suggested that Z-FA-DMK affects the activity of *L. (L.) mexicana* cysteine proteinase B, a known pivotal virulence factor for this species; however, the specificity of this action was not completely defined. This inhibitor was very efficient at preventing the infection of peritoneal cells from BALB/c mice by promastigotes or amastigotes and also reduced the number of infecting parasites per host cell; however, when used in parasite cultures for extended periods, it did not alter the growth of the parasite cells and only partially inhibited their CP activities.

The treatment of *L. (L.) tropica*-infected BALB/c mice with subcutaneous or intraperitoneal injections of an irreversible CP inhibitor, the pseudopeptide substrate analogue

N-Pip-phenylalanine-homophenylalanine-vinyl sulphone phenyl (N-Pip-F-hF-VS Phenyl or K11777), showed that this compound possesses antiparasitic activity. The treated animals showed a reduction in lesion size, and this effect persisted for as long as 2 months after the end of treatment [127].

This same CP inhibitor, K11777, was also reported to hinder the survival of *L. (L.) mexicana* parasites inside peritoneal macrophages from CD1 mice [128]. When parasites were incubated with K11777 prior to the infection assays, macrophage infection rates fell by nearly 75%. This effect is comparable to what is observed in experimental challenges using mutant parasites with *cpa* and *cpb* gene depletion. The effect of this inhibitor appears to be related to preventing autophagosome digestion in the parasites.

Cystatin, another inhibitor of CPs, has also been reported to show activity in murine models of *Leishmania* infection, specifically in BALB/c mice infected with *L. (L.) donovani* [129]. The use of cystatin in conjunction with interferon (IFN)- γ demonstrated antiparasitic effects. This combination affected amastigote growth inside macrophages *in vitro* and had curative effects for the infected animals, including the virtual elimination of parasites in the spleen after treatment. Interestingly, such treatment also led the treated mice to develop subsequent resistance to infection challenge. This evidence suggests the possibility that this CP inhibitor is not acting directly on parasite enzymes but is rather affecting the host cells in some way. This hypothesis is supported by the observations that macrophage nitrite production is enhanced, and the T lymphocyte response is altered by cystatin.

Two compounds derived from *trans*-aziridine-2,3-dicarboxylic acids (13b and 13e), which are irreversible inhibitors of cathepsin-B-like enzymes, have been reported to reduce the *L. (L.) major* infection rate in peritoneal macrophages obtained from BALB/c mice without showing toxic effects against the mammalian cells. These compounds induce parasite death with features that are similar to apoptosis, namely the accumulation of undigested debris in lysosome-like vacuoles within the parasites [130]. Similar to the pattern observed for cystatin, co-treatment with IFN- γ enhanced the antiparasitic effects of these compounds in infected macrophages. Furthermore, compounds 13b and 13e interfered with the production of interleukins and NO in infected peritoneal macrophages. These compounds changed the levels of IL-6, IL-12 and tumor necrosis factor (TNF)- α in cell culture and increased NO levels [131].

CP inhibitors have also demonstrated potential in the treatment against parasites during *Leishmania* infection of human cells or tissues. The cathepsin B-specific inhibitor CA074, which had a protective effect for BALB/c mice against *L. (L.) major* as described above, was shown to interfere in the infection of macrophages from the human myeloid cell line U937 with *L. (L.) infantum*. CA074 reduced parasite survival inside host cells [132]. Remarkably, the mechanism of this effect appears distinct from the one observed in the murine host and is possibly related to the inhibition of the parasite CPs rather than a direct effect on the host enzymes. In addition, because *Leishmania* cathepsin B has been implicated in the activation of host transforming growth factor (TGF)- β , which leads to an inefficient Th2

response, the inhibition of this enzyme by CA074 would prevent TGF- β activation and allow for the host to control the infection through an effective Th1 response.

Specific inhibitors of another class of CPs, cathepsin L, have also been shown to abrogate the parasite effect on IL-12 expression [133]. The compound cathepsin L inhibitor IV (Calbiochem) has been reported to interfere in the parasite-related cleavage of nuclear factor (NF)- κ B or its endogenous inhibitors, as assayed in bone marrow-derived macrophages challenged with *L. (L.) mexicana*. This effect prevents IL-12 production by macrophages even after lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Similar results have also been observed for K11002, which was previously mentioned due its effects on *L. (L.) major* survival in infected mice or murine cell cultures.

Inhibitors of other proteinase classes also have the potential to be used for the treatment of *Leishmania* infection. Five aspartyl proteinase inhibitors that are currently used for the treatment of HIV infection (amprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir and saquinavir) have been shown to affect *L. (L.) amazonensis* parasites *in vitro*, although with varying degrees of activity. These inhibitors impaired parasite growth in culture and induced changes in cell morphology. In addition, amprenavir, lopinavir and nelfinavir interfered with the parasite-macrophage association indexes if they were incubated with the promastigotes prior to the interaction assays [116].

However, other studies have reported that indinavir and ritonavir could not effectively control the infection in *L. (L.) amazonensis* experimentally infected mice; these antiretrovirals were able to reduce lesions in infected mice after 3-5 weeks of treatment, but they did not affect the parasite load [134].

Serine proteinase inhibitors present in potato tuber extract, which were effective to inhibit SP activities in log-phase promastigotes of *L. (L.) donovani*, also reduced viability of promastigotes in culture and affected amastigotes proliferation inside murine peritoneal macrophages [135]. This extract presented the potential to serve as basis for the development of new drugs against visceral leishmaniasis, as it was shown to have no adverse effects on macrophages, while enhancing the production of nitric oxide and reactive oxygen species, molecules related to parasite killing, in these cells.

REMARKS

Leishmaniasis is a neglected tropical disease and, as this term implies, there is a great need for additional research to improve the treatment options for this disease. Antimonials are the current first-choice drugs for leishmaniasis treatment and have been so for a substantial period of time. However, they are highly toxic compounds and, if they were proposed currently as a new drug, they would likely not be approved due to the rigid eligibility criteria and strict regulatory aspects for clinical trial investigations for drug approval [136, 137].

The current trends for drugs research in parasitic diseases include the application of proteinase inhibitors as chemotherapeutic agents. However, the data collected in inde-

pendent reports have been unable to effectively prove that proteinase inhibitors can adequately replace antimonials in the treatment of leishmaniasis.

As previously described for *L. (L.) amazonensis* [81], *Leishmania* parasites differentially express proteinases in the various stages of their life cycle, reflecting the changes in their environment. These variations must be regarded when considering proteinase inhibitors as potential chemotherapeutic drugs. New drugs should focus primarily on the proteinases that are relevant to the parasite morphological stages that inhabit vertebrate hosts.

Another important point to consider is that certain minor structural differences in proteinases of the same type can affect their catalytic site microenvironment. These variations may make it difficult to develop proteinase inhibitors with wide activity against an array of proteinases in *Leishmania* spp.

In addition, due to the large variety of proteinases reported in these parasites, it is possible that only a combined treatment with distinct proteinase inhibitors would be an effective antileishmanial therapy.

Finally, it is important to consider that, despite the relative safety that proteinase inhibitors have been presenting when used against *Leishmania* in cell cultures or animal models, these drugs may cause some undesired side effects when applied in the treatment of leishmaniasis patients. It has been reported that proteinase inhibitors used in anti-HIV therapies may cause dyslipidemia, insulin resistance, type 2 diabetes, cardiac conduct abnormalities, nausea and diarrhea, however the more recently developed inhibitors cause these side effects less frequently [138-141]. Currently, an experimental animal model, using hamsters, is being developed to conduct studies about the side effects of antiretroviral proteinase inhibitors [141] and may, therefore, be also useful to determine the safety of potential antileishmanial proteinase inhibitors.

We firmly believe that only by understanding the modulation of distinct isoforms of the same proteinase will it be possible to propose a fine-tuned and effective strategy for controlling *Leishmania* parasites during infection of the vertebrate host. The establishment of treatments based on such variations would be a great contribution to controlling and curing this relevant parasitic disease.

Proteinases are a promising target for developing drugs to treat leishmaniasis because:	Relevant aspects to be considered for the development of treatments based on <i>Leishmania</i> proteinase inhibitors:
<ul style="list-style-type: none"> • They are pivotal factors for parasites' life cycle and interaction with host; • Drugs currently available for leishmaniasis present many toxic side effects and resistant strains are emerging; 	<ul style="list-style-type: none"> • Parasites express distinct sets of proteinases in different phases of their life cycle; • Minor structural differences in the catalytic site of proteinases of a same type may prevent broad effect by the inhibitors;

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Reports from <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> studies show that specific inhibitors for <i>Leishmania</i> proteinases are safe for mammalian cells and animals; • Knowledge about characteristics and diversity of parasite's proteinases has been advancing greatly in recent years. | <ul style="list-style-type: none"> • Development of inhibitors should focus primarily on those proteinases known to be expressed by amastigotes (mammalian host-inhabiting evolutive stage). |
|--|---|

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Alves CR designed this review study and Alves CR, Pereira BAS, Souza-Silva F, Silva-Almeida M, Santos-de-Souza R, Oliveira LFG and Ribeiro-Guimarães ML performed the research. All authors approved the final version of this manuscript.

This study received financial support from PAPES (CNPq/Fiocruz), CAPES and Faperj.

REFERENCES

- Neghina R, Neghina A. Leishmaniasis, a global concern for travel medicine. *Scandinavian J Infect Dis* 2010; 42(8): 563-70.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One* 2011; 7(5): e35671.
- Kato H, Gomez E, Cáceres A, *et al.* Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *Int J Environ Res Public Health* 2010; 7(3): 814-26.
- Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin Exp Dermatol* 2010; 35(7): 699-705.
- Cox F. History of human parasitology. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(4): 595-612.
- Vianna G: Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tartaro emético. In: *Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia*, Belo Horizonte, Brasil 1912; 42: pp 426-8.
- Rey L. Gaspar Vianna and the discovery of the treatment of leishmaniasis by antimonials. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1962; 4(2): 47-52.
- Di Cristina G, Caronia G. Sulla terapia della leishmaniosi interna. *Pathologica* 1915; 7: 82-83.
- Cook GC: Leonard Rogers KCSI FRCP FRS (1868-1962) and the founding of the Calcutta School of Tropical Medicine. *Notes Rec R Soc Lond* 2006; 60(2): 171-81.
- Shortt HE: Recent research on kala-azar in India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1945; 39(1): 13-31.
- Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis* 1988; 10(3): 560-86.
- Brahmachari UN. A Treatise on Kala-azar. London: John Bale, Sons & Danielsson 1928.
- Kikuth W, Schmidt H. Contribution to the progress of antimony therapy of kala-azar. *Chin Med J* 1937; 52: 425-32.
- Goodwin LG. Pentostam (sodium stibogluconate): a 50-year personal reminiscence. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89(3): 339-41.
- Haldar AK, Sen P, Roy S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Mol Biol Int* 2011; 2011: 571242.
- World Health Organization (WHO). WHO Technical Report Series 949. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the World Health Organization Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: WHO 2010.
- Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde - Brasil). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos 2ª edição. Brasília: Editora do Ministério da Saúde 2010.
- Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules* 2009; 14: 2317-36.
- Goodwin LG, Page JE. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem J* 1943; 37(2): 198-209.
- Miekeley N, Mortari SR, Shubach AO. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and online ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. *Anal Bioanal Chem* 2002; 372(3): 495-502.
- Frézard F, Demicheli C, Ferreira CS, *et al.* Glutathione- induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(3): 913-916.
- Frézard F & Garnier-Suillerot A. Permeability of lipid bilayer to anthracycline derivatives. Role of the bilayer composition and of the temperature. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1389(1): 13-22.
- Ferreira CS, Martins PS, Demicheli C, *et al.* Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *BioMetals* 2003; 16(3): 441-6.
- Berman JD, Waddell D, Hanson BD. Biochemical Mechanisms of the Antileishmanial Activity of Sodium Stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27(6): 916-20.
- Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2004; 279(38): 39925-32.
- Baiocco P, Colotti G, Franceschini S, *et al.* Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. *J Med Chem* 2009; 52(8): 2603-12.
- Sudhandiran G, Shaha C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem* 2003; 278(27): 25120-32.
- Lucumi A, Robledo S, Gama V, *et al.* Sensitivity of *Leishmania Viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(8): 1990-5.
- Demicheli C, Frézard F, Lecouvey M, *et al.* Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1570(3): 192-8.
- Carter NS, Drew ME, Sanchez M, *et al.* Cloning of a novel inosine-guanosine transporter gene from *Leishmania donovani* by functional rescue of a transport-deficient mutant. *J Biol Chem* 2000; 275(27): 20935-41.
- Sampaio RNR, Sampaio JHD, Mardsen PD. Pentavalent antimonial treatment in mucosal leishmaniasis. *Lancet* 1985; 1(8437): 1097.
- Herwaldt B, Berman JD. Recommendations for treating Leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46(3): 296-306.
- Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Act Trop* 2011; 118(2): 87-96.
- Yardley V, Croft SL. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 13(4): 243-8.
- Sundar S. Treatment of visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190(1-2): 89-92.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354(9185): 1191-9.
- Wolday D, Berhe N, Akuffo H, *et al.* Emerging Leishmania/HIV Co-infection in Africa. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190(1-2): 65-7.
- Sampaio RNR, Mardsen P. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a Glucantime com anfotericina B lipossomal. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; 30(2): 125-8.
- Sievers TM, Kubak BM, Bering AW. Safety and efficacy of Intralipid emulsions of Amphotericin B. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38(3): 333-47.

- [40] Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde - Brasil). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2003.
- [41] Bryncton A. Current issues in the treatment of visceral leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190(1-2): 81-4.
- [42] Murrey HW, Hariprasad J, Fich HRE. Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis in a T-cell-deficient Host: Response to Amphotericin B and pentamidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(7): 1504-05.
- [43] Monzote L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. *Open Antimicrob Agents J* 2009; 1: 9-19.
- [44] Jha TK. Evaluation of allopurinol in the treatment of kala-azar occurring in North Bihar, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77(2): 204-7.
- [45] Jha SN, Singh NK, Jha TK. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. *J Assoc Physicians India* 1991; 39(4): 314-6.
- [46] Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 2001; 6(11): 849-54.
- [47] Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 2004; 7(4-5): 257-66.
- [48] Doua F, Miezian TW, Singaro JRS, *et al.* The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55(6): 586-8.
- [49] Correia D, Macêdo VO, Carvalho EM, *et al.* Comparative study of meglumine antimoniate, pentamidine isethionate and aminosidine sulfate in the treatment of primary skin lesions caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29(5): 447-53.
- [50] Rang NP, Dale MM, Ritter JM. In: *Farmacologia 4th ed.*; Rang NP, Dale MM, Ritter JM, Guanabara Koogan. 2002: pp 610-21.
- [51] Croft SL, Engel J. Miltefosine discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100(Suppl 1): S4-8.
- [52] Sundar S, Jha TK, Thakur CP, *et al.* Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 2002; 347(22): 1739-46.
- [53] Croft SL, Seifert K, Duchêne M. Antiprotozoal activities of phospholipids analogues. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 126(2): 165-72.
- [54] Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(8): 3010-5.
- [55] Jha TK, Sundar S, Thakur CP, *et al.* Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 1999; 341(24): 1795-800.
- [56] Sundar S, Rosenkaimer F, Makharia MK, *et al.* Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet* 1998; 352(9143): 1821-3.
- [57] Bhattacharya SK, Jha TK, Sundar S, *et al.* Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clin Infect Dis* 2004; 38(2): 217-21.
- [58] Minodier P & Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis* 2007; 5(3): 150-158.
- [59] Arana B, Rizzo N, Diaz A. Chemotherapy of Cutaneous leishmaniasis: a review. *Med Microbiol Immunol* 2001; 190(1-2): 93-5.
- [60] Fisher C, Voss A, Engel J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. *Med Microb Immunol* 2001; 190(1-2): 85-7.
- [61] Croft SL, Yardley V, Kendrick H. Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96(Suppl 1): S127-29.
- [62] Sundar S, Jha TK, Thakur CP, *et al.* Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med* 2007; 356(25): 2571-81.
- [63] Ben Salah A, Zakraoui H, Zaatour A, *et al.* A randomized, placebo-controlled trial in Tunisia treating cutaneous leishmaniasis with paromomycin ointment. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53(2): 162-6.
- [64] Sundar S, Chakravarty J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Invest Drugs* 2008; 17(5): 787-94.
- [65] Rani N, Sharma A, Gupta GK, *et al.* Imidazoles as potential antifungal agents: a review. *Mini Rev Med Chem* 2013; 13(11): 1626-55.
- [66] Lestner J, Hope WW. Itraconazole: an update on pharmacology and clinical use for treatment of invasive and allergic fungal infections. *Expert Opin Drug Metabol Toxicol* 2013; 9(7): 911-26.
- [67] Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB, *et al.* Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N Engl J Med* 2002; 346: 891-5.
- [68] Jha BB. Fluconazole in Visceral Leishmaniasis. *Indian Pediatrics* 1998; 35: 268-9.
- [69] Sousa AQ, Frutuoso MS, Moraes EA, *et al.* High-dose oral fluconazole therapy effective for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 693-5.
- [70] Morizot G, Delgudice P, Caumes E, *et al.* Healing of Old World cutaneous leishmaniasis in travelers treated with fluconazole: drug effect or spontaneous evolution? *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76: 48-52.
- [71] Zuluñov A, Klaus S, Vardy D. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis (Letters to the Editor). *N Engl J Med* 2002; 347(5): 370.
- [72] Torres JR, Suárez JA. Fluconazole effectiveness against *Leishmania (Viannia) braziliensis*: is the evidence enough? *Clin Infect Dis* 2012; 55: 309.
- [73] Emad M, Hayati F, Fallahzadeh MK, *et al.* Superior efficacy of oral fluconazole 400 mg daily versus oral fluconazole 200 mg daily in the treatment of cutaneous *Leishmania major* infection: a randomized clinical trial. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64(3): 606-8.
- [74] Consigli J, Danielo C, Gallerano V, *et al.* Cutaneous leishmaniasis: successful treatment with itraconazole. *Int J Dermatol* 2006; 45: 46-9.
- [75] Baroni A, Aiello FS, Voza A, *et al.* Cutaneous leishmaniasis treated with itraconazole. *Dermatologic Therapy* 2009; 22: S27-S29.
- [76] Nassiri-Kashani M, Firooz A, Khamesipour A, *et al.* A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial of itraconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005; 19: 80-3.
- [77] Saenz RE, Paz H, Berman JD. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am J Med* 1990; 89: 147-55.
- [78] Weinrauch L, Livshin R, Even-Paz Z, *et al.* Efficacy of ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. *Arch Dermatol Res* 1983; 275: 353-4.
- [79] Weinrauch L, Livshin R, El-On J. Ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. *Br J Dermatol* 1987; 117: 666-8.
- [80] Beynon RJ, Bond JS. *Proteolytic enzymes: a practical approach*, 2nd ed. Oxford: Oxford University Press 2001.
- [81] Alves CR, Corte-Real S, Bourguignon SC, *et al.* *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation *in vitro*. *Exp Parasitol* 2005; 109(1): 38-48.
- [82] Silva-Almeida M, Pereira BAS, Ribeiro-Guimarães ML, *et al.* Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasit Vectors* 2012; 5: 160.
- [83] Erez E, Fass D, Bibi E. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* 2009; 459(7245): 371-8.
- [84] Pulvertaft RJ, Hoyle GF. Stages in the life-cycle of *Leishmania donovani*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1960; 54: 191-6.
- [85] McConville MJ, Naderer T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 2011; 65: 543-61.
- [86] Selzer PM, Pingel S, Hsieh I, *et al.* Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(20): 11015-22.
- [87] Sajid M & McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 120(1): 1-21.
- [88] Lasakosvitsch F, Gentil LG, dos Santos MR, *et al.* Cloning and characterization of a cysteine proteinase gene expressed in amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis*. *Int J Parasitol* 2003; 33(4): 445-54.
- [89] de Araújo Soares RM, dos Santos AL, Bonaldo MC, *et al.* *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. *Exp Parasitol* 2003; 104(3-4): 104-12.
- [90] Poot J, Denise H, Herrmann DC, *et al.* In: Experimental challenge models for canine leishmaniasis in hamsters and dogs. optimization and application in vaccine research; Poot J, Utrecht University press, 2006: pp 93-107.
- [91] 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(1): 3.

- [92] Mottram JC, Coombs GH, Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7(4): 375-81.
- [93] 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(12): 6794-801.
- [94] Denise H, McNeil K, Brooks DR, et al. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence *in vivo*. *Infect Immun* 2003; 71(6): 3190-5.
- [95] Cameron P, McGachy A, Anderson M, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol* 2004; 173(5): 3297-304.
- [96] Abu-Dayyeh I, Hassani K, Westra ER, et al. Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. *Infect Immun* 2010; 78(6): 2438-45.
- [97] De Souza Leao S, Lang T, Prina E, et al. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci* 1995; 108(Pt 10): 3219-31.
- [98] Marín-Villa M, Vargas-Inchaustegui DA, Chaves SP, et al. The C-terminal extension of *Leishmania pifanoi* amastigote-specific cysteine proteinase Lpcys2: a putative function in macrophage infection. *Mol Biochem Parasitol* 2008; 162(1): 52-9.
- [99] Alves CR, Benévolo-De-Andrade TC, Alves JL, et al. Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2004; 26(3): 127-35.
- [100] Pereira BAS, Silva FS, Rebello KM, et al. *In silico* predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during *Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection. *BMC Immunol* 2011; 12: 44.
- [101] Bart G, Frame MJ, Carter R, et al. Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 88(1-2): 53-61.
- [102] Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1(4): 455-60.
- [103] Denise H, Poot J, Jiménez M, et al. Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. *BMC Mol Biol* 2006; 13(7): 42.
- [104] Etges R, Bouvier J, Bordier C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem* 1986; 261(20): 9098-101.
- [105] Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 132(1): 1-16.
- [106] Yao C. Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? *Infect Immun* 2010; 78(1): 22-31.
- [107] Thiakaki M, Kolli B, Chang KP, et al. Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes Infect* 2006; 8(6): 1455-63.
- [108] Lieve T, Nylén S, Eidsmo L, et al. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol* 2008; 153(2): 221-30.
- [109] Contreras I, Gómez MA, Nguyen O, et al. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog* 2010; 6(1): e1001148.
- [110] Gregory DJ, Godbout M, Contreras I, et al. A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression. *Eur J Immunol* 2008; 38(4): 1071-81.
- [111] Gomez MA, Contreras I, Hallé M, et al. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal* 2009; 2(90): ra58.
- [112] Choudhury R, Das P, Bhaumik SK, et al. *In situ* immunolocalization and stage-dependent expression of a secretory serine protease in *Leishmania donovani* and its role as a vaccine candidate. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(4): 660-7.
- [113] Swenerton RK, Zhang S, Sajid M, et al. The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem* 2011; 286(1): 429-40.
- [114] Savoia D, Aliche T, Tovo PA. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26(1): 92-4.
- [115] Trudel N, Garg R, Messier N, et al. Intracellular survival of *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis is significantly reduced by HIV-1 protease inhibitors. *J Infect Dis* 2008; 198(9): 1292-9.
- [116] Santos LO, Marinho FA, Altoé EF, et al. HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. *PLoS One* 2009; 4(3): e4918.
- [117] Santos LO, Vitorio BS, Branquinha MH, et al. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(2): 348-53.
- [118] Valdivieso E, Rangel A, Moreno J, et al. Effects of HIV aspartyl-proteinase inhibitors on *Leishmania* sp. *Exp Parasitol* 2010; 126(4): 557-563.
- [119] Pereira IO, Assis DM, Juliano MA, et al. Natural products from *Garcinia brasiliensis* as *Leishmania* protease inhibitors. *J Med Food* 2011; 14(6): 557-62.
- [120] Silva-Lopez RE, Morgado-Díaz JA, Chávez MA, et al. Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. *Parasitol Res* 2007; 101: 1627-35.
- [121] Gangwar S, Baig MS, Shah P, et al. Identification of novel inhibitors of dipeptidylcarboxypeptidase of *Leishmania donovani* via ligand-based virtual screening and biological evaluation. *Chem Biol Drug Des* 2012; 79(2): 149-56.
- [122] Desai PV, Patny A, Sabnis Y, et al. Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors using virtual screening. 1. The ChemBridge database. *J Med Chem* 2004; 47(26): 6609-15.
- [123] Shah PP, Myers MC, Beavers MP, et al. Kinetic characterization and molecular docking of a novel, potent, and selective slow-binding inhibitor of human cathepsin L. *Mol Pharmacol* 2008; 74(1): 34-41.
- [124] d'Avila-Levy CM, Marinho FA, Santos LO, et al. Antileishmanial activity of MDL 28170, a potent calpain inhibitor. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28(2): 138-42.
- [125] Maekawa Y, Himeno K, Ishikawa H, et al. Switch of CD4+ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1998; 161(5): 2120-27.
- [126] 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.
- [127] Mahmouzzadeh-Niknam H, McKerrow JH. *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. *Expl Parasitol* 2004; 106(3-4): 158-63.
- [128] Williams RA1, Tetley L, Mottram JC, Coombs GH. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* 2006; 61(3): 655-74.
- [129] Das L, Datta N, Bandyopadhyay S, et al. Successful Therapy of Lethal Murine Visceral Leishmaniasis with Cystatin Involves Up-Regulation of Nitric Oxide and a Favorable T Cell Response. *J Immunol* 2001; 166(6): 4020-8.
- [130] Schurigt U, Schad C, Glowa C, et al. Aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in *Leishmania major* associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(12): 5028-41.
- [131] Ponte-Sucre A, Vicic R, Schultheis M, et al. Aziridine-2,3-Dicarboxylates, Peptidomimetic Cysteine Protease Inhibitors with Antileishmanial Activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(7): 2439-47.
- [132] Somanna A, Mundodi V, Gedamu L. Functional Analysis of Cathepsin B-like Cysteine Proteases from *Leishmania donovani* Complex: Evidence for the Activation of Latent Transforming Growth Factor B. *J Biol Chem* 2002; 277(28): 25305-12.
- [133] Cameron P, McGachy A, Anderson M, et al. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Macrophage IL-12 Production by *Leishmania mexicana* Amastigotes: The Role of Cysteine Peptidases and the NF-κB Signaling Pathway. *J Immunol* 2004; 173(5): 3297-304.
- [134] Demarchi IG, Silveira TG, Ferreira IC, et al. Effect of HIV protease inhibitors on New World *Leishmania*. *Parasitol Int* 2012; 61(4): 538-44.
- [135] Paik D, Das P, De T, Chakraborti T. *In vitro* Anti-leishmanial Efficacy of Potato Tuber Extract (PTEx): Leishmanial Serine Pro-

- tease(s) as Putative Target. *Exp Parasitol* 2014; pii: S0014-4894(14)00199-4.
- [136] Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of Leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 2002; 8(4): 319-42.
- [137] Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003; 19(11): 502-8.
- [138] Carr A, Samaras K, Chisholm DJ, *et al.* Pathogenesis of HIV-1-protease inhibitor-associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance. *Lancet* 1998; 352: 1881-3.
- [139] Anastos K, Lu D, Shi Q, *et al.* Association of serum lipid levels with HIV serostatus, specific antiretroviral agents, and treatment regimens. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 45: 34-42.
- [140] Günthard HF, Aberg JA, Eron JJ, *et al.* Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2014 recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA* 2014; 312(4): 410-25.
- [141] Ramos-Sanchez EM, Goto H, Rivero DHRF, *et al.* *In vivo* assessment of antiretroviral therapy-associated side effects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109(4): 484-7.

Received: July 09, 2014

Revised: August 22, 2014

Accepted: October 07, 2014

PMID: 25323706