

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

Cisteína-proteinases em promastigotas de *Leishmania (Viannia)*  
*braziliensis*

Karina Mastropasqua Rebello

**Orientador:** Carlos Roberto Alves

Rio de Janeiro  
2008

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

R291

Rebello, Karina Mastropasqua

Cisteína-proteinases em promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Karina Mastropasqua Rebello. – Rio de Janeiro, 2008.

xvi, 84 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2008.

Bibliografia: f. 69-84

1. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 2. Cisteína-proteinases. 3. Proteína de membrana. 4. Atividade enzimática. 5. Reação em Cadeia da Polimerase Via Transcriptase Reversa. I. Título.

CDD 616.936 4



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz

# Cisteína-proteinases em promastigotas de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*

Karina Mastropasqua Rebello

**Orientador:** Dr. Carlos Roberto Alves

**Banca Examinadora:** Dr. Reginaldo Peçanha Brazil

Dra. Suzana Côrte-Real Faria

Dra Helena Carla Castro

**Suplentes:** Dr. Fernando Ariel Genta (revisor)

Dra. Katia da Silva Calabrese

**Data da defesa:** 10/04/2008

Rio de Janeiro  
2008

*Dedico essa tese com muito amor para os meus pais e meus irmãos que sempre acreditaram e se orgulham da “filha-irmã cientista”...e aos meus anjinhos da guarda de plantão Léa, Rubem, Xuxu e Dani que me ajudaram muitíssimo para finalização dessa tese.*

## **Agradecimentos**

A agência de fomento CAPES pela minha bolsa de estudos durante o mestrado.

Ao Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) por oferecer uma excelente infra-estrutura para a pesquisa e de muitas vezes proporcionar a locomoção gratuita a Congressos e eventos científicos.

A Pós-Graduação de Biologia Celular e Molecular que esteve sempre engajada em solucionar os problemas surgidos ao longo desses dois anos, e por custear a minha participação no Congresso de Microscopia.

Aos meus pais Sandra e Adelino, por acreditarem nos meus sonhos e meus objetivos, e serem meus grandes incentivadores na busca incessante por um lugar ao sol. Amo muito vocês e com certeza sem o apoio e o carinho de vocês eu não chegaria até aqui, e esse é só o primeiro passo.

Ao meu orientador Carlos Roberto Alves, por toda confiança depositada em mim, pelo aprendizado, pela paciência, amizade, compreensão e até pelas nossas desavenças ao longo desse caminho, pois até essas foram de grande auxílio para meu crescimento pessoal e científico.

A Luzia Monteiro Côrtes, pelo convívio, por ser uma grande amiga, por todo o aprendizado quando entrei no laboratório na graduação, pelas inúmeras ajudas, carinho, conversas e pelas infinitas caronas para a Fundação, mesmo quando eu acordava atrasada. Pelo papel fundamental e essencial para o bom andamento das coisas do laboratório.

A Dr<sup>a</sup> Suzana Corte-Real, por todo o carinho e amizade conquistados durante essa jornada, por ser uma grande incentivadora e pelas belíssimas imagens de Microscopia de Transmissão.

A Renata Correia Hespanhol do Laboratório de Biologia Estrutural, pela ajuda inegável na preparação das amostras para os experimentos de Imunocitoquímica.

A Daniela de Pita Pereira, amiga muito querida que foi fundamental no meu crescimento pessoal e profissional, pelas conversas, caronas, incentivo e o auxílio indispensável com os experimentos de Biologia Molecular.

A Dr<sup>a</sup> Claudia Mansini D'Ávila Levy, por me ajudar na elaboração de alguns experimentos, pela amizade, carinho, sábios conselhos, confiança, aprendizado e eterno incentivo.

A Dr<sup>a</sup> Lea Cysne do Laboratório de Imunoparasitologia, pelo aprendizado, os inegáveis sorrisos e auxílios pedidos ao longo dessa jornada, e pela sua amizade. Além claro das garrafas da cepa infectiva de *Leishmania braziliensis* doadas para o desenvolvimento da tese, as quais foram carinhosamente apelidadas de *Xuxumanias mastropasquensis* pelo saudoso amigo Fabiano.

A Dr<sup>a</sup> Constança, chefe do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, pelo carinho, amizade, conversas, aprendizado e pelos anos maravilhosos que eu fiz parte da equipe.

A Anna Beatriz Robotton (Xuxu) pela imensurável ajuda durante toda a elaboração e análise estatística dos resultados obtidos dos experimentos de RT-PCR e PCR Tempo Real. Por ter sido sempre tão solícita e gentil comigo ao longo da minha inesquecível e divertida temporada no Laboratório de Micobacterioses, me auxiliando desde a bancada até a árdua adaptação de protocolos. Sempre dedicada, paciente e muito didática a Xuxu me ensinou muito sobre Biologia Molecular, fazendo com que uma “pequena” colaboração se transformasse em uma grande amizade.

Ao Dr Milton Ozório Moraes, por permitir a minha ida e constante presença em seu Laboratório para um grande aprendizado e desenvolvimento de uma parte da minha dissertação, além do auxílio nas análises dos dados e ainda permitir o uso dos reagentes necessários para fazer estes experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Micobacterioses: Xuxu, Flávia, Aline, Vivi, Cíntia, Alejandra, Dioguinho, Luana e Guilherme pela convivência maravilhosa durante o período que “estagiei” no laboratório e pelas inúmeras ajudas durante esse período tão importante e decisivo para elaboração dessa tese.

Ao Rubem Mena-Barreto pela imensa ajuda com os experimentos de citometria de fluxo e suas respectivas análises, pela amizade e pelas conversas com e sem conteúdo científico.

Ao Bernardo, pela imensa e inegável ajuda no processo seletivo do mestrado, por ser nosso *personal english teacher*, pela amizade e também pela ajuda nos estudos *in silico*.

A Angélica Cardoso, pela amizade e pelo auxílio em algumas etapas durante os experimentos de Biologia Molecular.

Aos amigos Fabiano Pires, Francisco Odêncio, Fernanda Rivas e Wellington Muniz pela excelente convivência no laboratório, amizade, ajuda, pelas conversas produtivas e sempre por boas risadas.

Ao Dr José Batista, Dra Patrícia Cuervo e Leonardo Viana pelas conversas, amizade e aprendizado.

Ao Thomas Dan Otto pela grande ajuda ao desenhar os *primers* que eu utilizei nessa tese, pelo aprendizado e amizade.

A Aline dos Santos Moreira responsável técnica da subunidade de sequenciamento de DNA da plataforma de genômica do PDTIS, pela amizade e pelo auxílio no sequenciamento e análise dos meus produtos de PCR.

A Dr<sup>a</sup> Rosa Pinho do Laboratório de Imunologia Clínica por estar sempre nos cedendo espaço e auxílio em seu laboratório.

A Dani secretária da Pós Graduação da Biologia Celular e Molecular por sempre estar disposta a ajudar que se tornou uma grande amiga depois da organização do Curso de Verão

Aos meus irmãos, que sempre foram grandes incentivadores.

A minha avó Francisca, por estar sempre orando e torcendo por mim.

Ao meu avô (*in memoriam*) que com certeza está torcendo por mim.

As minhas amigas Olívia, Carolina, Flávia e Juliana por acreditarem na amiga-cientista apesar de nunca entenderem nada do que eu fazia.

Ao Richard que foi um grande incentivador, pelas conversas elucidativas, aprendizado, pelos conselhos, paciência, carinho, amizade e pela incansável disposição em me ajudar.

Ao Dr Fernando Genta por ter feito uma excelente revisão na minha tese e por todo aprendizado durante as nossas conversas.

Ao laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas que foi o local em que eu iniciei e concretizei grande parte da minha formação científica.

Aos boêmios da quadra e ao Carlinhos pela cerveja “gelada” e pela conversa fiada de toda sexta-feira para esfriar a cabeça depois de uma semana cheia.

A todos aqueles que indireta ou diretamente me ajudaram na conclusão dessa dissertação, que por esquecimento não estão aqui citados.



“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele te conduz somente até onde os outros já foram”. *Alexander Graham Bell*

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo”. *Fernando Pessoa*

## Lista de Figuras

	Páginas
Figura 1: Distribuição geográfica das principais espécies de <i>Leishmania</i> dermatrópicas no Brasil	3
Figura 2: Imagem de uma cerâmica pré – Inca com indícios de leishmaniose.	5
Figura 3: Ciclo Biológico da Leishmaniose	11
Figura 4: Nomeclatura de Schechter & Berger (1967) para ligação de um substrato a uma enzima.	25
Figura 5: Fracionamento de cisteína-proteinases solúveis a TX-114 de promastigotas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	39
Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (p/v) na presença de SDS das proteínas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	40
Figura 7: Avaliação da atividade enzimática das bandas de 63 kDa e 43 kDa de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	42
Figura 8: Reatividade do soro anti cisteína-proteinase B em promastigotas vivas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	43
Figura 9: Imunoeletromicroscopia para detecção de cisteína-proteinases B em <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	44
Figura 10: Detecção da presença de âncoras de glicofosfatidilinositol de cisteína-proteinase B na membrana de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	46
Figura 11: Extração temperatura dependente de cisteína-proteinases B de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> . por detergente	47
Figura 12: Detecção da presença de cisteína-proteinase B em promastigotas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	48
Figura 13: Ensaio de atividade enzimática para cisteína-proteinase ao longo das passagens <i>in vitro</i> dos promastigotas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	51
Figura 14: Gel de agarose 1,2% desnaturante para a análise de RNA total de promastigotas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	52
Figura 15: Análise dos produtos amplificados do gene de cisteína-proteinase B de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	53
Figura 16: Análise do pareamento dos iniciadores senso e anti-senso nas três sequencias do gene <i>cpb</i> de <i>L. (V.) braziliensis</i>	55
Figura 17: Alinhamento múltiplo das três sequencias do gene <i>cpb</i> de <i>L. (V.) braziliensis</i> depositadas no banco de dados	56
Figura 18: Curvas de dissociação da PCR em tempo real utilizando <i>SYBR green</i> obtidas a partir da temperatura de desnaturação dos produtos amplificados	57

Figura 19:	Quantificação do gene <i>cpb</i> de <i>L. (V.) braziliensis</i> em PCR Tempo Real	58
Figura 20:	Análises das sequencias de aminoácidos de CPB originadas a partir das sequencias depositadas no banco de dados	59

## Lista de Tabelas

	Páginas
Tabela I: Principais espécies de <i>Leishmania</i> dermatóricas causadoras de doença em humanos nas Américas dos subgêneros <i>Viannia</i> e <i>Leishmania</i>	7
Tabela II: Classificação taxonômica de <i>Leishmania</i> spp.	8
Tabela III: Principais espécies de <i>Leishmania</i> encontradas no Brasil e os seus respectivos vetores	12
Tabela IV: Classificação e modo de ação das principais proteases	18
Tabela V: Oligonucleotídeos utilizados para <i>L.(V.) braziliensis</i>	34
Tabela VI: Sequencias com alto grau de identidade na sequencias de nucleotídeos significativo com o fragmento amplificado e sequenciado do gene <i>cpb</i> de <i>L.(V.) braziliensis</i>	54

## Abreviaturas

aa- aminoácido

anti-CP- antisoro policlonal para região COOH terminal da cisteína- proteinase de *Leishmania (L.) mexicana*

anti-CRD - *cross reacting determinant*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA- *bovine serum albumine* (soro de albumina bovina)

cDNA- *complementary Desoxiribonucleic Acid* (ácido desoxiribonucléico complementar)

CHAPS- *3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate*

ConA- Concanavalina A

CP- cisteína-proteinase

*cp*- gene codificante de cisteína-proteinase

CPB- cisteína proteinase B

*cpb*-gene codificante de cisteína-proteinase B

Ct- *cycle threshold* (ciclo inicial de amplificação determinado pela emissão de fluorescência do produto amplificado que ultrapassa a linha basal no sistema de PCR tempo real)

DEAE- dietilaminoetil

dNTPs: desoxiribonucleotídeos trifosfatados

DTT- ditionitrotol

E-64- *trans*-Epoxy succinyl-L-leucylamida(4-guanidina)butano

EC- *enzymatic class*

ECL- reagente luminol quimioluminescente

FITC- isotiocianato de fluoresceína

fPPG- proteofosfoglicano filamentoso

GA- glutaraldeído

gp46- glicoproteína de 46kDa

gp63- glicoproteína de 63 kDa

GPI- glicosil-fosfatidil-inositol

HRP- *horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG* (anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase)

LC - Leishmaniose cutânea

LCD - Leishmaniose cutânea difusa

LMC - Leishmaniose mucocutânea

LDPK- Leishmaniose dermal pós- kalazar  
LT- Leishmaniose Tegumentar  
LTA - Leishmaniose tegumentar americana  
LV - Leishmaniose visceral  
LVA - Leishmaniose visceral Americana  
MOPS- *3-[N-morpholino]propanesulfonic acid*  
NNN- meio de cultivo composto por 1 parte de sangue desfibrinado e 1 parte de meio de Schneider suplementado por soro fetal  
PBS- *phosphate buffered saline* (solução salina tamponada composta por 10mM tampão fosfato e 0,15M NaCl)  
PBST- PBS acrescido de 0,5% (v/v) de Tween 20  
PCR- *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)  
pEFLpNan- substrato peptídico pGlu-Phe-Leu p-nitroanilida  
PFA- paraformaldeído  
PLC- fosfolipase C  
poli A - oligonucleotídeo formado pela base adenina  
RF- *RNAse free* (livre de RNase)  
RNA- *Ribonucleic Acid* (ácido ribonucléico)  
RPMI 1640- *Roswell Park Memorial Institute 1640* (meio de cultura para o crescimento de células).  
RT - *Reverse Transcriptase Reaction* (reação de transcrição reversa)  
SDS- *sodium dodecil sulfate* (dodecil sulfato de sódio)  
SDS-PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecil sulfate – polyacrilamide gel electrophoresis*)  
SFB- soro fetal bovino  
TBE- tampão Tris-Ácido. Bórico-EDTA  
Tm - *melting temperature* (temperatura média onde 50% dos produtos amplificados estão dissociados)  
Tris- tris (hidroximetil- amino) metano  
TWEEN 20- *Polyethylene (20) glycol sorbitan monolaurate* (laurato de sorbitan etoxilado 20)  
TX-100- tampão Triton X-100 (*T-Octylphenoxy polyethoxyethanol* )  
TX-114- tampão Triton X-114 (*octylphenoxy poly(oxyethylene)ethanol*)

## Resumo

No presente trabalho foram detectadas cisteína-proteinases (CPs) em promastigotas infectivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A estratégia de purificação consistiu na associação do método de extração por Triton X-114 com cromatografia em coluna de Concanavalina A-Sepharose, seguida por outra de DEAE-Sepharose. No ensaio das cromatografias, observamos um pico majoritário de atividade enzimática na presença do substrato pEFLpNan ( $165 \times 10^{-32} \mu\text{M}$  de pNan/minuto) para cerca de  $10^{10}$  parasitas, coincidente com o pico majoritário da proteína eluído da coluna de troca iônica. A análise por SDS-PAGE do material eluído da coluna de troca iônica mostrou quatro principais bandas de proteínas com massas moleculares relativas de 63, 43, 30 e 27 kDa. Os ensaios da atividade enzimática após eletroforese mostraram que as bandas de 63 kDa e 43 kDa, hidrolisam substratos como gelatina em pH 7,0 e são sensíveis à presença de E-64. Além disso, as duas enzimas são capazes de hidrolisar o substrato pEFLpNan: 63 kDa ( $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$  de pNan/minuto) e 43 kDa ( $0,05 \pm 0,2 \mu\text{M}$  de pNan/minuto), e são inibidas por  $10 \mu\text{M}$  E-64 (47 % e 36 %, respectivamente). Os ensaios de reconhecimento imunológico utilizando um anti-soro policlonal específico contra cisteína-proteinase B [anti-CPB de *L. (L.) mexicana*] revelaram que as enzimas de 63 kDa e 43kDa são reconhecidas por este anti-soro. Os experimentos de aglutinação, citometria de fluxo e imunocitoquímica utilizando esse mesmo antisoro revelaram que homólogos de CPBs estão localizados na superfície da membrana de promastigotas. Além disso, a incubação dos promastigotas com fosfolipase C (PLC) reduziu o número de células positivas para os homólogos de CPB. Os anti-soros anti-CRD (*cross reactive determinat*) e anti-CPB reconhecem bandas de 63 kDa e 43 kDa do sobrenadante das células tratadas com PLC em ensaios de *immunoblotting* sugerindo que isoformas destas proteínas são ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) à membrana plasmática. Também observamos que os homólogos de CPBs são presos a membrana por âncora GPI e se concentram em plataformas lipídicas. Nós observamos que as proteínas homólogas a CPB não permanecem estáveis na superfície da membrana quando os parasitas são mantidos em culturas sucessivas, assim como a atividade enzimática total sobre o substrato pEFLpNan é alterada. Mostramos ainda através da técnica RT-PCR em tempo real um aumento da transcrição de *cpb* de *L. (V.) braziliensis* quando os parasitas foram submetidos a culturas sucessivas. De uma forma geral os dados apresentados suportam a hipótese de que o parasita estudado apresentam CPs de membrana ativas, além de homólogos de CPB intracelulares.

## Abstract

It was detected cysteine-proteinases (CPs) in infective *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. The purification strategy consisted of an association of Triton X-114 extraction method with chromatography in Concanavalin A-Sepharose column, followed by chromatography in DEAE-Sepharose column. In the assay of chromatographic fractions, we observed a peak of enzymatic activity against the pEFLpNan substrate ( $165 \times 10^{-32} \mu\text{M}$  of pNan/minute) in over  $10^{10}$  parasites, coincident with the major protein peak eluted from the column. SDS-PAGE analysis of the material eluted from the ionic exchange column showed four main protein bands with relative molecular mass of 63, 43, 30 and 27 kDa. Gelatin-SDS-PAGE assays indicated that the 43kDa and the 63kDa bands can hydrolyze gelatin at neutral pH and are sensitive to E-64. Also, both enzymes can hydrolyze pEFLpNan substrate: 63 kDa ( $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$  of pNan/minute) and 43 kDa ( $0,05 \pm 0,2 \mu\text{M}$  of pNan/minute) being both inhibited by E-64 (47 % and 36 % inhibition, respectively). Immunological recognition assays, with a specific polyclonal antibody against CPB from *L. (L.) mexicana*, showed that bands of 63 kDa and 43 kDa are recognized in the fractions of the ionic exchange column. Agglutination, flow cytometry and immunocytochemistry assays performed with anti-CPB antiserum revealed that homologous of CPB are located on the promastigote membrane surface. Moreover, the incubation of promastigotes with phospholipase C reduced the number of CPBs homologues-positive cells. Both anti-cross-reacting determinant (CRD) and anti-CPB antisera recognized 63kDa and 43kDa bands in the supernatant of phospholipase C-treated cells, suggesting that isoforms of these proteins are attached to the plasma membrane by glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchors. Also, our data suggest that GPI-anchored CPBs are present in the detergent-resistant lipid rafts. We observed that the CPB homologues do not remain stable on the membrane surface when the parasites are maintained under successive cultures; also, the total enzymatic activity over the substrate pEFLpNan is altered. We additionally showed by real-time RT-PCR that *L. (V.) braziliensis cpb* genes are active and their relative expression is increased throughout the successive cultures. Thus, the presented data support the hypothesis of that studied parasite presents CPs of membrane active, beyond homologous of intracellular CPB.

# Índice

## INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais sobre as leishmanioses.....	1
1.2. Breve histórico da doença.....	4
1.3. O parasito.....	6
1.4. Ciclo Biológico.....	9
1.5. As formas clínicas da leishmaniose.....	13
1.6. Glicoconjugados presentes na superfície da <i>Leishmania</i> spp.....	14
1.7. Proteases.....	16
1.8. Proteinases de <i>Leishmania</i> spp.....	18
1.9. As cisteína-proteinases.....	20
OBJETIVOS.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Reagentes e meio de cultura.....	27
3.2. Cultivo dos parasitas.....	28
3.3. Extração de proteínas com TX-114.....	28
3.4. Cromatografia em coluna de Con A – Sepharose.....	28
3.5. Cromatografia em coluna de DEAE-Sephacel.....	29
3.6. Determinação da concentração de proteínas.....	29
3.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio.(SDS-PAGE).....	29
3.8. Ensaio enzimáticos <i>in gel</i> após SDS-PAGE.....	29
3.9. Detecção de âncora GPI.....	30
3.10- <i>Immunoblotting (Western blotting)</i> .....	30
3.11. Atividade enzimática com substrato cromogênico.....	31
3.12. Preparação de amostras para Imunocitoquímica e Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	32
3.13. Observação da aglutinação direta com anti-CPB por microscopia de luz.....	32



3.14. Observação do reconhecimento imunológico por citometria de fluxo.....	33
3.15. Detecção de âncora GPI.....	33
3.16. Determinação da presença de CPB em domínios lipídicos por solubilidade.....	33
3.17. Quantificação relativa da expressão do gene <i>cpb</i> em promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	33
3.17.2. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores específicos.....	33
3.17.3. Extração de RNA total de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	34
3.17.4 Eletroforese em gel de agarose desnaturante.....	35
3.17.5. Síntese de cDNA.....	35
3.17.6 PCR semi-qualitativo.....	35
3.17.7. PCR quantitativo (PCR em Tempo Real).....	36
3.18. Análises da sequencias.....	37
3.19. Sequenciamento do produto amplificado.....	37
3.20. Análises estatísticas.....	37
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
4.1. Isolamento de CPBs de membrana em promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	38
4.2. Atividade Enzimática das bandas de 63kDa e 43kDa.....	41
4.3. Localização sub-celular de homólogos de CPBs em promastigotas de <i>L.(V.) braziliensis</i> .....	41
4.4. Evidências de âncora GPI associada aos homólogos de CPBs de <i>L.(V.) braziliensis</i> .....	45
4.5. Detecção de proteínas homólogas a CPBs em promastigotas ao longo de duas passagens sucessivas <i>in vitro</i> .....	45
4.6. Estimativa da atividade enzimática de CPs dos promastigotas ao longo três de passagens sucessivas <i>in vitro</i> .....	49
4.7. Verificação da expressão relativa d gene <i>cpb</i> dos promastigotas ao longo de três passagens sucessivas <i>in vitro</i> .....	49
4.8. Modificações pós traducionais nas sequencias de CPB.....	50
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>69</b>

## I- Introdução

### 1.1- Considerações Gerais sobre as leishmanioses

As leishmanioses fazem parte de um grupo de doenças com vasta distribuição geográfica, principalmente nas regiões de clima tropical e subtropical (Ashford, 2000; Murray *et al.*, 2005). Esta vasta distribuição é associada à diversidade dos insetos flebotomíneos vetores e das espécies de *Leishmania*. A doença apresenta várias manifestações clínicas agrupadas em duas categorias: Leishmaniose tegumentar (LT) e Leishmaniose visceral (LV) (Desjeux, 2004). No continente americano, as formas clínicas da doença são conhecidas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral Americana (LVA).

Os insetos vetores são classificados como pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) ou pertencem ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas). Acometem animais silvestres e domésticos (zoonose) e também o homem, o qual também pode ser considerado agente disseminador da doença (antroponose) (Ashford, 2000).

Mundialmente, cerca de 12 milhões de pessoas estão infectadas com *Leishmania* e dois milhões de novas infecções são relatadas anualmente (WHO, 2004); no entanto, apenas 600 mil casos são registradas oficialmente. Esta subestimativa está relacionada com o fato de que as notificações são obrigatórias em apenas 33 dos 88 países acometidos pela doença sendo que, desse total 72 estão em desenvolvimento e somente 16 são desenvolvidos.

No Brasil, além de serem descritas as duas formas clínicas da doença, várias espécies de *Leishmania* podem ser encontradas, o que constitui um quadro endêmico com características próprias das nossas questões de Saúde Pública. A incidência da LVA e LTA vem aumentando nos últimos dez anos, com descrição em áreas urbanas de importantes cidades brasileiras. O maior número de casos registrados de leishmaniose são nas regiões Norte e Nordeste. A crescente expansão da doença em todo o território brasileiro atrelada aos sub-registros de casos impede o conhecimento do verdadeiro número de indivíduos infectados (Desjeux, 2004).

As diversas espécies de *Leishmania* são classificadas em dois subgêneros, de acordo com a localização do parasita no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado: *Viannia*, na qual os parasitas se desenvolvem nas regiões anteriores e posteriores do intestino médio anterior e do intestino médio posterior (região peripilária) e *Leishmania*, os parasitas se desenvolvem somente na região anterior e posterior do estômago do flebotomíneo (região suprapilária) (Lainson, 1972; 1987a; Safjanova, 1982; Correa *et al.*, 2005).

No território brasileiro a LVA é uma zoonose causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* que possui como principal reservatório silvestre a raposa, e domiciliar o cão. É uma doença endêmica, e ocorrem surtos com alguma frequência. Está presente em 17 dos 27 estados da federação, atingindo quatro das cinco regiões brasileiras. Sua maior incidência encontra-se no Nordeste com 92 % do total de casos. É uma doença de distribuição primariamente rural, porém encontra-se em franca expansão para focos urbanos (Rangel & Lainson, 1988; Rangel, 2003). A urbanização das leishmanioses no país é um problema de saúde pública e, nas últimas décadas, ocorreram surtos em várias capitais (Guerra *et al.*, 2006).

A LTA distribui-se amplamente no continente americano, desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina (Gontijo & de Carvalho Mde, 2003). Mesmo sendo uma doença endêmica em várias regiões desse continente, sua real prevalência não se encontra estabelecida, em virtude de alguns fatores, como sub-registros de dados e variações de resposta do hospedeiro (Shaw, 2007).

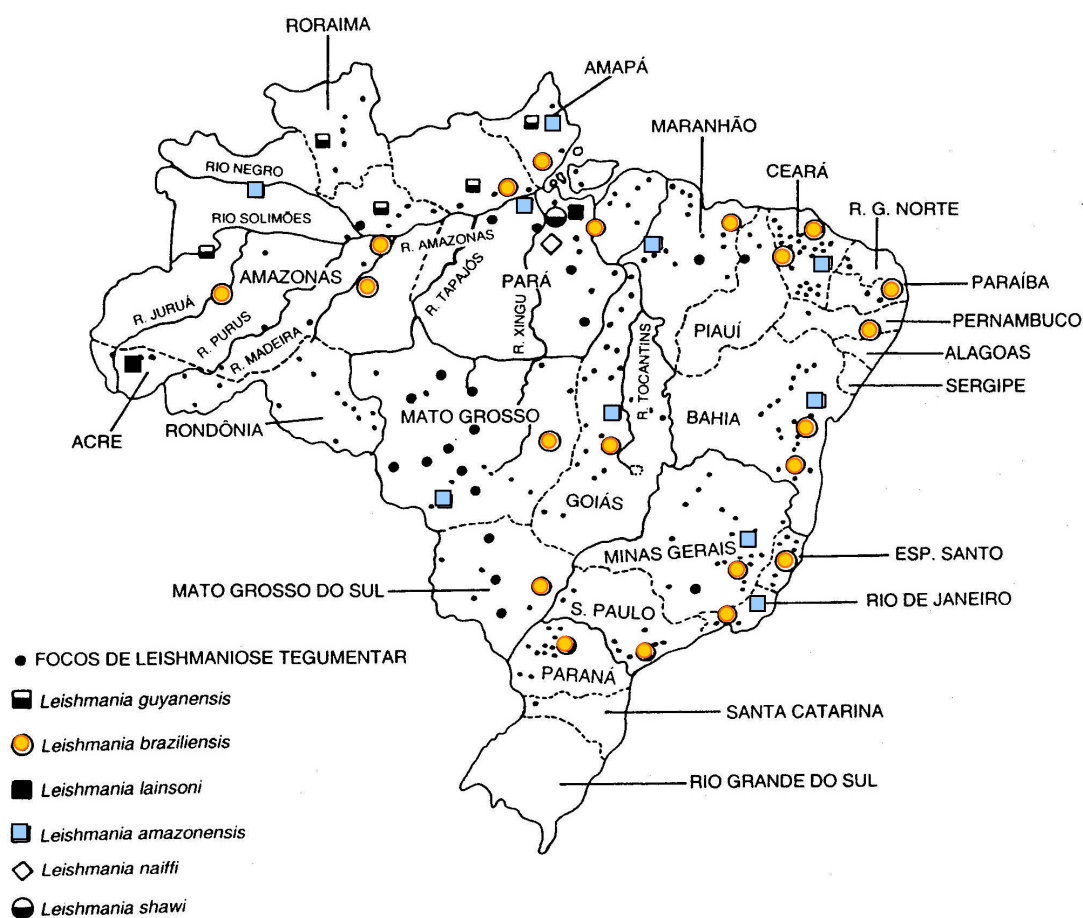
A incidência de LTA no Brasil tem aumentado e surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e na região Amazônica (Guerra *et al.*, 2006), sendo nessa última relacionados ao processo predatório de colonização das florestas (Chagas, 2006). A importância dessa doença não reside somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica caracterizando um problema de Saúde Pública, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas e desfigurantes no homem. Até o ano passado, a única espécie relacionada aos casos de LTA no Rio de Janeiro foi *Leishmania (Viannia) braziliensis*, quando foi então descrito o primeiro relato de leishmaniose cutâneo difusa por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Azeredo-Coutinho *et al.*, 2007) (**Figura 1**).

No Rio de Janeiro, casos autóctones e epidemias de leishmaniose tegumentar vêm sendo registrados desde o início do século XX. Estas epidemias podem ser explicadas pelo processo de ocupação de áreas florestais para a formação de espaço urbano, como em Jacarepaguá em 1974 (Marzochi *et al.*, 1980). Foram registrados cerca de 4900 casos de leishmaniose tegumentar no Estado do Rio de Janeiro entre 1985 e 2003, sendo que desses, cerca de 1300 foram descritos no Município do Rio de Janeiro, o que demonstra que a doença permanece ativa nessa área (de Pita-Pereira *et al.*, 2005).

Assim, as leishmanioses são doenças em franca expansão e ainda sem um controle efetivo no Brasil. O tratamento da doença ainda é um desafio, pois as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade (Ameen, 2007) e os tratamentos existentes não são totalmente eficazes (Croft *et al.*, 2006; Arevalo *et al.*, 2007). A recidiva das lesões (Deps *et al.*, 2000) e a resistência ao tratamento

(Desai *et al.*, 2004; Ashutosh *et al.*, 2007) são fatores que motivam a busca de uma droga ideal. Uma vacina ou um quimioterápico eficiente e com baixa toxicidade, sem dúvida seriam a melhor maneira de controlar esta doença (Salay *et al.*, 2007).

Nesse contexto, os estudos sobre as proteínas desse protozoário são de notável relevância, uma vez que podem esclarecer aspectos das interações entre o parasito e seus hospedeiros, revelando novos alvos de ação sobre a cadeia de transmissão da doença, em ambos os hospedeiros: vertebrado e invertebrado.



**Figura 1** : Distribuição geográfica das principais espécies de *Leishmania* dermatrópicas no Brasil (Adaptado de Marzochi & Marzochi, 1994; revisado Tojal as Silva AC *et al.*, 2006).

## 1.2- Breve histórico da doença

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença que acompanha o homem desde a Antigüidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o século I (Camargo, 2003). Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-Incas, datadas de 400 a 900 anos d.C. que apresentavam mutilações de lábios e nariz, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose cutânea-mucosa (Rabello, 1925b; Lainson, 1987c). Tal fato é indicativo de uma possível origem autóctone da doença no continente americano (**Figura 2**). Em estudos de Paleomedicina foram descobertas múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose (Santos, 1994).

A primeira referência de LT no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado “Antigüidad de la Syphilis en el Peru”, onde é relatada a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga (AM) até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico (Rabello, 1925a). A natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foram confirmadas muitos anos depois por (Lindenberg, 1909), que observou formas de *Leishmania*, idênticas a *Leishmania (L.) tropica* já relatadas no Velho Mundo (Wright, 1903). Dois anos depois, Gaspar Vianna observou que os parasitas encontrados nos casos humanos eram morfologicamente distintas de *L. (L.) tropica*, denominando-os de *Leishmania (V.) braziliensis* (Vianna, 1911). A partir desse momento, a *L. (V.) braziliensis* foi descrita como agente etiológico da leishmaniose no Brasil, sendo mais conhecida por denominações populares como “úlceras de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir” (Silveira, 1997).

No Brasil, até a década de setenta, todos os casos de LT eram atribuídos a *L. (V.) braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de análise e intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas sendo registradas até o momento oito espécies causadoras da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), são elas: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) naiiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) lindenbergi* (Rodriguez-Bonfante *et al.*, 2003; Basano, 2004; Correa *et al.*, 2005).

A Leishmaniose visceral (LV) foi descrita na Grécia em 1835 quando então era denominada "ponos" ou "hapoplínakon". Foi na Índia em 1869 que recebeu o nome "kala-jwar" que quer dizer febre negra ou "kala-azar" que significa pele negra em virtude do discreto aumento da pigmentação da pele ocorrido durante a doença (Marzochi *et al.*, 1981).

Existe uma grande polêmica em torno da origem da Leishmaniose Visceral (LV) no Novo Mundo. É discutido se a doença foi introduzida recentemente, na época da colonização européia e causada pela *L. (L.) infantum*, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *L. (L.) chagasi*. Os achados de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone (Lainson *et al.*, 1987). Atualmente estas duas espécies são caracterizadas como uma única espécie, denominada de *L. (L.) infantum chagasi* (Dantas-Torres, 2006).

No Brasil o primeiro caso de LV foi descrito por Migone (1913) um imigrante italiano que vivera muitos anos em Santos (SP) e após viajar para o Mato Grosso, adoeceu. No entanto, os estudos sobre a distribuição geográfica da leishmaniose foram ocorrer em 1934, por Penna, um patologista do Instituto Oswaldo Cruz, que iniciou os estudos sobre a distribuição geográfica da Leishmaniose Visceral nas Américas, quando comprovou parasitologicamente, 41 casos dentre as 40.000 viscerotomias examinadas para febre amarela provenientes de vários estados do Brasil.



**Figura 2:** Imagem de uma cerâmica pré – Inca exibindo mutilação do nariz e lábio superior, lesões típicas de leishmaniose cutânea-mucosa (Altamirano-Enciso *et al.*, 2003).

### 1.3- O parasito

A *Leishmania* é um protozoário parasita que apresenta duas formas biológicas distintas (amastigota e promastigota), e que para completar o seu ciclo de vida necessita, obrigatoriamente, passar por dois hospedeiros diferentes. No hospedeiro invertebrado encontra-se a forma promastigota, que é alongada e extracelular, com dimensões de 15 - 30 µm de comprimento por 2 - 3 µm de diâmetro, apresentando um núcleo central, um cinetoplasto anterior ao núcleo e um flagelo longo e livre emergindo da bolsa flagelar na extremidade anterior. No vertebrado, a forma encontrada é a amastigota, que é arredondada e intracelular, com 2 - 6 µm de diâmetro, contendo um núcleo deslocado para a porção anterior, acima do cinetoplasto, próximo ao qual se encontra um flagelo interno inaparente (Bates & Rogers, 2004). As formas promastigotas podem ser facilmente crescidas e mantidas *in vitro* em meio de cultura complexo, semidefinidos e definidos (Jaffe, 1984; Sharief *et al.*, 2007), ao passo que, as formas amastigotas só conseguem ser mantidas *in vitro* em cultura de células infectadas e *in vivo* por infecção de animais experimentais (Berens & Marr, 1979). Ainda é possível obter formas similares às amastigotas por diferenciação *in vitro*, a partir de promastigotas submetidos às condições especiais de cultivos (pH 5,5 a 32°C), denominadas amastigotas axênicas (Pan, 1984; Bates, 1993; Cysne-Finkelstein *et al.*, 1998).

Ainda existe um grupo distinto, na qual as espécies responsáveis por infectar répteis se enquadram no gênero chamado de *Sauroleishmania*, que tem sido confirmado por critérios bioquímicos e moleculares e hoje é adotado por vários autores (Cupolillo *et al.*, 1998; Cupolillo *et al.*, 2000; Cupolillo *et al.*, 2001).

Estudos mais recentes sugerem a separação destes protozoários em duas linhagens genéticas distintas: as “seções” Euleishmania e Paraleishmania. A primeira compreende parasitas dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*; a segunda abrange o gênero *Endotrypanum* (parasitas que infectam hemácias de preguiças na forma tripomastigota e epimastigota, quando dentro de flebotomínios e em meio de cultura assumem a forma promastigota) (Shaw, 1964; Shaw, 1992; Barbosa *et al.*, 2006).

Os protozoários pertencentes aos dois sub-gêneros acometem o homem nas regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo e determinam doenças que apresentam ampla distribuição geográfica. Nas Américas são reconhecidas atualmente quatorze espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana (**Tabela I**) e apenas uma espécie causadora da forma visceral que é a *Leishmania (L.) infantum chagasi* (Lainson & Rangel, 2005).

**Tabela I:** Principais espécies de *Leishmania* dermatrópicas causadores de doença em humanos nas Américas dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*.

<b>Subgênero <i>Viannia</i> (Lainson &amp; Shaw, 1972)</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>L. (V.) braziliensis</i> Vianna, 1911	América do Sul, América Central e México
<i>L. (V.) peruviana</i> Velez, 1913	Peru
<i>L. (V.) guyanensis</i> Floch, 1954	América do Sul
<i>L. (V.) panamensis</i> Lainson & Shaw, 1972	América Central e América do Sul
<i>L. (V.) lainsoni</i> Silveira <i>et al.</i> , 1987	América do Sul
<i>L. (V.) shawi</i> (Shaw <i>et al.</i> , 1991	Região Amazônica e Pará
<i>L. (V.) naiffi</i> Lainson <i>et al.</i> , 1990	Região Amazônica e Pará
<i>L. (V.) colombiensis</i> Kreutzer <i>et al.</i> , 1991	Porção Norte da América do Sul
<i>L. (V.) equatorensis</i> Grimaldi <i>et al.</i> , 1992	Equador
<i>L. (V.) lindenbergi</i> Silveira <i>et al.</i> , 2002	Estado do Pará
<b>Subgênero <i>Leishmania</i> (Safjanova, 1982)</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>L. (L.) mexicana</i> Biagi, 1953	México e América Central
<i>L. (L.) amazonensis</i> Lainson & Shaw, 1972	América Central e Brasil (regiões Norte, Nordeste e Sudeste)
<i>L. (L.) venezuelensis</i> Bonfante-Garrido, 1980	Porção Norte da América do Sul
<i>L. (L.) pifanoi</i> Medina & Romero, 1959	América do Sul

Fontes: (Reithinger *et al.*, 2007; Rodriguez-Bonfante *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2002)



De acordo com (Levine *et al.*, 1980) a *Leishmania* possui a seguinte posição sistemática em termos taxonômicos (**Tabela II**):

**Tabela II:** Classificação taxonômica de *Leishmania* spp.

<b>REINO</b>	Protista, Haeckel, 1986
<b>SUB-REINO</b>	Protozoa, Goldfuss, 1817
<b>FILO</b>	Sarcomastigophora, Honigberg & Balamuth, 1963
<b>SUB-FILO</b>	Mastigophora, Desing, 1866
<b>CLASSE</b>	Zoomastigophora, Calkins 1909
<b>ORDEM</b>	Kinetoplastida, Honingberg, 1963, Vickerman, 1976
<b>SUB-ORDEM</b>	Trypanosomatina, Kent, 1880
<b>FAMÍLIA</b>	Trypanosomatidade, Doflein, 1901
<b>GÊNERO</b>	<i>Leishmania</i> , Ross, 1903

#### 1.4- Ciclo Biológico da *Leishmania* spp.

O modo mais comum de transmissão da leishmaniose ocorre através da picada de espécies de flebotomíneo dos gêneros *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo) (Yuong & Ducan, 1994; Killick-Kendrick, 1999) (**Figura 3**). Os flebotomíneos são insetos dípteros, que pertencem à família *Psychodidae* e são incluídos na sub-família *Phlebotominae*. Cerca de 800 espécies de flebotomos estão descritas, sendo que 400 destas ocorrem nas Américas (Yuong & Ducan, 1994). Estudos indicam (Lainson, 1987b) a existência de grupos de vetores intimamente ligados à transmissão de uma determinada espécie de *Leishmania* (espécie-específica) (**Tabela III**).

A infecção no hospedeiro vertebrado ocorre através da picada da fêmea hematófaga infectada, durante o seu repasto sanguíneo em representantes da classe Mammalia susceptíveis à infecção, notadamente as espécies incluídas nas ordens Rodentia, Canidea, Marsupialia e Primata. De uma maneira geral os canídeos podem ser relacionados com o ciclo domiciliar e peridomiciliar, enquanto que os roedores e marsupiais participam da manutenção do ciclo silvestre (Lainson *et al.*, 1992; Saliba & Oumeish, 1999). Além disso, os canídeos silvestres são classicamente descritos como reservatórios da *L. (L.) infantum chagasi* (Deane & Deane, 1954; Deane, 1961).

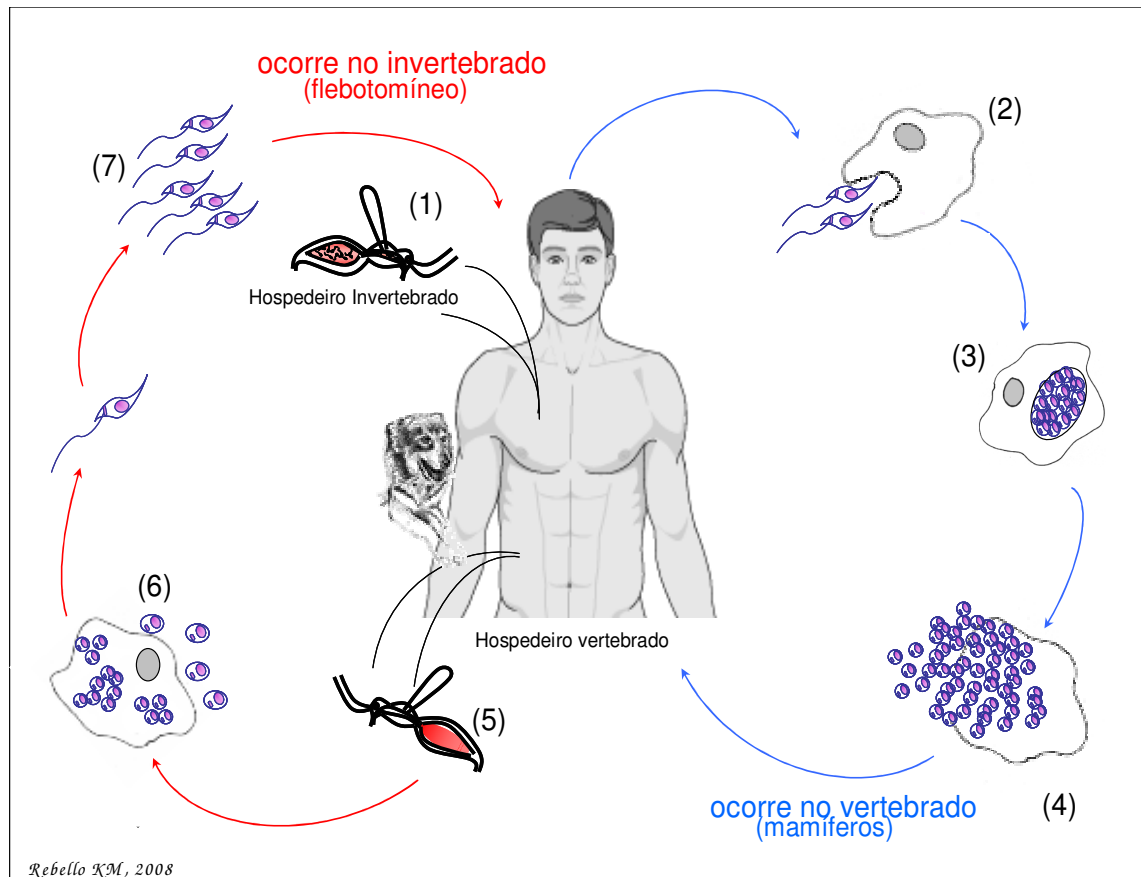
O vetor inocula cerca de 100-1000 formas promastigotas metacíclicas no tecido subcutâneo (Warburg & Schlein, 1986; Sacks, 2001; de Almeida *et al.*, 2003), e essas então infectam as células do sistema fagocítico mononuclear (Dominguez & Torano, 2001). Este primeiro contato é mediado por moléculas da superfície do parasito, em geral glicoconjugados, que irão definir o sucesso da infecção através da habilidade do parasito de escapar do sistema de defesa inato e induzir a resposta imune adaptativa do hospedeiro vertebrado. As formas flageladas ligam-se aos macrófagos por meio de diversos receptores celulares, sendo subsequente fagocitadas e no interior destas células ficam em vacúolos. Posteriormente, os lisossomos, contendo hidrolases que têm como função a digestão, se fundem ao vacúolo contendo o parasita, formando o vacúolo parasitóforo (Russel, 1995). Por um mecanismo ainda desconhecido, os parasitos sobrevivem à ação digestiva das hidrolases ácidas, e se transformam em formas amastigotas, que são as formas arredondadas com seu flagelo internalizado. Estas então se multiplicam intensamente por fissão binária e rompem as células hospedeiras para então infectarem outras células mononucleares. Outras vias também foram descritas para o mecanismo de evasão do parasito, como o desenvolvimento de estratégias de detoxificação que incluem a produção de moléculas inibitórias específicas como catalases, novos agentes redutores e inibidores de proteína quinases

(Cunningham, 2002). Quando a célula hospedeira está demasiadamente parasitada, há o rompimento da membrana plasmática e as formas amastigotas disseminam-se infectando novas células.

O flebotomíneo ao fazer o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado previamente infectado ingere juntamente com o sangue, macrófagos contendo as formas amastigotas e/ou as formas amastigotas livres. Durante o trajeto pelo trato digestório do hospedeiro invertebrado macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas. Dentro do intestino do inseto é formada uma rede fibrosa, composta por quitina e diversas proteínas associadas à membrana peritrófica, onde ocorre a diferenciação de amastigota para promastigotas procíclicas (ovóides com flagelo curto e pouco móveis) (Pimenta *et al.*, 1997; Sacks, 2001; Soares *et al.*, 2005). De 36 - 60 horas após o repasto, as formas promastigotas procíclicas se multiplicam intensamente, entre 60-72 horas iniciam-se a evasão da membrana peritrófica, e adesão às microvilosidades das células epiteliais da porção anterior do intestino médio (Walters *et al.*, 1992). De 4 -7 dias após a infecção todo o bolo alimentar já foi eliminado e os promastigotas procíclicos se diferenciam em promastigotas metacíclicos (Sacks, 1989).

O processo de transformação das formas promastigotas procíclicas para metacíclicas é conhecido como metaciclogênese. Os promastigotas metacíclicos, que é a forma infectante, são pequenos e delgados com flagelos longos, muito ativos e não se multiplicam (Saraiva *et al.*, 2005). Os promastigotas metacíclicos migram então para o esôfago, faringe e se alojam na probóscide do vetor, bloqueando a entrada de sangue quando um novo repasto sanguíneo ocorre. Uma contração do músculo da probóscide faz com que o flebotomíneo regurgite o sangue recém ingerido contendo promastigotas metacíclicos (Kamhawi, 2006).

Outras formas de transmissão raras já foram relatadas, são elas: através da placenta (Meinecke *et al.*, 1999), pelo sêmen (Symmers, 1960), agulhas infectadas (Amela *et al.*, 1996) e através da transfusão de sangue (Cohen *et al.*, 1991; Luz *et al.*, 1997; Dey & Singh, 2006).



**Figura 3:** Ciclo Biológico da Leishmaniose. No ciclo peri-urbano e urbano, as fêmeas infectadas podem transmitir as formas metacíclicas ao homem e animais domésticos (1). As formas flageladas são infectam as células do sistema fagocítico mononuclear (2), e dentro dessas células sofrem diferenciação, transformando-se em amastigotas (3). As formas amastigotas se multiplicam intensamente e induzem rompimento das células infectadas (4), ficando livres na corrente sanguínea podendo infectar novas células. Quando um díptero não infectado faz repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado (5) ele ingere juntamente com o sangue células contendo formas amastigotas (6) que irão sofrer metaciclogênese e se multiplicar no trato digestório do díptero (7), migrando posteriormente para a probóscide do vetor.

**Tabela III:** Principais espécies de *Leishmania* dermatrópicas encontradas no Brasil e os seus respectivos vetores

Fontes: Rangel & Lainson, 2003, Lainson & Shaw, 2005.

<i>Leishmania</i> spp.	Vetor ( <i>Lutzomyia</i> )
<i>L.(L.) amazonensis</i>	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i> , <i>Lu.olmecca</i> , <i>Lu. reducta</i>
<i>L.(V.) braziliensis</i>	<i>Lu. welcomei</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. migonei</i>
<i>L.(V.) guyanensis</i>	<i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. anduzei</i>
<i>L.(V.) lainsoni</i>	<i>Lu. ubiquitalis</i>
<i>L.(V.) naiffi</i>	<i>Lu. paraensis</i> , <i>Lu. ayrozai</i> , <i>Lu. squamiventris</i>
<i>L.(V.) shawi</i>	<i>Lu. whitmani</i>

### 1.5- As formas clínicas da leishmaniose

Na relação parasito-hospedeiro, aspectos inerentes a ambos vão delinear a infecção resultante e sua evolução. As leishmanioses não são entidades patológicas únicas, constituindo-se, na verdade, em um largo espectro de doenças causadas por *Leishmania* spp, cujas manifestações clínicas vão depender de complexas interações resultantes da invasividade, tropismo e patogenicidade de cada espécie do parasito, assim como da suscetibilidade genética e imunológica do hospedeiro (Herwaldt, 1999).

As formas clínicas da leishmaniose podem ser agrupadas em cinco apresentações, com base na sintomatologia da doença: leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea ou cutâneo-mucosa (LMC), cutânea-difusa (LCD), visceral (LV) e leishmaniose dermal pós-kalazar (LDPK). É importante ressaltar que uma única espécie de leishmania pode produzir diferentes síndromes, assim como as diversas formas clínicas podem ser causadas por outras espécies, além das que são seus agentes habituais (Ashford, 2000).

A Leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada por úlceras rasas ou profundas, geralmente uma única lesão com bordas salientes, endurecidas e bastantes delineadas (Marzochi, 1992; Berman, 1996) encontradas em partes do corpo como a face, braços e pernas. Ocasionalmente pode ser notado exsudado amarelo devido a infecções bacterianas concomitantes (Da-Cruz, 2001). A densidade de parasitos nas bordas da úlcera é relativamente alta nas fases iniciais da lesão enquanto que em úlceras crônicas a carga parasitária é baixa, o que dificulta bastante o diagnóstico parasitológico da doença (Gontijo & de Carvalho, 2003).

A Leishmaniose muco-cutânea (LMC), também conhecida como espúdia, caracteriza-se por lesões que acometem a mucosa orofaríngea a partir de uma úlcera cutânea. Está geralmente associada à infecção por *L. (V.) braziliensis*, na maioria dos casos ocorrendo em um intervalo de tempo variável após a instalação da lesão cutânea inicial. Os fatores que contribuem para que a doença inicialmente cutânea evolua para essa forma tardia não são todos conhecidos, mas sabe-se que a demora na cicatrização da lesão primária e tratamento inicial inadequado podem estar associados (Marsden, 1986; Carvalho *et al.*, 1995). A infecção do tecido mucoso se dá provavelmente pela via hematogênica, diferente da forma cutânea onde a lesão ocorre no local da picada do inseto vetor. O acometimento das mucosas do nariz, faringe, boca e laringe podem surgir a partir da lesão cutânea ainda em atividade, ou anos após a sua cicatrização (Schubach *et al.*, 1998, Da-Cruz & Azevedo-Coutinho, 2001). O processo é bastante agressivo ao hospedeiro,

chegando a ocorrer a completa destruição de toda estrutura cartilaginosa nasal, comprometendo nos casos mais severos a respiração, a fala e alimentação levando o indivíduo a morte ( Marsden & Nonata, 1975; Marsden, 1984).

A Leishmaniose cutânea-difusa (LCD) é uma doença com longa duração devido a uma resposta imune celular deficiente, e que tem como características múltiplas lesões difusas, papulares e não ulceradas por extensas áreas da pele. Os nódulos são ricos em amastigotas, o que a diferencia das formas cutânea e cutânea mucosa, onde há uma escassez de parasitos. É a única forma tegumentar da doença que não responde ao tratamento medicamentoso habitual (Convit & Kerdel-Vegas, 1965; Costa *et al.*, 1992).

A Leishmaniose Visceral (LV) é também conhecida como kalazar. É uma doença infecciosa generalizada e crônica atingindo em preferência, órgãos como: baço, fígado, medula óssea e linfonodos (Musa *et al.*, 2007). A sintomatologia pode variar muito de acordo com o paciente, caracterizando-se por febres irregulares e de longa duração, hepatoesplenomegalia, emagrecimento, e finalmente, o óbito se o paciente não receber tratamento adequado (Chappuis *et al.*, 2007). A partir dessa forma clínica, o paciente pode evoluir para o quadro de LPKD. O agente etiológico desta forma clínica no Novo é a espécie *L. (L.) infantum infantum* e no Velho Mundo é a espécie *L. (L.) infantum chagasi* ( Mauricio, 2000; Lukes *et al.*, 2007) .

A Leishmaniose dermal pós-kalazar (LDPK), descrita por (Ramesh & Mukherjee, 1995) é uma dermatite crônica que se caracteriza pelo desenvolvimento de máculas, lesões nodulares e despigmentação da pele, desde 6 meses até 4 anos pós-cura da forma visceral. Um determinado grau de fotosensibilidade é associado com a doença, onde o rosto é quase sempre o primeiro local a desenvolver as lesões, que na maioria dos casos são múltiplas e indolores (Ramesh *et al.*, 2007). É causada pela espécie *L. (L.) donovani*, predominantemente na Índia, Sudão e países da África (Zijlstra *et al.*, 2003). Indivíduos imunosuprimidos presentes em áreas endêmicas de *L. (L.) infantum chagasi* podem desenvolver essa forma clínica da doença (Chappuis *et al.*, 2007). Existe ainda, um único relato feito por Barral (1991) da *L. (L.) amazonensis* causando leishmaniose dermal pós-kalazar, pois essa é uma espécie que causa a forma tegumentar e no caso descrito causou a forma visceral.

#### **1.6- Glicoconjugados presentes na superfície de parasitas do gênero *Leishmania***

A superfície celular dos protozoários parasitos representa o primeiro contato com as células de seus hospedeiros invertebrado e vertebrado, sendo também o local onde existem os fatores que proporcionam o sucesso da infecção. Dentre esses fatores destacam-se os glicoconjugados que

são encontrados em abundância na superfície dos tripanossomatídeos. Esses são carboidratos covalentemente ligados a lipídeos ou proteínas de superfície, cuja ação é conhecida em diversos eventos moleculares que definem o sucesso do parasitismo da *Leishmania* (Ilgoutz & McConville, 2001).

Nesse contexto, o lipofosfoglicano (**LPG**) é um glicoconjugado de superfície com ampla variedade de funções. Essa molécula está presente nas formas amastigota e promastigota do parasito, sendo mais expressa nas formas flageladas (Handman *et al.*, 1984; McConville & Blackwell, 1991). A expressão de LPG parece ser diferentemente regulada nas formas amastigotas e promastigotas do parasita (Pimenta *et al.*, 1991).

Variações destas estruturas moleculares podem ser detectadas dentro de uma mesma espécie e entre espécies de *Leishmania*, revelando um polimorfismo dos oligossacarídeos que as constituem, servindo assim, como marcador da espécie ou do estágio de desenvolvimento em que se encontra o parasita (Turco *et al.*, 1987; Ilg *et al.*, 1992; McConville *et al.*, 1992; Chaves *et al.*, 2003). No hospedeiro invertebrado, é importante na fixação de promastigotas procíclicas ao epitélio intestinal (Mahoney *et al.*, 1999), porém, tem-se observado que não é essencial na sobrevivência contra enzimas digestivas (Sacks, 2000; 2001; Soares *et al.*, 2002). No hospedeiro vertebrado vem sendo considerado como um ligante de macrófagos e importante no processo de infecção.

Os glicoconjugados mais abundantes expressos nas duas formas do desenvolvimento do parasita são os glicoinositol-fosfolipídeos (**GILPs**), também conhecidos como **GPIs livres** por não estarem ligados a proteínas e tão pouco a polissacarídeos. Os GIPLs auxiliam *L. (L.) major* na sobrevivência dentro de macrófagos inibindo a síntese de óxido nítrico (Proudfoot *et al.*, 1995; Zufferey *et al.*, 2003)

Os proteofosfoglicanos (**PPGs**) são proteínas, que através de *O*-glicosilação, apresentam ligação de fosfossacarídeos na cadeia peptídica. Quando são encontrados na membrana celular do parasito sendo ancoradas por GPI são chamadas de **mPPGs** (Ilg *et al.*, 1999b). A função do mPPG ainda não está totalmente clara, porém especula-se que esta molécula, devido sua longa cadeia que reveste a membrana plasmática das espécies de *Leishmania*, seja importante como ligante de receptores de macrófagos e de células do tubo digestório do inseto vetor (Ilg, 2000). Em promastigotas um PPG secretado e filamentoso (**fPPG**), forma um agregado viscoso estabelecendo uma rede de filamentos fibrosos como um gel. O fPPG é secretado pela bolsa flagelar (Stierhof *et al.*, 1994) com 95 % de sua composição de fosfoglicanos e a porção peptídica com abundância de serina, alanina e prolina. Sua extensiva fosfoglicosilação confere uma



possível capacidade de resistir à ação de proteinases, embora isto ainda não tenha sido evidenciado experimentalmente. Além disso, sua participação parece ser importante no bloqueio do intestino anterior do inseto vetor, detendo a ingestão de alimento e levando o inseto a sucessivos repastos sanguíneos, aumentando as chances de disseminação da *Leishmania* spp. (Walters *et al.*, 1989; Lawyer *et al.*, 1990; Ilg, 2000). As formas amastigotas secretam **aPPG**, que estruturalmente são definidas como uma cadeia polipeptídica modificada com fosfoglicanos ligados a resíduos de serina (Ilg *et al.*, 1998). A secreção de aPPG dentro de macrófagos parece contribuir para manutenção do vacúolo parasitóforo (Peters *et al.*, 1997b), e aPPG é capaz de ativar o complemento via proteína ligadora de manose (Peters *et al.*, 1997a), o que favorece a ligação de *Leishmania* spp. à célula hospedeira.

As glicoproteínas contendo âncora de GPI se diferem dos proteoglicanos GPI-ancorados por possuírem carboidratos ligados através de *N*-glicosilação. As glicoproteínas GPI ancoradas mais conhecidas em *Leishmania* são a gp63 e gp46/M-2 (Handman & Goding, 1985).

A gp63 também é conhecida como “leishmanolisina” e está presa à membrana através de âncora GPI, que recobre toda a superfície das formas promastigotas, inclusive o flagelo. Estão presentes nas formas promastigotas e amastigotas, sendo nessa última expressa em menor quantidade. Através de análises bioquímicas e moleculares, a gp63 foi identificada como uma endopeptidase zinco-dependente (Bouvier *et al.*, 1989). Durante a metacicloênese ocorre um aumento da quantidade dessa proteinase (Kweider *et al.*, 1989; Brittingham *et al.*, 1995).

A gp46/M-2 também conhecida como gp46/PSA-2 foi identificada em *L. (L.) amazonensis* (Kahl & McMahon-Pratt, 1987). A caracterização desta glicoproteína por métodos bioquímicos (Rivas *et al.*, 1991) evidenciou sua ligação à membrana celular através de âncora de GPI. Inicialmente caracterizada como uma proteína de promastigotas, também é expressa em amastigotas (Symons *et al.*, 1994). Vale ressaltar, que apenas em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) enrittii* os genes que codificam gp46/M-2 não foram encontrados (Hanekamp & Langer, 1991; McMahon-Pratt *et al.*, 1992)

## 1.7- Proteases

As proteases, peptidases ou peptídeo-hidrolases estão presentes em todos os organismos. Essas enzimas catalisam a quebra das ligações peptídicas das proteínas. Para que ocorra a clivagem proteolítica é utilizada uma molécula de água, e devido a isso as proteases são classificadas como hidrolases. Este é um mecanismo comum de ativação ou inativação de enzimas

envolvidas em processos fisiológicos como digestão, coagulação sanguínea, diferenciação celular e apoptose (Beynon, 2001).

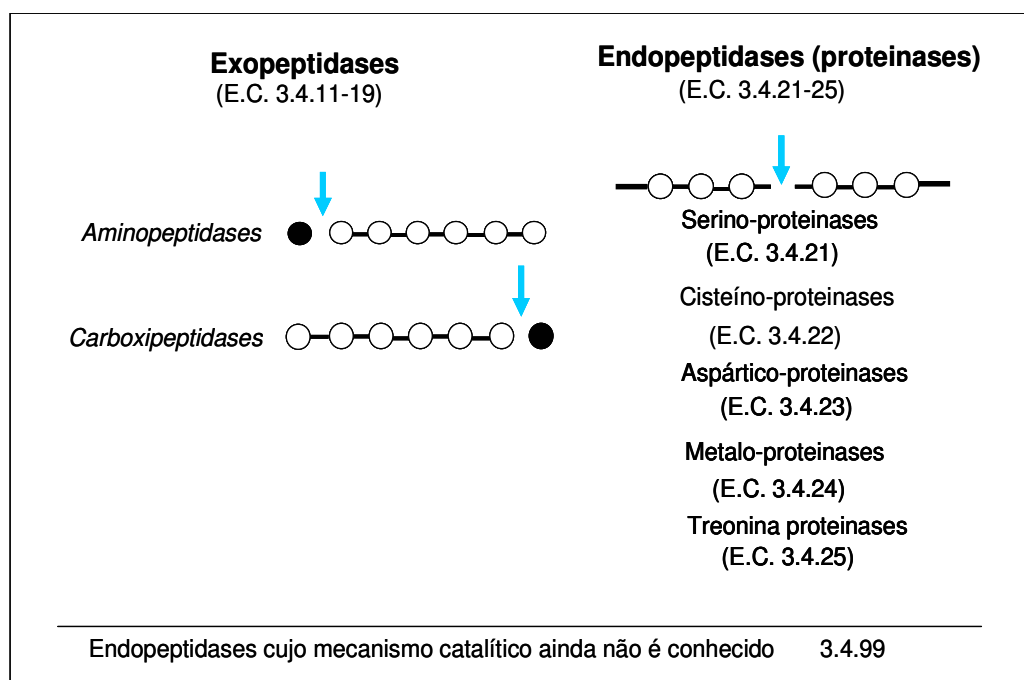
Estas enzimas são classificadas com base no tipo de reação catalisada e na natureza química do sítio catalítico. Segundo o comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as proteases constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases ou proteinases (EC 3.4. 21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), dependendo do local de clivagem na molécula de proteína. Esse sistema de classificação utiliza o número de identificação EC (*enzymatic class*- classe enzimática) composto por quatro números separados por um ponto. O primeiro número refere-se a química da enzima, o segundo e o terceiro números especificam os grupos químicos envolvidos na reação e o quarto e último número designa a especificidade do substrato. Esta classificação tem como princípio que diferentes moléculas com diferentes seqüências primárias e estruturas tridimensionais podem ser agrupadas com o mesmo número EC porque catalizam a mesma reação enzimática (Kotera *et al.*, 2004).

As exopeptidases são proteases que agem preferencialmente nas extremidades das cadeias polipeptídicas, na região amino- ou carboxi-terminal, as quais são denominadas aminopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente (Bond & Butler, 1987). Já as endopeptidases atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica.

De acordo com o tipo de reação catalisada e o grupamento químico crítico para a catálise, as endopeptidases podem ser divididas em subclasses do tipo serino-, cisteíno-, aspártico-, metalo- e treonina-proteinases. Algumas proteinases de mecanismo catalítico desconhecido formam a subclasse 3.4.99 (Barrett *et al.*, 2001) (**Tabela IV**).

Existe ainda um outro sistema mais novo de classificação das proteases, o MEROPS ([merops.sanger.ac.uk](http://merops.sanger.ac.uk)), que complementa a classificação enzimática dada pelo EC. Este agrupa as enzimas em famílias de acordo com a homologia na seqüência de aminoácidos. Por sua vez, as famílias de mesma origem ancestral são agrupadas em clãs (Barrett *et al.*, 2003). Por exemplo, as proteinases treonina e ácido glutâmico ou glutâmico-proteinases, que não haviam sido descritas até 1995 e 2004, respectivamente.

**Tabela IV:** Classificação e modo de ação das principais proteases. Os círculos brancos representam os aminoácidos da cadeia polipeptídica. Os círculos pretos representam os aminoácidos terminais. As setas indicam os sítios de ação das proteases



**Fontes:** (Barrett, 1994; Barrett, 2004).

### 1.8- Proteínases de *Leishmania* spp.

As proteínases de *Leishmania* são estudadas há mais de três décadas (Coombs, 1982) e sua importância foi confirmada através da descoberta dos inibidores específicos de proteases, que têm a capacidade de eliminar o parasito, e ainda reduzir a progressão da lesão (Sajid & McKerrow, 2002). Estas enzimas possuem um papel crucial na interação parasita-hospedeiro, atuando na modulação do sistema imune, na invasão e destruição dos tecidos e células do hospedeiro, auxiliam na disseminação dos parasitas e na aquisição de nutrientes essenciais (Klemba & Goldberg, 2002) que asseguram a sobrevivência do parasita e conseqüentemente a infecção (Sajid & McKerrow, 2002)

As proteinases em *Leishmania* são consideradas como um indicador da diferenciação do parasita (McKerrow *et al.*, 1993; Sajid & McKerrow, 2002). Quatro classes de proteinases foram descritas em *Leishmania* spp. : metalo-proteinases, cisteína-proteinases, aspártico-proteinases e serino-proteinases (Jaffe & Dwyer, 2003; Mottram *et al.*, 2004; Guedes *et al.*, 2007; Valdivieso *et al.*, 2007). Somente as metalo- e as cisteína-proteinases foram localizadas na membrana plasmática, até o momento (Jaffe & Dwyer, 2003; Alves *et al.*, 2005).

O primeiro indício da presença de aspártico-proteinases em *Leishmania* foi relatado em *L. (L.) amazonensis* durante a diferenciação celular (Alves *et al.*, 2005). A identificação e caracterização destas enzimas foram confirmadas em *L. (L.) mexicana* e essas parecem estar envolvidas na multiplicação do parasita (Valdivieso *et al.*, 2007).

As serino- proteinases foram identificadas nas formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* (Guedes *et al.*, 2007) e de *L.(L.) amazonensis* (Morgado-Diaz *et al.*, 2005). Três isoformas destas enzimas foram isoladas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com massas moleculares relativas de 110kDa, uma proteína dimérica denominada de LSPI (da Silva Lopez & De Simone, 2004), 68kDa, uma proteína monomérica intracelular chamada de LPSII (da Silva-Lopez & Giovanni-De-Simone, 2004; Morgado-Diaz *et al.*, 2005) e 115kDa, uma proteína dimérica secretada denominada LPSIII (Morgado-Diaz *et al.*, 2005).

As metalo-proteinases são as endopeptidases mais estudadas e melhor caracterizadas do gênero *Leishmania*, e já foram descritas em todas as espécies desse gênero. Essas proteinases são zinco dependentes, e a mais estudada é a glicoproteína de 63 kDa, gp63. São expressas em abundância na superfície celular das formas promastigotas de *Leishmania* (Yao *et al.*, 2003), apresentam uma expressão aumentada nas formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectivas (fase estacionária de crescimento), ainda possuem um baixo, porém detectável, nível de expressão intracelular em amastigotas (Muskus & Marin Villa, 2002; McGwire *et al.*, 2002).

Nos últimos anos vem sendo demonstrado que a massa molecular das metalo-proteinases de *Leishmania* spp. é muito variada, podendo ser detectadas enzimas entre 59 kDa e 205 kDa (de Araujo Soares *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2004; Cuervo *et al.*, 2006). A proteinase em questão possui um papel de extrema importância na sobrevivência do parasito, pois está relacionada à resistência a lise pelo sistema complemento, adesão e invasão dos macrófagos, proteção da degradação dentro do fagolisossomo de macrófagos, e inibição da quimiotaxia de monócitos e neutrófilos (Yao *et al.*, 2003)

A presença das cisteína-proteinases já foi descrita nas duas formas do desenvolvimento do parasito em diversas espécies de *Leishmania* (Alves *et al.*, 2005; Ueda-Nakamura *et al.*, 2007).

Essas proteinases atuam diretamente em processos indispensáveis para o sucesso da infecção (Mahmoudzadeh-Niknam & McKerrow, 2004; Hide *et al.*, 2007), como na autofagia (Williams *et al.*, 2006).

Entre os inúmeros estudos voltados para entender a bioquímica e a biologia molecular de *Leishmania* as proteinases vêm se destacando como promissores alvos para o desenvolvimento de drogas anti-leishmania (Mottram *et al.*, 1997; Werbovetz, 2002), uma vez que estas enzimas atuam no sucesso do ciclo biológico do parasito (North *et al.*, 1990; Mottram *et al.*, 1996).

### 1.9- As cisteína-proteinases

Diversas cisteína-proteinases (CPs) foram descritas em espécies de *Leishmania* que causam as formas tegumentares e visceral da doença. No entanto, permanece a concepção de que estas hidrolases teriam características hidrofílicas, o que é típico das tiol-peptidases de compartimentos lisossomais de células de plantas, mamíferos e parasitos (Roberts, 2005).

Apesar das observações que as cisteína-proteinases podem dificultar a resposta T na leishmaniose, estudos sugerem que estas enzimas podem ser apresentadas pelos dímeros de histocompatibilidade do hospedeiro e induzirem uma resposta imune. Em experimentos de proteção na leishmaniose cutânea usando duas linhagens de camundongos (Balb/c e CBA/J), duas CPs (A-2 e P-2) isoladas de amastigotas de *L. (L.) pifanoi* conferiram um grau de proteção nos animais testados (Pan & McMahon-Pratt, 1988). Utilizando as mesmas proteínas, Coutinho *et al.* (1996) investigaram a resposta de células T de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em ensaios *in vitro*. Os resultados, entretanto, mostraram que o índice de estimulação de linfócitos T é baixo, sendo detectado resposta T específica em apenas 25% dos pacientes estudados.

Por outro lado, um estudo sobre a imunogenicidade de uma proteína com massa molecular relativa de 24 kDa isolada de amastigotas *L. (L.) major* (Rafati *et al.*, 1997), com características de cisteína-proteinases, mostra que esta proteína é capaz de estimular *in vitro* linfócitos oriundos do sangue periférico de pacientes com lesões cutâneas agudas e crônicas causadas por *L. (L.) major*. Em relação à secreção de citocinas avaliadas no sobrenadante dessas culturas, constatou-se que nos casos agudos da infecção havia presença de INF- $\gamma$  e não IL-4, ao passo que nos casos crônicos os dois tipos de mediadores inflamatórios estavam presentes.

Resultados de Wolfram *et al.*, (1995) sugerem que as *cpbs* de *L. (L.) mexicana* (*Lmcpb*) podem ser apresentadas por macrófagos murinos e induzir uma resposta celular do tipo Th1, com produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Neste trabalho os autores concluem que macrófagos infectados

apresentam eficientemente estes antígenos de *Leishmania* desde que os parasitos estejam inativados ou degradados.

Esse estudo pode ser confirmado pelas observações posteriores de Alexander *et al.* (1998), que propuseram um estudo de vacinação e de infecção experimental em camundongos com *L.(L.) mexicana*. Nesse trabalho observou-se que promastigotas deficientes dos genes *Lmcpa* e *Lmcpb* apresentam uma virulência atenuada e potencializam uma resposta celular do tipo Th1, quando comparado ao tipo selvagem. Os resultados do grupo sugerem que cisteína-proteinases de *L.(L.) mexicana* podem influenciar o destino da infecção em hospedeiros mamíferos.

Os genes de cisteína-proteinases (*cps*) foram isolados e caracterizados em algumas espécies relacionadas com a leishmaniose tegumentar (*L. (L.) mexicana*, *L. (L.) pifanoi* e *L.(L.) major*) e em duas espécies de *Leishmania* viscerotrópica (*L. (L.) chagasi* e *L.(L.) donovani*). Em *L.(L.) mexicana* foram constatados os genes de cisteína-proteinases do tipo a (*Lmecpa*) e do tipo b (*Lmcpb*). O gene *Lmcpa* encontra-se em cópia simples e o mesmo tem como principal característica a ausência de codificação para uma região carboxi-terminal (Mottram *et al.*, 1992), características de CPs.

Inicialmente, o uso de métodos cromatográficos sugeriram a presença de uma CP majoritária de 31 kDa em amastigotas de *L.(L.) mexicana* (Pupkis & Coombs, 1984). Posteriormente, (Robertson & Coombs, 1990) mostraram que amastigotas desta mesma espécie de *Leishmania* continham três grupos distintos de CPs, com vários subgrupos, de peso molecular aparente na faixa de 20 a 35 kDa [A (A1, A2, A3, A4), B (B1, B2 e B3) e C (C1 e C2)]. As enzimas do grupo (A) são ricas em resíduos de manose e, por conseguinte, foram isoladas em coluna de concanavalina A. Já as enzimas dos grupos (B) e (C) foram distinguidas por seus potenciais de carga, sendo separadas por cromatografia de troca iônica. Estes dois últimos grupos de enzimas mostraram-se diferentes quanto à especificidade de hidrólise sobre peptídeos sintéticos. Assim, as enzimas do grupo (B) têm maior atividade na presença de substratos com aminoácidos fenilalanina na posição P2 e lisina na posição P3, enquanto que as enzimas do grupo (C) têm maior atividade quando em presença de substratos com aminoácidos básicos na posição P1 (**Figura 4**). Todas as enzimas isoladas foram igualmente sensíveis à presença de inibidores característicos das CPs. Estas enzimas (B) e (C) foram classificadas como similares à catepsina L humana.

Mais tarde, (Robertson & Coombs, 1993) descreveram um outro grupo de CPs, também em amastigotas de *L.(L.) mexicana*, classificado como grupo (D). Essas diferem dos outros três grupos de CPs, pois hidrolizam com grande eficiência substratos que apresentam ligações

peptídicas como Phe-Val-Arg, não hidrolizam gelatina copolimerizada com poliacrilamida e demonstram características anfifílicas. As duas enzimas isoladas deste grupo têm peso molecular de 31 e 33 kDa e o sequenciamento do amino-terminal demonstrou serem similares entre si, apresentando alta homologia com a catepsina B humana (Mottram *et al.*, 2003).

Quatro bandas com atividade de CPs foram detectadas na fase estacionária de promastigotas de *L. (L.) mexicana* em sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), copolimerizado com gelatina (Robertson *et al.*, 1994). As bandas de alto peso molecular (>58 kDa), contém pelo menos três isoformas que foram separadas por cromatografia trocadora de ânion. Estas bandas de atividade mostraram-se distintas de todas as cisteína-proteases já descritas em amastigotas da mesma espécie de parasito. Também foi detectada uma forma precursora que é ativa em condições ácidas, sugerindo que esta enzima é estágio-específica de formas promastigotas metacíclicas e que podem ter algum papel na sobrevivência deste parasito durante a sua inoculação no mamífero.

As CPs podem ser classificadas em famílias e clãs, dependendo de suas características evolutivas como: estruturas tridimensionais semelhantes, alto grau de homologia entre as seqüências de aminoácidos do sítio ativo e especificidades bioquímicas (Barrett, 1994). Estas enzimas, agrupadas dentro da superfamília da papaína (Berti & Storer, 1995), compõem o Clã CA e pertencem a Família C1. Outros membros da família C1 incluem proteases de plantas (quimopapaína, caricaína, bromelaína, actinidina, ficina, aleuraína e orizaína), de vírus, de mamíferos (proteases lisossomais como catepsina B, L, H, S, C e K) e de protozoários (cruzipaína, falcipaína e CPs de *Leishmania*) (McKerrow *et al.*, 1993).

A primeira enzima a ser classificada como CP foi isolada e purificada em 1989, a partir do látex do *Carica papaya*, mais conhecido como mamão papaia e, denominada então de papaína (Sajid & McKerrow, 2002) que é considerada o arquétipo das CPs. A estrutura primária destas proteínas revelou um alto grau de conservação ao longo da evolução.

A organização estrutural das CPs é constituída por três regiões: região pré: composta por um peptídeo sinal responsável pelo endereçamento da molécula; e pela região pró que mantém a enzima sob a forma inativa até o momento de sua maturação e sua remoção, originando a forma ativa da enzima (Hellman *et al.*, 1991; Eakin *et al.*, 1992).

As CPs são sintetizadas sob a forma de pré-próenzimas e possuem alta similaridade de seqüência e estrutura. O domínio pré possui entre 15 e 21 aas e é responsável pelo endereçamento da protease ao retículo endoplasmático, sendo removido posteriormente pela peptidase sinal. Por outro lado, o tamanho da região pró é bastante variável e pode compreender de 41 a 251 aas.

Dentre as principais funções atribuídas ao pró-peptídeo, destacam-se a sua participação no enovelamento correto da proteína; a manutenção da estabilidade da enzima em pHs neutros e alcalinos; o direcionamento para compartimentos endossomais/lisossomais e a manutenção da enzima inibida, impedindo a atividade proteolítica indesejável fora dos compartimentos lisossomais (Wiederanders *et al.*, 2003).

A região madura ou domínio catalítico das CPs é composto por seqüências de 214 até 260 aas onde se encontram os resíduos conservados de cisteína, histidina e asparagina. Todas as CPs de mamíferos já descritas apresentam sítios potenciais de *N*-glicosilação para a adição de manose 6- fosfato, que podem ser utilizados para endereçar estas proteases para os lisossomos (Turk & Guncar, 2003).

Majoritariamente são estudados nas diversas espécies de *Leishmania* três tipos de CPs: CPA, CPB e CPC. As proteinases CPA e CPB são homólogas a catepsina L de mamíferos, ao passo que CPC é uma enzima homóloga a catepsina B de mamíferos (Mottram *et al.*, 1998; Sajid & McKerrow, 2002). Elas diferem entre si pelo tamanho, substrato específico e glicosilação (Robertson & Coombs, 1990). Muitas dessas CPs provavelmente atuam nas interações entre parasito- hospedeiro, embora atualmente o papel da maioria dessas CPs só possa ser predito, baseando-se no conhecimento atual de enzimas aparentemente homólogas em outros organismos (Mottram *et al.*, 2004).

Observações de (Ilg *et al.*, 1994) sobre a distribuição das CPs durante a infecção de *L. (L.) mexicana* sugerem que tais enzimas podem ser encontradas no meio extracelular, na lesão de camundongos Balb/c. Este mesmo grupo propôs que as amastigotas lisadas liberam as cisteína-proteinases lisossomais no interior do vacúolo parasitóforo dos macrófagos infectados. Os autores sugerem que estas enzimas detectadas na lesão prejudicariam as demais células do hospedeiro, degradando as proteínas da matriz extracelular e desta forma participariam da desintegração do tecido no local da lesão.

Dois genes de *cps* de *L. (L.) major* (*Lmacpa* e *Lmacpb*) foram isolados e sequenciados integralmente (Sakanari *et al.*, 1997). Um dos genes é estruturalmente semelhante as *cps* do grupo das catepsinas L, apresentando similaridades em regiões bem definidas, tendo como particularidade uma região carboxi-terminal rica em prolina e treonina. Foi verificado neste estudo que os genes semelhantes às catepsinas L humanas ocorrem em múltiplas cópias (*Lmacpb*), enquanto os que se assemelham às catepsinas B humanas ocorrem em cópias simples (*Lmacpa*).



Os genes de *cpa* e *cpc* são genes de cópia única, enquanto *cpb* está representado em múltiplas cópias em *Leishmania*. Diferenças quanto ao número de cópias e nas seqüências de nucleotídeos existem dentre as diferentes espécies de *Leishmania* (Mundodi *et al.*, 2002).

Através da geração de mutantes nulos para os genes *cpa*, *cpb* e *cpc*, foi possível avaliar o papel de *cpb* em diferentes etapas da interação parasita-hospedeiro (Mottram *et al.*, 2004).

As proteinases do tipo CPB são importantes fatores de virulência que modulam a resposta imune do hospedeiro e parecem possuir um papel vital na sobrevivência do parasita nos macrófagos (Mottram *et al.*, 2004; Mundodi *et al.*, 2005, McKerrow *et al.*, 2006).

Os genes de *cpb* possuem diferenças significantes entrea as diferentes espécies de *Leishmania* (Mottram *et al.*, 1997). Uma análise de banco de dados do genoma de *L. (L.) major* ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)), revela que aparentemente existem genes que codificam 56 cisteína-proteinases distintas, com apenas oito cópias do gene *cpb*. Muitas dessas enzimas, provavelmente, possuem atuações importantes na interação parasito-hospedeiro, embora atualmente tais atuações só possam ser preditas com bases no conhecimento de enzimas homólogas em outros organismos. Em *L. (L.) mexicana*, os múltiplos genes *cpb* codificam para isoenzimas que são regulados diferencialmente. Dos 19 genes *cpb* de *L. (L.) mexicana*, os genes *cpb1* e *cpb2* são significativamente diferentes das outras 17 cópias. Estes dois genes são predominantemente expressos principalmente nas formas promastigotas metacíclicas e codificam enzimas que possuem a região carboxi-terminal truncada. As 17 cópias restantes são principalmente expressas nas formas amastigotas. Portanto, a expressão dessas enzimas ocorre exclusivamente nas formas do parasita que interagem com o hospedeiro mamífero (Mottram *et al.*, 1997). Em *L. (V.) braziliensis* existem 34 genes que codificam cisteína-proteinases distintas, existindo apenas três cópias do gene *cpb* ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)).

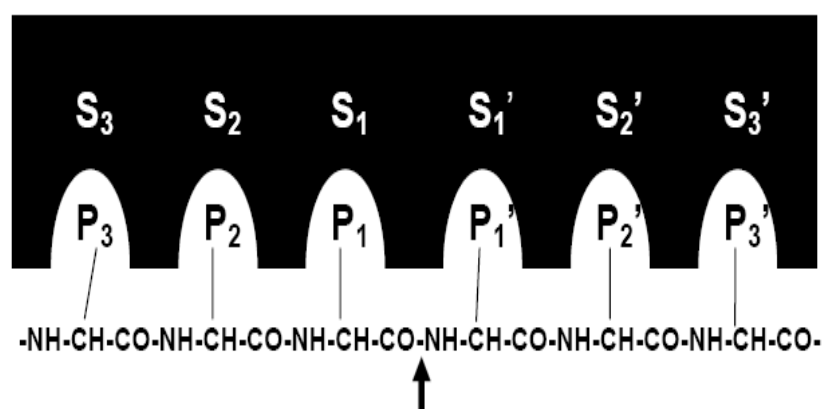
Mutantes para o gene que codifica a CPB (*Lmcpb*) mostraram que este não era essencial para o crescimento e diferenciação da *L. (L.) mexicana*. No entanto, as formas promastigotas que tiveram o gene *cpb* retirado do genoma se mostraram menos infectivas aos macrófagos *in vitro* do que as formas selvagens, e somente foram capazes de formar lesões pequenas com crescimento lento em BALB/c. Em contraste, as formas amastigotas que não possuíam o gene que codifica *cpb* não tiveram sua infectividade alterada quando comparadas à selvagem, mas também formaram lesões menores em camundongos ( Mottram *et al.*, 1996; Frame *et al.*, 2000). Estudos feitos com linhagens mutantes deficientes nos genes das CPB ( $\Delta cpb$ ) permitiram a obtenção de informações sobre a importância desse tipo de CP na interação parasita-hospedeiro. Mutantes de *L. (L.) mexicana* deficientes no gene *cpb* ( $\Delta cpb$ ) apresentaram virulência reduzida e pouca

capacidade de promover lesões em animais murinos de experimentação (Alexander *et al.*, 1998; Saravia *et al.*, 2006) e somente a reinserção de múltiplos genes *cpb* nesses mutantes a partir de um cosmídeo foi capaz de efetivamente restaurar a virulência, sugerindo que esses genes possuem funções complementares (Denise *et al.*, 2003).

As enzimas do tipo CPB possuem características não-usuais, pois apresentam, em comparação com outras CPs, uma extensão de cerca de 100 aa em sua seqüência carboxi-terminal (Mottram *et al.*, 2004), com função desconhecida, que não é essencial para a atividade catalítica (Turk & Guncar, 2003). São encontradas em megasomos e vacúolos (Ilg *et al.*, 1994).

As CPs estão envolvidas em diversos processos incluindo diferenciação, nutrição, infecção da célula hospedeira e no mecanismo de escape à resposta do sistema imune do hospedeiro vertebrado (Sajid & McKerrow, 2002; Mottram *et al.*, 2004; Olivier *et al.*, 2005; Zavasnik-Bergant & Turk, 2006) embora a atuação precisa dessas enzimas no mecanismo de escape ainda não esteja elucidada.

Experimentos que comprovam a funcionalidade de CPs, durante o processo da patogenicidade, ou simplesmente em passos metabólicos importantes na fisiologia da *Leishmania (Viannia) braziliensis* necessitam de comprovação experimental. Assim, são necessários estudos mais apurados destes potenciais alvos moleculares, que estão envolvidos na virulência e sobrevivência do parasita. Embora já tenham sido realizados estudos para uma série de proteinases em *L. (V.) braziliensis*, poucos relatos existem na literatura enfocando as CPs nesse parasita. Dessa forma, o estudo e a caracterização de novos alvos para o controle das leishmanioses é notório, já que para essas doenças não existem estratégias de cura ou controle eficientes até momento.



**Figura 4:** Nomeclatura de Schechter & Berger (1967) para ligação de um substrato a uma enzima. A protease é representada pela área escura. P<sub>1</sub>- P<sub>1</sub>' são as cadeias laterais dos seis aminoácidos e S<sub>1</sub>- S<sub>1</sub>' são os subsítios correspondentes na protease. A seta indica o local da hidrólise (Fonte: Beynon & Bond, 1996)

## 2- Objetivos

### Objetivo Geral

Identificar cisteína-proteinases nas formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

### Objetivos Específicos

- Isolar uma fração enriquecida de cisteína-proteinases de membrana de promastigotas de uma cepa infectiva de *L. (V.) braziliensis*.
- Caracterizar parcialmente a atividade enzimática das enzimas isoladas.
- Verificar a localização celular de proteínas homólogas a cisteína-proteinases B nas formas promastigotas.
- Analisar a expressão do gene de cisteína-proteinases *b (cpb)* em promastigotas oriundos de passagens sucessivas em cultura.

### 3- Materiais e Métodos

#### 3.1- Reagentes e meio de cultura

MARCA	REAGENTES
<i>Applied Biosystems</i> (Califórnia, EUA)	<i>SYBR green master mix</i>
<i>BioRad Laboratories</i> (Califórnia, EUA)	Membrana de nitrocelulose, $\beta$ mercaptoetanol
<i>Caltag Laboratories</i> , (Califórnia, EUA)	Anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, obtido em cabra (anti-coelho IgG HRP)
<i>Cultilab S/A</i> (Brasil)	Soro fetal bovino (SFB)
<i>Difco Laboratories</i> (Detroit, EUA)	Meio de cultura infusão de cérebro e coração (BHI- <i>Brain heart infusion</i> )
<i>Gibco BRL</i> (Grand Island, NY, EUA)	Agarose
<i>Promega Co.</i> (Madison, Wisconsin, EUA)	Kit: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System
<i>Santa Cruz Biotechnology</i> (Califórnia, EUA)	Kit para detecção de quimioluminescência: ( <i>Chemiluminescence luminol reagent</i> , kit-ECL)
<i>Sigma-Aldrich Chemical Co.</i> (St Luis, MO, EUA)	<b>Detergentes:</b> Dodecil sulfato de sódio ( <i>Sodium dodecyl sulphate- SDS</i> ); Tween 20; Triton X-100 (TX-100), Triton X-114 (TX-114), {3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propano-sulfonato) (CHAPS); <b>Inibidores:</b> [ <i>L-trans</i> -epoxisuccinil <i>L</i> -leucylamido-(4-guanidino) butano (E-64), 1,10-fenantrona (o-phe), pepstatina A (pep A) e fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF); <b>Agente redutor:</b> ditioneitol (DTT); <b>Substratos:</b> [pGlu Phe-Leu- <i>p</i> nitroanilida (pEFLpNan)], gelatina; <b>Colunas de cromatografia:</b> [Concanavalina A-Sepharose (Con A-Sepharose), [Dietilaminoetil-Sephacel (DEAE-Sephacel); <b>Corantes:</b> Comassie Blue R-250, azul de bromofenol, Azul de Trypan, PonceauS; <b>Reagentes para RT-PCR e PCR:</b> Trizol®, oligo DT, dNTPs, tampão da enzima RT 5X concentrado, DNase, enzima transcriptase SuperScript III (enzima RT), RNase; Taq DNA Polimerase, Tampão da enzima Taq 10X, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> . <b>Marcadores Moleculares:</b> SDS-6H e SDS-7; Anti- IgG de coelho marcado com FITC, obtido em cabra (anti-coelho IgG FITC); <b>Outros reagentes:</b> penicilina G potássica; $\alpha$ -metil-D-manopirosídeo ( $\alpha$ -D manose); Paraformaldeído (PFA); glutaldeído (GA); Proteína A conjugada a ouro colloidal; Acrilamida; N-N' metil bis acrilamida; Fosfolipase C (PLC); Albumina de soro bovino (BSA- <i>bovine serum albumine</i> ).

Os demais reagentes utilizados que não estão listados acima foram todos de grau analítico.

### 3.2- Cultivo dos parasitas

Neste estudo foram utilizadas formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* de uma cepa infectiva (MCAN/BR/1998/619), que foi gentilmente cedida pela Dra Maria de Fátima Madeira (Laboratório de Vigilância em Leishmaniose-IPEC/FIOCRUZ). Os parasitas foram mantidos em meio semi-sólido NNN (Novy, McNeal & Nicole) a 28 °C. Para ampliação da massa de parasitas, os mesmos foram transferidos para meio BHI, enriquecido com 20 % de soro fetal bovino e 0,5 % de penicilina G potássica (100 UI/mL) e mantidas em estufa à temperatura de 28 °C.

Para obtenção da massa de promastigotas, as culturas foram submetidas a sucessivas ampliações, a cada três dias, até a obtenção do número adequado de parasitas na fase estacionária para cada experimento. As culturas foram mantidas até sete passagens.

### 3.3- Extração de proteínas com TX-114

Os parasitas foram lavados três vezes por centrifugação (25°C, 15 minutos, 8000 × g) em 10 mM de fosfato de sódio pH 7,2 contendo 0,15 M de NaCl (PBS) e as frações aquosa e solúvel foram obtidas usando a técnica de separação de fases com detergente TX-114 (Bordier, 1981; Alves *et al.*, 1993). Brevemente, cerca de 10<sup>10</sup> promastigotas foram extraídas (40 minutos, 4 °C) com 2 % de TX-114. A fração insolúvel foi removida por centrifugação (4 °C, 30 minutos, 4000 × g), e a fração solúvel, ao detergente, foi obtida após condensação a 37 °C seguida de centrifugação (25 °C, 5 minutos, 12 000 × g). Após a formação das fases, a porção hidrofílica (fase superior) foi desprezada, e a fração hidrofóbica (fase inferior) lavada por três vezes com PBS por centrifugação (25°C, 15 minutos, 4500 × g). Posteriormente, à fração hidrofóbica foi adicionado 1 % de TX-100 (4 °C, 10 minutos) e o material foi acondicionado a -20 °C.

### 3.4 - Cromatografia em Coluna de Con A- Sepharose

A solução de proteínas de membrana obtida por extração com TX-114 foi aplicada à coluna (6,0 cm x 1,2 cm) de Con A – Sepharose, devidamente empacotada e previamente equilibrada em 20 mM Tris- HCL, pH 7,2. A cromatografia foi realizada manualmente (eluição por gravidade). O material não ligado foi recolhido e a coluna então foi lavado com tampão de equilíbrio, em um volume equivalente a 10 vezes o volume do leito da resina. Após a lavagem, as proteínas ligadas a Con A - Sepharose foram eluídas com 20 mM Tris-HCl, pH 7,2 contendo 0,5 % de glicerol e 50 mM α-manose. Frações de 2 mL foram coletadas num fluxo de 0,2 mL/minuto. A eluição das proteínas foi acompanhada medindo-se a absorvância a 280 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro; Amersham Biosciences, UK). Todas as etapas de cromatografia foram realizadas em câmara fria (4°C).

### 3.5 - Cromatografia em Coluna de DEAE-Sephacel

A fração obtida da coluna de Con A-Sepharose, após concentração em filtros Centriprep YM-10 (Millipore Corporation, Bedford, EUA) e diálise com tampão de equilíbrio (20 mM de Tris-HCl pH 7,2 contendo 0,5 % de glicerol) foi aplicada em uma coluna de DEAE-Sephacel (6,0 cm x 1,2 cm), devidamente empacotada. Após lavagem (dez vezes o volume da coluna) com o mesmo tampão as proteínas foram eluídas utilizando-se um gradiente linear de NaCl (0 – 0,5 M) em tampão de equilíbrio. Frações de 1 mL foram coletadas em um fluxo de 0,2 mL/minuto, em um volume final de 120 mL. A eluição das proteínas foi acompanhada medindo-se a absorbância a 280 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro, Amersham Biosciences, UK). Todas as etapas de cromatografia foram realizadas em câmara fria (4°C).

### 3.6 - Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada de acordo com o método de Lowry *et al.*, (1951), usando BSA como padrão. As leituras foram feitas em cubeta de quartzo no espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro; Amersham Biosciences, UK) com o comprimento de onda de 617 nm.

### 3.7- Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

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 os ensaios de eletroforese desnaturante, 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 %  $\beta$ -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 (Goncalves *et al.*, 1990). Os marcadores de massa molecular usados foram: SDS-7 (albumina bovina 66kDa, albumina de ovo 45kDa, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, músculo de coelho 36kDa, anidrase carbônica bovina 29kDa, tripsinogênio 24kDa, inibidor de tripsina 20kDa e  $\alpha$  lactalbumina 14kDa) e SDS-6H (Miosina 205kDa,  $\beta$  galactosidase 116kDa, fosforilase b 97,4 kDa, albumina bovina 66kDa, albumina de ovo 45 kDa e anidrase carbônica 29 kDa) (Sigma).

### 3.8- Ensaios enzimáticos *in gel* após SDS-PAGE

A enzimografia foi realizada em gel de SDS – PAGE contendo 0,1 % de gelatina copolimerizada com acrilamida (gelatina – SDS – PAGE; (Heussen & Dowdle, 1980), sem ferver

as amostras. As eletroforeses foram conduzida no gelo e posteriormente, os géis incubados (25°C, 1 hora) com 2,5 % (v/v) de TX-100 em PBS, à temperatura ambiente, para remover o SDS. As proteases foram ativadas incubando-se os géis (37°C, 16 horas) em 10 mL de 50 mM de tampão fosfato sódio, pH 7,0 contendo 1,0 mM de DTT. A atividade proteolítica foi revelada corando-se os géis por 60 minutos com azul de Comassie R-250 [0,2 % (p/v) em metanol: ácido acético: água (4 : 1 : 5)]. A descoloração foi realizada utilizando-se a mesma concentração dos reagentes sem corante. As regiões claras representam as áreas de digestão da gelatina pelas proteinases. Para os testes de inibição os géis foram incubados (37° C, 16 horas) com 10 µM de E-64, que é um inibidor específico para CPs.

### 3.9- Detecção de âncora GPI

Para detecção de âncora GPI, cerca de  $10^7$  promastigotas previamente lavados por centrifugação ( $3000 \times g$ , 4°C, 10 minutos) e fixados com 1% (v/v) de PFA (4°C, 30 minutos) foram ressuspensos em 100µL de uma solução contendo 0,1 U/µL de PLC em PBS (25 °C, 30 minutos). Posteriormente, as preparações foram centrifugadas ( $4000 \times g$ , 4°C, 10 minutos) e os sobrenadantes foram tratados para ensaios de *immunoblotting*. Os precipitados foram ressuspensos em PBS e conduzidos para os ensaios de citometria de fluxo.

### 3.10- Immunoblotting (Western blotting)

Os ensaios de *immunoblotting* (Towbin *et al.*, 1979) foram conduzidos com amostras solúveis de proteínas oriundas das cromatografias, a fração solubilizada com TX-114 (item 3.3 do material e métodos) dos promastigotas em diferentes passagens (item 3.5 do material e métodos) ou com os sobrenadantes oriundos da centrifugação das células após tratamento com a enzima PLC (item 3.9 do material e métodos). Nestes experimentos, a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose foi realizada utilizando-se condições descritas por em um sistema semi-seco de transferência Trans- blot (Bio-Rad, USA) por 50 minutos a 15V, 25°C. Após a confirmação da transferência das proteínas com solução de PonceauS (0,1% de PonceauS e 0,1% (v/v) de ácido acético), as membranas foram lavadas com água corrente e incubadas (20°C, 16 horas) em solução de PBS acrescido de 0,5 % de Tween 20 (PBST) e 5 % (p/v) de leite desnatado em pó (Molico). Em seguida, as membranas foram incubadas (25°C, 60 minutos) com anti-soro policlonal específico para CP: produzido contra a região carboxi-terminal da CP de *L. (L.) mexicana* (anti-CPB; (Alves *et al.*, 2005) na diluição de 1:400 em PBST. Nos ensaios de detecção de âncora-GPI foi utilizado o anticorpo primário anti-CRD (*cross reacting determinant*

- 1:400), para detecção do epítipo 1,2 inositol cíclico monofosfato, exposto quando a âncora GPI é removida (Zamze *et al.*, 1988). Posteriormente, as membranas foram lavadas (6 vezes, 5 minutos) e incubadas (25 °C, 60 minutos) com anti IgG de coelho HRP, diluído 1:200 em PBST.

Finalmente, as membranas foram submetidas a mais um ciclo de lavagens (6 vezes, 5 minutos) e o complexo imune formado foi revelado por quimioluminescência, usando kit ECL. O anticorpo anti-CRD foi gentilmente cedido pelo Dr Michael A.J. Fegurson e pela Dr<sup>a</sup> Maria Lucia Guther da Universidade de Dundee (Reino Unido).

### 3.11- Atividade enzimática com substrato cromogênico

Os ensaios de atividade enzimática foram realizados com amostras de proteínas eluídas da coluna de DEAE-Sephacel, imobilizadas em gel de SDS-PAGE e das frações de membrana dos promastigotas em diferentes passagens. Nestes experimentos foi utilizado o substrato peptídico pEFLpNan ( $\Delta E = 10\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ;  $\lambda = 405\text{ nm}$ ), na concentração de 0,1 mM. As absorbâncias de todos os ensaios foram medidas em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro).

A atividade enzimática das frações eluídas da coluna de DEAE-Sephacel foi medida em 50  $\mu\text{L}$  das frações incubadas com 450  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de sódio (50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,0, contendo 0,1 % CHAPS e 1 mM DTT) acrescido de 0,1mM do substrato peptídico. Após incubação (37 °C, 15 minutos) as preparações foram mantidas no gelo até a leitura, e a hidrólise do substrato foi detectada em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro).

As frações de membrana que compõem o pico majoritário de atividade enzimática da coluna de troca iônica foram reunidas e concentradas utilizando filtros centripep e resolvidos por SDS-PAGE. As bandas de proteínas foram identificadas em gel de poliacrilamida a 12 % (p/v), após precipitação do SDS com solução 0,3 M  $\text{ZnCl}_2$  (Dzandu *et al.*, 1988) e os fragmentos de interesse foram recortados com auxílio de um bisturi. Após três lavagens (15 minutos) com tampão 50 mM fosfato de sódio contendo 0,1 % (p/v) CHAPS, os fragmentos foram incubados (37 °C, 15 minutos) com tampão fosfato de sódio acrescido de substrato, em um volume final de 500  $\mu\text{L}$ . Para os testes de inibição os fragmentos de géis foram previamente incubados (37 °C, 5 minutos) com 10  $\mu\text{M}$  de E-64 e absorbância do produto da hidrólise (pNan) foi medida, pelo produto liberado (pNan) por minuto. Todos os ensaios foram realizados em condições nas quais a formação do produto da hidrólise (absorbância) é proporcional ao tempo e a concentração de proteínas. Foram inclusos como controle da reação (brancos) na ausência de enzima e de substrato, os quais foram incubados e lidos da mesma forma que as amostras.



Os ensaios de atividade enzimática com extrato total dos promastigotas em diferentes passagens foram realizados de acordo com Alves *et al.* (2005). Cerca de 5 µg de proteínas da fração de membrana foram incubada com o substrato peptídico (25 °C, 60 minutos) em tampão de Tris-HCl (10 mM Tris-HCl, pH 7.0 contendo 1 mM de DTT e 1 % (p/v) de CHAPS) em um volume final de 100 µL. Os ensaios de inibição foram realizados com pré incubação com 10 µM de E-64 (15 min, 25°C). A variação da absorbância foi seguida durante 60 minutos e a velocidade da reação calculada usando a fórmula  $v = [s - so]/(t - to)$ , onde  $v$  = velocidade,  $[s - so]$  = concentração de substrato final subtraída da concentração de substrato inicial e  $(t - to)$  = tempo final subtraído do tempo inicial. Os ensaios foram controlados verificando a auto-liberação do conjugado cromogênico (pNan) nos mesmos intervalos de tempo. A atividade enzimática foi expressa em µM de produto gerado (pNan) por minuto.

### **3.12- Preparação de amostras para imunocitoquímica e Microscopia eletrônica de Transmissão**

Promastigotas ( $10^8$  parasitas), de *L. (V.) braziliensis*, foram lavados com PBS por centrifugação duas vezes ( $4000 \times g$ , 4°C, 10 minutos) e fixados por uma hora em tampão apropriado contendo 0,1 M de cacodilato de sódio pH 7,0, 0,1 % de GA e 4 % de PFA a 4°C. Após a fixação foram lavados com PBS por centrifugação ( $4000 \times g$ , 4°C, 10 minutos), desidratados em metanol e então embebidos em resina de Lowcryl K4M e colocados a -20°C para polimerizar sob luz UV. Cortes ultra-finos foram coletados em grades de níquel embebidas com PBS (Corte-Real *et al.*, 1993). A seguir, os cortes foram colocados em tampão de 50 mM de cloreto de amônio por 15 minutos e posteriormente lavadas três vezes com PBS, para então serem incubadas com anti-CPB diluído em PBS (1:500), seguida pela incubação com a proteína A conjugada com ouro-coloidal (15 nm, diluição 1:1000). As grades foram então rinsadas com água e contrastadas com solução de acetato de uranila (Corte-Real *et al.*, 1993) e finalmente observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss ETM 10C).

### **3.13- Observação da aglutinação direta com anti-CPB por microscopia de luz**

Os ensaios de aglutinação direta foram conduzidos em placa de 96 poços com fundo reto com promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Inicialmente o anti-soro anti-CPB (100µL) foi diluído em série e foram adicionados  $10^5$  promastigotas/ poço previamente fixados em 0,1 % (v/v) de PFA (4°C, 30 minutos). A placa foi incubada (25 °C, 60 minutos) e o título aglutinante foi definido como a última diluição onde foi possível visualizar a aglutinação dos promastigotas.

Ensaio de controle foram conduzidos com soro normal de coelho (pré-imune). Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **3.14- Observação do reconhecimento imunológico por citometria de fluxo**

Os ensaios de reconhecimento imunológico de CPB de *L. (V.) braziliensis* pelo antisoro anti-CPB foram realizados com promastigotas em diferentes passagens em meio de cultura. Para estes ensaios, aproximadamente  $10^6$  promastigotas pré-fixadas com 1 % (v/v) de PFA (4 °C, 30 minutos) foram incubadas com anti-CPB (1:100 ou 1:1000) e depois com anti-IgG de coelho FITC diluído (1:200) por 1 hora a 25°C. As preparações foram então analisadas em citômetro de fluxo (FACSalibur), o qual estava ligado a um computador equipado com o Programa Cell-Quest®. Dois ensaios de controle foram feitos: um com a incubação dos promastigotas na presença de soro pré-imune (anticorpo primário) e com anti-IgG de coelho FITC (anticorpo secundário) e outro onde os promastigotas foram incubados somente com anti-IgG de coelho FITC (anticorpo secundário).

### **3.15 - Determinação da presença de CPB em domínios lipídicos por solubilidade**

Para execução destes ensaios foi utilizado o protocolo de Denny *et al.* (2001) com ligeiras modificações. Cerca de  $10^8$  promastigotas em cultura de *L. (V.) braziliensis* foram lavados com PBS e incubados (4 °C ou 37 °C, 10 minutos) em 1 mL de solução de extração (1% de TX-100 em PBS; TX-100 PBS) contendo inibidores de proteases (10 µM E-64, 1 mM PMSF, 10 mM ortofenantrolina e 1 µM pepstatina A). As fases detergente-solúveis (sobrenadante) e detergente-insolúveis (sedimento) foram recuperadas após centrifugação ( $14\ 000 \times g$ , 4°C ou 25°C, 15 minutos). Após solubilização dos sedimentos em 50 µL de PBS contendo 1 % (p/v) de SDS, os volumes foram ajustados para 1 mL com TX-100 PBS e suplementados com 5 mM de CaCl<sub>2</sub> e de MnCl<sub>2</sub>. Posteriormente, todas as frações foram incubadas (25 °C, 1 hora) com 10 µL de Con A-Sepharose para precipitar as proteínas glicosiladas e as amostras usadas em ensaios de *immunoblotting*.

### **3.16 - Quantificação relativa da expressão do gene *cpb* em promastigotas de *L.(V.) braziliensis***

#### **3.17.1- Desenho dos iniciadores oligonucleotídeos específicos**

Os iniciadores utilizados foram desenhados a partir do programa PerlPrim disponível na Plataforma de Bioinformática/PDTIS (IOC/FIOCRUZ). A partir do genoma de *L. (V.)*

*braziliensis* foram detectadas três sequências do gene *cpb* (*Lbr.\_V2. 0810*, *Lbr.\_V2. 0820* e *LbrM08\_V2.0830*). Os dois pares de oligonucleotídeos iniciadores (*Bioneer Oligo Syntesis Report*) foram desenhados a partir da sequência de *LbrM08\_V2.0830*. Um par para amplificar o fragmento de 110pb na região intragênica do gene de *cpb* e o outro par para amplificar o fragmento do mesmo tamanho na região intragênica do gene de alfa-tubulina (**Tabela V**); sendo esse último gene utilizado como controle endógeno da reação. Os dois pares de iniciadores foram utilizados separadamente nas reações de RT-PCR convencional (qualitativo) e RT-PCR em tempo real (quantitativo) (**Tabela V**).

**Tabela V:** Oligonucleotídeos utilizados para *L.(V.) braziliensis*

	Oligonucleotídeos iniciadores específicos	Sequências
<b>1</b>	<i>cpb</i> (senso)	5' AAC TTC CAG CGT AAC CT 3'
<b>2</b>	<i>cpb</i> (anti-senso)	5' AAC TCT TCC TCC GAC AG 3'
<b>3</b>	alfa-tubulina (senso)	5'TAT CTG CAT TCA CAT CGG 3'
<b>4</b>	alfa- tubulina (anti-senso)	5'CGT CAT CCT CAA CAC CA 3'

### 3.17.2- Extração de RNA total de *L. (V.) braziliensis*

A metodologia utilizada para o isolamento do RNA total seguiu os procedimentos previamente descritos por Chomczynski & Sacchi (1987). A técnica utiliza o trizol, que é um reagente que consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato. Esse reagente permite que o RNA seja extraído íntegro através de uma extração com fenol/clorofórmio seguida de precipitação alcoólica com isopropanol.

Cerca de  $1 \times 10^7$  células/mL foram lisadas com 1 mL de Trizol® (Sigma) e misturadas em 200 µL de clorofórmio. Após homogeneização, os tubos foram incubados (25 °C, 5 minutos) e centrifugados ( $12\ 000 \times g$ , 15 minutos, 25°C). O sobrenadante foi recuperado em um novo tubo e acrescido de 500 µL de isopropanol, e após homogeneização o RNA foi precipitado a baixa temperatura (-70°C, 12 horas). Posteriormente, o RNA foi recuperado por centrifugação ( $14\ 000 \times g$ , 20 minutos, 4 °C) e o precipitado foi lavado cuidadosamente com 500 µL de etanol a 70 %.(v/v), sendo então centrifugado ( $7500 \times g$ , 8 minutos, 4 °C) e ressuspenso em 240 µL de água livre de RNase.

Em seguida o RNA foi submetido a uma segunda etapa de precipitação seguindo os procedimentos previamente descritos por Chang (1993). As preparações de RNA foram aquecidas (60 °C, 10 minutos) e tratadas com 2,5 M de LiCl<sub>2</sub> (-20 °C, 30 minutos). Após este

período, as amostras foram centrifugadas ( $13\ 000 \times g$ ,  $4\ ^\circ\text{C}$ , 20 minutos) e o precipitado lavado com etanol a 70 % (v/v) sendo recentrifugado por 15 minutos a  $13\ 000 \times g$ . Finalmente, o RNA foi solubilizado em 10  $\mu\text{L}$  de água RF, e tratado com DNase (1 U/ $\mu\text{L}$ ) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação de RNA foi determinada a 260 nm em Nanodrop (ND-1000, ThermoFischer, USA), e sua integridade foi avaliada em gel de agarose 1,2 % (p/v) desnaturante.

### 3.17.3- Eletroforese em gel de agarose desnaturante

A integridade do RNA recém isolado foi avaliada em gel de agarose desnaturante 1,2 % (p/v) contendo 25 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  RF (*RNAse free*), 4 mL de MOPS 10X (0,2M MOPS, 0,05M de acetato de sódio e 0,01M EDTA, pH 7,0) e 7 mL de formaldeído. As amostras contendo 1 $\mu\text{g}$  de RNA foram tratadas com 1,8  $\mu\text{L}$  de MOPS 10X, 7,5  $\mu\text{L}$  de formamida e 2,6  $\mu\text{L}$  de formaldeído, aquecidas ( $65\ ^\circ\text{C}$ , 15 minutos) e acrescidas de 1  $\mu\text{L}$  de brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e 2  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os produtos foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados em (UVP White Darkroom, *Bioimaging Systems*, USA).

### 3.17.4 - Síntese de cDNA

A partir do RNA previamente extraído foi realizada a síntese de cDNA, através da reação de transcrição reversa (RT). A reação foi realizada incubando-se 1 $\mu\text{g}$  de RNA total com 1  $\mu\text{L}$  do iniciador complementar à cauda poli A (oligo dT) ( $70\ ^\circ\text{C}$ , 10 minutos). Logo após, foram adicionados 10 mM de DTT (0,1M/mL), 0,04 mM de dNTPs, 1  $\mu\text{L}$  de inibidor de RNase (40U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  enzima transcriptase SuperScript III (200U/ $\mu\text{L}$ ), 4  $\mu\text{L}$  do tampão da enzima concentrada 10X (200mM Tris-HCl e 500mM KCl, pH 8,4) e  $\text{H}_2\text{O}$  (q.s.p. para o volume final de 20  $\mu\text{L}$  de reação). As amostras foram incubadas por 1 hora a  $42\ ^\circ\text{C}$  e a reação foi interrompida incubando em  $90\ ^\circ\text{C}$  por 5 min. Após a reação os volumes das preparações foram ajustados para 100  $\mu\text{L}$  e as amostras armazenadas em  $-20\ ^\circ\text{C}$  até a sua utilização. A quantificação de cDNA foi determinada em 260 nm com aparelho Nanodrop (ND-1000, ThermoFischer, USA).

Os produtos amplificados foram detectados em gel de agarose 1,7% (p/v) em TBE 0,5X após coloração com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e visualização sob luz ultra-violeta. Os resultados foram fotodocumentados em UVP (UVP White Darkroom, *Bioimaging Systems*, USA).

### 3.17.5 - PCR semi-quantitativo

Para testar a eficácia dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados e posteriormente sequenciar os produtos amplificados pelos mesmos, foram feitas reações de PCR em um volume

final de 25 µL utilizando: 5µL de cDNA, 2,5µL de tampão 10X da Taq Polimerase (10mM Tris HCl pH 8,3, 500mM de KCl), 2,5mM de dNTPs, 0,04 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5µM de cada iniciador e 0,2µL de Taq DNA polimerase (5U/µL). Os programas utilizados para amplificação consistiram de: 36 ciclos de desnaturação (95°C, 45 segundos), anelamento (55°C, X 50 segundos) e extensão (72°C, 90 segundos). Para garantir a completa extensão do DNA sintetizado foi acrescentada uma etapa final a 72°C por 10 minutos. Os ensaios foram realizados no equipamento PTC-100 (Applied, USA) da firma MI Research.

### 3.17.6 - PCR quantitativo (PCR em Tempo Real)

A análise da expressão diferencial do gene *cpb* de *L. (V.) braziliensis* após várias passagens em cultura, foi utilizado o sistema que emprega o fluoróforo *SYBR Green* (com a capacidade de se intercalar na dupla fita de DNA sintetizada em cada ciclo de amplificação) e um par de iniciadores que amplifica o gene *cpb*. Como controle endógeno (gene constitutivo normalizador) foi usado outro par de iniciadores desenhados para o gene que amplifica a alfa-tubulina de *L. (V.) braziliensis*. As reações foram preparadas em um volume final de 25 µL nas seguintes condições: 0,8 µmol de cada iniciador (**Tabela IV**), 12,5 µL SYBR *green master mix*, 5 µg de cDNA e 5,9 µL água (ultra pura e estéril, grau Biologia Molecular). As condições de ciclagem foram: um passo inicial de ativação de 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de amplificação compostos por 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 50 °C e 1 ciclo para determinar a curva de dissociação de 15 segundos a 95 °C, 60 °C, 20 segundos a 60°C, e submetido a um gradiente de temperatura (60 °C - 95 °C) de 20 minutos de duração com um passo final de 15 segundos a 95 °C. Ao término da reação foi realizada a análise da curva de dissociação dos produtos gerados com a finalidade de avaliar a especificidade dos mesmos. Controles negativos da reação foram conduzidos com todos os reagentes com exceção dos cDNAs. Os ensaios de PCR quantitativo foram realizados no equipamento ABI Prism 7000 (*Sequence Detector System – Applied Biosystems*).

A quantidade relativa dos produtos amplificados foi determinada a partir da diferença entre *cycle threshold* (Ct) referente ao gene *cpb* e o respectivo ciclo do gene endógeno (normalizador),  $\Delta CT$ : [ $\Delta CT = Ct (cpb) - Ct (alfa-tubulina)$ ]. Os dados de quantificação relativa foram expressos em  $2^{-\Delta CT}$  (Livak & Schmittgen, 2001). O Ct de uma determinada amostra corresponde ao número de ciclos onde foi registrada uma intensidade de fluorescência acima de uma faixa basal.

### 3.18- Análises das sequencias

O levantamento das sequencias de nucleotídeos do gene que codifica *cpb* foi pesquisada no *GeneDB website Version 2.1* ([www.genedb.org/](http://www.genedb.org/)), empregando as palavras chaves *Leishmania (V) braziliensis* e *cysteine-proteinase*. A comparação das sequencias dos genes *cpb* e o local de pareamento dos iniciadores senso e antisense (tabela V), incluindo o produto amplificado por esses pela PCR, foram estudadas através de análise de múltiplas seqüências usando o programa *ClustalW2*. Ainda foram realizados estudos de modificações pós-traducionais nas sequencias de aminoácidos da cisteína-proteinase B de *Leishmania (V) braziliensis*, como: sítios de glicosilação (*DictyOGlyc 1.1*), sites de âncora GPI (*big-PI Predictor- The GPI Prediction Server*) e presença de peptídeo sinal (*SignalP 3.0 Server*). Todas essas ferramentas de análise de sequencias estão disponíveis no servidor [www.expasy.org/tools](http://www.expasy.org/tools).

### 3.19 - Sequenciamento do produto amplificado correspondente ao gene *cpb* de *L. (V.) braziliensis*

Após visualização em gel de agarose a 2% (p/v) de uma única banda correspondente a 110pb do gene *cpb*, o produto amplificado do gene de interesse foi purificado utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, seguindo as instruções do fabricante. Este kit tem como princípio a adsorção de ácidos nucleicos à matriz sólida de sílica. O cDNA recuperado foi estocado a -20°C até a etapa de sequenciamento. O material foi seqüenciado pela Plataforma Genômica - Sequenciamento de DNA-PDTIS/FIOCRUZ do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática (IOC/FIOCRUZ) através do kit *Power SYBR green* (Applied Biosystems). As reações foram aplicadas no seqüenciador automático *DNA Analyser® PCR System 3730 – Applied Biosystems*. A análise das seqüências foi feita através da comparação com o banco de dados de nucleotídeos do *Gene Bank* através do programa *BLAST* ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).

### 3.20- Análises estatísticas

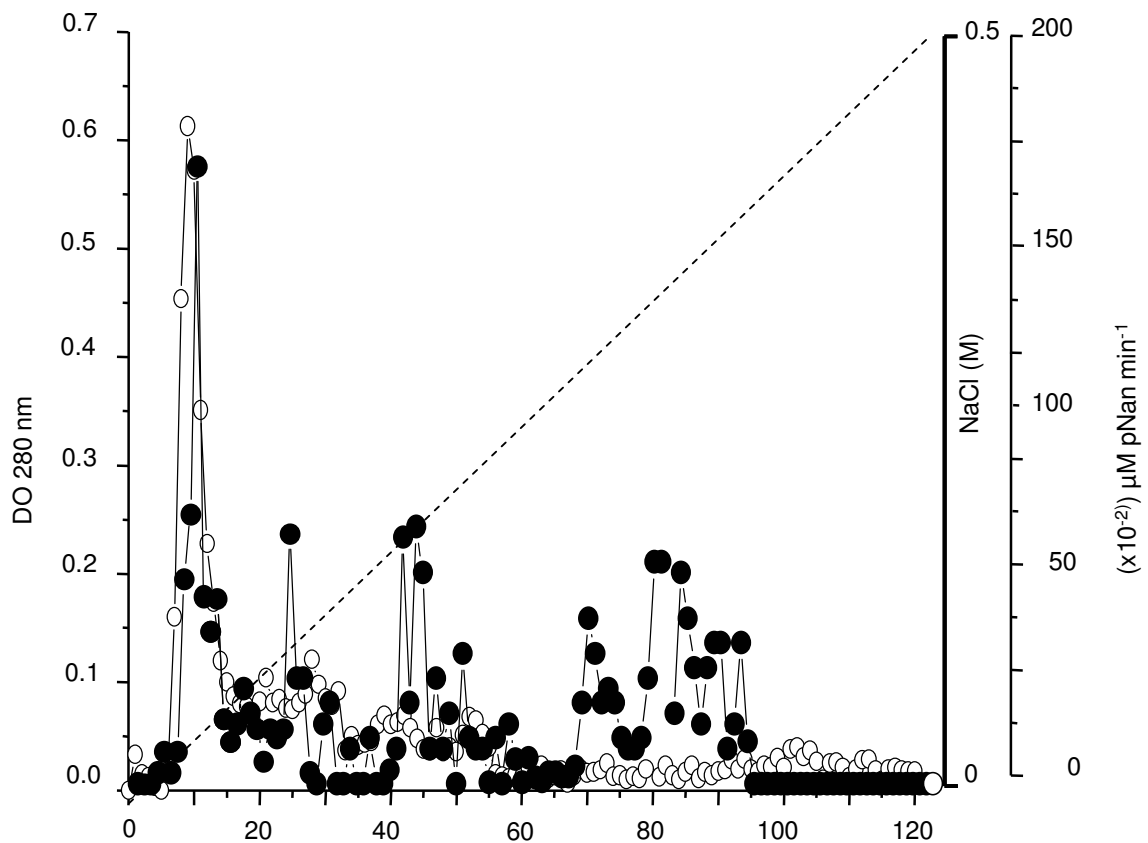
As análises estatísticas dos experimentos foram feitas no programa *Graph Pad Prism® 4.0* (San Diego, USA). *Graph prism 4.0*, onde foi utilizado o teste-T. Para comparar os resultados, todos os experimentos com  $n \geq 2$  foram apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

## 4- Resultados

### 4.1 - Isolamento de cisteína- proteinases B (CPB) de membrana em promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

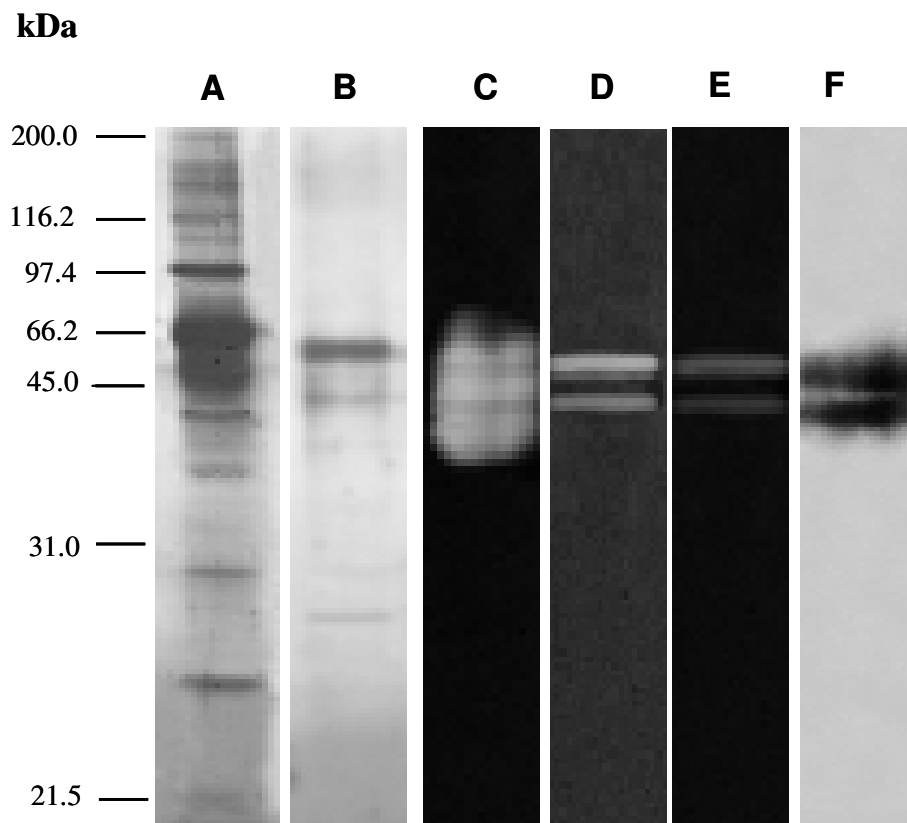
Durante este trabalho, constatamos que de  $3,7 \pm 0,4$  mg das proteínas de membrana detectadas, cerca de  $0,4 \pm 0,1$  mg (11%) foram eluídas da coluna de Con A-Sepharose com  $\alpha$ -D-manose. Posteriormente, a fração de proteínas ligadas em coluna de ConA foi avaliada quanto ao seu comportamento em coluna de troca iônica. Os resultados obtidos da análise dessa fração em coluna de DEAE-Sephacel indicaram que quase a totalidade ( $0,4 \pm 0,03$ mg) das proteínas aplicadas à coluna mantiveram-se adsorvidas à fase sólida após a etapa lavagem, indicando uma predominância de carga negativa nessas proteínas em pH 7,2 (**Figura 5**). De uma forma geral, os dados acima indicam que CPs de membrana de *L. (V.) braziliensis* são proteínas glicosiladas e com  $pI < 7,2$ . Estas proteínas foram recuperadas somente após a eluição com gradiente de NaCl (0-0,5M). O cromatograma gerado nesse fracionamento indicou que cerca de 23% ( $0,092 \pm 0,005$  mg) das proteínas foram eluídas na concentração de 0,055 M de NaCl, correspondente ao pico 1 com 0,625 de absorbância a 280nm. O restante do material ( $77\% = 0,31 \pm 0,01$  mg) dispersou-se ao longo do gradiente de sal. Analisando a atividade enzimática destas preparações foi possível detectar que o pico majoritário de absorbância foi coincidente ao pico principal de atividade sobre o substrato pEFLpNan ( $165 \times 10^{-2}$   $\mu$ M de pNan/minuto) (**Figura 5**).

A eletroforese das frações eluídas da coluna de DEAE-Sephacel, sob condições desnaturantes, revelaram um perfil mais simples de bandas de proteínas (**Figura 6B**) (63 kDa, 43 kDa, 30 kDa e 27 kDa) quando comparado com o extrato total da fração solúvel ao detergente TX-114 (**Figura 6A**). A enzimografia da fração solúvel total do parasita revelou cerca de três bandas de gelatinólise em pH neutro (66 kDa, 45 kDa e 40 kDa) (**Figura 6C**) que não foram sensíveis a presença do inibidor E-64 (dados não mostrados). Por outro lado, os ensaios de enzimografia com as frações da coluna de troca iônica, sugeriram que duas bandas de proteínas majoritárias de 63kDa e 43kDa têm atividade de proteinase em pH neutro, e são coincidentes com as bandas observadas em gel de SDS-PAGE corados pela prata (**Figura 6D**). As atividades destas bandas foram parcialmente sensíveis a presença do E-64 (**Figura 6E**), além de serem reconhecidas pelo antisoro anti-CPB nos ensaios de *immunoblotting* (**Figura 6F**).



**Figura 5:** Fracionamento de cisteína-proteinases solúveis a TX-114 de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. As frações foram previamente enriquecidas de mano-proteínas por cromatografia em coluna de afinidade de Con A e posteriormente fracionadas em coluna de DEAE-Sephacel. As proteínas retidas na coluna foram eluídas com um gradiente linear de NaCl (0-0,5M), e as frações foram coletadas em um fluxo de 0.2 mL por minuto. A etapa de eluição das proteínas foi acompanhada a 280nm (○) e a atividade enzimática com o substrato pEFLpNan (●) foi verificada a 405nm ( $\times 10^{-2}$  um de pNan/minuto).





**Figura 6:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (p/v) na presença de SDS das proteínas de *Leishmania (V.) braziliensis*. (A) e (C) são frações solúveis em TX-114, (B) e (D) são frações recolhidas após cromatografia em DEAE-Sephacel.; Raias (A) e (B) coradas pela prata. Raias (C) (D) e (E) são ensaios de atividade com gelatina incorporada no gel, sendo essa última incubada com 10 $\mu$ M E-64. Raia (F) *Imunoblotting* com antisoro anti-CPB.

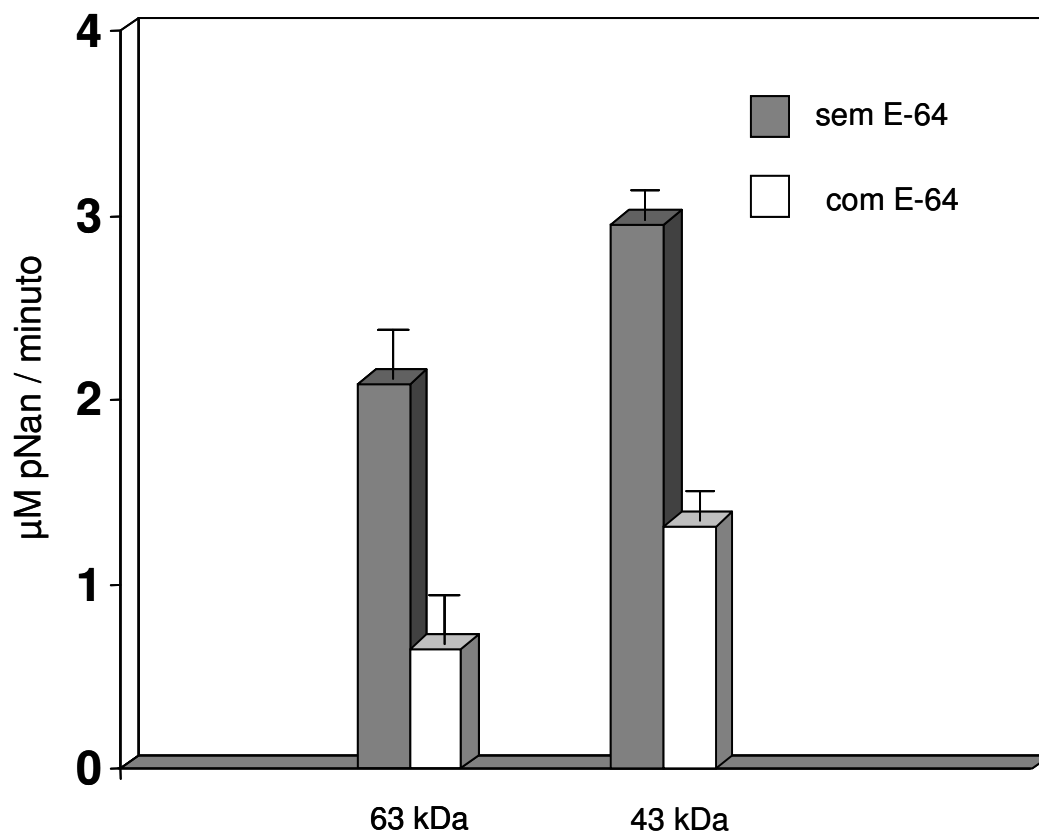
#### 4.2- Atividade Enzimática das bandas com peso molecular de 63kDa e 43kDa

Durante este trabalho, implementamos um estudo adicional de atividade das proteinases de 63 kDa e 43 kDa. Nestes experimentos, as duas bandas de proteinases, imobilizadas em gel de poliacrilamida, hidrolisaram o substrato peptídico específico para cisteíno-proteínase, pEFLpNan. Neste caso, a velocidade de hidrólise foi menor na proteinase de 63 kDa ( $2,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$  de pNan/minuto) comparado com a velocidade da proteinase de 43 kDa ( $0,05 \pm 0,2 \mu\text{M}$  de pNan/minuto). Ambas foram inibidas por  $10\mu\text{M}$  de E-64, com uma inibição de 47 % e 36 %, respectivamente (**Figura 7**).

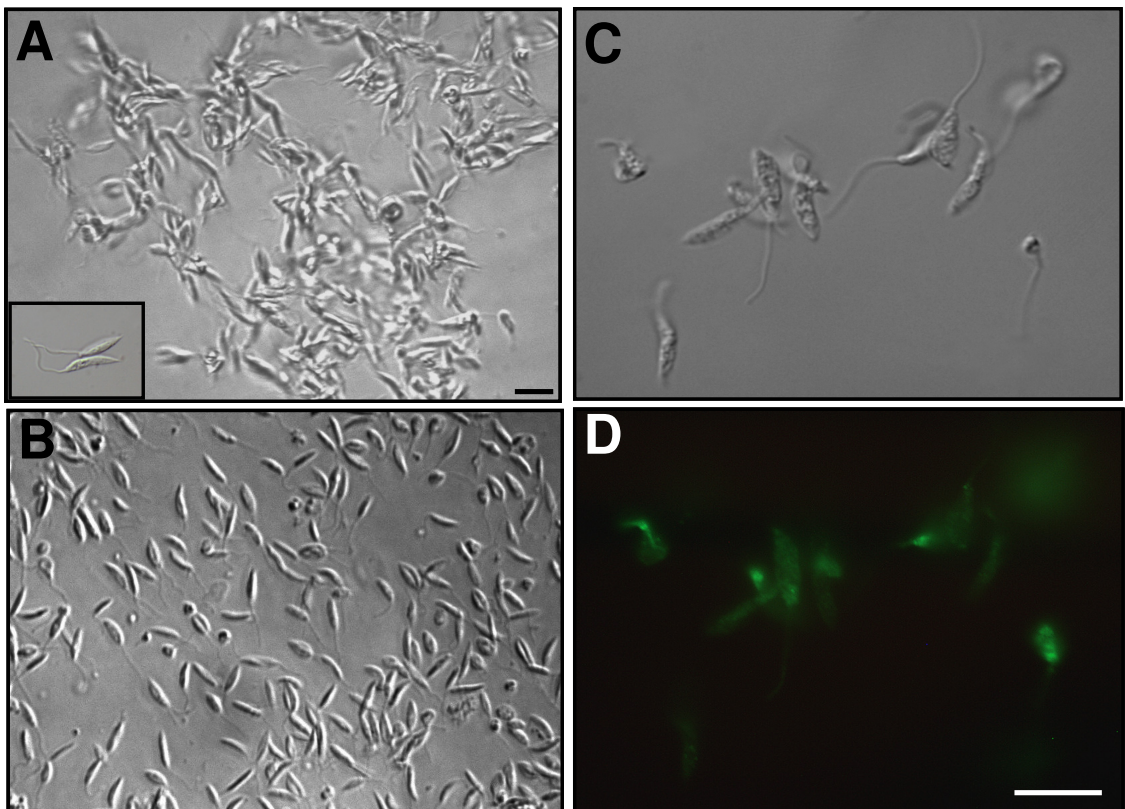
#### 4.3- Localização sub-celular de proteínas homólogas a CPBs em promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

Ensaio de aglutinação direta com promastigotas vivos foram feitos para indicar a localização de proteínas homólogas de CPB na superfície da membrana, com a utilização do antisoro anti-CPB. O efeito da aglutinação foi verificado a partir da diluição 1:50 (**Figura 8A**) até 1:1000. Como controle da reação foram utilizadas células incubadas com soro de coelho pré-imune, onde não foi visualizada aglutinação (**Figura 8B**). Observamos ainda que a aglutinação ocorre principalmente pelo corpo dos promastigotas (destaque na **Figura 8A**). Ensaio de imunofluorescência também foram realizados com parasitas vivos, utilizando o mesmo antisoro, e nesse caso foi observada uma intensa marcação, incluindo a superfície da membrana celular (**Figura 8C e 8D**).

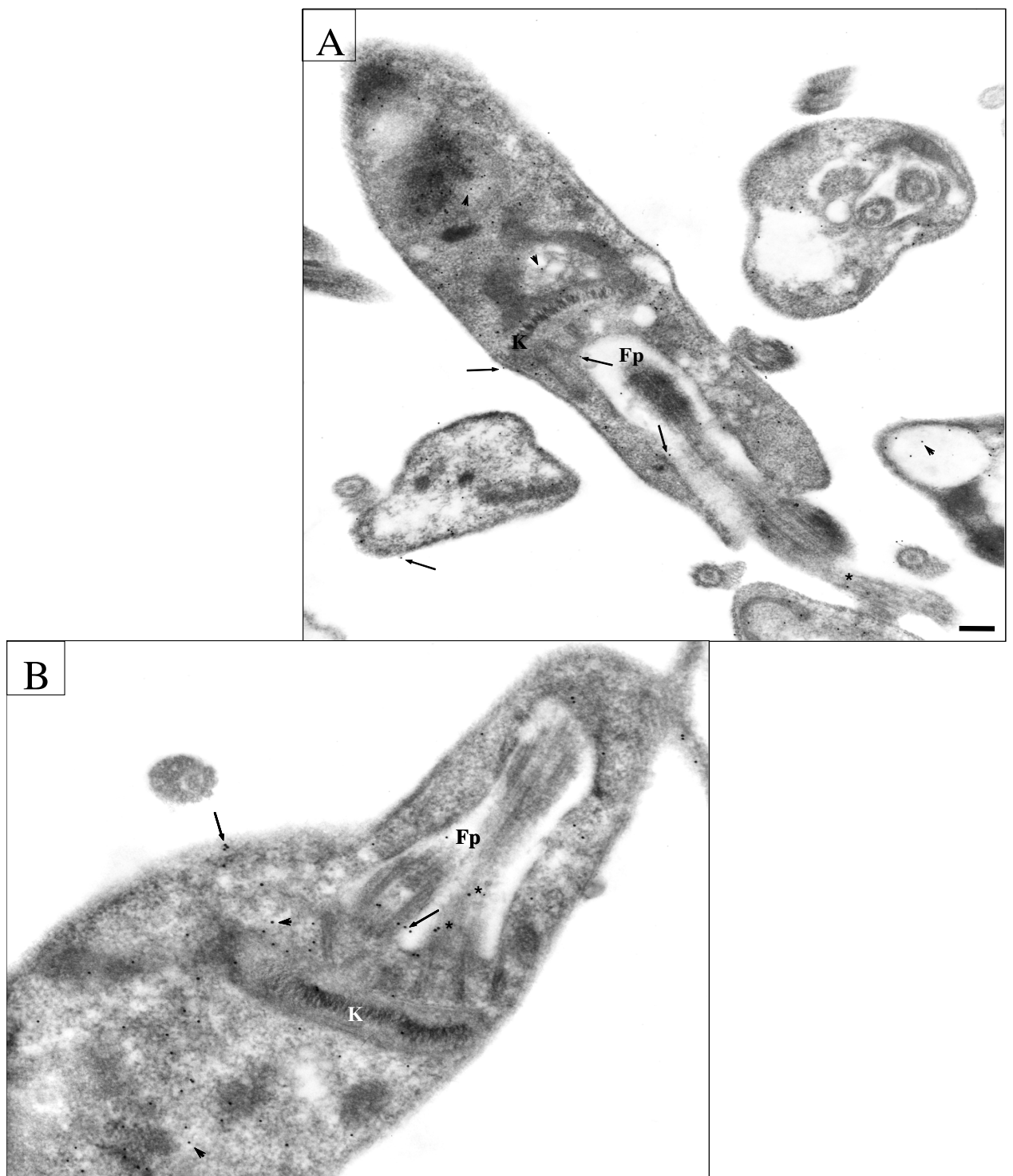
Adicionalmente ensaios de imunocitoquímica foram implementados utilizando antisoro anti-CPB e partículas de ouro coloidal conjugada a proteína A. Nestes ensaios constatamos uma marcação na superfície da membrana, assim como em vesículas intracelulares (**Figura 9**). Ensaio controle foram conduzidos em paralelo com soro pré-imune não revelaram nenhuma marcação nas preparações de promastigotas (dados não mostrados).



**Figura 7:** Avaliação da atividade enzimática das bandas de 63 kDa e 43 kDa de *Leishmania (V) braziliensis*. A atividade enzimática de ambas as bandas imobilizadas em fragmentos de gel foram analisadas com substrato cromogênico pEFLpNan (0.1 mM) em 50mM de fosfato de sódio pH 7,0 contendo DTT (1mM) na presença e na ausência de E-64 (10μM). A hidrólise sobre o substrato foi medida a 405 nm e a atividade enzimática foi expressa em μM de pNan/minuto. Esses resultados são representativos em três experimentos independentes.



**Figura 8:** Reatividade do soro anti cisteína-proteinase B em promastigotas vivas de *Leishmania (V.) braziliensis*. Foram realizados ensaios de aglutinação direta (**A e B**) e ensaios de imunofluorescência indireta (**C e D**). Em ambos, os ensaios foram utilizados soro de coelho pré-imune (**B**) e anti-CPB (**A, C e D**) Barra = 10  $\mu$ m. Em destaque: parasitas com aglutinação corpo-a-corpo. A e B = contraste de fase e C= contraste interferencial



**Figura 9:** Imunoeletromicroscopia para detecção de cisteína-proteinase B em *L. (V.) braziliensis*. A localização ultraestrutural de CPB em promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foi feita utilizando antisoro policlonal específico anti-CPB (1:500) e partículas de ouro coloidal marcadas com proteínas A (10 nm). As partículas de ouro são vistas associadas a membrana (seta) e em vesículas intracelulares (cabeça de seta). K, kinetoplasto; Fp, bolsa flagelar. Em (A), barra = 0,5 µm e em (B) barra = 1,0 µm

#### **4.4- Evidências de âncora glicofosfatidilinositol associada as proteína homólogas a CPBs de *L. (V.) braziliensis***

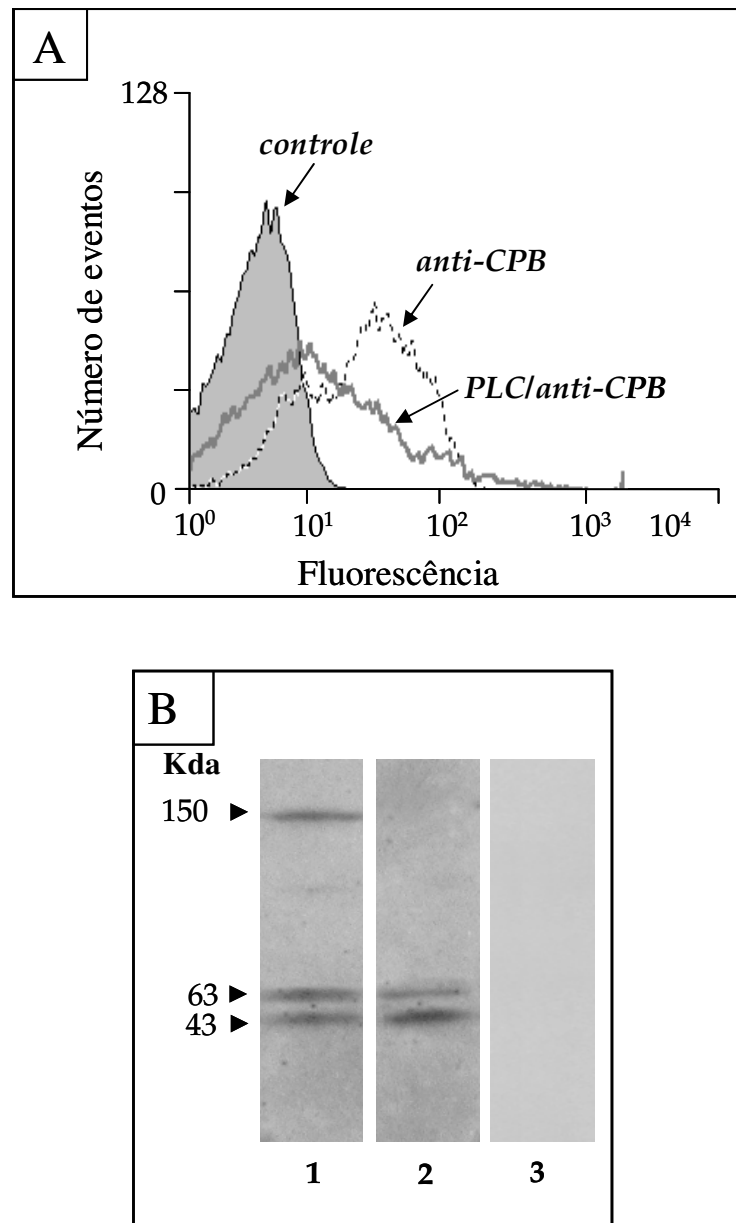
A análise por citometria de fluxo, com a utilização do antisoro anti-CPB, foi feita para detectar as proteínas homólogas a CPB na superfície celular deste parasita. A porcentagem de promastigotas fluorescentes (73 %) foi significativamente ( $p = 0,001$ ) superior no grupo de promastigotas tratado com anti-CPB do que no grupo de promastigotas tratado com soro pré-imune (0,9 %). Além disso, houve um decréscimo do número de promastigotas CPB positivas, quando as mesmas foram pré-tratadas com PLC. Esses resultados sugerem que essas proteínas são ancoradas à membrana, por moléculas de glicofosfatidilinositol (GPI) (**Figura 10A**).

Os sobrenadantes obtidos a partir das células pré-tratadas com PLC foram submetidos a ensaios de *immunoblotting* com anti-CRD e com anti-CPB. Nesses experimentos foi evidenciado que *L. (V.) braziliensis* apresenta três principais bandas de proteínas GPI ancoradas (120 kDa, 63 kDa e 43 kDa), o que foi confirmado pela exposição do epítipo inositol 1,2 cíclico monofosfato. A reatividade do antisoro anti-CPB nas massas moleculares equivalentes de 63 e 43 kDa recuperadas do sobrenadante das células tratadas com PLC é um indicativo de que proteínas homólogas a CPB podem ser removidos da superfície do parasita pela PLC (**Figura 10B**).

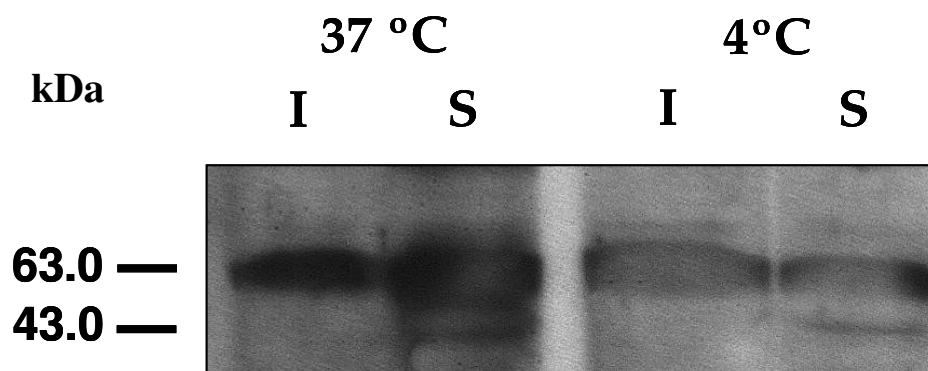
Além das proteínas de 63 kDa e 43 kDa serem ancoradas à superfície das formas promastigotas, a extração com detergente de algumas isoformas pode ser dependente da temperatura. A extração dos promastigotas com TX-100, nas temperaturas de 4 °C e 37 °C, revela que bandas de 63 kDa e 43 kDa são menos solúveis a 4 °C do que a 37 °C. (**Figura 11**).

#### **4.5 – Detecção de proteínas homólogas a CPBs em promastigotas ao longo de duas passagens sucessivas *in vitro***

Os resultados com o antisoro anti-CPB foram obtidos através de ensaios de citometria de fluxo utilizando promastigotas pré-fixados oriundos de primeira e quarta passagens de cultura são apresentados na **Figura 12**. Uma maior porcentagem de marcação foi observada na primeira passagem (12,4%) em relação a quarta passagem (5,2%), indicando uma diferença significativa ( $p = 0,04$ ) no reconhecimento de proteínas de membrana pelo antisoro anti-CPB. Em ambos os casos observaram-se uma marcação significativa acima do controle feito com soro pré-imune (0,6% e 0,9%, respectivamente).

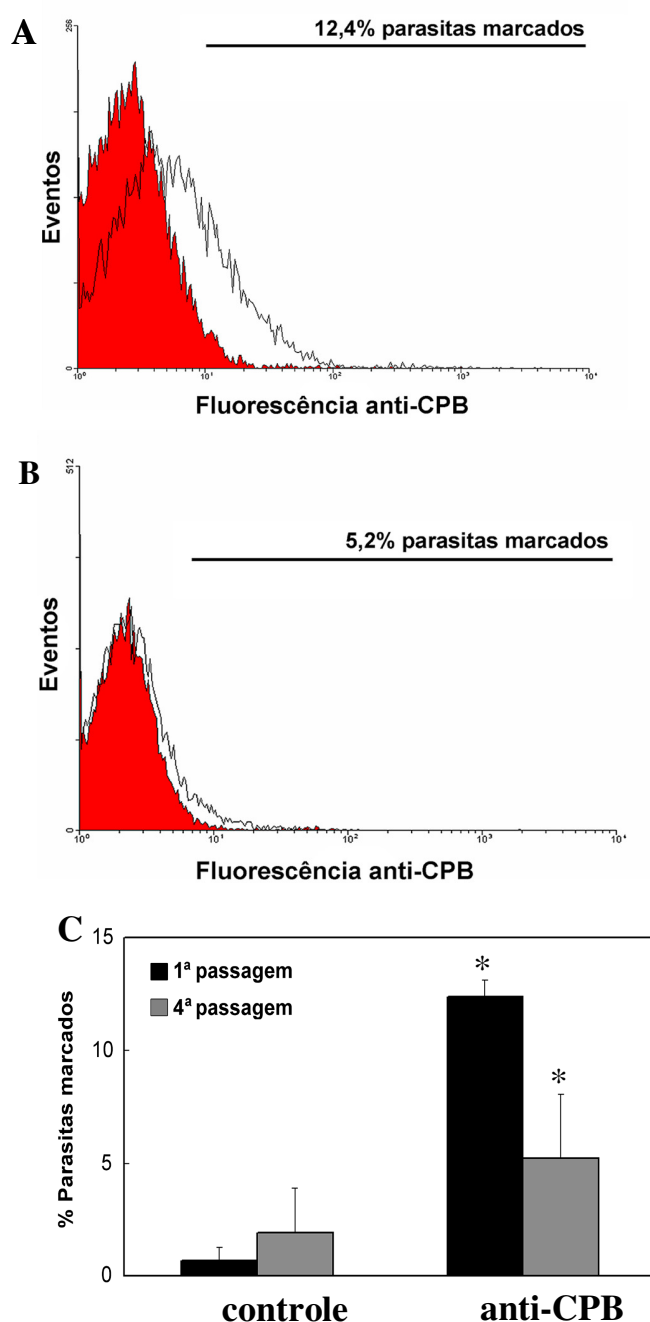


**Figura 10:** Detecção da presença de âncoras de glicofosfatidilinositol de cisteína-proteinase B na membrana de *Leishmania (V.) braziliensis*. **(A)** As análises foram feitas em citometria de fluxo, utilizando com antisoro anti-CPB antes e após tratamento das promastigotas com PLC. O controle negativo utilizado no experimento foi soro pré-imune de coelho como controle. **(B)** O sobrenadante originado das células tratadas com PLC foram analisados em *imunoblotting* com os antisoros anti CRD (1) e anti-CPB (2). A raia (3) é o controle negativo do ensaio feito com soro pré-imune. Os marcadores de massa molecular (kDa) são indicados na figura. Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes.



**Figura 11:** Extração temperatura dependente de cisteína-proteinase B de *Leishmania (V.) braziliensis* por detergente. Extratos de promastigotas ( $10^7$  células) foram obtidos utilizando 1% TX-100 a 4°C ou a 37°C, na presença de inibidores de proteases. As frações de mano-protéicas insolúveis (**I**) e solúveis (**S**) foram separadas por centrifugação, eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose e reveladas com anti-CPB. A massa molecular (kDa) das bandas de CPBs majoritárias reconhecidas pelo antisoro específico são indicados a esquerda. Esses resultados são representativos de três experimentos independentes.





**Figura 12:** Detecção da presença de cisteína-proteinase B em promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. Os ensaios foram conduzidos com promastigotas em primeira (A) e em quarta (B) passagens em meio de cultura líquido a 27 °C. Preparações de promastigotas ( $10^6$  vivam foram incubados com anti-CPB (1:1000) e como controle da reação foram utilizadas promastigotas incubadas com soro pré-imune de coelho (1:1000 - controle). Após a marcação dos parasitos, os mesmos foram analisadas por citometria de fluxo e os resultados foram expressos em números de eventos ( $10^3$  promastigotas) e em log da intensidade de fluorescência. Estas análises são representativas de cinco experimentos independentes. O gráfico de barras (C) indica a média e o desvio padrão das análises por citometria de fluxo ( $p < 0.05$ ).

#### 4.6 – Estimativa da atividade enzimática de CPs dos promastigotas ao longo de três passagens sucessivas *in vitro*

Tivemos ainda oportunidade de avaliar a atividade enzimática de CPs em promastigotas de primeira, quarta e sétima passagens (**Figura 13**). Os resultados apresentados mostram que as CPs avaliadas no extrato de proteína do parasita hidrolizam o substrato cromogênico (pNan) em pH 7,0. Assim, foi possível constatar que a atividade de CP é decrescente à medida que os promastigotas foram submetidos a sucessivas passagens, sendo observado um decréscimo de 24 % ( $16,3 \pm 0,9 \times 10^{-3}$   $\mu\text{moles. minuto}^{-1}$ . mg de proteínas<sup>-1</sup>;  $p = 0,001$ ) e 34 % ( $14,0 \pm 0,006$   $\mu\text{moles. minuto}^{-1}$ . mg de proteínas<sup>-1</sup>,  $p = 0,001$ ) da atividade na quarta e sétima passagem, respectivamente, quando comparado com a atividade CP na primeira passagem ( $21 \pm 0,001$   $\mu\text{moles. minuto}^{-1}$ . mg de proteínas<sup>-1</sup>).

Para termos uma idéia melhor da participação de CPs na atividade total do substrato foi utilizado o inibidor E-64 para confirmar a especificidade dessas enzimas. Os percentuais de inibição da atividade das sucessivas passagens foram: primeira passagem, 96,3 % ( $20,2 \pm 0,001$   $\mu\text{moles. minuto}^{-1}$ . mg de proteína<sup>-1</sup>); quarta passagem, 54 % ( $11,3 \pm 0,0009$   $\mu\text{moles. minuto}^{-1}$ . mg de proteína<sup>-1</sup>); e de sétima passagem, 52 % ( $10 \pm 0,001$   $\mu\text{moles. minuto}^{-1}$ . mg de proteína<sup>-1</sup>).

#### 4.7 – Verificação da expressão relativa do gene *cpb* dos promastigotas ao longo de três passagens sucessivas *in vitro*

Na continuidade do nosso estudo o RNA total de *L. (V.) braziliensis* (**Figura 14**) foi reversamente transcrito em cDNA para avaliação da expressão do gene *cpb* de promastigotas de primeira, quarta e sétima passagens. Em uma análise preliminar verificamos a eficiência dos iniciadores desenhados para amplificar uma região comum aos genes *cpb* do parasita. Os resultados da reação de PCR com os distintos cDNAs dos promastigotas de *L.(V.) braziliensis* revelaram amplificação de um único fragmento de gene com 110 pb nas três preparações de cDNA testadas (**Figura 15**). O sequenciamento destes produtos amplificados revelou identidade com seqüências de CPs de *Leishmania* spp. (**Tabela VI**). A análise das seqüências comparando com o banco de dados de nucleotídeos do *Gene Bank* através do programa *BLAST* revelou identidade máxima de 98% para sequencias de catepsina-L de *L. (V.) braziliensis*, assim como para as sequencias encontradas no cromossomo oito deste parasita; e identidade mínima de 86% para os genes *cpb* de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) pifanoi* (**Tabela VI**). Esse percentual de

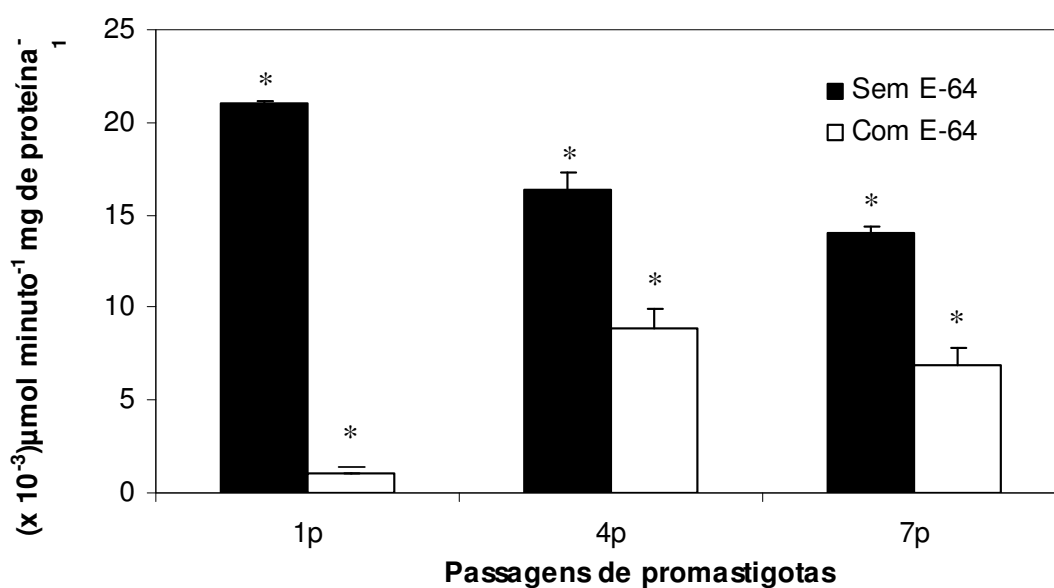
identidade de 98% é justificado, pois estávamos trabalhando com uma região conservada nas três sequências de *cpb* (**Figura 16**), essas não apresentam 100% de homologia entre si (**Figura 17**).

Uma vez constatado no sequenciamento que o fragmento de 110pb estava relacionado exclusivamente com sequências de CPs de *Leishmania* spp procedeu-se aos ensaios de PCR quantitativo. Como os nossos ensaios foram realizados com o reagente *SYBR green* foi necessário construir curvas de dissociação para checar a especificidade dos ensaios para os genes *cpb* e alfa-tubulina. Os resultados para ambos os genes indicaram um único pico de temperatura de dissociação para o produto amplificado pelos iniciadores utilizados ( $T_m = 83^\circ\text{C}$  para *cpb* e  $T_m = 86^\circ\text{C}$  para alfa-tubulina), sugerindo que os ensaios de PCR em tempo real foram genes específicos e que os resultados não foram confundidos com amplificações inespecíficas ou dímeros de iniciadores (**Figura 18**).

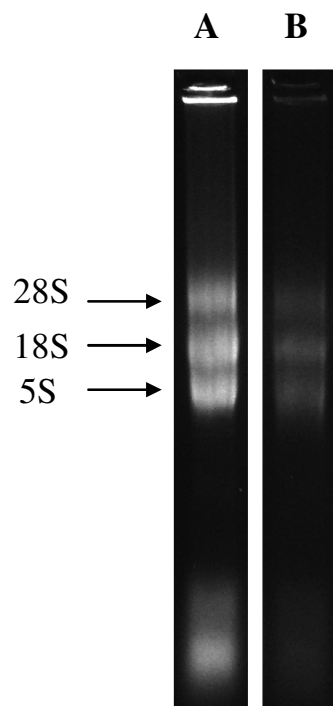
Utilizando o gene que codifica a alfa-tubulina como normalizador da reação ( $C_t = 16 \pm 0,3$ ), observamos que as sucessivas passagens dos promastigotas em cultura geraram um aumento da quantidade de transcritos do gene *cpb*: primeira passagem ( $C_t = 22 \pm 0,2$ ), quarta passagem ( $C_t = 21 \pm 0,8$ ) e sétima passagem ( $C_t = 20 \pm 0,10$ ). A **Figura 19** apresenta a média dos valores da expressão normalizada do gene *cpb* de promastigotas utilizando como gene de referência (constitutivo) de alfa-tubulina. Com estes dados foi possível constatar que a expressão do gene *cpb* estava significativamente aumentada em 2,2X ( $4 \pm 0,6$ ,  $p = 0,009$ ) e 2,7 X ( $5 \pm 0,3$ ,  $p = 0,003$ ) nas preparações de cDNA dos promastigotas de quarta e sétima passagens, respectivamente; quando comparada com os resultados de quantificação realizados com preparações de cDNA dos promastigotas de primeira passagem ( $1 \pm 0,1$ ).

#### 4.8 – Modificações pós traducionais nas sequências de CPB

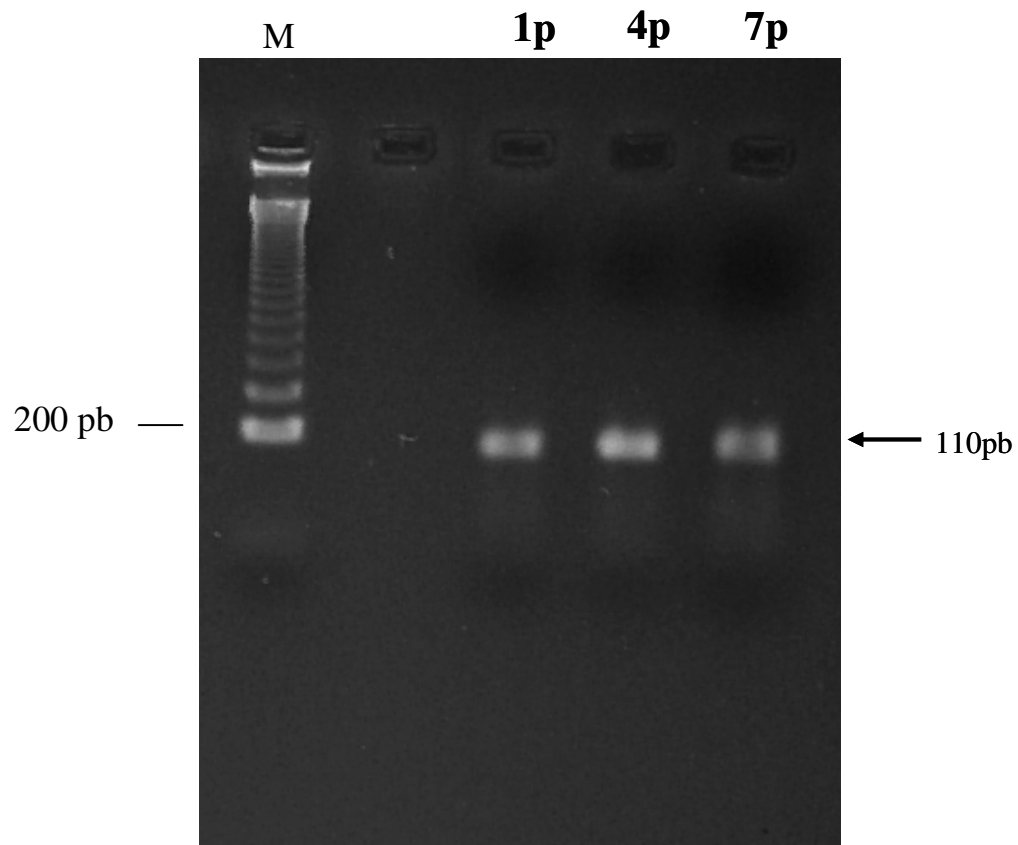
Ao longo desse trabalho foi possível confirmar a presença de modificações pós-traducionais como sítios de glicosilação, região de âncora GPI e presença de peptídeo sinal – **Figura 19**. As análises *in silico* indicaram a presença de apenas *O*-glicosilação nas sequências de CPB sendo, 11 sítios em *Lbr.\_V2. 0810* e *Lbr.\_V2. 0820* e 18 sítios em *Lbr.\_V2. 0830*. Também constatamos que na análise teórica do resíduo de aminoácido Ser<sup>429</sup> poderiam conter âncora GPI nas sequências *Lbr.\_V2. 0820* e *Lbr.\_V2. 0830* e o resíduo Gli<sup>422</sup> na sequência *Lbr.\_V2. 0810*. Além disso, os dados indicaram que as três sequências de CPB contêm peptídeo sinal entre os resíduos de aminoácidos Ala<sup>27</sup> - Met<sup>28</sup> (**Figura 20**)



**Figura 13:** Ensaio de atividade enzimática para cisteína-proteinase ao longo das passagens *in vitro* dos promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. A atividade enzimática foi medida a partir do extrato total de proteínas (5 μg) de promastigotas usando pEFLpNan (0,1mM) como substrato, em tampão 10mM Tris HCl pH 7,0 contendo 1mM de DTT e 1% de CHAP´S. Os ensaios foram realizados com promastigotas de primeira (1p), quarta (4p) e sétima (7p) passagens. A atividade enzimática foi medida na ausência (■) e na presença (□) de 0,1 mM de E-64. Os dados de atividade foram expressos em μmoles minutos<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>. Os valores representam as médias de um ensaio em triplicata e os seus desvios padrão. (p < 0.05).



**Figura 14:** Gel de agarose 1,2% (p/v) desnaturante para a análise de RNA total de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*. A integridade do RNA extraído (1 $\mu$ g) sem tratamento prévio com DNase e LiCl<sub>2</sub> (A) e após tratamento com DNase e LiCl<sub>2</sub> (B). As três bandas correspondem, respectivamente aos RNAs ribossomais 28S, 18S e 52S.



**Figura 15:** Análise dos produtos amplificados do gene de cisteína-proteinase B de *Leishmania (V.) braziliensis*. As amostras de cDNA de obtidas da primeira (1p), quarta (4p) e sétima (7p) passagens foram submetidas a reação de PCR e os produtos amplificados foram visualizados em gel de 1,2%, de agarose à corado em brometo de etídeo. M= marcador de massa molecular *DNA Ladder* (Invitrogen Life Technologies)

**Tabela IV:** Sequencias que com alto grau de identidade na sequencia de nucleotídeos com o fragmento amplificado e seqüenciado do gene *cpb* de *L. (V.) braziliensis*

Número de Acesso	Descrição	Escore Máx	Grau de Similaridade
<a href="#">XM_001562091.1</a>	<i>L. braziliensis</i> cathepsin L-like protease (LbrM08_V2.0830)	<a href="#">100</a>	98%
<a href="#">XM_001562090.1</a>	<i>L. braziliensis</i> cathepsin L-like protease (LbrM08_V2.0820)	<a href="#">100</a>	98%
<a href="#">XM_001562089.1</a>	<i>L. braziliensis</i> cathepsin L-like protease (LbrM08_V2.0810)	<a href="#">100</a>	98%
<a href="#">AM494945.1</a>	<i>L. braziliensis</i> cromossomo 8	<a href="#">100</a>	98%
<a href="#">AY850168.1</a>	Vetor de clonagem pQ-CPB recombinante	<a href="#">100</a>	98%
<a href="#">Z49962.2</a>	<i>L. mexicana</i> gene <i>lmcpb2.8</i> de CP	<a href="#">69.4</a>	86%
<a href="#">Z49963.2</a>	<i>L. mexicana</i> gene <i>cpb1</i>	<a href="#">69.4</a>	86%
<a href="#">Z14061.1</a>	<i>L. mexicana</i> RNAm de CP	<a href="#">69.4</a>	86%
<a href="#">Y09958.1</a>	<i>L. mexicana</i> gene <i>cpb18</i>	<a href="#">69.4</a>	86%
<a href="#">AJ319727.1</a>	<i>L. mexicana</i> gene <i>cpb2</i>	<a href="#">69.4</a>	86%
<a href="#">M97695.1</a>	<i>L. pifanoi</i> gene CP ( <i>cys2</i> )	<a href="#">69.4</a>	86%

```

Primer_Senso      AACTTCCAGCGTAACCT----- 17
LbrM08_V2.0810   AACTTCCAGCGTAACCTGGAGCTGATGCGCGAGCACCAGGCGAACAACCCACACGCGCGG 240
LbrM08_V2.0830   AACTTCCAGCGTAACCTGGAGCTGATGCGCGAGCACCAGGCGAACAACCCACACGCGCGG 240
LbrM08_V2.0820   AACTTCCAGCGTAACCTGGAGCTGATGCGCGAGCACCAGGCGAACAACCCACACGCGCGG 240
*****

Primer_Antisenso -----CTGTCCGAGGAAGAGTT----- 17
LbrM08_V2.0810   TTCGGGATCACGAAGTTCTTTGACCTGTCCGAGGAAGAGTTGCCACGCGCTACCTGAGC 300
LbrM08_V2.0830   TTCGGGATCACGAAGTTCTTTGACCTGTCCGAGGAAGAGTTGCCACGCGCTACCTGAGC 300
LbrM08_V2.0820   TTCGGGATCACGAAGTTCTTTGACCTGTCCGAGGAAGAGTTGCCACGCGCTACCTGAGC 300
*****

```

**Figura 16:** Análise do pareamento dos iniciadores senso e anti-senso nas três sequências do gene *cpb* de *L. (V.) braziliensis*. Os asteriscos (\*) representam os nucleotídeos idênticos em todas as sequências do alinhamento. Em destaque o local nas sequências onde ocorre o anelamento do pareamento. As análises foram feitas no *ClustalW* ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)).



```

LbrM08_V2.0830      TTCAAGCAGACGTACCAGCGCGTGTACGCGACGCTGGACGAGGAGCAGCAGCGGCTGGCG 180
LbrM08_V2.0820      TTCAAGCAGACGTACCAGCGCGTGTACGCGACGCTGGACGAGGAGCAGCAGCGGCTGGCG 180
LbrM08_V2.0810      TTCAAGCAGACGTACCAGCGCGTGTACGCGACGCTGGACGAGGAGCAGCAGCGGCTGGCG 180
*****

LbrM08_V2.0830      AACTTCCAGCGTAACCTGGAGCTGATGCGCGAGCACCAGGCGAACAACCCACACGCGCGG 240
LbrM08_V2.0820      AACTTCCAGCGTAACCTGGAGCTGATGCGCGAGCACCAGGCGAACAACCCACACGCGCGG 240
LbrM08_V2.0810      AACTTCCAGCGTAACCTGGAGCTGATGCGCGAGCACCAGGCGAACAACCCACACGCGCGG 240
*****

LbrM08_V2.0830      TTCGGGATCACGAAGTTCITTTGACCTGTTCGGAGGAAGAGTTCGCCACGCGCTACCTGAGC 300
LbrM08_V2.0820      TTCGGGATCACGAAGTTCITTTGACCTGTTCGGAGGAAGAGTTCGCCACGCGCTACCTGAGC 300
LbrM08_V2.0810      TTCGGGATCACGAAGTTCITTTGACCTGTTCGGAGGAAGAGTTCGCCACGCGCTACCTGAGC 300
*****

LbrM08_V2.0830      GCGGCCACGCACTTCGCAAAGGCGAAGAAGTTCGCAAGCCAGCACTACCGCAAGGTGGGC 360
LbrM08_V2.0820      GCGGCCACGCACTTCGCAAAGGCGAAGAAGTTCGCAAGCCAGCACTACCGCAAGGTGGGC 360
LbrM08_V2.0810      GCGGCCACGCACTTCGCAAAGGCGAAGAAGTTCGCAAGCCAGTACTACCGCAAGGTGGGC 360
*****

LbrM08_V2.0830      GCGGACCTGTCGACAGCGCCTGCTGCGGTGGACTGGCGTGAGAAGGGCGCCGTGACGCCG 420
LbrM08_V2.0820      GCGGACCTGTCGACAGCGCCTGCTGCGGTGGACTGGCGTGAGAAGGGCGCCGTGACGCCG 420
LbrM08_V2.0810      GCGGACCTGTCGACAGCGCCTGCTGCGGTGGACTGGCGTGAGAAGGGCGCCGTGACGCCG 420
*****

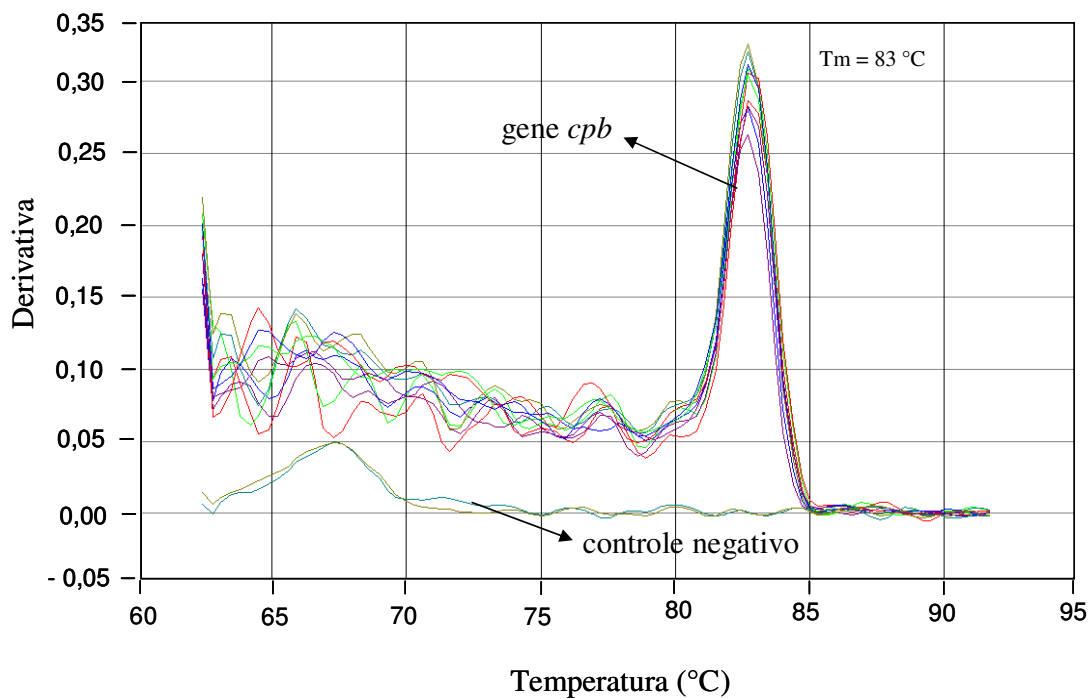
LbrM08_V2.0830      GTGAAGGACCAGGGGATGTGCGGGTCATGCTGGGCGTTCTCGGCGATCGGCAACATAGAG 480
LbrM08_V2.0820      GTGAAGGACCAGGGGATGTGCGGGTCATGCTGGGCGTTCTCGGCGATCGGCAACATAGAG 480
LbrM08_V2.0810      GTGAAGGACCAGGGGATGTGCGGGTCATGCTGGGCGTTCTCGGCGATCGGCAACATAGAG 480
*****

LbrM08_V2.0830      TCGCAGTGGTACCTTGCCACCCACTCGCTGATCTCCCTGTCGGAGCAGGAGCTGGTGAGC 540
LbrM08_V2.0820      TCGCAGTGGTACCTTGCCACCCACTCGCTGATCTCCCTGTCGGAGCAGGAGCTGGTGAGC 540
LbrM08_V2.0810      TCGAAGTGGTACCTTGCCACCCACTCGCTGATCTCCTTGTTCGGAGCAGGAGCTGGTGAGC 540
*** *****

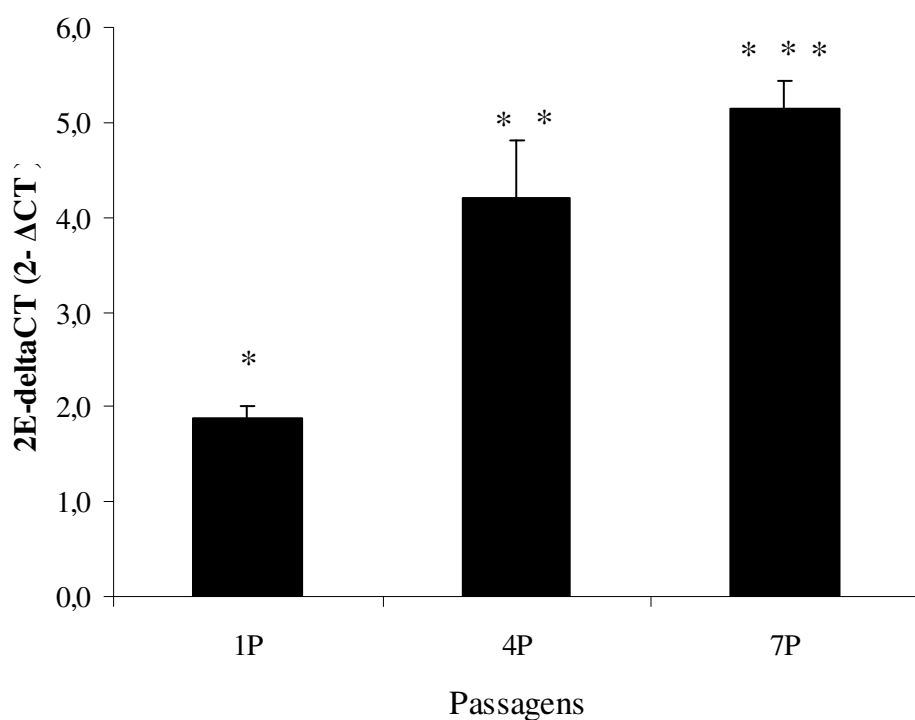
LbrM08_V2.0830      TGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCGTTTACTGGCTG 600
LbrM08_V2.0820      TGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCGTTTACTGGCTG 600
LbrM08_V2.0810      TGCGATGATGTGGACGAGGGCTGCAACGGCGGCCTGATGCTGCAGGCGTTTACTGGCTG 600
*****

```

**Figura 17:** Alinhamento múltiplo das três sequencias do gene *cpb* de *L. (V.) braziliensis* depositadas no banco de dados. Os asteriscos (\*) representam os nucleotídeos idênticos em todas as sequencias do alinhamento. O alinhamento foi feito no programa *ClustalW* ([www.expansy.org](http://www.expansy.org)).



**Figura 18:** Curvas de dissociação da PCR em tempo real utilizando SYBR *green* para gene *cpb* obtidas a partir da temperatura de desnaturação dos produtos amplificados. O gráfico expressa a derivativa da curva de dissociação dos produtos amplificados a partir dos iniciadores para o gene *cpb* demonstrando um único pico na temperatura de 83 °C quando comparado ao controle negativo que não apresenta pico de dissociação. Esses resultados são representativos de cinco experimentos independentes em duplicata com as três passagens de cultura.



**Figura 19:** Quantificação do gene de cisteína-proteinase B (*cpb*) de *Leishmania (V) braziliensis* por PCR em Tempo Real. Os produtos amplificados da reação PCR quantitativo foram obtidos a partir dos cDNAs dos promastigotas de primeira (1p), quarta (4p) e sétima (7p). A reação foi normalizada utilizando-se a alfa-tubulina, sendo os dados expressos por  $2^{-\Delta CT}$  (CT do gene CPB – CT do gene alfa-tubulina). Estes resultados correspondem a média e o desvios padrão de cinco experimentos independentes ( $p < 0.05$ ).



#### 4 - Discussão

O estudo sobre as proteinases de parasitas do gênero *Leishmania* indica que é possível detectar estas enzimas diretamente do extrato total do parasita por ensaios de eletroforese através da digestão de substratos copolimerizados em gel de poliacrilamida. Ao longo de três décadas de estudos utilizando este método de análise de proteinases só foi possível revelar metalo-proteinases e cisteína-proteinases nestes protozoários (Alves *et al.*, 2004; Bouvier *et al.*, 1995; Cuervo *et al.*, 2006; de Araujo Soares *et al.*, 2003), que estas enzimas são predominantes nestes parasitas. Enquanto metalo-proteinases são encontradas em abundância nas formas promastigotas (Bouvier *et al.*, 1985; Schneider *et al.*, 1992), as cisteína-proteinases concentram-se nas formas amastigotas (Mottram *et al.*, 1997; North *et al.*, 1990; Traub-Cseko *et al.*, 1993). Nesse contexto, os estudos de proteinases em cepas de *L. (V.) braziliensis* através dessa técnica, foram capazes de detectar metalo-proteinases, sendo poucos os estudos que revelam a existência de cisteína-proteinase nesta espécie de parasita (Alves *et al.*, 1993). Entretanto, é necessário ter cautela ao se analisar este tipo de eletroforese, pois a revelação da atividade enzimática é dependente de uma série de fatores, os quais necessitam ser avaliados, tais como atividade enzimática, difusão e penetração do inibidor E-64 (Michaud, 1998).

Desta forma, decidimos adotar uma abordagem extrínseca ao sistema de enzimografia. Nosso questionamento foi direcionado ao parasita e tentamos estudá-lo sob o ponto de vista bioquímico. Assim, propomos detectar CPs em frações de proteínas de membrana em promastigotas de uma cepa infectiva de *L. (V.) braziliensis*. Esta linha de pesquisa teve como suporte os resultados prévios do nosso grupo que revelou pela primeira vez CPs em frações de proteínas de membrana de uma cepa de parasita da mesma espécie (Alves *et al.*, 1993).

Os avanços sobre o conhecimento de CPs de *Leishmania* spp. podem ser divididos em duas frentes: a diversidade dos genes *cpb* nesse gênero e a influência dessas enzimas na interação entre parasita e hospedeiro mamífero (Mottram *et al.*, 2004). Contudo, as evidências bioquímicas de CPs são pouco estudadas em cepas de *L. (V.) braziliensis* que são parasitas com baixa taxa de multiplicação *in vitro* e *in vivo*, e estão associados à leishmaniose cutâneo-mucosa (Smith *et al.*, 2007). Neste trabalho, mostramos que CPs de membrana ricas em manose podem ser detectadas em promastigotas desse parasita e que métodos de concentração para a análise quantitativa e qualitativa individual dessas enzimas. Portanto, o desenho experimental proposto para o isolamento de CPs de membrana em *L. (V.) braziliensis* foi parcialmente bem sucedido.

A sensibilidade destas enzimas ao inibidor E-64 foi um indicativo de que as preparações de proteínas isoladas continham cisteína-proteinases. Ainda, as propriedades catalíticas de CPs

foram confirmadas uma vez que estas enzimas hidrolizam o substrato pEFLpNan, que é um substrato específico para proteinases com grupamento tiol em seu centro ativo, como a papaína (*Carica papaya*), ficina (*Ficus carica*) ou bromelina (*Ananas comosus*) (Filippova *et al.*, 1984). A hidrólise dos substratos com resíduos de fenilalanina na posição P2 é compatível com a especificidade das proteinases com grupamento tiol. Além disso, nossos dados nos permitem classificar essas enzimas como parte do grupo A das CPs, descrita por Robertson & Coombs (1990), uma vez que elas são ricas em resíduos de manose e ainda são previstos sítios de *O*-glicosilação nas três sequências de CPB analisadas *in silico*.

Os parasitas ao longo do seu ciclo de vida estão sujeitos a transformações consideráveis. Esse ponto é de interesse especial no caso dos protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, que ao longo do seu ciclo biológico são expostos a diferentes condições dentro dos hospedeiros, invertebrado e vertebrado. Os resultados de hidrólise desta enzima sobre a gelatina indicam o potencial destas em agir sobre componentes da matriz extra-celular o que pode favorecer a invasão em ambos os hospedeiros. No ambiente do trato digestório do vetor, estas enzimas atuam na catálise de vários substratos necessários à nutrição das formas promastigotas. No hospedeiro vertebrado estas enzimas poderiam atuar no início da invasão do sistema fagocítico mononuclear. Neste caso é conhecido que CPs que hidrolizam o substrato pEFLpNan podem inibir a biossíntese de prostaglandinas pró-inflamatórias (Taussig, 1980) e reduzir a eficiência da coagulação, agindo sobre o fibrinogênio (Livio *et al.*, 1978).

O perfil de migração eletroforética destas proteinases foi caracterizado ao longo deste trabalho. Os ensaios de eletroforese revelados por nitrato de prata indicaram um perfil simples de massas moleculares das frações isoladas da coluna de DEAE-Sephacel, o que foi detectado também pelos ensaios de enzimografia, sugerindo que as bandas de 63kDa e 43 kDa são as CPs predominantes sensíveis a incubação com o E-64. Esses dados foram confirmados por *immunoblotting*, utilizando antisoro policlonal mono-específico anti-CPB, o que sugere que tais proteinases sejam homólogas de CPBs de *L. (L.) mexicana*, como descrito para *L. (L.) amazonensis* (Alves *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que essas massas moleculares predominantes podem ser relacionadas aos dados já descritos para CPs de outras espécies de *Leishmania*, como a forma precursora de 45 kDa de *L. (L.) pifanoi* (Duboise *et al.*, 1994); as bandas de proteinases de 65 kDa de promastigotas não infectiva de *L. (L.) major like* (Alves *et al.*, 1993) e também, a proteína de 43 kDa previamente descrita para outra cepa de *L. (V.) braziliensis* (Alves *et al.*, 1993).

Um fato interessante, é que esta primeira etapa do nosso trabalho indicou a possibilidade destas enzimas estarem na superfície celular das formas promastigotas. Geralmente no fracionamento com TX-114, na fase detergente estão presentes as proteínas de membrana (Bordier, 1981), enquanto as que permanecem na fase aquosa são essencialmente hidrofílicas, embora algumas exceções tenham sido descritas (Maher & Singer, 1985; Pryde & Phillips, 1986). Baseado nestas observações é possível sugerir que as proteínas de membrana das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* eluídas da coluna de troca iônica estão associadas às membranas externa ou interna. Ainda é possível inferir, que as proteínas de 63 e 43 kDa são proteínas de membrana externa devido a presença de resíduos de manose, uma vez que estes resíduos de açúcar são típicos de muitas proteínas presentes na membrana externa (Gahmberg & Tolvanen, 1996).

Como a compartimentalização celular de uma enzima pode estar diretamente relacionada com sua função biológica, estudos subseqüentes foram propostos para investigar a distribuição celular das proteínas homólogas a CPB. Um outro indicativo da presença de proteínas homólogas a CPB na superfície de promastigotas foi obtido através de ensaios de aglutinação direta, com antisoro anti-CPB. Esse fato foi confirmado por ensaios de imunocitoquímica, utilizando o mesmo antisoro que também foi capaz de revelar a presença destas proteínas, ou polipeptídeos contendo epítomos idênticos, na superfície celular e em organelas intracelulares. Desta forma, estes dados de localização celular com base no reconhecimento imunológico das proteínas homólogas a CPB confirmam os achados bioquímicos da solubilidade destas proteínas em TX-114.

Embora, estes resultados corroborem com os achados em promastigotas de *L. (L.) major*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (Alves *et al.*, 1993, 2000) que CPs podem ser proteínas de membrana e integrais, é importante mencionar que outros autores reportam que diferentes CPs estão associadas a organelas internas da *Leishmania* e teriam propriedades hidrofílicas (Dubois *et al.*, 1994; Robertson & Coombs, 1990). A localização das CPs na superfície celular do parasita não é um fato muito demonstrado, visto que a rota conhecida para o direcionamento celular destas enzimas, não prevê o endereçamento das mesmas para a superfície deste parasita. Embora formas maduras dessas proteínas estejam geralmente confinadas a megassomos, em amastigotas, supõe-se que elas estejam localizadas nos lisossomos-túbulo multivesicular em promastigotas (Leon *et al.*, 1994). O modelo de rota de direcionamento das CPs mais estudado é o de *L. (L.) mexicana*. Sabe-se que esta rota é pouco usual, uma vez que envolve a bolsa flagelar e

a via endossomal, e é direcionada por elementos seqüências no pró-domínio (Brooks *et al.*, 2000; Huete-Perez *et al.*, 1999; McConville *et al.*, 2002).

Na superfície deste protozoário, estas enzimas podem estar relacionadas com a nutrição, invasão de tecidos ou com o mecanismo de escape de defesa (McKerrow *et al.*, 1993; Sajid & McKerrow, 2002). No entanto, com os nossos dados não é possível afirmar que estas enzimas estão ativas na superfície dos promastigotas. De qualquer forma, nossos resultados mostram que ocorre reação imunológica cruzada entre o antisoro anti-CPB e proteínas homólogas de *L. (V.) braziliensis*. Provavelmente os complexos imunes detectados correspondem a maioria das CPs identificadas em *Leishmania* (Duboise *et al.*, 1994; Pupkis & Coombs, 1984; Robertson & Coombs, 1990).

Adicionalmente, o tipo de marcação na superfície celular e na membrana da bolsa flagelar indica que as proteínas homólogas de CPB podem ser secretados pelo parasita. Esse fato foi observado nesse trabalho através de análises *in silico*, que indicaram a presença de peptídeo sinal nas três sequencias de CPB depositadas no banco de dados. A metalo-proteinase gp63 é a única proteinase de superfície *Leishmania* spp descrita como secretada (McGwire *et al.*, 2002). Não obstante as CPs serem enzimas secretadas por vários protozoários parasitas (McKerrow *et al.*, 1993), no momento, não é possível afirmar que as proteínas homólogas a CPB descritos neste trabalho estão sendo secretados pelas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

De uma maneira geral, a membrana plasmática de protozoários parasitas como *Leishmania* são altamente especializadas, com uma fina camada de glicoconjugados e glicoproteínas atuando como fator de virulência (Ilg *et al.*, 1999a; McConville *et al.*, 1993; Naderer *et al.*, 2004; Turnock & Ferguson, 2007). Dentre estes glicoconjugados e glicoproteínas destacam-se a gp63, lipofosfoglicanos e glicoinositol fosfolipídeos de *Leishmania* spp. (Alexander *et al.*, 1999; Frommel *et al.*, 1990). A maioria dessas macromoléculas de superfície é fixada à membrana plasmática através de âncora GPI (Ferguson, 1999), o que também parece ser verdade para algumas isoformas homólogas a CPB, como demonstrado nesse trabalho através de ensaios *in silico* de predição da presença de âncora GPI e nos ensaios de citometria. Nesse caso, o tratamento de promastigotas com PLC afeta o reconhecimento (31%) do antisoro anti-CPB. O que foi confirmado, uma vez que a PLC atuou na perda da estabilidade do ancoramento à membrana das proteínas de 63 kDa e 43 kDa. Estes polipeptídeos estáveis em solução aquosa expõem o epítipo inositol 1,2 monofosfato, que foram revelados com os antisoros anti-CPB e anti-CRD, respectivamente.



Um dado interessante obtido neste estudo foi a detecção de um polipeptídeo de 120 kDa que também mostrou-se estável em solução aquosa após tratamento com PLC, sendo reconhecido apenas pelo antisoro anti-CRD. Este achado é indicativo que este polipeptídeo também está ancorado por GPI a superfície da membrana celular dos promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Até o momento, as fosfatases ácidas são as proteínas de superfície celular de *Leishmania* spp que apresentam massa molecular de 120 kDa (Shakarian & Dwyer, 2000). No entanto, nenhuma correlação pode ser feita entre as fosfatases ácidas e os nossos dados, sendo necessários estudos futuros para maiores informações sobre este polipeptídeo.

Os nossos dados de ancoramento das bandas de 63 kDa e 43 kDa foram confirmados pelos ensaios de *lipid rafts* solúveis a 37 °C. Esses fornecem evidências preliminares que isoformas de CPB de 63 kDa e 43 kDa podem ser encontradas em regiões de membrana resistentes a detergente (“detergent resistant membrane”- *DRM*), que podem concentrar glicoproteínas GPI-ancoradas (Denny *et al.*, 2001). A propriedade dos *DRMs/lipid rafts* é relacionada também com o comportamento diferencial, quando extraídas com 1% de TX-100, com variação de temperatura. Especificamente, algumas proteínas associadas aos *lipid rafts* são resistentes à extração a 4°C, porém são eficientemente solubilizadas em altas temperaturas (Brown & Rose, 1992). Geralmente, proteínas associadas às membranas apresentam âncoras com cadeias aciladas saturadas, sendo também GPI ancoradas ou modificadas com ácidos graxos mirísticos e ou palmíticos, como a gp63 GPI ancoradas e LPG segregadas em *DRMs* de *Leishmania* (Denny *et al.*, 2001). Assim, provavelmente algumas das isoformas das proteínas homólogas a CPB de 63 kDa e 43 kDa podem ter a estrutura molecular de ancoramento semelhante a gp63 e a LPG de *Leishmania*.

O conjunto de resultados apresentados é indicativo da localização de proteínas homólogas a CPB na superfície do parasita e sugere que isoformas destas proteínas são covalentemente ligadas a lipídios de membrana, gerando domínios alternativos de membrana para ancoramento dessas proteínas no parasita, como ocorre em eucariotos (Lalanne *et al.*, 2004). As implicações da presença dos *lipid rafts* CPB-GPI ancoradas à superfície da *L. (V.) braziliensis*, podem estar relacionadas com micro-domínios na membrana plasmática envolvidos no sítio de adesão e reconhecimento, sinal de transdução (Denny *et al.*, 2001) e ainda podem funcionar no tráfico através das vias endocíticas e secretórias (Brown & London, 1998).

Uma vez confirmado que proteínas homólogas a CPB estão presentes na superfície celular dos promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, a continuidade deste estudo foi investigar a estabilidade da expressão destas proteínas na superfície celular do protozoário. Interessantemente, os

experimentos de citometria de fluxo conduzidos com promastigotas pré-fixadas indicaram um decréscimo da intensidade de fluorescência ( $\approx 2,4X$ ) nas preparações de parasitas de quarta passagem. De uma maneira geral, os componentes de superfície de *Leishmania* spp relacionados com a virulência têm a expressão diminuída, ou estrutura molecular modificada, quando os parasitas são mantidos em cultivo *in vitro* (Ramamoorthy *et al.*, 1992; Turco & Descoteaux, 1992). Como as CPBs também são fatores de virulência diretamente relacionados com a adaptação da *Leishmania* spp no hospedeiro vertebrado, seja na modulação da resposta imune celular (Alves *et al.*, 2004) ou ainda na sobrevivência do protozoário nos macrófagos (Mottram *et al.*, 2004; Mundodi *et al.*, 2005), é possível que na manutenção dos promastigotas *in vitro* ocorra uma diminuição da expressão das proteínas homólogas a CPB de superfície celular deste parasita.

As sucessivas passagens em cultura dos promastigotas de *L.(V).braziliensis* parece influenciar na atividade enzimática de CPs, similar ao fenômeno de decaimento do reconhecimento imunológico das proteínas homólogas a CPB na superfície do parasita. O que foi constatado com a diminuição da taxa de hidrólise do substrato pEFLpNan pelas preparações de proteínas de promastigotas das três passagens sucessivas: primeira, quarta e sétima. Assim, a quantificação da atividade enzimática em diferentes passagens de promastigotas também indicou que estas enzimas estão sendo diferentemente expressas.

Um fato curioso observado nesta etapa do estudo foi a queda da eficiência inibitória de E-64 sobre a atividade total de CPs nas preparações de proteínas obtidas da quarta (54%) e sétima (52%) passagens dos promastigotas, quando comparado com as preparações de primeira passagem (96%). Este achado pode significar que as proteases expressas pelos promastigotas ao longo das passagens sucessivas não são totalmente semelhantes sob o ponto de vista dos mecanismos catalíticos. Um passo fundamental à compreensão deste fenômeno seria proposição de um estudo com um painel de substratos e inibidores de CPs, o que nos permitiria entender que tipo de CPs são expressas quando este parasita é submetido a diferentes passagens em cultivo. Este é um problema biológico muito complexo de se estudar em preparações com misturas de proteínas devido a dificuldade de se controlar a quantidade das enzimas nas preparações, o que foi o caso das nossas análises.

As 87 famílias de cisteína-proteinases descritas são organizadas com base na composição de aminoácidos e na composição do centro catalítico destas enzimas (<http://merops.sanger.ac.uk/>), significando uma micro-heterogenidade que determina a preferência de catálise das ligações peptídicas, e, por conseguinte da ação de inibidores sobre os diferentes membros das famílias. Neste contexto, sabe-se que o E-64 - uma molécula orgânica relativamente simples - é um

inibidor irreversível específico de diversas CPs como a 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 falcipaina 1 (Goh, 2005), respectivamente. Assim, é possível que CPs diferentes dessas passem a ser expressas quando os promastigotas são submetidos a cultivos sucessivos.

Ainda que os estudos de reconhecimento imunológico e de atividade enzimática propostos neste trabalho sejam esclarecedores de que as CPs estão presentes e ativas em *L.(V).braziliensis*, estes dados foram corroborados com a constatação de que os genes *cpb* estão sendo transcritos nestes parasitas. Este fato foi comprovado com os ensaios de detecção de transcritos de *cpb* em preparações de RNA total dos promastigotas após passagens em cultivo. O sequenciamento dos cDNAs de *cpb* de *L. (V.) braziliensis* obtidos pela RT-PCR convencional após primeira, quarta e sétima passagens em cultivo revelou uma identidade de 86% com *cps* de outras espécies de *Leishmania* e 98% de homologia com *cpb* de *L. (V.) braziliensis*. As análises de comparação de seqüências foram feitas através do algoritmo *BLAST*.

Neste estudo de quantificação de transcritos do gene de *cpb*, o gene normalizador selecionado foi importante. A seleção de um gene endógeno controle implica em uma avaliação cuidadosa da expressão do mesmo em relação ao tipo de célula e à situação experimental sobre a qual vai ser realizada a investigação (Thellin *et al.*, 1999). Sendo assim, investigamos a expressão de alfa-tubulina, como gene controle interno (constitutivo) para estudos de expressão gênica em promastigotas de *L.(V).braziliensis* pelo método RT-PCR quantitativo. A análise da expressão diferencial do gene *cpb* pôde ser comparada com os resultados obtidos pelo gene constitutivo.

Nos estudos de detecção de transcritos de *cpb* foi detectado o aumento do nível da expressão relativa deste gene, ao longo das sucessivas passagens em cultura. Uma possível explicação para este fato seria a existência de múltiplos genes *cpb*. Em *L. (V.) braziliensis* são descritos somente três cópias do gene *cpb*, cujas funções biológicas ainda não são conhecidas ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)). Isso sugere que as isoformas de CPB individualmente possuem papéis distintos na interação parasita-hospedeiro. Provavelmente, o constante cultivo *in vitro* dos promastigotas seja favorável à indução da expressão dos genes *cpb*, essencial a esta condição do parasita. Como os iniciadores foram projetados para detectar uma região comum aos genes *cpb*, não foi possível inferir quais das três cópias deste gene estavam com sua expressão aumentada. De qualquer forma é possível sugerir que as isoformas de CPB individualmente exerçam papéis distintos ao longo do ciclo de vida deste protozoário, sendo alguns genes *cpb* sintetizados em circunstâncias especiais - apenas quando necessários. Este tipo de expressão regulada é um fato

notório para outros genes de *Leishmania* spp (Folgueira & Requena, 2007; Omara-Opyene & Gedamu, 1997; Somanna *et al.*, 2002).

Adicionalmente, em tripanossomatídeos os genes codificadores de proteínas estão organizados em *tandem* separados por regiões intergênicas curtas, e são transcritos em longas subunidades policistrônicas (Johnson *et al.*, 1987). Dessa forma, é possível que a quantidade de transcritos de *cpb* vista nas preparações de RNA total dos promastigotas nas diferentes passagens não reflita a quantidade real de CPB presente em *L. (V.) braziliensis* (McNicoll *et al.*, 2006). Os tripanossomatídeos possuem regulação gênica principalmente, se não exclusivamente no nível pós-transcricional, e dessa forma é de extrema importância o estudo do processamento de RNA nestes organismos (Horn, 2008). Em contrapartida, nossos resultados mostraram que ocorre também uma regulação pós-traducional, já que houve um aumento na expressão de produtos traduzidos ao longo das passagens. As unidades de RNA policistrônicas são processadas através de reações de *trans-splicing* e poliadenilação para dar origem aos RNAs mensageiros maduros monocistrônicos. O *trans-splicing* é uma reação de processamento de RNA na qual seqüências de duas moléculas separadas são associadas para formar um mRNA maduro. Assim os genes *cpb* originados de uma mesma unidade transcricional podem mostrar grandes diferenças no padrão de expressão da CPB, como descritos para outros genes desta família de parasitas (Pays & Nolan, 1998).

Embora esses parasitas tenham distribuição em vários países do continente Sul Americano, fundamentalmente circulam entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. Dessa maneira, a exposição do parasita a diferentes ambientes em condições adversas (trato digestório inseto vetor e fora e dentro das células do hospedeiro mamífero) influencia a expressão de proteínas específicas que auxiliam a sua sobrevivência na nova condição a qual é submetido (Smith *et al.*, 2007). Desta forma é válido pensar que CPB de membrana estariam envolvidas no início da dinâmica de interação que se estabelece entre a *L. (V.) braziliensis* e os seus hospedeiros, o que pode ter contribuído com o sucesso adaptativo deste parasita. Estamos certos que o nosso esforço em evidenciar CPB de *L. (V.) braziliensis* possa contribuir no entendimento das interações finas e vitais que se estabelecem entre este parasita e os seus hospedeiros e com isso sugerir novas alvos para controle da doença em nossas áreas endêmicas.

## 7- Conclusões

- Com o desenho experimental proposto foi possível isolar uma fração enriquecida de cisteína-proteinases der membrana contendo resíduos de manose de promastigotas de uma cepa infectiva de *L. (V.) braziliensis*.
- Os ensaios bioquímicos propostos indicaram que as proteínas majoritárias de 63 kDa e 43kDa com resíduos de manose estão presentes neste parasita, e ambas possuem potencial de catálise sobre o substrato complexo (gelatina) e um sintético (pEFLpNan) em pH neutro. Estas enzimas mostraram-se sensíveis a presença do inibidor específico para cisteína-proteinase, E-64.
- O antisoro anti-CPB mostrou ser uma ferramenta útil para identificação de cisteína-proteinases B nas formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Estas enzimas são homólogas a cisteína-proteinases B de *L. (L.) mexicana*, o que indica que ambas podem partilhar algumas propriedades estruturais.
- A localização das proteínas homólogas a cisteína-proteinase B de *L. (V.) braziliensis* não é homogênea. Estas proteínas são expressas na superfície celular e em organelas intracelulares do promastigota.
- O conjunto de dados obtidos até o momento sugere que algumas isoformas de proteínas homólogas a CPBs podem ser ancoradas por GPI à lipídios resistentes a extração com detergente.
- Atividade enzimática de cisteína-proteinase total parece estar diminuída quando o protozoário é submetido a cultivos *in vitro* sucessivos.
- A quantidade de transcritos do gene *cpb* aumenta quando o parasita é submetido a cultivos sucessivos.

## 8 - Referências Bibliográficas

- Alexander, J., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 1998, *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *Journal of Immunology* 161, 6794-6801.
- Alexander, J., Satoskar, A.R., Russell, D.G., 1999, *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science* 112 Pt 18, 2993-3002.
- Alves, C.R., Corte-Real, S., Bourguignon, S.C., Chaves, C.S., Saraiva, E.M., 2005, *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. *Experimental Parasitology* 109, 38-48.
- Alves, C.R., Corte-Real, S., De-Freitas Rosa, M., Giovanni-De-Simone, S., 2000, Detection of cysteine-proteinases in *Leishmania amazonensis* promastigotes using a cross-reactive antiserum. *FEMS Microbiology Letters* 186, 263-267.
- Alves, C.R., Marzochi, M.C., Giovanni-de-Simone, S., 1993, Heterogeneity of cysteine proteinases in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major*. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research* 26, 167-171.
- Alves, J.L., Mendonca-Lima, F.W., Alves, C.R., 2004, The use of metal chelate affinity chromatography on the isolation of *Leishmania chagasi* promastigote hydrophobic proteinases. *Veterinary Parasitology* 119, 137-145.
- Ameen, M., 2007, Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 8, 2689-2699.
- Amela, C., Lopez-Gay, D., Alberdi, J.C., Castilla, J., 1996, Injecting drug use as risk factor for visceral leishmaniasis in AIDS patients. *European Journal of Epidemiology* 12, 91-92.
- Arevalo, J., Ramirez, L., Adui, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verastegui, C., Lazo, M., Loayza-Muro, R., De Doncker, S., Maurer, A., Chappuis, F., Dujardin, J.C., Llanos-Cuentas, A., 2007, Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 195, 1846-1851.
- Ashford, R.W., 2000, The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology* 30, 1269-1281.
- Ashutosh, Sundar, S., Goyal, N., 2007, Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *Journal of Medical Microbiology* 56, 143-153.
- Azeredo-Coutinho, R.B., Conceicao-Silva, F., Schubach, A., Cupolillo, E., Quintella, L.P., Madeira, M.F., Pacheco, R.S., Valette-Rosalino, C.M., Mendonca, S.C., 2007, First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101, 735-737.
- Barbosa, A.F., Oliveira, S.M., Bertho, A.L., Franco, A.M., Rangel, E.F., 2006, Single and concomitant experimental infections by *Endotrypanum* spp. and *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the neotropical sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 851-856.

- Barral A, P.-S.D., Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM, et al, 1991, Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 44, 536-546.
- Barrett, A.J., 1994, Classification of peptidases. Methods in Enzymology 244, 1-15.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., O'Brien, E.A., 2001, The MEROPS database as a protease information system. Journal of Structural Biology 134, 95-102.
- Barrett, A.J., Tolle, D.P., Rawlings, N.D., 2003, Managing peptidases in the genomic era. Biological Chemistry 384, 873-882.
- Barrett, A.R., ND; Woessner, JF, 2004, The Handbook of Proteolytic Enzymes, Vol 2. Academic Press.
- Basano, S.A.C., L.M.A., 2004, Leishmaniose tegumentar americana. Revista Brasileira de Epidemiologia, 7, 328-337.
- Bates, P.A., 1993, Axenic culture of *Leishmania* amastigotes. Parasitology Today 9, 143-146.
- Bates, P.A., Rogers, M.E., 2004, New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. Current Molecular Medicine 4, 601-609.
- Berens, R.L., Marr, J.J., 1979, Growth of *Leishmania donovani* amastigotes in a continuous macrophage-like cell culture. The Journal of Protozoology 26, 453-456.
- Berman, J.D., 1996, Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniases. Clinical Dermatology 14, 519-522.
- Berti, P.J., Storer, A.C., 1995, Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. Journal of Molecular Biology 246, 273-283.
- Beynon, R.J., Bond, J.S., 2001, Proteolytic Enzymes - Practical Approach. , Second Edition. Oxford Press, England, 340 p.
- Bond, J.S., Butler, P.E., 1987, Endopeptidase-24.5 is not a metallo-endopeptidase. Biochemistry Journal 246, 559.
- Bordier, C., 1981, Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. The Journal of Biological Chemistry 256, 1604-1607.
- Bouvier, J., Bordier, C., Vogel, H., Reichelt, R., Etges, R., 1989, Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase. Molecular and Biochemical Parasitology 37, 235-245.
- Bouvier, J., Etges, R.J., Bordier, C., 1985, Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. The Journal of Biological Chemistry 260, 15504-15509.
- Bouvier, J., Schneider, P., Etges, R., 1995, Leishmanolysin: surface metalloproteinase of *Leishmania*. Methods in Enzymology 248, 614-633.
- Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R., McGwire, B.S., Chang, K.P., Mosser, D.M., 1995, Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. Journal of Immunology 155, 3102-3111.
- Brooks, D.R., Tetley, L., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 2000, Processing and trafficking of cysteine proteases in *Leishmania mexicana*. Journal of Cell Science 113 ( Pt 22), 4035-4041.

- Brown, D.A., London, E., 1998, Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 14, 111-136.
- Brown, D.A., Rose, J.K., 1992, Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533-544.
- Camargo, L.B., MA., 2003, Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. *Ciência e Cultura* 1, 34-37.
- Carvalho, E.M., Correia Filho, D., Bacellar, O., Almeida, R.P., Lessa, H., Rocha, H., 1995, Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53, 273-277.
- Chagas, A.C.P., Felipe Arley Costa; Medeiros, Jansen Fernandes; de Py-Daniel Victor, Mesquita Éder C.; Balestrassi Dulcevir Antônio, 2006, Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 9, 186-192.
- Chang, S., Puryear, J., and Cairney, J., 1993, A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees *Plant Molecular Biology Reporter* 11, 113-116.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., Boelaert, M., 2007, Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews* 5, 873-882.
- Chaves, C.S., Soares, D.C., Da Silva, R.P., Saraiva, E.M., 2003, Characterization of the species- and stage-specificity of two monoclonal antibodies against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology* 103, 152-159.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.
- Cohen, C., Corazza, F., De Mol, P., Brasseur, D., 1991, Leishmaniasis acquired in Belgium. *Lancet* 338, 128.
- Convit, J., Kerdel-Vegas, F., 1965, Disseminated Cutaneous Leishmaniasis; Inoculation to Laboratory Animals, Electron Microscopy and Fluorescent Antibodies Studies. *Archives of Dermatology* 91, 439-447.
- Coombs, G.H., 1982, Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. *Parasitology* 84, 149-155.
- Correa, J.R., Brazil, R.P., Soares, M.J., 2005, *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus-a mini review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 587-592.
- Corte-Real, S., Porrozi, R., de Nazareth M, de Meirelles L (1993). Immunogold labeling and cerium cytochemistry of the enzyme ecto 5'-nucleotidase in promastigote forms of *Leishmania* species. *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz* 88(3)407-12.
- Costa, J.M., Saldanha, A.C., de Melo e Silva, A.C., Serra Neto, A., Galvao, C.E., Pedroso e Silva Cde, M., da Silva, A.R., 1992, The current status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhão. II. The epidemiological and clinico-evolutionary aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25, 115-123.
- Coutinho, S.G., Oliveira, M.P., Da-Cruz, A.M., De Luca, P.M., Mendonca, S.C., Bertho, A.L., Soong, L., McMahon-Pratt, D., 1996, T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania*



- braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Experimental Parasitology* 84, 144-155.
- Croft, S.L., Sundar, S., Fairlamb, A.H., 2006, Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 111-126.
- Cuervo, P., Saboia-Vahia, L., Costa Silva-Filho, F., Fernandes, O., Cupolillo, E., JB, D.E.J., 2006, A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Parasitology* 132, 177-185.
- Cunningham, A.C., 2002, Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology* 72, 132-141.
- Cupolillo, E., Aguiar Alves, F., Brahim, L.R., Naiff, M.F., Pereira, L.O., Oliveira-Neto, M.P., Falqueto, A., Grimaldi, G., Jr., 2001, Recent advances in the taxonomy of the New World leishmanial parasites. *Medical Microbiology Immunology* 190, 57-60.
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H., Grimaldi, G., Jr., 2000, A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today* 16, 142-144.
- Cupolillo, E., Momen, H., Grimaldi, G., Jr., 1998, Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 663-668.
- Cysne-Finkelstein, L., Temporal, R.M., Alves, F.A., Leon, L.L., 1998, *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Experimental Parasitology* 89, 58-62.
- Da-Cruz, A.M., Azevedo-Coutinho, K.B., 2001, Leishmaniose Tegumentar Americana, In: Batista, L.M., Igreja, R.P., Gomes, A.C., Huggins, D.W. (Eds.) *Medicina Tropical - Abordagem atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Cultura Médica, Rio de Janeiro, pp. 131-140.
- Da-Cruz, A.M.A.-C., K.B., 2001, Leishmaniose Tegumentar Americana, In: Batista, L.M., Igreja, R.P., Gomes, A.C., Huggins, D.W. (Ed.) *Abordagem atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Cultura Médica, Rio de Janeiro, pp. 131-140.
- da Silva-Lopez, R.E., Giovanni-De-Simone, S., 2004, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: purification and characterization of a promastigote serine protease. *Experimental Parasitology* 107, 173-182.
- da Silva Lopez, R.E., De Simone, S.G., 2004, A serine protease from a detergent-soluble extract of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Zeitschrift fur Naturforschung* 59, 590-598.
- Dantas-Torres, F., 2006, *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 117-118; discussion 118.
- de Almeida, M.C., Vilhena, V., Barral, A., Barral-Netto, M., 2003, Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 861-870.
- de Araujo Soares, R.M., dos Santos, A.L., Bonaldo, M.C., de Andrade, A.F., Alviano, C.S., Angluster, J., Goldenberg, S., 2003, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. *Experimental Parasitology* 104, 104-112.
- de Pita-Pereira, D., Alves, C.R., Souza, M.B., Brazil, R.P., Bertho, A.L., de Figueiredo Barbosa, A., Britto, C.C., 2005, Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed

- by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene 99, 905-913.
- Deane, L.M., 1961, Reservoirs of *Leishmania donovani* in Brazil. Revista da Associação de Medicina Brasileira 7, 161-169.
- Deane, L.M., Deane, M.P., 1954, Dogs naturally infected by *Leishmania donovani* in Ceara. Hospital (Rio de Janeiro) 45, 703-707.
- Denise, H., McNeil, K., Brooks, D.R., Alexander, J., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 2003, Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence *in vivo*. Infection and Immunity 71, 3190-3195.
- Denny, P.W., Field, M.C., Smith, D.F., 2001, GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. FEBS Letters 491, 148-153.
- Deps, P.D., Viana, M.C., Falqueto, A., Dietze, R., 2000, Comparative assessment of the efficacy and toxicity of N-methyl-glucamine and BP88 sodium stibogluconate in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 33, 535-543.
- Desai, P.V., Patny, A., Sabnis, Y., Tekwani, B., Gut, J., Rosenthal, P., Srivastava, A., Avery, M., 2004, Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors using virtual screening. 1. The ChemBridge database. Journal of Medicinal Chemistry 47, 6609-6615.
- Desjeux, P., 2004, Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 27, 305-318.
- Dey, A., Singh, S., 2006, Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. Indian Journal of Medical Microbiology 24, 165-170.
- Dominguez, M., Torano, A., 2001, *Leishmania* immune adherence reaction in vertebrates. Parasite Immunology 23, 259-265.
- Duboise, S.M., Vannier-Santos, M.A., Costa-Pinto, D., Rivas, L., Pan, A.A., Traub-Cseko, Y., De Souza, W., McMahon-Pratt, D., 1994, The biosynthesis, processing, and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinases. Molecular and Biochemical Parasitology 68, 119-132.
- Dzandu, J.K., Johnson, J.F., Wise, G.E., 1988, Sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis: staining of polypeptides using heavy metal salts. Analytical Biochemistry 174, 157-167.
- Eakin, A.E., Mills, A.A., Harth, G., McKerrow, J.H., Craik, C.S., 1992, The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. The Journal of Biological Chemistry 267, 7411-7420.
- Ferguson, M.A., 1999, The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. Journal of Cell Science 112 ( Pt 17), 2799-2809.
- Filippova, I., Lysogorskaya, E.N., Oksenoit, E.S., Rudenskaya, G.N., Stepanov, V.M., 1984, L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide-a chromogenic substrate for thiol proteinase assay. Analytical Biochemistry 143, 293-297.
- Folgueira, C., Requena, J.M., 2007, A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. FEMS Microbiology Reviews 31, 359-377.

- Frame, M.J., Mottram, J.C., Coombs, G.H., 2000, Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. *Parasitology* 121 ( Pt 4), 367-377.
- Frommel, T.O., Button, L.L., Fujikura, Y., McMaster, W.R., 1990, The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 38, 25-32.
- Gahmberg, C.G., Tolvanen, M., 1996, Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochemistry Science* 21, 308-311.
- Goh, S.L., Goh, L.L., Sim, T.S., 2005, Cysteine protease falcipain 1 in *Plasmodium falciparum* in biochemically distinct from its isozymes. *Parasitology Research* 97:295-301.
- Goncalves, A.M., Nehme, N.S., Morel, C.M., 1990, An improved silver staining procedure for schizodeme analysis in polyacrylamide gradient gels. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 85, 101-106.
- Gontijo, B., de Carvalho Mde, L., 2003, American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36, 71-80.
- Guedes, H.L., Rezende, J.M., Fonseca, M.A., Salles, C.M., Rossi-Bergmann, B., De-Simone, S.G., 2007, Identification of serine proteases from *Leishmania braziliensis*. *Zeitschrift fur Naturforschung* 62, 373-381.
- Guerra, J.A., Ribeiro, J.A., Coelho, L.I., Barbosa, M.G., Paes, M.G., 2006, Epidemiology of tegumentary leishmaniasis in Sao Joao, Manaus, Amazonas, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública / Ministerio da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública* 22, 2319-2327.
- Handman, E., Goding, J.W., 1985, The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *The EMBO Journal* 4, 329-336.
- Handman, E., Greenblatt, C.L., Goding, J.W., 1984, An amphipathic sulphated glycoconjugate of *Leishmania*: characterization with monoclonal antibodies. *The EMBO Journal* 3, 2301-2306.
- Hanekamp, T., Langer, P.J., 1991, Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding two major surface glycoproteins, gp63 and gp46/M2, hsp70, and beta-tubulin in cloned strains of several *Leishmania* species. *Molecular Biochemistry Parasitology* 48, 27-37.
- Hellman, U., Wernstedt, C., Cazzulo, J.J., 1991, Self-proteolysis of the cysteine proteinase, cruzipain, from *Trypanosoma cruzi* gives a major fragment corresponding to its carboxy-terminal domain. *Molecular and Biochemical Parasitology* 44, 15-21.
- Herwaldt, B.L., 1999, Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.
- Harrach, T., Eckert, K., Maurer, HR., Machleidt, I., Machleidt, W., Nuck, R., 1998. Isolation and characterization of two forms of an acidic bromelain stem proteinase. *Journal of Protein Chemistry* 17(4):351-361.
- Heussen, C., Dowdle, E.B., 1980, Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry* 102, 196-202.
- Hide, M., Bras-Goncalves, R., Banuls, A.L., 2007, Specific cpb copies within the *Leishmania donovani* complex: evolutionary interpretations and potential clinical implications in humans. *Parasitology* 134, 379-389.

- Horn, D., 2008, Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids. *BMC Genomics* 9, 2.
- Huete-Perez, J.A., Engel, J.C., Brinen, L.S., Mottram, J.C., McKerrow, J.H., 1999, Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein motif. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 16249-16256.
- Ilg, T., 2000, Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitology Today* 16, 489-497.
- Ilg, T., Craik, D., Currie, G., Multhaup, G., Bacic, A., 1998, Stage-specific proteophosphoglycan from *Leishmania mexicana* amastigotes. Structural characterization of novel mono-, di-, and triphosphorylated phosphodiester-linked oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* 273, 13509-13523.
- Ilg, T., Etges, R., Overath, P., McConville, M.J., Thomas-Oates, J., Thomas, J., Homans, S.W., Ferguson, M.A., 1992, Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. *Journal of Biological Chemistry* 267, 6834-6840.
- Ilg, T., Fuchs, M., Gnau, V., Wolfram, M., Harbecke, D., Overath, P., 1994, Distribution of parasite cysteine proteinases in lesions of mice infected with *Leishmania mexicana* amastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 67, 193-203.
- Ilg, T., Handman, E., Stierhof, Y.D., 1999a, Proteophosphoglycans from *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Biochemical Society Transactions* 27, 518-525.
- Ilg, T., Montgomery, J., Stierhof, Y.D., Handman, E., 1999b, Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania major* gene, ppg1, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. *Journal of Biological Chemistry* 274, 31410-31420.
- Ilgoutz, S.C., McConville, M.J., 2001, Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *International Journal of Parasitology* 31, 899-908.
- Jaffe, C., Grimaldi, Jr., G; McMahon-Pratt, D., 1984, The cultivation and cloning of *Leishmania*. In: *Genes and Antigens of Parasites: A laboratory Manual* (second edition). Morel, C.M. ed, Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro, 47-91 pp.
- Jaffe, C.L., Dwyer, D.M., 2003, Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. *Parasitology Research* 91, 229-237.
- Johnson, P.J., Kooter, J.M., Borst, P., 1987, Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell* 51, 273-281.
- Kahl, L.P., McMahon-Pratt, D., 1987, Structural and antigenic characterization of a species- and promastigote-specific *Leishmania mexicana amazonensis* membrane protein. *Journal of Immunology* 138, 1587-1595.
- Kamhawi, S., 2006, *Phlebotomine* sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology* 22, 439-445.
- Killick-Kendrick, R., 1999, The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinical Dermatology* 17, 279-289.
- Klemba, M., Goldberg, D.E., 2002, Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annual Reviews of Biochemistry* 71, 275-305.

- Kotera, M., Okuno, Y., Hattori, M., Goto, S., Kanehisa, M., 2004, Computational assignment of the EC numbers for genomic-scale analysis of enzymatic reactions. *Journal of the American Chemical Society* 126, 16487-16498.
- Kweider, M., Lemesre, J.L., Santoro, F., Kusnierz, J.P., Sadigursky, M., Capron, A., 1989, Development of metacyclic *Leishmania* promastigotes is associated with the increasing expression of GP65, the major surface antigen. *Parasite Immunology* 11, 197-209.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lainson, R., & Shaw, J.J., 1972, Leishmaniasis of New World: taxonomic problems. *British Medical Bulletin* 28, 44-48.
- Lainson, R., & Shaw, J.J., 1987a, Evolution, classification and geographical distribution, In: Peters W. & Killick-Kendrick R., e. (Ed.) *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press, London, pp. 1-119.
- Lainson, R., Rangel, E.F., 2005, *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 811-827.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Silveira, F.T., Braga, R.R., 1987, American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Transactions Royal of the Society of Tropical Medicine Hygiene* 81, 517.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Souza, A.A., Silveira, F.T., Falqueto, A., 1992, Further observations on *Lutzomyia ubiquitalis* (Psychodidae: Phlebotominae), the sandfly vector of *Leishmania (Viannia) lainsoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 87, 437-439.
- Lainson, R.S., JJ, 1987c, Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Peters W. and Killinfrick-Kendrick R., eds., London, p. 120.
- Lalanne, E., Honys, D., Johnson, A., Borner, G.H., Lilley, K.S., Dupree, P., Grossniklaus, U., Twell, D., 2004, SETH1 and SETH2, two components of the glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthetic pathway, are required for pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 229-240.
- Lawyer, P.G., Ngumbi, P.M., Anjili, C.O., Odongo, S.O., Mebrahtu, Y.B., Githure, J.I., Koech, D.K., Roberts, C.R., 1990, Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43, 31-43.
- Lecaille, F., Kaleta, J., Bromme, D., 2002, Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chemical Reviews* 102, 4459-4488.
- Leon, L.L., Temporal, R.M., Soares, M.J., Grimaldi Junior, G., 1994, Proteinase activities during temperature-induced stage differentiation of species complexes of *Leishmania*. *Acta Tropica* 56, 289-298.
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honingberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, E.C., Poljankys, G., Sprague, V., Vávra, J., Wallace, A.R., 1980, A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology* 27, 37-58.

- Lindenberg, A., 1909, L'ulcère de Bauru ou le bouton d'Orient au Brésil. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 2, 252-254.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods (San Diego, 402-408.
- Livio, M., Villa, S., de Gaetano, G., 1978, Aspirin, thromboxane, and prostacyclin in rats: A dilemma resolved? Lancet 1, 1307.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry 193, 265-275.
- Lukes, J., Mauricio, I.L., Schonian, G., Dujardin, J.C., Soteriadou, K., Dedet, J.P., Kuhls, K., Tintaya, K.W., Jirku, M., Chocholova, E., Haralambous, C., Pratlong, F., Obornik, M., Horak, A., Ayala, F.J., Miles, M.A., 2007, Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 9375-9380.
- Luz, K.G., da Silva, V.O., Gomes, E.M., Machado, F.C., Araujo, M.A., Fonseca, H.E., Freire, T.C., d'Almeida, J.B., Palatnik, M., Palatnik-de Sousa, C.B., 1997, Prevalence of anti-*Leishmania donovani* antibody among Brazilian blood donors and multiply transfused hemodialysis patients. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 57, 168-171.
- Maher, P.A., Singer, S.J., 1985, Anomalous interaction of the acetylcholine receptor protein with the nonionic detergent Triton X-114. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 82, 958-962.
- Mahmoudzadeh-Niknam, H., McKerrow, J.H., 2004, *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. Experimental Parasitology 106, 158-163.
- Mahoney, A.B., Sacks, D.L., Saraiva, E., Modi, G., Turco, S.J., 1999, Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. Biochemistry 38, 9813-9823.
- Marsden, P.D., 1984, Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. XIV. Leishmaniasis. Reviews of Infective Diseases 6, 736-744.
- Marsden, P.D., 1986, Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 80, 859-876.
- Marsden, P.D., Nonata, R.R., 1975, Mucocutaneous leishmaniasis - A review of clinical aspects. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 9, 309-326.
- Marzochi, M.C., 1992, Leishmaniose no Brasil. Jornal Brasileiro de Medicina 63, 82-104.
- Marzochi, M.C., Coutinho, S.G., Sabroza, P.C., de Souza, W.J., 1980, Indirect immunofluorescence reaction and intradermoreaction for American cutaneous leishmaniasis in residents of the Jacarepaguá region (Rio de Janeiro). Comparative study of results observed in 1974 and 1978. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 22, 149-155.
- Marzochi, M. C. A., Coutinho, S. G., Souza, W. J., Amendoeira, M.R., 1981, Leishmaniose Visceral ( Calazar). Jornal Brasileiro de Medicina. 41 (5): 61-84.
- Mauricio, I.L., Stothard, J. R. & Miles, M. A., 2000, The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitology Today 16, 188-189.

- McConville, M.J., Blackwell, J.M., 1991, Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *The Journal of Biological Chemistry* 266, 15170-15179.
- McConville, M.J., Collidge, T.A., Ferguson, M.A., Schneider, P., 1993, The glycoinositol phospholipids of *Leishmania mexicana* promastigotes. Evidence for the presence of three distinct pathways of glycolipid biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 15595-15604.
- McConville, M.J., Ilgoutz, S.C., Teasdale, R.D., Foth, B.J., Matthews, A., Mullin, K.A., Gleeson, P.A., 2002, Targeting of the GRIP domain to the trans-Golgi network is conserved from protists to animals. *European Journal of Cell Biology* 81, 485-495.
- McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A., Sacks, D.L., 1992, Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *Embo J* 11, 3593-3600.
- McGwire, B.S., O'Connell, W.A., Chang, K.P., Engman, D.M., 2002, Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 8802-8809.
- McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., Sajid, M., 2006, Proteases in parasitic diseases. *Annual Review of Pathology* 1, 497-536.
- McKerrow, J.H., Sun, E., Rosenthal, P.J., Bouvier, J., 1993, The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annual Reviews of Microbiology* 47, 821-853.
- McMahon-Pratt, D., Traub-Cseko, Y., Lohman, K.L., Rogers, D.D., Beverley, S.M., 1992, Loss of the GP46/M-2 surface membrane glycoprotein gene family in the *Leishmania braziliensis* complex. *Molecular Biochemistry Parasitology* 50, 151-160.
- McNicoll, F., Drummelsmith, J., Muller, M., Madore, E., Boilard, N., Ouellette, M., Papadopoulou, B., 2006, A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics* 6, 3567-3581.
- Meinecke, C.K., Schottelius, J., Oskam, L., Fleischer, B., 1999, Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala-azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics* 104, e 65.
- Michaud, D., 1998, Gel electrophoresis of proteolytic enzymes. *Analytica Chimica Acta* 372, 173-185.
- Migone, L.E., 1913, un caso de Kalazar en Assunción (Paraguay). *Bulletin Societe Pathologic Exotique* 6, 118-120.
- Morgado-Diaz, J.A., Silva-Lopez, R.E., Alves, C.R., Soares, M.J., Corte-Real, S., De Simone, S.G., 2005, Subcellular localization of an intracellular serine protease of 68 kDa in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 377-383.
- Mottram, J.C., Brooks, D.R., Coombs, G.H., 1998, Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Current Opinion in Microbiology* 1, 455-460.
- Mottram, J.C., Coombs, G.H., Alexander, J., 2004, Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Current Opinion in Microbiology* 7, 375-381.

- Mottram, J.C., Frame, M.J., Brooks, D.R., Tetley, L., Hutchison, J.E., Souza, A.E., Coombs, G.H., 1997, The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 14285-14293.
- Mottram, J.C., Helms, M.J., Coombs, G.H., Sajid, M., 2003, Clan CD cysteine peptidases of parasitic protozoa. *Trends in Parasitology* 19, 182-187.
- Mottram, J.C., Robertson, C.D., Coombs, G.H., Barry, J.D., 1992, A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Molecular Microbiology* 6, 1925-1932.
- Mottram, J.C., Souza, A.E., Hutchison, J.E., Carter, R., Frame, M.J., Coombs, G.H., 1996, Evidence from disruption of the lncpb gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 6008-6013.
- Mundodi, V., Kucknoor, A.S., Gedamu, L., 2005, Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. *BMC Molecular Biology* 6, 3.
- Mundodi, V., Somanna, A., Farrell, P.J., Gedamu, L., 2002, Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. *Gene* 282, 257-265.
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G., 2005, Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-1577.
- Musa, A.M., Khalil, E.A., Mahgoub, F.A., Elgawi, S.H., Modabber, F., Elkadaru, A.E., Aboud, M.H., Noazin, S., Ghalib, H.W., El-Hassan, A.M., 2007, Immunochemotherapy of persistent post-kala-azar dermal leishmaniasis: a novel approach to treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.
- Muskus, C.E., Marin Villa, M., 2002, Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica* 22, 167-177.
- Naderer, T., Vince, J.E., McConville, M.J., 2004, Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Current Molecular Medicine* 4, 649-665.
- North, M.J., Mottram, J.C., Coombs, G.H., 1990, Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitology Today* 6, 270-275.
- Olivier, M., Gregory, D.J., Forget, G., 2005, Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews* 18, 293-305.
- Omara-Opyene, A.L., Gedamu, L., 1997, Molecular cloning, characterization and overexpression of two distinct cysteine protease cDNAs from *Leishmania donovani chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 90, 247-267.
- Pan, A.A., 1984, *Leishmania mexicana*: serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. *Experimental Parasitology* 58, 72-80.
- Pan, A.A., McMahan-Pratt, D., 1988, Monoclonal antibodies specific for the amastigote stage of *Leishmania pifanoi*. I. Characterization of antigens associated with stage- and species-specific determinants. *Journal of Immunology* 140, 2406-2414.



- Pays, E., Nolan, D.P., 1998, Expression and function of surface proteins in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 91, 3-36.
- Penna, H.A., 1934, Leishmaniose Visceral no Brasil. *Brasil Médico* 18, 940-950.
- Peters, C., Kawakami, M., Kaul, M., Ilg, T., Overath, P., Aebischer, T., 1997a, Secreted proteophosphoglycan of *Leishmania mexicana* amastigotes activates complement by triggering the mannan binding lectin pathway. *European Journal of Immunology* 27, 2666-2672.
- Peters, C., Stierhof, Y.D., Ilg, T., 1997b, Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages. *Infect Immunology* 65, 783-786.
- Pimenta, P.F., Modi, G.B., Pereira, S.T., Shahabuddin, M., Sacks, D.L., 1997, A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115 ( Pt 4), 359-369.
- Pimenta, P.F., Saraiva, E.M., Sacks, D.L., 1991, The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Experimental Parasitology* 72, 191-204.
- Proudfoot, L., O'Donnell, C.A., Liew, F.Y., 1995, Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *European Journal of Immunology* 25, 745-750.
- Pryde, J.G., Phillips, J.H., 1986, Fractionation of membrane proteins by temperature-induced phase separation in Triton X-114. Application to subcellular fractions of the adrenal medulla. *Biochemistry Journal* 233, 525-533.
- Pupkis, M.F., Coombs, G.H., 1984, Purification and characterization of proteolytic enzymes of *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes and promastigotes. *Journal of General Microbiology* 130, 2375-2383.
- Rabello, E., 1925a. Contribuição ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil I. História e sinonímia. In: *Anais Brasileiros de Dermatologia e Sifilografia*, pp. 3-29.
- Rafati, S., Couty-Jouve, S., Alimohammadian, M.H., Louis, J.A., 1997, Biochemical analysis and immunogenicity of *Leishmania major* amastigote fractions in cutaneous leishmaniasis. *Clinical Experimental Immunology* 110, 203-211.
- Ramamoorthy, R., Donelson, J.E., Paetz, K.E., Maybodi, M., Roberts, S.C., Wilson, M.E., 1992, Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes to an infectious form. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 1888-1895.
- Ramesh, V., Mukherjee, A., 1995, Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *International Journal of Dermatology* 34, 85-91.
- Ramesh, V., Singh, R., Salotra, P., 2007, Short communication: Post-kala-azar dermal leishmaniasis - an appraisal. *Tropical Medicine International Health* 12, 848-851.
- Rangel, E.F., Lainson, R., 1988, Ecological interactions in the transmission of the leishmaniasis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 321, 389-404.
- Rangel EF, Lainson R 2003. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In EF Rangel, R Lainson (eds), *Flebotomíneos do Brasil* . Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 291-310.

- Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007, Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 7, 581-596.
- Rivas, L., Kahl, L., Manson, K., McMahon-Pratt, D., 1991, Biochemical characterization of the protective membrane glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 47, 235-243.
- Roberts, R., 2005, Lysosomal cysteine proteases: structure, function and inhibition of cathepsins. *Drug news & perspectives* 18, 605-614.
- Robertson, C.D., Coombs, G.H., 1990, Characterisation of three groups of cysteine proteinases in the amastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 42, 269-276.
- Robertson, C.D., Coombs, G.H., 1993, Cathepsin B-like cysteine proteases of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 62, 271-279.
- Robertson, C.D., Martinez, J., Cazzulo, J.J., Coombs, G.H., 1994, Analysis of the cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma cruzi* using specific antisera. *FEMS Microbiology Letters* 124, 191-194.
- Rodriguez-Bonfante, C., Bonfante-Garrido, R., Grimaldi, G., Jr., Momen, H., Cupolillo, E., 2003, Genotypically distinct *Leishmania colombiensi*s isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. *Infect Genetic Evolution* 3, 119-124.
- Russel, M., 1995, Moving through the membrane with filamentous phages. *Trends Microbiol* 3, 223-228.
- Sacks, D.L., 1989, Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology* 69, 100-103.
- Sacks, D.L., 2001, *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiology* 3, 189-196.
- Sacks, D.L., Modi, G., Rowton, E., Spath, G., Epstein, L., Turco, S.J., Beverley, S.M., 2000, The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. *Proceedings of the National Academic Sciences USA* 97, 406-411.
- Safjanova, V., 1982, Classification of the genus *Leishmania* Ross, In: Academy of Sciences, U.A.U.S.o.P. (Ed.) *The Leishmaniasis*. *Protozoology*, pp. 95-101.
- Sajid, M., McKerrow, J.H., 2002, Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120, 1-21.
- Sakanari, J.A., Nadler, S.A., Chan, V.J., Engel, J.C., Leptak, C., Bouvier, J., 1997, *Leishmania major*: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. *Experimental Parasitology* 85, 63-76.
- Salay, G., Dorta, M.L., Santos, N.M., Mortara, R.A., Brodskyn, C., Oliveira, C.I., Barbieri, C.L., Rodrigues, M.M., 2007, Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clinical Vaccine Immunology* 14, 1173-1181.
- Saliba, E.K., Oumeish, O.Y., 1999, Reservoir hosts of cutaneous leishmaniasis. *Clinical Dermatology* 17, 275-277.
- Santos, R.C., JRCEA, 1994, *Saúde e Povos Indígenas* Ed. FIOCRUZ (Rio de Janeiro), 119-211.

- Saraiva, E.M., Pinto-da-Silva, L.H., Wanderley, J.L., Bonomo, A.C., Barcinski, M.A., Moreira, M.E., 2005, Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. *Experimental Parasitology* 110, 39-47.
- Saravia, N.G., Escorcía, B., Osorio, Y., Valderrama, L., Brooks, D., Arteaga, L., Coombs, G., Mottram, J., Travi, B.L., 2006, Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models. *Vaccine* 24, 4247-4259.
- Schneider, P., Bordier, C., Etges, R., 1992, Membrane proteins and enzymes of *Leishmania*. *Subcellular Biochemistry* 18, 39-72.
- Schubach, A., Marzochi, M.C., Cuzzi-Maya, T., Oliveira, A.V., Araujo, M.L., Oliveira, A.L., Pacheco, R.S., Momen, H., Conceicao-Silva, F., Coutinho, S.G., Marzochi, K.B., 1998, Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58, 824-827.
- Shakarian, A.M., Dwyer, D.M., 2000, Structurally conserved soluble acid phosphatases are synthesized and released by *Leishmania major* promastigotes. *Experimental Parasitology* 95, 79-84.
- Sharief, A.H., Khalil, E.A., Omer, S.A., Abdalla, H.S., 2007, Innovative serum-free medium for *in vitro* cultivation of promastigote forms of *Leishmania* species. *Parasitology International*
- Shaw, J., 1964, A possible vector of *Endotrypanum schaudinni* of the sloth *Choloepus hoffmanni* in Panama. *Nature* 201, 417-418
- Shaw, J., 1992, *Endotrypanum*, a unique intraerythrocytic flagellate of New World tree sloths. An evolutionary link or an evolutionary backwater? *Ciência e Cultura* 44, 107-116.
- Shaw, J., 2007, The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 (5) 541-547.
- Silveira, F.T., Lainson R., Brito A.C., Oliveira M.R.F., Paes MG, Souza, A.A.A., Silva B.M., 1997, Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão RNQ. *Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico*. Belém: Editora CEJUP.
- Silveira, F.T., Ishikawa, E.A., De Souza, A.A., Lainson, R., 2002, An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite (Paris, France)* 9, 43-50.
- Smith, D.F., Peacock, C.S., Cruz, A.K., 2007, Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *International Journal for Parasitology* 37, 1173-1186.
- Soares, R.P., Cardoso, T.L., Barron, T., Araujo, M.S., Pimenta, P.F., Turco, S.J., 2005, *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International Journal for Parasitology* 35, 245-253.
- Soares, R.P., Macedo, M.E., Ropert, C., Gontijo, N.F., Almeida, I.C., Gazzinelli, R.T., Pimenta, P.F., Turco, S.J., 2002, *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Molecular Biochemistry Parasitology* 121, 213-224.

- Somanna, A., Mundodi, V., Gedamu, L., 2002, Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 25305-25312.
- Stierhof, Y.D., Ilg, T., Russell, D.G., Hohenberg, H., Overath, P., 1994, Characterization of polymer release from the flagellar pocket of *Leishmania mexicana* promastigotes. *Journal Cell Biology* 125, 321-331.
- Symmers, W.S., 1960, Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *Lancet* 1, 127-132.
- Symons, F.M., Murray, P.J., Ji, H., Simpson, R.J., Osborn, A.H., Cappai, R., Handman, E., 1994, Characterization of a polymorphic family of integral membrane proteins in promastigotes of different *Leishmania* species. *Molecular and Biochemical Parasitology* 67, 103-113.
- Taussig, S.J., 1980, The mechanism of the physiological action of bromelain. *Medical Hypotheses* 6, 99-104.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Traub-Cseko, Y.M., Duboise, M., Boukai, L.K., McMahon-Pratt, D., 1993, Identification of two distinct cysteine proteinase genes of *Leishmania pifanoi* axenic amastigotes using the polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* 57, 101-115.
- Turco, S.J., Descoteaux, A., 1992, The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annual Reviews of Microbiology* 46, 65-94.
- Turco, S.J., Hull, S.R., Orlandi, P.A., Jr., Shepherd, S.D., Homans, S.W., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., 1987, Structure of the major carbohydrate fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochemistry* 26, 6233-6238.
- Turk, D., Guncar, G., 2003, Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallographica* 59, 203-213.
- Turnock, D.C., Ferguson, M.A., 2007, Sugar nucleotide pools of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. *Eukaryotic cell* 6, 1450-1463.
- Ueda-Nakamura, T., Attias, M., de Souza, W., 2007, Comparative analysis of megasomes in members of the *Leishmania mexicana* complex. *Research Microbiology* 158, 456-462.
- Valdivieso, E., Dagger, F., Rascon, A., 2007, *Leishmania mexicana*: identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. *Experimental Parasitology* 116, 77-82.
- Vianna, G., 1911, Sobre uma espécie de *Leishmania*. *Brasil Médico* 25, 411.
- Walters, L.L., Chaplin, G.L., Modi, G.B., Tesh, R.B., 1989, Ultrastructural biology of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* (*Leishmania braziliensis panamensis*) in *Lutzomyia gomezi* (Diptera: Psychodidae): a natural host-parasite association. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40, 19-39.
- Walters, L.L., Irons, K.P., Modi, G.B., Tesh, R.B., 1992, Refractory barriers in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46, 211-228.

- Warburg, A., Schlein, Y., 1986, The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 35, 926-930.
- Werbovetz, K.A., 2002, Promising therapeutic targets for antileishmanial drugs. Expert Opinion therapeutic targets 6, 407-422.
- World Health Organization (WHO) 2004. The World Health Report. World Health Organization Report. In Changing History (Geneva).(<http://www.who.int/whr/2004/en>).
- Wiederanders, B., Kaulmann, G., Schilling, K., 2003, Functions of propeptide parts in cysteine proteases. Current Protein & Peptide Science 4, 309-326.
- Williams, R.A., Tetley, L., Mottram, J.C., Coombs, G.H., 2006, Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. Molecular Microbiology 61, 655-674.
- Wolfram, M., Ilg, T., Mottram, J.C., Overath, P., 1995, Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages: activation of helper T cells specific for amastigote cysteine proteinases requires intracellular killing of the parasites. European Journal of Immunology 25, 1094-1100.
- Wright, J.H., 1903, Protozoa in a case of tropical ulcer. Journal Medicine Research 10, 472-482.
- Yao, C., Donelson, J.E., Wilson, M.E., 2003, The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. Molecular and Biochemical Parasitology 132, 1-16.
- Yuong, D.G., Ducan, N.A., 1994, Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sandflies in México, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Memoirs of the American Entomological Institute, 54.
- Zamze, S.E., Ferguson, M.A., Collins, R., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., 1988, Characterization of the cross-reacting determinant (CRD) of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. European Journal of Biochemistry 176, 527-534.
- Zavasnik-Bergant, T., Turk, B., 2006, Cysteine cathepsins in the immune response. Tissue Antigens 67, 349-355.
- Zijlstra, E.E., Musa, A.M., Khalil, E.A., el-Hassan, I.M., el-Hassan, A.M., 2003, Post-kala-azar dermal leishmaniasis. The Lancet Infectious Diseases 3, 87-98.
- Zufferey, R., Allen, S., Barron, T., Sullivan, D.R., Denny, P.W., Almeida, I.C., Smith, D.F., Turco, S.J., Ferguson, M.A., Beverley, S.M., 2003, Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*. Journal of Biological Chemistry 278, 44708-44718.