

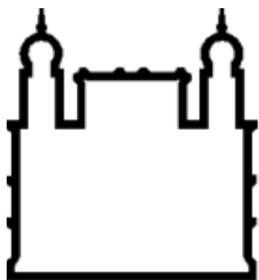
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Expressão de calpaínas e efeito do inibidor MDL28170 em  
*Leishmania braziliensis*

Bianca da Silva Vitória

Rio de Janeiro  
Setembro de 2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Bianca da Silva Vitório

Expressão de calpaínas e efeito do inibidor MDL28170 em *Leishmania  
braziliensis*

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

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

**Rio de Janeiro**  
Setembro de 2014

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

V845 Vitório, Bianca da Silva

Expressão de calpaínas e efeito do inibidor MDL28170 em  
*Leishmania braziliensis* / Bianca da Silva Vitório. – Rio de Janeiro, 2014.

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

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 66-82

1. Calpaínas. 2. *Leishmania braziliensis*. 3. Leishmaniose. 4. Inibidor  
MDL28170. I. Título

CDD 616.9364



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

**Instituto Oswaldo Cruz**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**Bianca da Silva Vitório**

**Expressão de calpaínas e efeito do inibidor MDL28170 em *Leishmania braziliensis***

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

**Aprovado em: 26 de setembro de 2014**

**Examinadores:**

**Prof. Dr.** Eduardo Caio Torres dos Santos – **Presidente**(IOC/FIOCRUZ)

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Maria Cristina Machado Motta (UFRJ)

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Léa Cysne Finkelstein (IOC/FIOCRUZ)

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Patrícia Maria Lourenço Dutra (UERJ)

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Patrícia Fampa Negreiros Lima (UFRJ)

Rio de Janeiro, 26 de setembro de 2014.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais José Guilherme e Maria Helena e ao meu irmão Helton que, com todo o carinho, apoio e incentivo não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade e privilégio de concluir esta etapa tão importante na minha vida, principalmente no nosso país que o estudo ainda é precário, porém a oportunidade de concluir a pós-graduação em uma instituição de excelência realmente é uma vitória.

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Claudia Masini d'Avila-Levy por abrir as portas do LABIMDOE (Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Êndemicas), que tive a honra de conhecer e ter como orientadora, muito obrigada por me iniciar na área da pesquisa, pela paciência para ensinar, discutir ciência, qual a melhor decisão tomar, como melhorar os resultados. Uma orientadora capaz de entender que somos dotados de qualidades e defeitos, você é mais que uma orientadora, é uma amiga.

Ao doutorando Vítor Ennes-Vidal, foi praticamente o meu co-orientador, pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos e pela impecável condução deste meu trabalho. Muito obrigada pela amizade e pelo apoio.

A Dr<sup>a</sup> Constança Brito por abrir as portas do LABIMDOE, pela confiança e pela oportunidade de trabalhar no laboratório.

Ao Dr. André Luís Souza dos Santos e à Dr<sup>a</sup>. Marta Helena Branquinha pela colaboração, pelas críticas e sugestões. A estudante Simone pela ajuda nos experimentos.

Ao Dr. Rubem Menna Barreto por toda a colaboração, pelos experimentos de microscopia, pelas valiosas análises e sugestões no projeto.

A Dr<sup>a</sup> Sílvia, nossa colaboradora, a toda família do laboratório da UERJ em especial a estudante Luciana, pela ajuda preciosa nos experimentos.

A Dr<sup>a</sup> Léa Cysne pela ajuda na obtenção de células e por aceitar o convite para banca.

Ao Dr. André Pitaluga por toda colaboração prestada na análise de bioinformática.

Ao Dr. Caio pelas dicas e conselhos nas prévias de entrevista de mestrado, revisão da dissertação e por aceitar o convite para banca.

A Dr<sup>a</sup> Patricia Cuervo pelas dicas e conselhos nas prévias de entrevista de mestrado.

As Dr<sup>a</sup>Cristina Motta, Patrícia Dutra e Patricia Fampa por aceitarem o convite para banca e suplentes.

Ao Dr. Carlos Roberto Alves e ao Dr. Otacílio Moreira da Cruz pelas dicas e conselhos nas prévias de entrevista de mestrado, seminário discente e defesa.

A minha eterna “chefinha”, Lívia Santos, que desde a minha iniciação científica esteve comigo, obrigada pela grande amizade.

A Ellen Altoé, Camila, Caroline Lopes, Keyla, Sheila e Livia Uehara por toda ajuda no projeto, companheirismo e convivência.

A toda família LABIMDOE pelo companheirismo, ajuda desde a minha iniciação científica e ótima convivência diária.

A Plataforma PCR em Tempo Real/PDTIS, Plataforma de Sequenciamento/PDTIS, Plataforma de Citometria de Fluxo/IOC e Plataforma de Microscopia Eletrônica/IOC que muitas vezes precisei usar para os meus experimentos.

Ao Instituto Oswaldo Cruz/Ensino por oferecer um curso de pós-graduação de excelente qualidadee pelo apoio financeiro.

As minhas amigas da época da faculdade, Rosa, Adriana e Taciane, por sempre acreditarem que eu chegaria mais longe na minha vida acadêmica.

A minha amiga e irmã Thais, sempre ao meu lado em todos os momentos.

A minha família, José Guilherme, Maria Helena e meu irmão Helton por estarem o tempo todo ao meu lado, incondicionalmente. Obrigada família, meu AMOR.

A todos não mencionados anteriormente que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## Instituto Oswaldo Cruz

### Expressão de calpaínas e efeito do inibidor MDL28170 em *Leishmania braziliensis*

#### Resumo

**Bianca da Silva Vitória**  
**Dissertação de mestrado**

As diversas espécies de *Leishmania* são parasitas de considerável importância médica e econômica. As drogas atualmente utilizadas no tratamento da leishmaniose apresentam efeitos adversos, alta toxicidade, elevado custo e surgimento de cepas resistentes. Nesse contexto, inibidores proteolíticos é uma alternativa para o tratamento desta doença. Este estudo está focado nas calpaínas, que compreendem uma família de cisteína peptidases neutras dependentes de cálcio, envolvidas numa ampla variedade de funções fisiológicas. As calpaínas estão envolvidas em importantes doenças humanas, portanto inibidores de calpaínas já vêm sendo desenvolvidos e testados para o tratamento dessas doenças, alguns encontra-se em estágios avançados de triagem clínica. Dessa forma, o presente trabalho avalia a expressão e identificação de homólogos das calpaínas em *Leishmania braziliensis* e o efeito do inibidor de calpaínas MDL28170 em ensaios *in vitro*. Através da busca por sequências no GenBank, alinhamentos múltiplos, filogenia e análise de domínios conservados nas sequências obtidas, selecionamos como alvo inicial sequências de calpaínas que possuíam o maior número de domínios conservados. A análise da expressão gênica relativa indica que 13 das 20 calpaínas estudadas apresentam níveis constitutivos de mRNA nas formas procíclica e metacíclica de *L. braziliensis*. A expressão de cinco alvos é maior na forma procíclica, e a de um alvo é maior na forma metacíclica e há expressão estágio específica de apenas um alvo na forma procíclica. A partir de análises *in silico*, das sequências proteicas dessas calpaínas, selecionamos uma região consenso e um peptídeo correspondente a essa região foi sintetizado e empregado na imunização de coelhos. A reatividade do anticorpo gerado (Anti-TryTrip CALPAIN) foi avaliada por *Western blotting*, citometria de fluxo e imunocitoquímica. Em ensaios de *Western blotting*, verificamos que o anticorpo foi capaz de reagir contra uma proteína de 50 kDa. Já na imunolocalização foi possível observar calpaínas dispersas no citoplasma, membrana e núcleo. Além disso, através de citometria de fluxo, as moléculas homólogas às calpaínas foram identificadas em maior abundância no interior das células. Nos ensaios de inibição com o MDL28170, inibidor de calpaínas, foi possível observar a redução da proliferação nas formas promastigotas recém isoladas e múltiplas passagens de forma dose-dependente nas diferentes concentrações do inibidor ao longo de quatro dias. O efeito reversível do inibidor também foi avaliado nas formas promastigotas, com taxas menores comparado com o controle. O efeito do inibidor, também foi capaz de diminuir de maneira dose-dependente o índice de associação e aumentou o percentual de células com parasitos aderidos durante o processo de interação com macrófagos peritoneais. O parasito aumentou a expressão de uma peptidase clássica (gp63) quando tratado com o MDL28170, já a expressão de calpaínas e cpb não foi alterada pelo estresse induzido pelo composto. Estes dados sugerem mais estudos para melhor caracterizar as calpaínas em *L. braziliensis* e sugerem uma maior avaliação para uma possível associação de moléculas similares as calpaínas com a virulência ou não do parasito. Assim este trabalho acrescenta novas possibilidades para a utilização de inibidores de calpaínas como um potencial alvo de desenvolvimento para o tratamento da leishmaniose





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## Instituto Oswaldo Cruz

### Calpain expression and effect of MDL28170, a calpain inhibitor, on *Leishmania braziliensis*

#### Abstract

Bianca da Silva Vitória

Master Degree

The various species of *Leishmania* are parasites of considerable medical and economic importance. The drugs used in the treatment of leishmaniasis have adverse effects, high toxicity, high cost and emergence of resistant strains. In this context, proteolytic inhibitors could be an alternative for the treatment of this disease. This study is focused on calpains, which comprise a family of neutral cysteine peptidases, which are strictly dependent of calcium, and are there of known as Calcium Dependent Peptidases. These enzymes play a variety of physiological functions, and are involved in human diseases, therefore calpains inhibitors are under trial to treat these diseases. Thus, this study aimed to assess calpain expression levels in *Leishmania braziliensis*, as well as the effect of the calpain inhibitor MDL28170 in vitro. Through the searching for sequences in GenBank, multiple alignments, and phylogenetic analysis of the obtained sequences conserved domains, selected as an initial target sequences of calpain which possessed the greatest number of conserved domains. In this sense, we assessed the expression levels of mRNA from a group of twenty sequences containing archetypal calpain domain. The analysis indicated that 13 out of the 20 studied calpains have constitutive levels of mRNA between the procyclic and metacyclic forms of *L. braziliensis*, while five calpains presented higher expression levels at the procyclic stage, and only one sequence is augmented at the metacyclic stage. One calpain molecule was found to be procyclic-specific. After that, we selected a consensus region and a peptide was synthesized and used to immunize rabbits. The reactivity of the antibody (anti-calpainTryTrip) was evaluated by Western blotting, flow cytometry and immunocytochemistry. In Western blotting assays, we found that the anti-calpain TriTryp antibody was able to recognize a 50 kDa protein. The immunolocalization assays revealed calpain molecules present at the membrane, nucleus and dispersed throughout the cytoplasm. Also, by flow cytometry, molecules homologous to calpains have been identified in abundance within cells. In inhibition assays employing MDL28170, a potent and specific calpain inhibitor, it was possible to observe a dose-dependent reduction in the proliferation rate, either in freshly isolated promastigotes or multiple passages parasites. MDL28170 presents a reversible inhibitory effect. The inhibitor was also able to decrease in a dose-dependent manner the association index and the percentage of host cells with attached parasites during the process of interaction with peritoneal macrophages. Finally, MDL28170 enhanced the expression of gp63 molecules, while cpb and calpains expression were not affect. Further studies to better characterize the calpain in *L. braziliensis* should be performed, aiming to add new possibilities for the exploitation of calpain inhibitors as a potential for the treatment of leishmaniasis.

# ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1-23</b>
1. A família Trypanosomatidae	1
2. Expressão gênica em tripanossomatídeos	4
3. O gênero <i>Leishmania</i> e as Leishmanioses	6
4. Tratamento das Leishmanioses	13
5. Peptidases	14
6. Cisteína peptidases	16
7. Calpaínas	17
8. Calpaínas em tripanossomatídeos	20
9. O inibidor de calpaínas MDL28170	22
10. Inibidores proteolíticos	23
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>24-25</b>
<b>Parte 1</b>	<b>24</b>
<b>Parte 2</b>	<b>24</b>
<b>III. METODOLOGIA</b>	<b>26-32</b>
<b>IV. RESULTADOS</b>	<b>33-58</b>
<b>Parte 1</b>	<b>33</b>
<b>Parte 2</b>	<b>47</b>
<b>V. DISCUSSÃO</b>	<b>59-63</b>
<b>VI. CONCLUSÕES</b>	<b>64-65</b>
<b>Parte 1</b>	<b>64</b>
<b>Parte 2</b>	<b>64</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>66-82</b>
<b>VIII. Anexo</b>	<b>83</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da morfologia dos tripanossomatídeos, forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	<b>1</b>
<b>Figura 2.</b> As formas encontradas nos estágios de desenvolvimento no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado nas espécies de <i>Leishmania</i> .	<b>3</b>
<b>Figura 3.</b> Transcrição e processamento de mRNA em tripanossomatídeos.	<b>6</b>
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado.	<b>8</b>
<b>Figura 5.</b> Casos notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil.	<b>13</b>
<b>Figura 6.</b> Taxas de incidência média para leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral	<b>13</b>
<b>Figura 7.</b> Esquema da classificação das peptidases.	<b>15</b>
<b>Figura 8.</b> Representação da estrutura tridimensional da m-calpaína humana (mili-calpaína).	<b>19</b>
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática dos domínios de uma calpaína clássica.	<b>20</b>
<b>Figura 10.</b> Estrutura química do inibidor de calpaína MDL28170.	<b>23</b>
<b>Figura 11:</b> Análise da separação das formas procíclicas e metacíclicas de <i>L. braziliensis</i> .	<b>33</b>
<b>Figura 12:</b> Estrutura esquemática das calpaínas típicas.	<b>34</b>
<b>Figura 13:</b> Eletroforese em gel de agarose a 2%.	<b>36</b>
<b>Figura 14.</b> Análise por <i>Western blotting</i>	<b>40</b>
<b>Figura 15.</b> Imunocitoquímica ultraestrutural de calpaínas	<b>41</b>
<b>Figura 16.</b> Expressão de moléculas similares a calpaínas	<b>43</b>
<b>Figura 17.</b> Expressão de moléculas similares a calpaínas	<b>43</b>
<b>Figura 18.</b> Expressão de moléculas similares a calpaínas	<b>44</b>
<b>Figura 19.</b> Expressão de moléculas similares a calpaínas	<b>45</b>
<b>Figura 20.</b> Expressão de moléculas similares a calpaínas	<b>45</b>
<b>Figura 21.</b> Macrófagos infectados com as formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	<b>47</b>
<b>Figura 22:</b> Efeito do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a taxa de multiplicação de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> recém isoladas e múltiplas passagens.	<b>49</b>
<b>Figura 23.</b> Efeito reversível do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a taxa de multiplicação de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> recém isoladas e após múltiplas passagens.	<b>51</b>
<b>Figura 24.</b> Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a expressão de calpaínas em formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> recém isolado ou múltiplas passagens.	<b>53</b>
<b>Figura 25.</b> Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a expressão de Cpb em formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> recém isolado ou múltiplas passagens.	<b>54</b>
<b>Figura 26.</b> Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a expressão de gp63 em formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> recém isolado ou múltiplas passagens.	<b>55</b>

**Figura 27.** Efeitos do pré-tratamento de promastigotas de *L. braziliensis* com o inibidor de calpaínas MDL28170 durante o processo de interação com macrófagos peritoneais. **57**

**Figura 28.** Efeitos do pré-tratamento de promastigotas de *L. braziliensis* com o inibidor de calpaínas MDL28170 durante o processo de interação com macrófagos peritoneais. **58**

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Principais espécies de *Leishmania* dermatrópicas. **11**

**Tabela 2:** Iniciadores específicos dos 20 genes de calpaínas mais os dois endógenos (actina e proteína S8) selecionados para análise da expressão gênica. **35**

**Tabela 3:** Análise da identidade dos produtos amplificados pelos oligonucleotídeos sintetizados para amplificar as calpaínas selecionadas. As sequências obtidas foram analisadas por Blastn contra o genoma de *L. braziliensis*, os valores de *score*, *e-value* e identidade apresentada são referentes aos próprios genes de interesse. **36**

**Tabela 4:** Análise da expressão gênica diferencial de calpaínas entre as formas procíclica e metacíclica de *L. braziliensis*. **38**

**Tabela 5:** Genes selecionados com a indicação da região que contém o peptídeo utilizado para produção do anticorpo policlonal anti-TryTrip CALPAIN e a região onde este peptídeo está presente. **39**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu$ l- Microlitro

$\mu$ M- Micromolar

BSA- Soro Albumina Bovina

Ca<sup>+2</sup>- Íons cálcio

CDPs- Peptidases Dependentes de Cálcio

CP- Cisteína peptidase

DMEM- Meio Eagle Modificado por Dubelco

DMSO- Dimetilsulfóxido

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EC- Comitê de Nomenclatura Enzimática

EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético

EGTA- Ácido Etileno Glicol Tetracético

E-64- Inibidor de cisteína peptidase

FACS- “Fluorescence Activated Cell Sorting” (Separador de Células Ativado por Fluorescência)

FITC- “Fluorescein Isothiocyanate” (Isotiocianato de Fluoresceína)

gp63- Glicoproteína 63

gp82- Glicoproteína 82

GPI- Glicosilfosfatidilinositol

h- Hora

IC<sub>50</sub>- Referente à concentração da droga que causa uma redução em 50% da sobrevivência dos parasitos em comparação à curva de crescimento controle

IBRAG- Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

IOC- Instituto Oswaldo Cruz

IgG- Imunoglobulina G

IUBMB- União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

LPG- Lipofosfoglicano

kDa- Kilodalton

kDNA- DNA do cinetoplasto

M- Molar

MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão

mg- miligrama  
min- Minuto  
mRNA- Ácido ribonucleico mensageiro  
MSP- Principal Peptidase de Superfície  
mM- Milimolar  
ng- nanograma  
PBS- Tampão Fosfato Salina  
PDTIS- Plataformas Tecnológicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde  
pH- Potencial Hidrogeniônico  
PGCs- “Polycistronic gene clusters”  
PKDL- Leishmaniose dérmica pós-calazar  
qPCR- Reação em cadeia de polimerase em tempo real  
qsp- Quantidade suficiente para  
RNA- Ácido ribonucleico  
SDS- “Sodium Dodecyl Sulfate” (Lauril Sulfato de Sódio)  
SFB- Soro Fetal Bovino  
sp.- Espécie  
spp.- Várias espécies  
UTM- Unidades de tipagem molecular  
UTR- Região não traduzida  
v/v- Volume por Volume

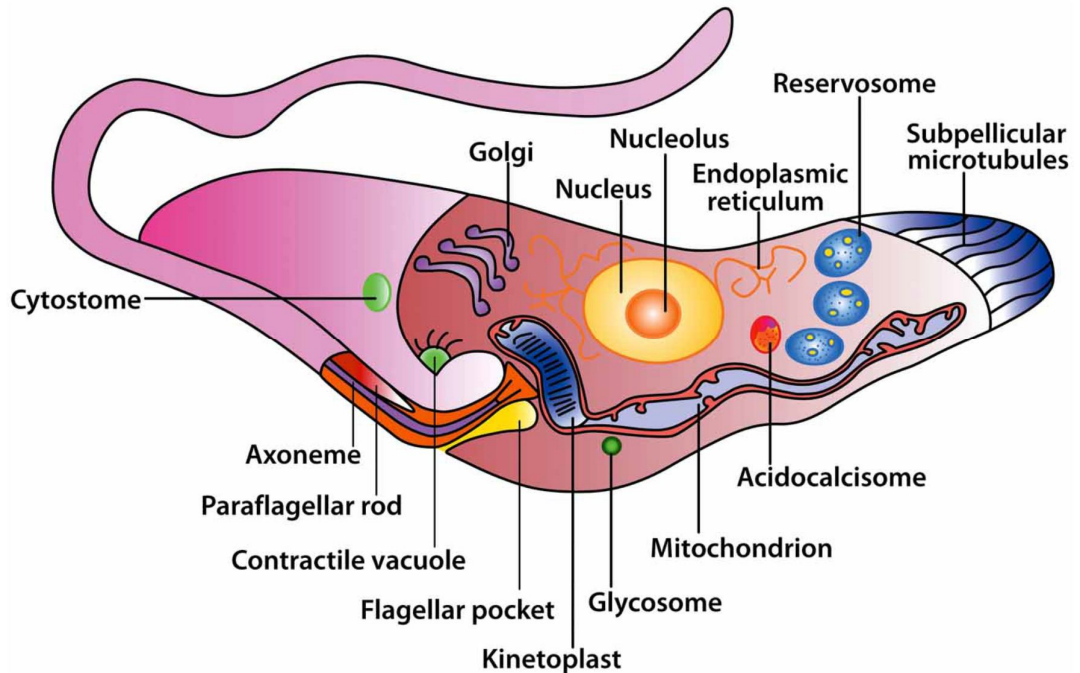
# I. INTRODUÇÃO

## 1. A Família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae, classificada na classe Kinetoplastea, compreende um grande número de parasitos monoflagelados eucariotos. Os tripanossomatídeos parasitam vertebrados (incluindo humanos), invertebrados (insetos) e plantas, causando sérios danos à saúde da população e à economia. Algumas doenças causadas por estes protozoários são consideradas doenças negligenciadas, como: doença de Chagas, doença do sono e leishmanioses. A família possui características típicas, como a presença de uma mitocôndria única e ramificada que percorre todo o corpo celular e a presença de um cinetoplasto localizado perpendicular ao flagelo que contém o DNA mitocondrial (20 a 30% do DNA total). O DNA desta estrutura é denominado kDNA e se organiza em redes de cadeias circulares, concatenadas e compactadas. Em muitos tripanossomatídeos, a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo varia de acordo com o morfotipo (MASLOV & SIMPSON, 1995). Dentre as características singulares deste grupo está a presença de uma organela conhecida como glicossoma, que torna a transformação de glicose em piruvato mais eficiente em tripanossomatídeos em comparação com outros organismos eucariotos, já que é uma organela de compartimentalização de enzimas glicolíticas (revisto por VICKERMANN, 1994). O glicossoma também possui outras funções relacionadas à biossíntese de pirimidinas, recuperação de purinas, síntese de éter-lipídios e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (revisto por MICHELS, HANNAERT & BRINGAUD, 2000).

Outra característica dos tripanossomatídeos é o flagelo único composto basicamente por axonema e uma estrutura paraflagelar, que se exterioriza através da bolsa flagelar (revisto por LANDFEAR & IGNATUSHCHENKO, 2001). O flagelo é importante na locomoção e em algumas espécies participa na adesão do micro-organismo aos tecidos hospedeiros, morfogênese celular, divisão celular e evasão do sistema imune (RALSTON *et al.*, 2009; VICKERMANN, 1994; VICKERMAN & TETLEY, 1990). O citoesqueleto de tripanossomatídeos é composto por uma camada de microtúbulos subpeliculares que formam ligações cruzadas entre si e com a membrana plasmática garantindo a sustentação da célula (revisto por GULL, 1999). O citoesqueleto representa barreira importante ao transporte vesicular, logo o principal sítio de

endocitose e exocitose é a bolsa flagelar, que consistem uma região onde os microtúbulossubpeliculares não estão presentes (revisto por OVERATH *et al.*, 1997). A representação esquemática da morfologia dos tripanossomatídeos pode ser observada na Figura 1.



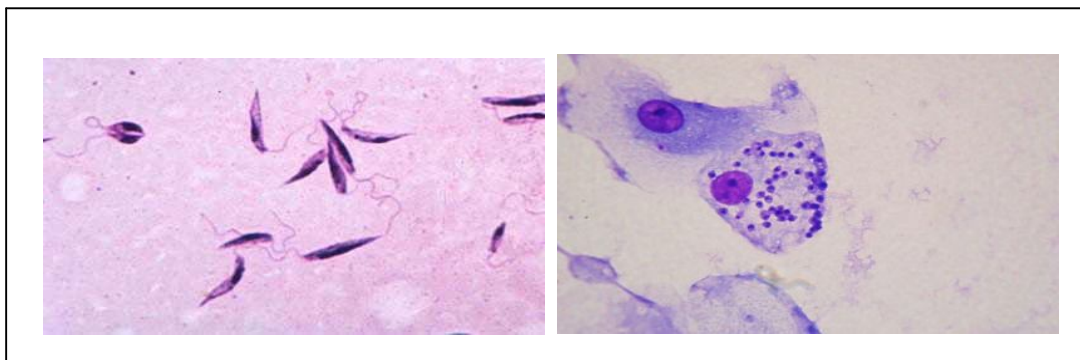
**Figura 1.** Representação esquemática da morfologia dos tripanossomatídeos, forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi* (LOPES *et al.*, 2010).

Os gêneros pertencentes à família Trypanosomatidae são historicamente classificados, baseados em três critérios: formas evolutivas, ciclo de vida e hospedeiro de isolamento. De acordo com o primeiro critério, as formas evolutivas são caracterizadas pela morfologia do corpo celular, e presença ou ausência da membrana ondulante e de flagelo extracelular, local de emergência do flagelo e pela posição do complexo formado pelo flagelo, bolsa flagelar e cinetoplasto em relação ao núcleo (HOARE & WALLACE, 1966; JANOVY *et al.*, 1974; VICKERMAN & PRESTON, 1976; WALLACE, 1977; YOSHIDA *et al.*, 1978; VICKERMAN, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1997). Quanto ao ciclo de vida os tripanossomatídeos são divididos em monoxênicos e heteroxênicos. Os monoxênicos são aqueles que possuem um único hospedeiro durante o seu ciclo evolutivo, geralmente um invertebrado. Já os tripanossomatídeos heteroxênicos, são aqueles que possuem mais de um



hospedeiro(invertebrado e planta ou invertebrado e vertebrado) (LOPES *et al.*, 2010).Atualmente, os tripanossomatídeos estão divididos nos seguintes gêneros: (*Leishmania*, *Trypanosoma*,*Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Phytomonas*, *Wallaceina*, *Angomonas*, *Strigomonas*,*Sergeia*, *Blechomonas*, *Proteomonas* *Paratrypanosoma*), com base em características morfológicas,filogenéticas e quanto à especificidade do hospedeiro (BORGHESAN *et al.*, 2013, MASLOV& SIMPSON, 1995).A partir dos relatos de isolamento e descrição de novas espécies e gêneros, está claro que existe uma grande diversidade de tripanossomatídeos ainda por ser descrita e descoberta, e que os gêneros formalmente descritos nem sempre agrupam unidades de tipagem molecular (UTM).

O ciclo de vida dos tripanossomatídeos é bastante diversificado, alternando entre o ambiente de um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor, por exemplo. Isso pode ajudar a explicar, as diferentes mudanças morfo-fisiológicas durante os estágios de desenvolvimento para ocorrer a infecção em ambos hospedeiros. Durante o complexo ciclo de vida das espécies de *Leishmania*, as formas promastigotas se adaptam no espaço extracelular da cavidade intestinal do inseto e as formas amastigotas se adaptam em um habitat intracelular em células fagocíticas mononucleadas (TEIXEIRA*et al.*, 2013). Os morfotipos de *Leishmania* encontrados nos hospedeiros vertebrado e invertebrado estão representados na Figura 2.



**Figura 2.** As formas encontradas nos estágios de desenvolvimento no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado nas espécies de *Leishmania*. A. promastigotas; B. amastigotas (Adaptado de Manual da Leishmaniose Tegumentar Americana., 2007).

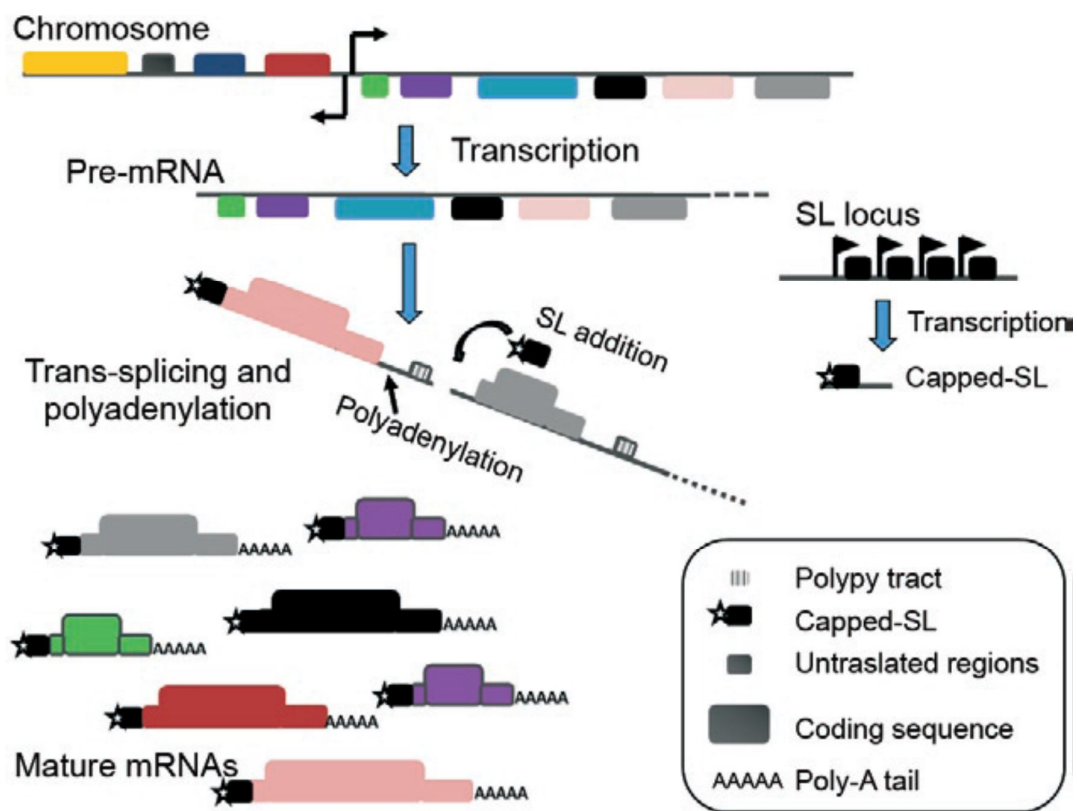
## 2. Expressão gênica em tripanossomatídeos

Nos sistemas biológicos, as células produzem constantemente moléculas de RNA que estão envolvidas direta ou indiretamente em processos como: reprodução, desenvolvimento, reparo e regulação de metabolismo. O processo pelo qual uma fita de RNA é sintetizado através de uma fita molde de DNA é conhecido como transcrição.

Os tripanossomatídeos apresentam características peculiares quanto à organização do seu genoma e a expressão gênica. A organização incomum do genoma dos tripanossomatídeos foi observada em 1999 no cromossomo 1 de *Leishmania major*, o primeiro cromossomo inteiramente sequenciado desta família (MYLER *et al.*, 1999). Os genes de tripanossomatídeos são organizados dentro de grandes grupos, PGCs (Polycistronic gene clusters), que originam transcritos de pré mRNA policistrônicos, representados por uma única molécula de RNA, geralmente contendo informação de diversos genes que não estão relacionados a uma determinada via metabólica. Assim, estes mRNA policistrônicos devem ser processados até mRNA individuais. Este processamento é feito através do *trans-splicing* 5' e poliadenilação 3' (Figura 3). O *trans-splicing* é o processo que adiciona à extremidade 5' a estrutura de um capeamento (*cap*) de 39 nucleotídeos de cada região codificante presente nos mRNA maduros. O *trans-splicing* é semelhante ao *cis-splicing* de outros eucariotos, que consiste na junção de duas sequências a partir de duas moléculas precursoras de RNA, mediante as duas reações de transesterificação, mas esta reação envolve a formação de uma estrutura em “Y” em vez da estrutura do “laço”, como ocorre no *cis-splicing*. A poliadenilação ocorre junto com o *trans-splicing*, e são determinados, em parte, por sequências de DNA ricas em pirimidinas presentes nas regiões intergênicas. As sequências determinantes do sítio 3' são regiões ricas em polipirimidina seguidas de um dinucleotídeo AG (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010).

Os genes desta família são policistrônicos e não se tem conhecimento de mecanismos de regulação transcricionais, porém são encontradas diferentes concentrações de mRNA maduros nas diferentes formas evolutivas dos tripanossomatídeos. Por exemplo, a glicoproteína gp63, também chamada de MSP (Major surface protease) ou leishmaniolisina, é a mais abundante protease de superfície em espécies de *Leishmania*, sendo um importante fator de virulência nas formas promastigotas. Esta molécula desempenha uma série de funções críticas e se destaca por apresentar expressão diferencial de acordo com os estágios de vida do parasito (YAO

*etal.*, 2003). Aglicoproteína gp82 é uma proteína de superfície celular e está relacionada com a invasão celular de *T. cruzi*. Análises por *northern blotting* e qPCR mostram o aumento dos níveis de mRNA em tripomastigotas metacíclicos comparados com os níveis de mRNA em epimastigotas, além de uma expressão reduzida de gp82 em cepas avirulentas deste parasito (GENTIL *et al.*, 2009; SONGTHAMWAT *et al.*, 2007). A ausência de mecanismo de regulação transcricional em conjunto com dados indicando o acúmulo específico de mRNA levanta a questão: De que maneira uma transcrição constitutiva permite o acúmulo diferencial de mRNA distintos? Acredita-se que a expressão gênica em tripanossomatídeos seja regulada principalmente a nível pós-transcricional. As sequências 3'UTR e 5'UTR (*untranslated region*) dos mRNA têm sido amplamente estudadas, e há indícios de seu papel no processamento destes mRNA, que afetaria sua estabilidade, meia vida e tradução (ARAÚJO & TEIXEIRA, 2011). Por exemplo, um estudo identificou uma família de genes regulados especificamente em amastigotas de *Leishmania*, as amastinas. Na região não codificante 3' da amastina, existem 450 nucleotídeos que são responsáveis pela expressão diferencial deste gene na forma amastigota, aumentando a tradução destes mRNA (BOUCHER *et al.*, 2002). Outro estudo mostra que a proteína de choque térmico HSP70 possui regulação gênica em *T. cruzi*, uma vez que a meia vida dos mRNA de HSP70 aumenta após o choque térmico e a estabilização é dependente da síntese de proteínas. Os ensaios que avaliaram o decaimento de RNA e o ensaio com gene repórter para região 5'e 3' UTR concluíram que as regiões de HSP70 3'e 5'UTR regulam a estabilidade do mRNA durante o choque térmico em *T. cruzi* (RODRIGUES *et al.*, 2010). Os poucos estudos acerca de expressão gênica em tripanossomatídeos, a maioria em *T. brucei* e *T. cruzi*, indicam que a abundância mRNA e de proteínas não são correlacionáveis, e também que o controle traducional e pós-traducional tem um papel importante na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos (KRAMER, 2012; ARAÚJO & TEIXEIRA, 2011; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010; MAYHO *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Transcrição e processamento de mRNA em tripanossomatídeos. Polycistronic gene clusters (PGCs) transcritos em mRNA policistrônicos e processados por reações de *trans-splicing* e poliadenilação. Os mRNA maduros monocistrônicos são acumulados em diferentes níveis no citoplasma, por mecanismos ainda pouco elucidados (ARAÚJO & TEIXEIRA, 2011).

### 3. O gênero *Leishmania* e as leishmanioses

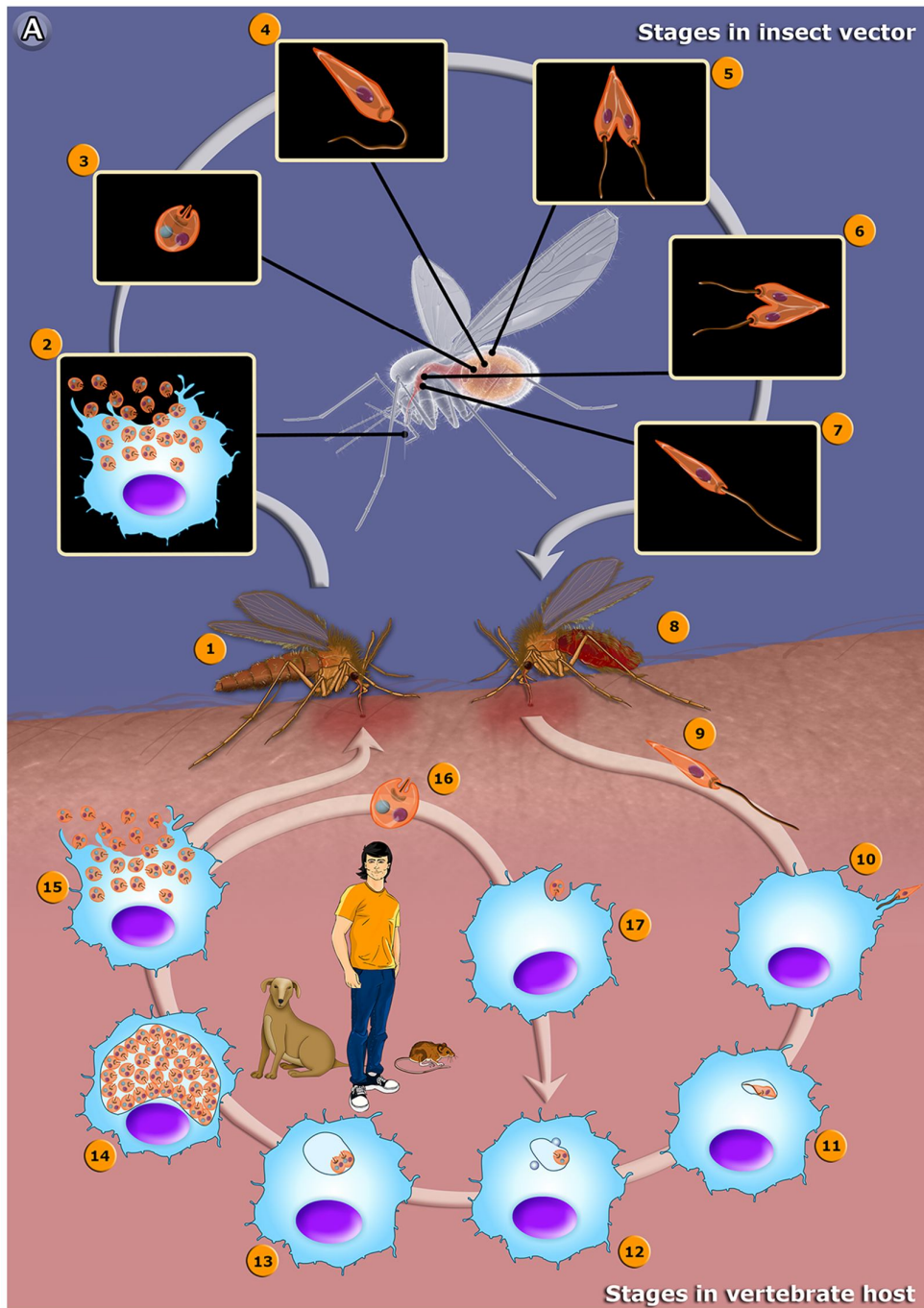
A leishmaniose representa uma das mais importantes endemias brasileiras, sendo reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como doença negligenciada. Pelo menos cerca de 200 a 400 mil casos de leishmaniose visceral e cerca de 1 milhão e 200 mil casos de leishmaniose cutânea ocorrem a cada ano em todo o mundo. A leishmaniose cutânea é a mais amplamente distribuída, sendo o Brasil um dos dez países com a maior estimativa de números de casos. Estes dez países correspondem acerca de 75% da incidência global de leishmaniose cutânea (ALVAR *et al.*, 2012).

A transmissão das leishmanioses ocorre através da picada de vetores hematófagos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) ou pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas). Essas

doenças podem ser transmitidas aos animais silvestres e domésticos (zoonose) e também ao ser humano (ASHFORD, 2000). O vetor inocula cerca de 100-1000 promastigotas metacíclicas (formas não replicativas, infectantes, móveis e muito ativas, pequenas e delgadas com flagelo longo) no tecido subcutâneo e essas infectam células do sistema fagocítico, principalmente macrófagos e neutrófilos. O ciclo se fecha quando os vetores picam os reservatórios infectados e ingerem macrófagos contendo as formas amastigotas intracelulares e/ou as formas amastigotas livres (formas arredondadas com o flagelo internalizado e imóveis). Durante o trajeto pelo trato digestório do inseto vetor, os macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas, que devido a importantes diferenças ambientais, como temperatura e pH, se diferenciam no intestino médio do flebotômíneo em promastigotas procíclicas (forma replicativa, ovóides, com flagelo curto e pouco móveis) (PIMENTA *et al.*, 1997, SACKS, 2001, SOARES *et al.*, 2005).

Os promastigotas procíclicas se multiplicam intensamente, e entre 60-72 horas iniciam a evasão da membrana peritrófica, e adesão às microvilosidades das células epiteliais da porção anterior do intestino médio (WALTERS *et al.*, 1992). Dentro de 4-5 dias após a infecção, os promastigotas procíclicas se diferenciam em promastigotas metacíclicas, em um processo conhecido como metacicloênese (SACKS, 1989; SARAIVA *et al.*, 2005). Os promastigotas metacíclicas migram para o esôfago e faringe, se alojando na probóscide do vetor. Durante um novo repasto sanguíneo, uma contração do músculo da probóscide faz com que o flebotômíneo regurgite o sangue recém ingerido, liberando promastigotas metacíclicas (KAMHAWI, 2006). Desta forma, os promastigotas metacíclicos liberados entram na pele do hospedeiro vertebrado, invadem as células que foram recrutadas, como neutrófilos e macrófagos, e iniciam o reconhecimento e adesão que é seguido por sinalização e penetração. O parasito adere à superfície da célula hospedeira pelo flagelo ou corpo celular, graças ao reconhecimento de moléculas de superfície do parasita como lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína gp63 (TURCO & DESCOTEAUX, 1992; RUSSELL & WILHELM, 1986). Estas moléculas se ligam a diferentes receptores dos macrófagos, incluindo receptores do complemento (CR1 e CR3), receptores de manose e de fibronectina (UENO & WILSON, 2012). O parasito (promastigota metacíclico) é internalizado pela célula hospedeira em um vacúolo parasitóforo, se diferenciam em amastigotas, se multiplicam intensamente e rompem as células hospedeiras, liberando os amastigotas no tecido, que podem infectar novos macrófagos ou serem ingeridas por um flebotômíneo

fêmea, reiniciando o ciclo (STUART *et al.*, 2008). O ciclo de vida da *Leishmania* está representado na Figura 4.



**Figura 4.** Representação esquemática do ciclo de vida de *Leishmania* sp. no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado (TEIXEIRA *et al.*, 2013). (1) Picada da fêmea hematófaga no hospedeiro vertebrado infectado, durante o repasto sanguíneo. (2) Macrófagos infectados com as formas amastigotas. (3) Forma amastigota. (4) Diferenciação de amastigota para promastigotas

procíclicos. (5) Multiplicação das formas promastigotas procíclicas no intestino médio. (6) Promastigotas migram para o intestino médio anterior e reiniciam a divisão celular. (7) Promastigotas procíclicos se diferenciam em promastigotas metacíclicos. (8) Flebotomíneo regurgita o sangue contendo as formas promastigotas metacíclicos durante o repasto sanguíneo. (9) Forma promastigota metacíclico. (10) Promastigota metacíclico infecta célula do sistema fagocítico mononuclear. (11) Formas metacíclicas se diferenciam em amastigotas. (12) Forma amastigota anexa à membrana do vacúolo parasitóforo. (13) Amastigota se multiplica no vacúolo. (14) Multiplicação intensa das formas amastigotas. (15) A célula fagocítica lisa e libera as formas amastigotas. (16) Formas amastigotas livres. (17) Amastigota livre infecta nova célula fagocítica mononuclear.

As formas clínicas da leishmaniose podem ser divididas em: leishmaniose cutânea localizada e cutânea difusa, mucocutânea e a forma visceral. A leishmaniose cutânea é causada por várias espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia*, as lesões podem ocorrer em qualquer parte do corpo, mas geralmente origina-se no local da inoculação, inicialmente na forma de uma lesão macular seguido por uma pápula, posteriormente nódulos, que se tornam úlceras (MARZOCHI, 1992; BERMAN, 1996, GONTIJO & DE CARVALHO, 2003, WHO, 2010; REVEIZ *et al.*, 2013). As lesões únicas ou múltiplas podem ser desenvolvidas após semanas, meses ou anos depois da inoculação. As lesões causadas por *L. mexicana* podem ter cura espontânea dentro de quatro a seis meses, e lesões causadas por espécies do subgênero *Viannia* como: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana* podem ter a cura clínica sem o tratamento dentro de seis meses. A leishmaniose cutânea difusa é caracterizada por máculas, pápulas, nódulos e infiltrações na pele, especialmente nos membros e na face, não há ulceração, mas características atípicas podem ocorrer. O envolvimento das mucosas se limita às narinas e lábios, as respostas terapêuticas são geralmente insatisfatórias. A leishmaniose cutânea difusa está associada com pacientes imunocomprometidos. No Velho Mundo é causada pela espécie *L. aethiopica*, já no Novo mundo está associada com *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* e *L. pifanoi* (CONVIT & KERDEL-VEGAS, 1965; COSTA *et al.*, 1992; WHO, 2010; DE SALDANHA *et al.*, 2012). A leishmaniose mucocutânea, encontrada somente no Novo Mundo, é causada principalmente por *L. braziliensis* e *L. panamensis*, com casos frequentes no Peru, Bolívia e Brasil. A característica desta forma clínica é a metástase, que pode ocorrer a partir de uma lesão primária para um sítio de mucosa distante, levando a lesões destrutivas, especialmente nas áreas nasofaríngea. Alguns estudos

mostram condições similares causadas por outras espécies de *Leishmania* em pacientes imunocomprometidos (WHO, 2010; DE SALDANHA *et al.*, 2012; REVEIZ *et al.*, 2013).

Os protozoários pertencentes aos dois subgêneros, que representam as principais espécies de *Leishmania* dermatrópicas, tem ampla distribuição geográfica nas Américas são conhecidas quatorze espécies que causam doenças no homem(Tabela1).



**Tabela 1:** Principais espécies de *Leishmania* dermatrópicas.

<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

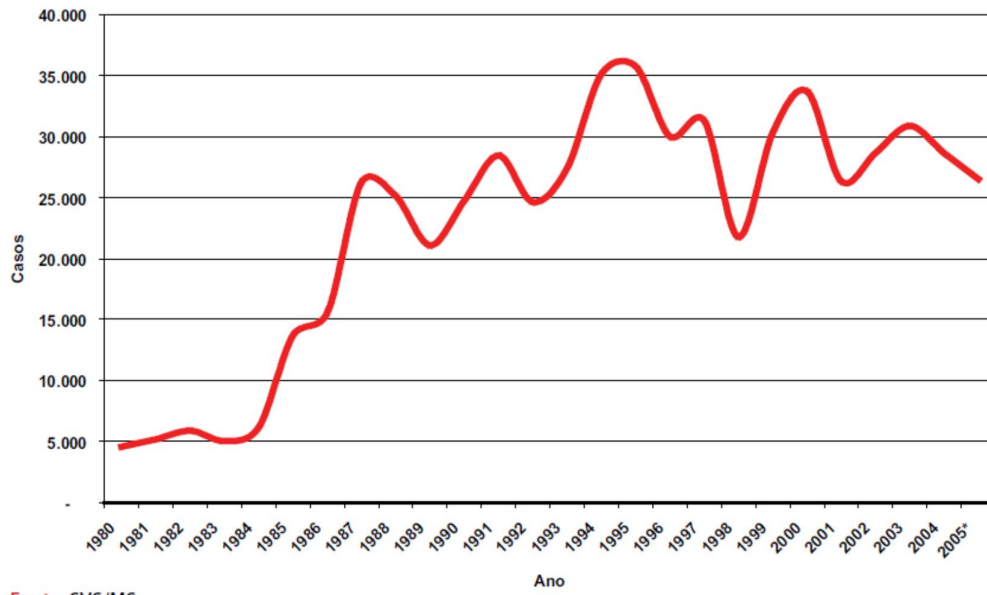
Principais espécies de *Leishmania* dermatrópicas causadores de doença em humanos nas Américas dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Fontes: (REITHINGER *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-BONFANTE *et al.*, 2003; SILVEIRA *et al.*, 2002)

A leishmaniose visceral ou calazar é a forma mais grave da doença, atingindo em preferência órgãos como: baço, fígado, medula óssea e linfonodos, que pode levar a perda das funções destes órgãos e óbito (MUSA *et al.*, 2007).

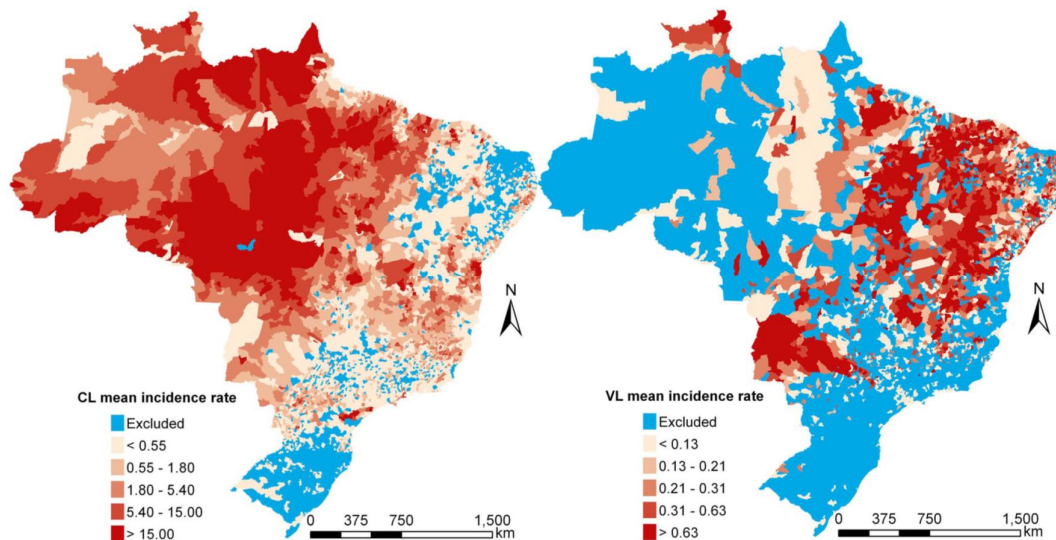
A partir dessa forma clínica, o paciente pode evoluir para o quadro de PKDL (forma dermal pós-calazar) (RAMESH & MUKHERJEE, 1995), que se caracteriza pelo desenvolvimento de máculas, lesões nodulares, múltiplas e indolores, com certo grau de fotossensibilidade e despigmentação da pele, desde seis meses até quatro anos pós-cura da forma visceral.

Em 1987, Lainson & Shaw propuseram a divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*. Estes dois subgêneros são classificados com base na localização do parasito no intestino do vetor. Os membros do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se nas regiões pilórica e do intestino médio (desenvolvimento suprapilário), enquanto as espécies do subgênero *Viannia* desenvolvem-se na região posterior do intestino (desenvolvimento peripilário) (LAINSON & SHAW, 1979, 1987; revisto por CORRÊA, BRAZIL & SOARES, 2005). Além disso, análises de isoenzimas são utilizadas para definir as espécies dentro de cada subgênero. Apesar desta subdivisão ter sido proposta com base comportamental das espécies de *Leishmania* no flebotomíneo, análises filogenéticas suportam esta divisão (DORVAL *et al.*, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, como uma das seis doenças infecciosas mais importantes e apresenta uma ampla distribuição nos estados do Brasil. Como mostra a Figura 5, a partir da década de 80 até o ano de 2005, há um aumento no número de casos oficialmente notificados (WHO, 2010). A incidência no Brasil de leishmaniose cutânea e visceral, no período de 2001 até 2010, pode ser visualizada na Figura 6. A ampla distribuição geográfica da doença requer uma ação efetiva para o seu controle.



**Figura 5.** Casos notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. 1980 até 2005.



**Figura 6.** Taxas de incidência média para leishmaniose cutânea (esquerda) e leishmaniose visceral (direita) após um período de 10 anos (2001-2010) (DIMITRIOS-ALEXIOS *et al.*, 2013).

#### 4. Tratamento das Leishmanioses

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de N-metilglucamina e o

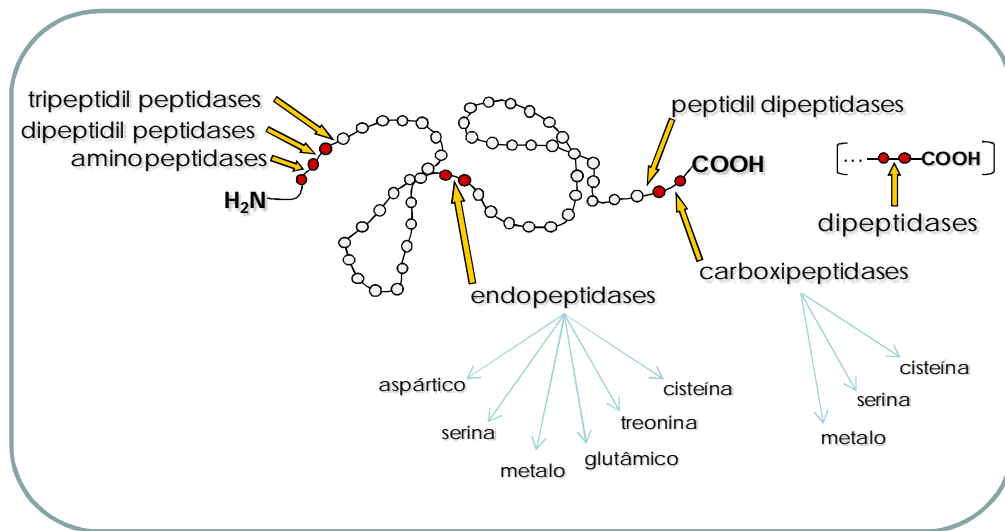
estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil (WHO, 2010). Os fármacos como anfotericina B, pentamidina e paromicina são usados como uma segunda opção em casos de resistência, apesar da alta toxicidade apresentada ao hospedeiro. Os fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose apresentam efeitos adversos, alta toxicidade, elevado custo dos compostos e surgimento de cepas resistentes. Com isso, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças causadas por estes parasitos. Alguns grupos de pesquisa têm buscado alternativas para o tratamento da leishmaniose, como compostos naturais e drogas sintéticas (DUTTA *et al.*, 2007a, DUTTA, 2007b, Soares *et al.*, 2007, JHA *et al.*, 1999; SUNDAR *et al.*, 2000, SUNDAR *et al.*, 1998, 1999, PALUMBO, 2008, SOTO *et al.*, 2001, 2008, PARIS *et al.*, 2004; VERMA & DEY, 2004; VERMA *et al.*, 2007).

## 5. Peptidases

Peptidases, proteinases ou proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. Estas enzimas são classificadas de acordo com o tipo de reação catalisada e na natureza química do sítio catalítico. O comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) fez um sistema de classificação que utiliza a letra 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. As proteases constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases (EC 3.4.11-19), são capazes de hidrolisar o peptídeo nas extremidades de uma cadeia polipeptídica única, e endopeptidases (EC 3.4.21-99), capazes de hidrolisar as ligações peptídicas nas regiões internas de um polipeptídeo (KOTERA, 2004; BEYNON & BOND, 2001; BOND & BUTLER, 1987).

As exopeptidases que atuam na região amino-terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases); já aquelas que atuam na região carboxi-terminal livre liberam um único aminoácido (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases). As carboxipeptidases podem também ser classificadas pela natureza química do seu sítio catalítico, são subdivididas em serina- (EC 3.4.16), metalo- (EC

3.4.17) e cisteína-peptidases (EC 3.4.18). As endopeptidases também são classificadas pela natureza química do seu sítio catalítico, sendo divididas em tipo serina- (EC 3.4.21), cisteína- (EC 3.4.22), aspártico- (EC 3.4.23), metalo- (EC 3.4.24), treonina- (EC 3.4.25). Existe, atualmente, um sexto tipo catalítico, as glutâmico-peptidases, que apresentam o ácido glutâmico em seu sítio ativo. As enzimas cujos mecanismos de ação não estão suficientemente elucidados são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99 (BARRET *et al.*, 2001, 2003). O esquema de classificação das peptidases pode ser observado na Figura 7.



**Figura 7.** Esquema da classificação das peptidases quanto ao tipo de reação catalisada e a natureza química do sítio ativo. Círculos brancos representam os aminoácidos e os círculos vermelhos indicam a sequência de aminoácidos que se ligará à peptidase. As setas de cor amarela apontam para o local de clivagem no substrato proteico. As setas azuis indicam a subclassificação de carboxipeptidases e endopeptidases de acordo com o grupamento químico presente no sítio catalítico da enzima (SANTOS, 2011).

As peptidases formam um grupo extenso e heterogêneo. Assim com os avanços da genômica, proteômica e metabolômica, a intensa disponibilização de novas sequências criou a necessidade de um sistema de classificação robusto, nesse sentido foi criado o banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>). O sistema MEROPS agrupa as enzimas proteolíticas em famílias de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos, com atenção especial aos domínios funcionais, principalmente o catalítico (RAWLINGS, 2014).

As famílias das peptidases são representadas por uma letra, que representa o tipo de mecanismo catalítico. As letras usadas são “A” (aspártico), “C” (cisteína), “M” (metaló), “S” (serina), “T” (treonina), “G” (glutâmico) ou “U” para mecanismo de hidrólise desconhecido (tipo desconhecido, do inglês, “*unknown*”), seguido de um número característico. A principal organização hierárquica deste sistema são famílias e clãs. As famílias representam um conjunto de peptidases homólogas e sequências de inibidores de proteínas. O clã representa uma ou mais famílias, que contém estruturas relacionadas (BARRET *et al.*, 2001, 2003; RAWLINGS, 2014).

A caracterização bioquímica destas enzimas proteolíticas é importante não somente para compreender as peptidases em geral mas, sobretudo, para compreender as infecções causadas por micro-organismos. O tratamento para alguns micro-organismos eucarióticos, como fungos e tripanossomatídeos, é difícil devido à natureza eucariótica destas células que são semelhantes em alguns aspectos bioquímicos e genéticos às células hospedeiras (SANTOS, 2011). Nos tripanossomatídeos, essas enzimas estão envolvidas em eventos cruciais do ciclo de vida destes parasitos, tais como a diferenciação e remodelação do parasito nas fases de seu ciclo de vida, ativação ou degradação de enzimas ou proteínas regulatórias, processamento nutricional de proteínas, escape e a modulação do sistema imunológico por degradação ou ativação de moléculas do sistema imune, como o sistema complemento e a coagulação sanguínea, além de serem responsáveis pela variabilidade antigênica do parasito (revisado por MCKERROW *et al.*, 1993; SAJID & MCKERROW, 2002).

Entre as seis classes principais de peptidases, as mais comumente detectadas nos tripanossomatídeos são as metalo- e as cisteína-peptidases (BRANQUINHA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2005; VILLALTA *et al.*, 2008)

## **6. Cisteína peptidases**

As peptidases desempenham várias funções básicas e essenciais no metabolismo e no processo de patogênese de diversos micro-organismos, cujas doenças parasitárias representam grave problema de saúde pública (MCKERROW *et al.*, 2006). Consequentemente, há crescentes estudos com evidências da contribuição das cisteína-peptidases nos eventos proteolíticos nas duas formas do desenvolvimento do parasito em diversas espécies de *Leishmania* (SANTOS, 2011).

Alguns genes responsáveis pela codificação de cisteína peptidases já foram identificados em espécies de *Leishmania* (*cpa*, *cpb*, *cpc*). As CPs mais estudadas em *Leishmania* (CPA, CPB e CPC) são classificadas como tipo papaína e pertencentes ao mesmo grupo das CPs, clã CA, que é dividido em famílias: a família C, que inclui a enzima tipo catepsina B (CPC), e as enzimas tipo catepsina L (CPA e CPB) e a família C2, que inclui as enzimas tipo calpaínas, entre outras. Diversas funções destas cisteína-peptidases já foram demonstradas, tais como: facilitar a evasão do ataque microbida do macrófago, facilitar a diferenciação de promastigota e amastigota, interação parasito-hospedeiro e na metaciclologênese (FRAME, MOTTRAM & COOMBS, 2000; MOTTRAN, COOMBS & ALEXANDER, 2004).

Através da geração de clones de promastigotas de *L. infantum*, foi demonstrado que a CPA não é essencial para a replicação de promastigotas, mas é importante na interação parasito-hospedeiro (DENISE *et al.*, 2006). Outro estudo demonstrou que a inibição de cisteína peptidases CPA e CPB em *L. mexicana*, e a remoção destes genes interfere na via de autofagia, e também impede a metaciclologênese e a transformação para amastigotas, reforçando assim que a autofagia é necessária para a diferenciação celular (WILLIAMS *et al.*, 2006). Os mutantes *null* para o gene *cpc* de *L. mexicana* tiveram o seu crescimento celular nas formas promastigotas e amastigotas em culturas axênicas aparentemente normal, mas com uma infectividade reduzida em macrófagos *in vitro* (BART *et al.*, 1997). Já em *L. infantum*, foi identificado que a CPC tem expressão aumentada na forma amastigota, atuando como fator de virulência (LYNN *et al.*, 2013).

Alguns estudos empregando zimografia demonstram que em *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, as cisteína peptidases são preferencialmente expressas em promastigotas recém isolados quando comparados com os parasitos mantidos em cultura por longos períodos (SOARES *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2009). Pelo fato destas cisteína peptidases serem conhecidas como importantes fatores de virulência, as mesmas se destacam como alvos de desenvolvimento de novas drogas e candidatas a vacinas.

## 7. Calpaínas

Calpaínas são cisteínas peptidases neutras dependentes de cálcio, que têm sido amplamente estudadas em mamíferos, existindo em duas principais isoformas,  $\mu$ -calpaína (Calpaína I) e m-calpaína (Calpaína II), que requerem concentrações de cálcio micro e milimolares, respectivamente, para sua ativação (Figura 8). Essas são proteínas

heterodiméricas, consistindo de uma subunidade maior (80kDa) e de uma subunidade menor (28kDa). A subunidade maior é ainda dividida em quatro domínios. O domínio (I) é a porção N-terminal da proteína com função ainda desconhecida, sabe-se que este domínio sofre autoproteólise quando as calpaínas são ativadas por cálcio, mas isto não é um pré-requisito para sua ativação. O domínio (II) corresponde ao centro catalítico da enzima, caracterizado pela presença da tríade catalítica conservada contendo os aminoácidos cisteína, histidina e asparagina que formam um sítio ativo na presença de cálcio, assim como dois sítios de ligação ao cálcio. Através de análises cristalográficas, este domínio foi subdividido em IIa (Cys) e IIb (His e Asn) (CAMPBELL & DAVIES, 2012). O domínio (III) é conector entre os domínios II e IV, e o domínio (IV) contém cinco motivos EF-Hand de ligação ao cálcio, que são essenciais para a atividade enzimática e a dimerização com a subunidade menor (GOLL *et al.*, 2003, HOSFIELD *et al.*, 1999). A subunidade menor (28kDa), regulatória, apresenta dois subdomínios, o domínio (V) rico em glicina, hidrofóbico, que pode interagir com a membrana plasmática e pode sofrer autoproteólise durante a ativação das calpaínas, e o domínio (VI), que é homólogo ao domínio (IV) da subunidade maior que contém os cinco motivos de ligação ao cálcio (EF-Hand) (Figuras 8 e 9) (STORR *et al.*, 2011; GOLL *et al.*, 2003; CARAFOLI & MOLINARI, 1998).

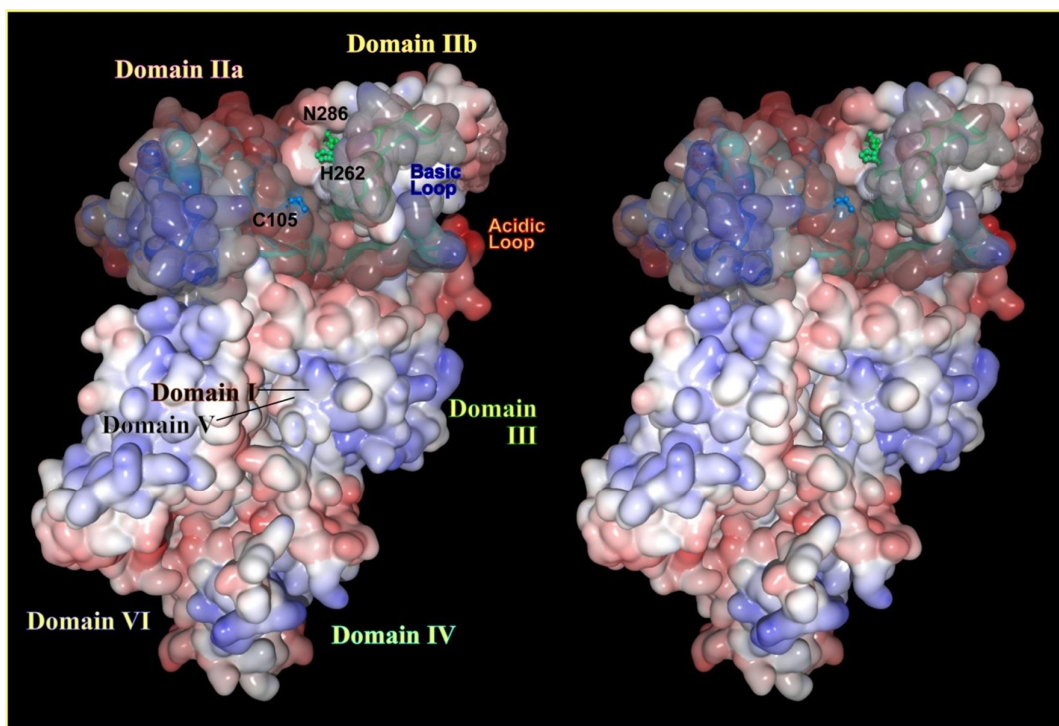
As calpaínas são divididas em dois grupos principais: calpaínas típicas (clássicas) e atípicas (não clássicas). No primeiro grupo, a calpaína-tipo é encontrada em mamíferos, com a estrutura descrita acima, que possui quatro domínios típicos na subunidade maior. O grupo das atípicas inclui uma gama de calpaínas que podem possuir desde apenas um dos domínios até a presença de domínios adicionais característicos de outras famílias. Este grupo inclui diversas subfamílias, das quais destacamos as melhor caracterizadas, que são os membros da subfamília PalB, que incluem os fungos e leveduras, enquanto os membros da subfamília SOL, que foram descritas em *Drosophila melanogaster*, e algas verdes. Aparentemente, as calpaínas estão presentes em todos os ramos da vida, portanto, a existência de moléculas homólogas a calpaínas numa ampla variedade de organismos sugere uma função básica e essencial em eventos fisiológicos celulares (CARAFOLI & MOLINARI, 1998; BRANQUINHA *et al.*, 2013).

A atividade das calpaínas em mamíferos é rigorosamente controlada pelo inibidor endógeno calpastatina, que é capaz de inibir a atividade por ligação reversível, somente na presença de cálcio. Até a presente data, ainda não ficou claro o mecanismo de inibição da calpastatina, e nem como as mudanças nas concentrações de cálcio

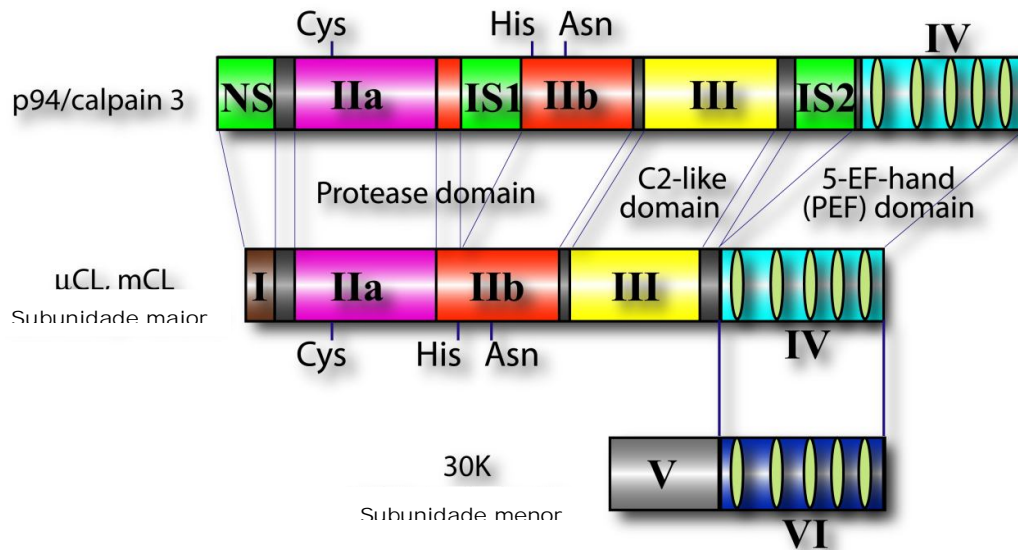


facilitariam a ligação do inibidor. As calpaínas clivam seletivamente as proteínas em respostas a sinais de cálcio, assim controlam funções celulares, tais como remodelação do citoesqueleto, a progressão de ciclo celular, expressão gênica e morte celular por apoptose (HANNA *et al.*, 2008).

Nesse contexto, com a variedade de funções fisiológicas, acredita-se que as calpaínas estejam envolvidas em algumas doenças humanas. A desregulação da atividade de calpaínas está envolvida em algumas doenças neurológicas como Alzheimer, Huntington, Parkinson e esclerose múltipla, também traumatismo craniano, isquemia, câncer, distrofia muscular, cataratas e diabetes (SAEZ *et al.*, 2006).



**Figura 8.** Representação da estrutura tridimensional da m-calpaína humana (mili-calpaína) na ausência de cálcio, forma inativa. À esquerda, a m-calpaína com seus respectivos domínios e a direita a mesma estrutura sem a identificação dos seus respectivos domínios (CaMPDB: Calpain for Modulatory Proteolysis – calpain.org).



**Figura 9.** Representação esquemática dos domínios de uma calpaína clássica. A calpaína específica do músculo esquelético, p94/CAPN3, é altamente semelhante a  $\mu$ - e m- calpaína. O domínio I (N-terminal), domínio IIa e IIb contendo o sítio ativo, domínio III de ligação entre os domínios II e IV, domínio IV que contém os cinco motivos de ligação ao cálcio (EF-hand), domínio V rico em glicina, e o domínio VI que também contém os cinco motivos de ligação ao cálcio (EF-hand). Os domínios NS, IS1 e IS2 são sequências específicas da p94/calpain3 (CaMPDB: Calpain for Modulatory Proteolysis – calpain.org).

## 8. Calpaínas em tripanossomatídeos.

O primeiro relato de atividade proteolítica relacionada com calpaínas em tripanossomatídeos ocorreu no gênero *Leishmania*, onde uma cisteína peptidase dependente de cálcio foi detectada nas formas promastigotas de *L. donovani*. A enzima foi denominada caldonopaína devido às suas características bioquímicas serem semelhantes às calpaínas, entretanto a reação cruzada com anticorpos contra calpaínas ou a determinação da sequência da proteína para análise de homologia nunca foi descrita, deixando dúvidas quanto à identidade da proteína (BHATTACHARYA *et al.*, 1993). O mesmo grupo detectou a atividade da proteína dependente de cálcio, caldonopaína, por eletroforese em gel. A análise de interação com macrófagos e *L. donovani* realizada *in vitro*, demonstrou que a ação do cálcio para a atividade da caldonopaína é um pré-requisito para facilitar a invasão dos parasitos nas células hospedeiras, sugerindo a participação de calpaínas (DEY *et al.*, 2006).

A análise de expressão gênica por *microarray*, demonstrou a existência de diferenças na expressão de genes de calpaínas em cepas de *L. donovani* isoladas de pacientes que haviam desenvolvido calazar e leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL). Foi encontrada uma calpaína com expressão aproximadamente duas vezes maior na cepa isolada de pacientes PKDL quando comparada com pacientes que apresentavam o quadro original de leishmaniose visceral, demonstrando que as calpaínas tem algum papel relevante nesses processos patológicos (SALOTRA *et al.*, 2006).

O tripanossomatídeo cuja caracterização de homólogos de calpaínas está mais avançado é o *Trypanosoma brucei*. Uma proteína associada ao citoesqueleto (CAP5.5) com similaridade com a região catalítica das calpaínas foi identificada neste protozoário, entretanto, não foi verificado se a proteína apresentava atividade enzimática (HERTZ-FOWLER, *et al.*, 2001). A CAP5.5 é detectada exclusivamente nas formas procíclicas do parasito e foi, de fato, o primeiro homólogo de calpaína caracterizado em tripanossomatídeos.

Posteriormente, o mesmo grupo descreveu em tripomastigotas metacíclicos a expressão aumentada de uma variante análoga desta proteína, denominada CAP5.5V. Através do silenciamento das duas proteínas e análises ultraestruturais, foi demonstrado que CAP5.5 e CAP5.5V estão relacionadas à correta morfogênese do *T. brucei* (OLEGO-FERNANDEZ *et al.*, 2009). Um estudo mais recente sobre expressão e localização celular de homólogos de calpaínas em *T. brucei* demonstrou uma expressão diferenciada de alguns genes homólogos de calpaínas, por qPCR, nas formas procíclica e tripomastigotas sanguíneos. Com relação à localização celular nas diferentes formas evolutivas do parasito, também foram demonstrados homólogos de calpaínas (LIU *et al.*, 2010).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou a presença de homólogos das calpaínas em tripanossomatídeos monoxênicos. Em um estudo com *Angomonas deanei* (cepa apossimbiótica), previamente classificada como *Crithidia deanei*, ao investigar as proteínas secretadas para o meio extracelular, foi identificada uma cisteína peptidase de aproximadamente 80 kDa. Esta mesma peptidase foi purificada e totalmente inibida por E-64 e EGTA, apresentando características bioquímicas da família de calpaínas. Além disso, a proteína purificada apresentou reatividade cruzada com um anticorpo que reconhece a família de calpaínas de *D. melanogaster* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2003).

Em *L. amazonensis*, nosso grupo também demonstrou uma proteína de aproximadamente 80 kDa, com reatividade cruzada contra o mesmo anticorpo. Além

disso, foi demonstrada a ação do inibidor de calpaínas MDL28170, nas formas promastigotas do parasito, induzindo alterações estruturais e alteração na taxa de multiplicação do parasito (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006).

Apesar de alguns estudos identificarem homólogos de calpaínas em tripanossomatídeos, ainda há necessidade de estudos mais detalhados sobre suas características bioquímicas, função, localização celular e expressão gênica. Por exemplo, existem cerca de 33 genes de calpaínas anotados no genoma de *L. braziliensis*. Até o momento, não existem dados acerca da expressão dessas moléculas, nem um levantamento ostensivo de suas características por análises *in silico*.

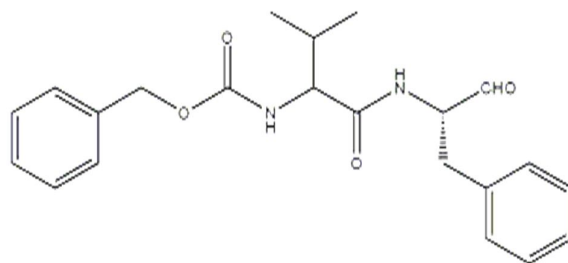
## 9. O inibidor de calpaínas MDL28170.

O inibidor de calpaínas MDL28170 (Z-Val-Phe-CHO) utilizado neste estudo, também conhecido como inibidor III de calpaínas, apresenta alta permeabilidade à membrana e mecanismo de ação reversível. A estrutura química está representada na Figura 10.

Em *T. cruzi*, foram demonstrados moléculas similares às calpaínas por análises de *Western blotting*, migrando em uma faixa de 80 kDa, utilizando o anticorpo que reconhece calpaínas de *D. melanogaster*. Também foi avaliado o efeito tripanostático do inibidor MDL28170 em três linhagens diferentes de *T. cruzi* (SANGENITO *et al.*, 2009). Em outro trabalho com *T. cruzi*, foi possível demonstrar o efeito do inibidor MDL28170 sobre as formas clínicas relevantes, amastigotas e tripomastigotas sanguíneas, através de ensaios com macrófagos peritoneais murinos *in vitro*. Portanto, foi possível verificar a diminuição da taxa de infecção de macrófagos murinos através de diferentes tratamentos utilizando o inibidor MDL28170. Moléculas homólogas às calpaínas também estão envolvidas com a interação com o inseto vetor, *Rhodnius prolixus*, com o processo de metaciclogênese e provocam desorganizações ultraestruturais em algumas organelas (ENNES-VIDA *et al.*, 2010, 2011). Através de análises por imunocitoquímica, foi possível determinar que essas moléculas são abundantemente detectadas no citoplasma, e na face interna da membrana plasmática, apesar de marcações pontuais indicarem a presença de moléculas calpaínas-like na superfície celular (ENNES VIDA *et al.*, 2011).

Em promastigotas de *L. amazonensis*, foi avaliado o efeito do inibidor MDL28170, em diversos aspectos da biologia do parasito. O inibidor interfere com a

viabilidade e proliferação celular, já por microscopia eletrônica de transmissão, foi demonstrado que o inibidor induz alterações ultraestruturais significativas como: perda da integridade da membrana nuclear, vacuolização no citoplasma, padrão alterado de condensação da cromatina, encurtamento do flagelo e arredondamento celular. Além disso, algumas características de apoptose foram detectadas, como a redução da viabilidade, alteração no potencial de membrana mitocondrial, externalização de fosfatidilserina, suspensão do ciclo celular e fragmentação do DNA (MARINHO *et al.*, 2014).



**Figura 10.** Estrutura química do inibidor de calpaína MDL28170 ([http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/smi\\_summary?mid=J00044](http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/smi_summary?mid=J00044))

## 10. Inibidores proteolíticos

A utilização das peptidases dos tripanossomatídeos como alvo terapêutico tem sido amplamente explorada, visando o bloqueio de funções biológicas, já que as peptidases destes parasitos têm funções específicas para o ciclo de vida, como patogênese (YAO 2011; VERMELHO *et al.*, 2007; MCKERROW *et al.*, 1993). A terapia atual usada para tripanossomatídeos apresenta elevada toxicidade, aumento da resistência pelos micro-organismos e alto custo dos compostos. Por estas razões, se faz necessário o desenvolvimento de novas drogas anti-tripanosomatídeos. Novas abordagens visam o bloqueio de funções biológicas nestes parasitos, e uma destas propostas está baseada no uso de inibidores proteolíticos.

## II. Objetivos

### Objetivo geral:

O presente trabalho tem como objetivo geral verificar a expressão gênica e detectar moléculas similares às calpaínas em *L. braziliensis* e avaliar a influência do inibidor de calpaínas, MDL28170, sobre a taxa de proliferação e expressão de moléculas homólogas às calpaínas destes flagelados.

### Objetivos específicos:

#### **Parte 1: Análise de expressão gênica e verificação de homólogos de calpaínas em *L. braziliensis* (cepa Thor MCAN/BR/1998/619).**

1. Avaliar a presença de calpaínas peptidases no genoma de *L. braziliensis*, através de análises *in silico*;
2. Avaliar a expressão de RNAm dos genes nas formas promastigotas procíclica e metacíclica através de iniciadores específicos para os genes selecionados de *L. braziliensis* por qPCR;
3. Detectar os homólogos de calpaínas peptidase em *L. braziliensis* através de *Western blotting* e citometria de fluxo;
4. Localizar as calpaínas no corpo do parasito utilizando imunocitoquímica ultraestrutural;

#### **Parte 2: Análise da ação do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre as formas promastigotas recém isolada e de múltiplas passagens de *L. braziliensis* (cepa Thor MCAN/BR/1998/619).**

5. Avaliar os efeitos do inibidor de calpaínas, MDL 28170, sobre a taxa de proliferação das formas promastigotas de *L. braziliensis* e determinar o valor de IC<sub>50</sub>;
6. Analisar se o inibidor possui ação leishmanicida ou leishmanistática sobre promastigotas de *L. braziliensis*;

7. Avaliar os níveis de expressão de peptidases nas formas promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com o inibidor, através de ensaios de citometria de fluxo com o anticorpo anti-calpaína;

8. Analisar os efeitos do inibidor de calpaínas durante o processo de interação da infecção dos macrófagos por formas promastigotas de *L. braziliensis*.

### III. Metodologia

#### **Parte 1: Análise de expressão gênica e verificação de homólogos de calpaínas em *L. braziliensis* (cepa Thor MCAN/BR/1998/619).**

**a) Verificação da presença de calpaínas peptidases no genoma de *L. braziliensis* através de análises *in silico*:** A identificação de calpaínas peptidases foi feita através de varreduras no genoma de *L. braziliensis* disponíveis na base de dados do tritrypdb (<http://tritrypdb.org>) utilizando duas abordagens complementares. As buscas dos genes de calpaínas no genoma foram feitas localmente utilizando os programas do Blast e HMMER. A partir de sequências previamente identificadas, foi criado um modelo utilizando o HMMModel posteriormente calibrado pelo HMMcalibrate. Após a elaboração do modelo HMM, foi feita a busca com o HMMsearch na base de dados de proteínas do organismo. Paralelamente, foi realizada uma busca utilizando as ferramentas do pacote do Blast. Utilizamos principalmente o BlastX e o tBlastn para analisarmos as proteínas e genoma da espécie em estudo. As sequências obtidas foram consideradas como calpaínas peptidases por similaridade com sequências já descritas de outros organismos como em ratos e humanos. Para tal, foi considerado o valor de corte do e-value de  $10^{-10}$ . As sequências obtidas com ambas as estratégias foram comparadas por alinhamentos múltiplos utilizando o programa MAFFT para podermos identificar e remover possíveis sequências redundantes.

**b) Classificação e análise das sequências pertencentes às famílias multigênicas e desenho de iniciadores específicos:** As sequências obtidas foram alinhadas para a identificação do grupo funcional baseado nos domínios conhecidos de 20 calpaínas peptidases (Tabela 2), utilizando o programa SMART ([smart.embl-heidelberg.de](http://smart.embl-heidelberg.de)). As sequências que possuíam do domínio II foram selecionadas para o desenho de oligonucleotídeos com objetivo de análise da expressão gênica. Os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando o programa primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) otimizados para uso em PCR em tempo real e conferidos tanto com as demais sequências de calpaínas peptidases, quanto contra os respectivos genomas para garantir a especificidade das PCRs.



**c) Centrifugação diferencial por gradiente de densidade para separação das formas procíclicas e metacíclicas de *L. braziliensis*:** Linfonodos e patas de hamsters infectados com *L.braziliensis* cepa Thor(MCAN/BR/1998/619) foram mantidos a 28°C em meio Schneider pH 7,0 (Schneider Insect Medium-Sigma), suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e acrescido de gentamicina (40 µg/ml), para indução da diferenciação das formas amastigotas sequestradas no órgão linfóide, ou na lesão, em promastigotas (CEUA/044/2009 – Comitê de ética de uso de animais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro). As formas promastigotas recém diferenciadas foram mantidas em cultura até a fase estacionária de crescimento celular, foram centrifugadas a 3000 × g por 10 min e ressuspendidas em meio Schneider. Em seguida, foi adicionado às células ficoll 20% e meio RPMI 10X para nova centrifugação (1300 × g por 10 min). Após esta centrifugação, o tubo fica dividido em três fases: sobrenadante; ficoll 20%; e pellet, onde estão concentradas as formas procíclicas. O sobrenadante passa por uma nova centrifugação a 3000 × g por 10 min, concentrando agora as formas metacíclicas do parasito (adaptado de SPATH *et al.*, 2001). As células foram analisadas em citometro de fluxo quanto a sua granulidade e tamanho, conforme descrito a seguir.

**d) Purificação do produto de PCR e sequenciamento:** Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados (A ciclagem da reação: desnaturação inicial 95°C/5 min; desnaturação 95°C/30seg; anelamento 65°C/30seg; síntese 72°C/30seg; síntese terminal 72°C/10min) através de coloração com Gel Red (Biotium) e separação eletroforética em géis de agarose 1,5% em cuba horizontal, preparados em Tris 0,089 M, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,02 M, ácido bórico 0,089 M, por 50 min à 90V. Os géis foram analisados e as imagens registradas através de um sistema fotográfico de documentação em gel – UVP *Bioimaging Systems*. A purificação dos produtos da reação de PCR foi realizada através de kit de purificação Illustra™ GFX (Ge Healthcare), utilizando o protocolo do fabricante. O sequenciamento foi realizado em um equipamento ABI 3730, disponível na plataforma de sequenciamento PDIIS/Fiocruz. A reação de sequenciamento foi realizada com uso do kit de extração BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems), utilizando a reação padrão com 2 µL de DNA molde (5-20 ng), 1 µL de Tampão Applied Biosystems 5×, 1 µL de BigDye (Applied Biosystems) e água Milli-Q, qsp 10 µL. A ciclagem da reação consistiu em 35 ciclos de 96 °C por 15 s, 50

°C por 10 s e 60 °C por 4 min. A precipitação das amostras foi realizada com acetato de sódio-EDTA 0,8 M, etanol 70%. Após a secagem, as amostras foram entregues à plataforma onde foi feita a etapa do sequenciamento do DNA.

**e) Avaliação da expressão de RNAm dos genes relacionados às calpaínas nas formas procíclica e metacíclica de *L. braziliensis* por PCR em Tempo Real:** Os níveis de expressão dessas peptidases nas formas procíclica e metacíclica de *L. braziliensis* foram comparados por RT-PCR acoplado a PCR em tempo real. Apesar de não haver controle transcricional nestes protozoários, mecanismos de estabilização das moléculas de RNAm parecem estar envolvidos com o aumento da meia-vida do RNAm e com os níveis traducionais das proteínas. Assim, o RNAm previamente isolado pelo uso da metodologia do Trizol foi convertido a DNA complementar pela reação da transcriptase reversa, incubando-se o RNA com oligonucleotídeos aleatórios ou um iniciador poli-(d)T. A ciclagem da reação consistiu em uma desnaturação inicial à 95°C por 5 min, seguida de 38 ciclos de 95°C por 30 s, 65°C por 30s e 72°C por 30s, e uma extensão final de 72°C por 10min. Posteriormente, as amostras foram diluídas e utilizadas na reação em tempo real, de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o reagente 'SYBR Green PCR Master Mix'. As reações em tempo real foram realizadas em um sistema ABI Prism 7500 FAST, disponível em nosso laboratório pela Plataforma de PCR em Tempo Real PDTIS/FIOCRUZ (PITALUGA *et al.* 2009).

**f) Produção de anticorpos a partir da síntese de peptídeo das regiões consenso de diversas calpaínas:** Peptídeos correspondentes a sequências conservadas das calpaínas, LEKAYAKLHGSY, foram sintetizados e utilizados na imunização de coelhos para obtenção de anticorpo policlonal. A imunogenicidade destes peptídeos foi avaliada com o algoritmo de Hopp e Woods (HOOP & WOODS, 1981) (<http://www.bioinformatics.org/JaMBW/3/1/7/>). Os peptídeos foram encomendados e utilizados para obtenção de anticorpo policlonal (anti-Try/Trip CALPAIN) através da empresa Rhea Biothech Ltda (Campinas, SP, Brasil) (TELLERIA *et al.*, 2010).

**g) Identificação dos homólogos de calpaína em *L. braziliensis* através de Western blotting citometria de fluxo:** O extrato total das formas promastigotas dos parasitos foi separado através de SDS-PAGE 12% (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006), e transferidas

para membrana de nitrocelulose, que foi bloqueada por 1h com PBS suplementado com BSA 1% e Tween 20 0,05%. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas por 2 h com o anticorpo policlonal obtido (anti-TryTrip CALPAIN). O anticorpo foi diluído em PBS (1:100). As membranas foram lavadas para remoção de anticorpos não ligados, e incubadas por 1 h com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à enzima peroxidase. As membranas foram lavadas mais uma vez para remoção de anticorpos não ligados e reveladas por quimiluminescência (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006). Na citometria de fluxo, as células ( $10^6$  células/ml) foram fixadas em PBS contendo paraformaldeído 1%. Alternativamente, um sistema de células ( $3 \times 10^6$  células/ml) foi permeabilizada em Triton X-100. Em seguida, as células foram lavadas e sequencialmente incubadas com o anticorpo primário descrito acima. Os anticorpos anti-C21, anti-C23 e anti-C24 (reativos contra a molécula inteira; a cisteína do sítio ativo; e a histidina do sítio ativo de m-calpaína de cérebro humano, respectivamente), cedidos pelo Dr. Ralph Nixon (McLean Hospital, Harvard Medical School, USA) (GRYNSPAN *et al.*, 1997). O anti-CDPIIb (reativo contra uma das quatro cisteína peptidases dependentes de cálcio de *Homarus americanus*) (BEYETT, EMORI & MYKLES, 1996) cedidos pelo Dr. Donald M. Mykles (Department of Biology, Cell and Molecular Biology Program and Program in Molecular, Cellular and Integrative Neurobiology, Colorado State University, USA). O anticorpo secundário marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). As células foram lavadas, ressuspensas em PBS e submetidas à citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). Foram analisadas no mínimo 10.000 células por sistema (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006).

**h) Imunolocalização das calpaínas na forma promastigota do parasito:** As células foram lavadas em PBS, fixadas por 60 minutos em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 contendo glutaraldeído 0,1%, paraformaldeído 2% e ácido pícrico 0,1%, e em seguida desidratadas em concentrações crescentes de metanol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (30% - 100%). As células foram infiltradas em Lowicryl misturada com metanol 100% a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A polimerização da resina foi realizada em cápsulas BEEM durante cinco dias a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  sob ação de luz ultra violeta. Os cortes ultrafinos obtidos em grades de níquel com o anticorpo policlonal primário (anti-TryTrip CALPAIN) diluído em solução de bloqueio contendo BSA 3% por 2 horas. Após lavagem em PBS em solução de bloqueio, os

cortes ultrafinos foram incubados por 1 hora com anticorpo secundário conjugado a partículas de ouro coloidal de 10 nm. Após lavagem em PBS e água destilada, as amostras foram contrastadas em acetato de uranila para observação em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss, EM 900) (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2008; ENNES-VIDAL, dados não publicados).

**Parte 2: Análise da ação do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre promastigotas de *Leishmania braziliensis* recém isoladas e após múltiplas passagens (cepa Thor MCAN/BR/1998/619)**

**a) Efeito do inibidor de calpaínas sobre a taxa de proliferação de promastigotas recém isoladas e após múltiplas passagens:** As promastigotas de *L. braziliensis* foram quantificadas, utilizando a câmara de Neubauer, e ressuspensas em meio Schneider (pH 7,0) a uma concentração final de  $1,0 \times 10^6$  células viáveis/ml. O inibidor de calpaínas foi adicionado às culturas em concentrações finais de 1,25; 2,5; 5; 10 e 20  $\mu$ M (partindo de uma solução estoque a 5 mM em dimetilsulfóxido-DMSO). Adiluição de DMSO correspondente à utilizada para preparar a maior concentração do inibidor foi usada como controle. A taxa de multiplicação foi monitorada por quatro dias *in vitro*, o número de parasitos viáveis foi quantificado em câmara de Neubauer. O IC<sub>50</sub>, que se refere à concentração que causa uma redução em 50% da sobrevivência dos parasitos em comparação à curva de crescimento controle, foi calculado durante os quatro dias através da regressão linear do número de promastigotas viáveis versus o logaritmo da concentração de MDL28170 utilizando o programa Excel.

**b) Avaliação do efeito reversível do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a taxa de multiplicação de promastigotas recém isoladas e múltiplas passagens de *L. braziliensis*:** Alternativamente, os parasitos crescidos pelo mesmo tempo (48 h), na ausência ou na presença do inibidor de calpaínas (utilizado IC<sub>50</sub> e o dobro do IC<sub>50</sub>), foram lavados três vezes (meio Schneider pH 7,0) e ressuspensos em meio Schneider pH 7,0 (Schneider Insect Medium-Sigma) fresco, suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e acrescido de gentamicina (40  $\mu$ g/ml), na ausência do inibidor. Após 48 h de incubação a 28°C, foi avaliada a taxa de multiplicação que foi monitorada por quatro dias *in vitro*, o número de parasitos viáveis foi quantificado em câmara de Neubauer.

**c) Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a expressão de peptidases em promastigotas recém isoladas e múltiplas passagens de *L. braziliensis*:** Promastigotas de *L. braziliensis* ( $1 \times 10^6$  células/ml) incubados na presença ou na ausência do inibidor de calpaínas a  $7 \mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) e  $14 \mu\text{M}$  (dobro do  $\text{IC}_{50}$ ) por 48 h. foram lavados e fixados durante 30 minutos à temperatura ambiente em paraformaldeído 1 % diluído em PBS. Alternativamente, um sistema de células ( $3 \times 10^6$  células/ml) foi permeabilizada com Triton X-100. Após fixação, as células foram lavadas três vezes em PBS gelado. Os parasitos fixados foram analisados por microscopia óptica para observação da integridade morfológica. Os parasitos foram então incubados por 2 h com os anticorpos primários policlonais anti-Trytrip CALPAIN (diluído 1:100), anti-cpb de *L. mexicana* (reativo contra cisteína peptidase b de *L. mexicana* – cedido pela Dra. Mary Wilson, Departamento de Medicina, Bioquímica, Microbiologia e Epidemiologia, Programa em Biologia Molecular, Universidade de Iowa, USA) e anti-gp63 (reativo contra gp63 recombinante de *L. mexicana* – cedido pelo Dr. Kwang-Poo Chang, Universidade de Ciências da Saúde, Chicago Medical School, USA), ambos diluídos 1:500. Após este período, as células foram lavadas extensivamente em PBS e incubadas com o anticorpo secundário (IgG) conjugado à isotiocianato de fluoresceína (FITC) na diluição de 1:750. Finalmente, as células foram lavadas e examinadas por citometria de fluxo. Células não tratadas e tratadas somente com o anticorpo secundário foram utilizadas como controles negativos. As células foram ressuspensas em PBS e submetidas ao citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). Foram analisadas no mínimo 10.000 células por sistema (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006).

**d) Obtenção de macrófagos peritoneais de hamsters:** Os macrófagos foram obtidos de hamsters com aproximadamente 3 meses de idade (CEUA LW16/13), através da lavagem da cavidade peritoneal utilizando-se meio RPMI 1640 pH 7,2 (Sigma). Os macrófagos peritoneais ( $5 \times 10^5$  células) foram plaqueados em lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro em placa de 24 poços. Para aderência das células, as placas foram incubadas por 1 h a  $37^\circ\text{C}$  em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e, posteriormente, as monocamadas foram lavadas com PBS a  $37^\circ\text{C}$  para remoção das células não-aderentes e incubados novamente em meio RPMI 1640.

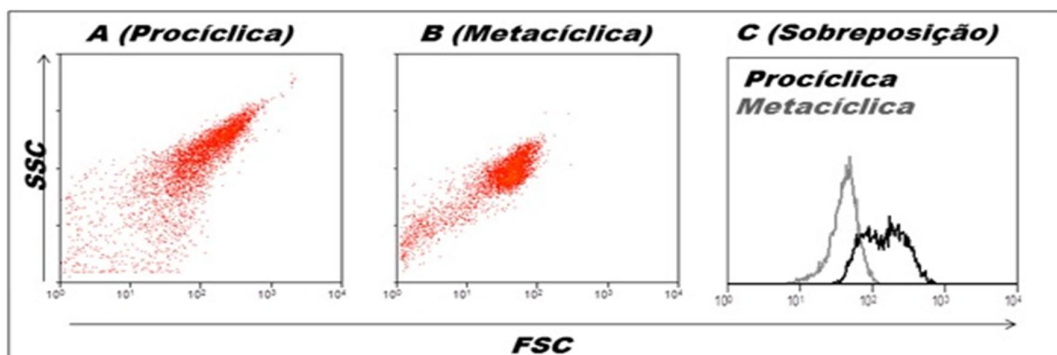
**e) Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a interação de *L. braziliensis* com macrófagos peritoneais (Pré-tratamento):** Os parasitos na fase estacionária de crescimento foram pré-tratados por 1 h na presença do inibidor de calpaínas nas concentrações referentes à metade do IC<sub>50</sub> (3,5 µM), IC<sub>50</sub> (7 µM), e o dobro do IC<sub>50</sub> (14 µM) referente ao ponto de 48 h, depois de lavados, foram incubados com macrófagos peritoneais na proporção protozoário: célula hospedeira de 1:1. A interação foi realizada por 1 h a 37 °C em atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>. Após este período, os protozoários não-aderidos foram removidos por lavagens sucessivas em PBS (pH 7,2). As monocamadas foram imediatamente fixadas em metanol absoluto, coradas com Panótico, desidratadas em soluções de acetona progressivamente substituídas por xilol. O número de células internalizadas e a porcentagem de macrófagos infectados foram determinados por contagem de pelo menos 100 células por lâminas em triplicatas (SANTOS *et al.*, 2009).

## IV. Resultados

### Parte 1:

#### 4.1. Análise da separação das formas procíclica e metacíclica de *L. braziliensis*.

As formas evolutivas de *L. braziliensis* escolhidas para análise da expressão gênica foram as formas promastigotas procíclica e metacíclica. A obtenção de ambas as formas foi realizada através de gradiente de densidade a partir do cultivo em meio axênico em fase estacionária (adaptado de SPATH *et al.*, 2001). As células separadas pelo gradiente foram analisadas por citometria de fluxo e as duas populações correspondentes às formas procíclicas e metacíclicas foram diferenciadas pela morfologia celular (Fig. 11). Estas formas foram utilizadas nas análises de expressão gênica, conforme descrito a seguir.



**Figura 11:** Análise da separação das formas procíclicas e metacíclicas de *L. braziliensis*. *Dot blot* ilustrativo da citometria de fluxo das formas procíclicas (A) e metacíclicas (B) obtidas através da separação por gradiente de ficoll. Sobreposição das populações baseada no FSC. (C) A linha cinza corresponde à população de metacíclicos e a linha preta corresponde à população de procíclicos. FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*).

#### 4.2. Análise da identidade dos fragmentos amplificados com os iniciadores desenhados para as calpaínas.

O grupo das calpaínas selecionado para o estudo de expressão gênica a partir de análises *in silico* possui 20 sequências (Tabela 2). Este grupo foi selecionado por

possuir o domínio II conservado. Este domínio é o que possui a tríade catalítica e é o domínio-tipo das calpaínas. Entretanto, em tripanossomatídeos, poucas sequências possuem a tríade catalítica conservada. No grupo em estudo, apenas quatro calpaínas possuem a tríade conservada. As calpaínas típicas possuem quatro domínios principais, representados esquematicamente na Figura 12.

A) Calpaínas típicas



B) Calpaínas atípicas



**Figura 12:** Estrutura esquemática das calpaínas típicas (A), classicamente descritas em mamíferos, e das calpaínas atípicas (B) encontradas em nossas análises. O triângulo invertido azul representa o domínio I (dI), o trapezóide invertido amarelo o domínio II (dII), o trapezóide invertido vermelho o domínio III (dIII), o retângulo de pontas arredondadas roxo o domínio IV (dIV/EF-hand) e o retângulo verde a cauda C-terminal sem domínios. Os dois pequenos sítios de ligação ao cálcio no domínio II representados pelas estrelas pretas, assim como a tríade catalítica representada pelos três losangos lilás, estão presentes nas calpaínas típicas (A), mas não necessariamente nas calpaínas atípicas (B) selecionadas para o estudo.

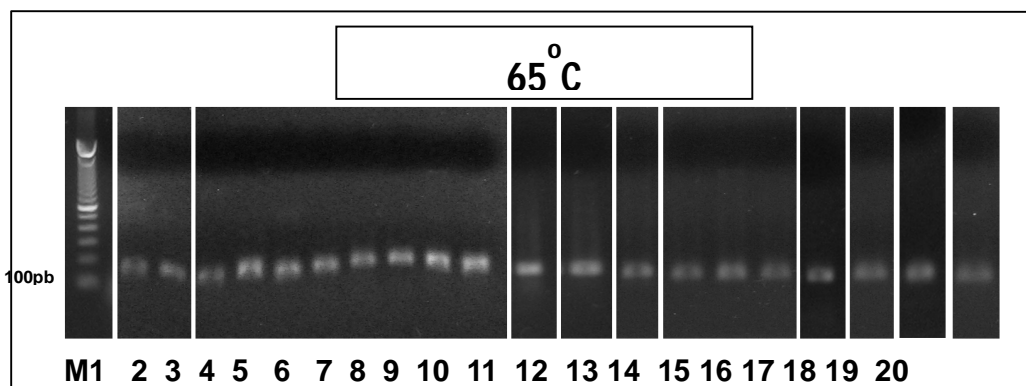
Os oligonucleotídeos (Tabela 2) foram testados *in silico* contra o genoma de *L. braziliensis* contra as demais calpaínas para garantir especificidade na PCR. Estes iniciadores foram utilizados para amplificação dos genes em estudo e geraram um fragmento único do tamanho esperado (Figura 13). Os segmentos de DNA amplificados foram purificados e sequenciados na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PDTIS/FIOCRUZ). Na Tabela 3 podemos verificar a análise do sequenciamento com a pontuação de *score*, *e-value* e identidade de cada gene selecionado.



**Tabela 2:** Iniciadores específicos dos 20 genes de calpaínas mais os dois endógenos (actina e proteína S8) selecionados para análise da expressão gênica.

Gene ID	Sequência senso	Sequência anti-senso
LbrM17_V2.1220	CGGCTACAACGCCTCCGTCT	AGTCCCTCCTGCTCCTCCGA
LbrM18_V2.1160	GGAGGCAGCTCAACTCCGGT	CATCCCAGCGCCAACACCC
LbrM20_V2.0290	TCGTCAGCGAAACGGAGGGG	ACGTACTCTCGCGTGCCAGG
LbrM20_V2.5430	GCGATGTGCGGGAGCTTTGG	ATGTCGTAGCGGGAGCACGG
LbrM30_V21.980	CTGTGCAAGGCAGACGTGCG	AGAAACGCTGCGAGCCCCAA
LbrM31_V2.0580	GCAACGCGCTTCTTTGCGCT	CGCCCTTTTCTGGGTGCGG
LbrM32_V2.1060	ACGGCAGTGGATCAGGGGTG	GCAGAAGCATCGCCTCGCAC
LbrM33_V2.2290	CGCTACGCTTTTGGTGGGGC	ACGACTCCGGCTTCCGGTTC
LbrM04_V2.0490	TGCAGGTGGAGATGGACGCC	ACTTGGATGCCCCGGAGTCG
LbrM20_V2.5380	GACAGGCAGCGACAATGCGG	GCGGCTTGAACGGCTTTCCC
LbrM20_V2.5400	CAGGATGACAAGCGCGGCAC	GTACTCAGGCGACGGTGGT
LbrM20_V2.5410	GCTTTCCACATCGCGGCTG	GTTGCCGGGGTACTCAGCA
LbrM25_V2.1350	CCGCAACCATCCGAACGAGC	AAGTCGTAGCCGGGAAGCC
LbrM27_V2.0620	GCCTCATGGCGCAAGAACCC	GCATCCGGGTACAGAAAAGC
LbrM31_V2.0510	AGCGTGCTCTCGGTGCCTAC	GCAAATTCGGGGCCGTCGTG
LbrM31_V2.0520	GCAAGGTGCTCGGCAAGTGG	TCGGGCGGAAGTTGAGGTGCG
LbrM31_V2.0590	CGCAGGTGATGGTTTGCCCC	GCTGCCTTGGGTGCGACAAC
LbrM31_V2.0600	TGGGTTACGCTGGAGGCAGG	AGGCCATCACATACGGGCG
LbrM31_V2.0620	TATCCGCTGGAGACGCTGCC	TCGCCTCGCGGTGATCCTC
LbrM35_V2.0900	GAGGGGGAGGAAGAGAGGGC	ACCTCAGACGCTGCACGGAG
LbrM.04.1250 (actina)	GGAGGTGCTGTTCAAGCCGT	AGTAGAGCCGCCAGACAGGA
LbrM.24.2160 (8S)	CAGCAGCCACAAGGTCGAGAAG	GGTAGAACTGAAGTCCGCACC

O programa Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) foi utilizado para o desenho dos oligonucleotídeos específicos para a reação de quantificação relativa por PCR em tempo real. A especificidade dos iniciadores foi verificada pela pesquisa das sequências no genoma de *L. braziliensis* depositadas no TrytripDB.



**Figura 13:** Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando bandas específicas para *L. braziliensis* com 100 pb. Legenda- M: marcador de peso molecular; 1 a 20: LbrM17\_V2.1220, LbrM18\_V2.1160, LbrM20\_V2.0290, LbrM20\_V2.5430, LbrM30\_V2.1980, LbrM31\_V2.0580, LbrM32\_V2.1060, LbrM33\_V2.2290, LbrM04\_V2.0490, LbrM20\_V2.5380, LbrM20\_V2.5400, LbrM20\_V2.5410, LbrM25\_V2.1350, LbrM27\_V2.0620, LbrM31\_V2.0510, LbrM31\_V2.0520 respectivamente.

**Tabela 3:** Análise da identidade dos produtos amplificados pelos oligonucleotídeos sintetizados para amplificar as calpaínas selecionadas. As sequências obtidas foram analisadas por Blastn contra o genoma de *L. braziliensis*, os valores de *score*, *e-value* e identidade apresentada são referentes aos próprios genes de interesse.

Gene oligonucleotídeo	Nome do	Score	e-value / Identidade
LbrM17_V2.1220	LbrCALP1	113bits(61)	9e-23 64/65 (98%)
LbrM18_V2.1160	LbrCALP2	110 bits (59)	1e-21 67/70(69%)
LbrM20_V2.0290	LbrCALP3	91.6 bits(49)	3e-1652/53 (98%)
LbrM20_V2.5430	LbrCALP4	115 bits(62)	3e-23 62/62(100%)
LbrM30_V2.1980	LbrCALP5	108 bits (58)	4e-21 58/58(100%)
LbrM31_V2.0580	LbrCALP6	117 bits (63)	1e-23 66/67(99%)
LbrM32_V2.1060	LbrCALP7	78.7bits(42)	4e-12 57/64(89%)
<b>LbrM33_V2.2290</b>	<b>LbrCALP8</b>	124 bits (67)	5e-26 67/67(100%)
<b>LbrM04_V2.0490</b>	<b>LbrCALP9</b>	191 bits (103)	1e-45105/106(99%)
LbrM20_V2.5380	LbrCALP10	113 bits (61)	1e-22 64/65(98%)
LbrM20_V2.5400	LbrCALP11	102 bits (55)	2e-19 58/59(98%)
LbrM20_V2.5410	LbrCALP12	106 bits (57)	2e-20 60/61(98%)
<b>LbrM25_V2.1350</b>	<b>LbrCALP13</b>	117 bits (63)	7e-2463/63(100%)
LbrM27_V2.0620	LbrCALP14	108 bits (58)	4e-21 58/58(100%)
LbrM31_V2.0510	LbrCALP15	119 bits (64)	2e-24 64/64(100%)
LbrM31_V2.0520	LbrCALP16	110 bits (59)	1e-21 61/62(98%)
LbrM31_V2.0590	LbrCALP17	113 bits (61)	9e-23 64/65(98%)
LbrM31_V2.0600	LbrCALP18	108 bits (58)	5e-21 58/58 (100%)
<b>LbrM31_V2.0620</b>	<b>LbrCALP19</b>	117 bits (63)	8e-21 63/63(100%)
LbrM35_V2.0900	LbrCALP20	89.7 bits (98)	1e-15 55/59(93%)
LbrM.04.1250	Lbr Actin	124 bits (67)	5e-26 67/67(100%)
LbrM.24.2160Lbr 8S		111 bits (60)	3e-22 62/63 (98%)

Os genes destacados em negrito possuem a tríade catalítica conservada (LbrCALP 8, 9, 13 e 19).

### **4.3. Análise da expressão gênica relativa dos transcritos de calpaínas em *L.braziliensis*.**

O limiar de expressão diferencial foi estabelecido como um aumento de pelo menos quatro vezes na comparação entre as formas procíclica e metacíclica. A análise de expressão gênica relativa realizada por PCR quantitativo indica que 13 das 20 calpaínas estudadas apresentaram níveis constitutivos de RNAm em *L. braziliensis*, uma vez que não ultrapassam uma diferença de expressão de quatro vezes entre os dois morfotipos. Até o momento, a calpaína LbrM35\_V2.0900 (LbrCALP 20) apresentou expressão apenas na forma procíclica do parasito. A expressão de alguns alvos é maior na forma procíclica, como: LbrM33\_V2.2290 (LbrCALP 8), LbrM20\_V2.5380 (LbrCALP 10), LbrM31\_V2.0510 (LbrCALP 15), LbrM31\_V2.0520 (LbrCALP 16) e LbrM31\_V2.0590 (LbrCALP 17). Já a expressão de apenas um gene é pelo menos quatro vezes maior na forma metacíclica: LbrM20\_V2.5410 (LbrCALP 12).

**Tabela 4:** Análise da expressão gênica diferencial de calpaínas entre as formas procíclica e metacíclica de *L.braziliensis*.

Gene ID	Nome do oligonucleotídeo	Procíclica	Metacíclica
LbrM17_V2.1220	LbrCALP1	2,6	1
LbrM18_V2.1160	LbrCALP2	1	2,3
LbrM20_V2.0290	LbrCALP3	1	3,3
LbrM20_V2.5430	LbrCALP4	1	1,4
LbrM30_V21.980	LbrCALP5	1	1,6
LbrM31_V2.0580	LbrCALP6	1	2,0
LbrM32_V2.1060	LbrCALP7	1	1,3
LbrM33_V2.2290	LbrCALP8	9,6	1
LbrM04_V2.0490	LbrCALP9	1	1,1
LbrM20_V2.5380	LbrCALP10	7,3	1
LbrM20_V2.5400	LbrCALP11	1	1,7
LbrM20_V2.5410	LbrCALP12	1	10,2
LbrM25_V2.1350	LbrCALP13	1	1,2
LbrM27_V2.0620	LbrCALP14	1	1,6
LbrM31_V2.0510	LbrCALP15	7,0	1
LbrM31_V2.0520	LbrCALP16	5,8	1
LbrM31_V2.0590	LbrCALP17	8,8	1
LbrM31_V2.0600	LbrCALP18	3,3	1
LbrM31_V2.0620	Lbr CALP19	1,9	1
LbrM35_V2.0900	LbrCALP20	+	-

Em vermelho estão destacados os genes que apresentaram expressão diferencial. + e – indicam a presença e ausência, respectivamente, do transcrito do gene. As médias correspondem a um total de quatro experimentos de duas replicatas biológicas. Para facilitar a visualização foi determinado como 1 a menor expressão entre as formas.

#### 4.4.Obtenção de anticorpo contra região consenso das calpaínas.

A partir de alinhamentos múltiplos da sequência de aminoácidos das calpaínas de tripanossomatídeos, nosso grupo selecionou uma região consenso para síntese de peptídeo e imunização de coelho para obtenção de um anticorpo policlonal específico para o grupodas calpaínas selecionados para este estudo. A Tabela 5 mostra em quais

dos 20 genes sob estudo se encontra a sequência correspondente ao peptídeo consenso (LEKAYAKLHGSY). Na Tabela, é possível observar a massa molecular predita, o número de aminoácidos e a posição em que se encontra o peptídeo utilizado para produção do anticorpo. Entre os 20 alvos selecionados apenas dois não contêm o peptídeo consenso (LbrM17\_V2.1220 e LbrM33\_V2.2290).

**Tabela 5:** Genes selecionados com a indicação da região que contém o peptídeo utilizado para produção do anticorpo policlonal anti-TryTrip CALPAIN e a região onde este peptídeo está presente.

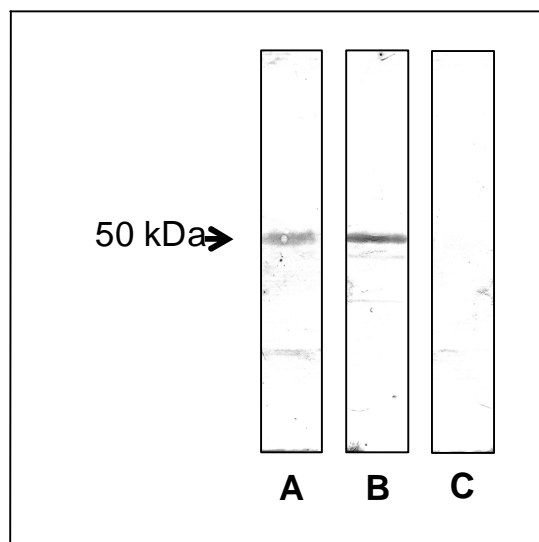
Gene	Nome do oligonucleotídeo	Massa molecular predita	Número de aminoácidos	Região que contém o peptídeo consenso
LbrM17_V2.1220	LbrCALP1	158.58kDa	1433	-
LbrM18_V2.1160	LbrCALP2	84.59kDa	758	329-335
LbrM20_V2.0290	LbrCALP3	174.21kDa	1557	308-311
LbrM20_V2.5430	LbrCALP4	59.97kDa	544	78-89
LbrM30_V2.1980	LbrCALP5	149.78kDa	1363	472-483
LbrM31_V2.0580	LbrCALP6	97.37kDa	890	453-464
LbrM32_V2.1060	LbrCALP7	200.49kDa	1890	1097-1111
LbrM33_V2.2290	LbrCALP8	151.85 kDa	1384	-
LbrM04_V2.0490	LbrCALP9	94.47kDa	856	433-444
LbrM20_V2.5380	LbrCALP10	91.29kDa	816	460-471
LbrM20_V2.5400	LbrCALP11	78.43kDa	687	315-326
LbrM20_V2.5410	LbrCALP12	83.03kDa	743	164-165 e 329-335
LbrM25_V2.1350	LbrCALP13	80.18kDa	705	315-325 e 532-537
LbrM27_V2.0620	LbrCALP14	60.45kDa	530	136-142
LbrM31_V2.0510	LbrCALP15	89.23kDa	783	103-108; 408-419 e 494-506
LbrM31_V2.0520	LbrCALP16	162.15kDa	1497	1047-1058
LbrM31_V2.0590	LbrCALP17	102.59kDa	947	559-570
LbrM31_V2.0600	LbrCALP18	53.74kDa	484	114-125
LbrM31_V2.0620	LbrCALP19	81.59kDa	714	328-339
LbrM35_V2.0900	LbrCALP20	122.26kDa	1131	603-613

A análise da massa molecular predita, e do número de aminoácidos foram realizadas com a ferramenta *Protein molecular weight*, disponível no site [www.bioinformatics.org](http://www.bioinformatics.org)

#### 4.5. Identificação dos homólogos de calpaína peptidase em *L. braziliensis* por *Western blotting*.

A reatividade do anticorpo gerado (Anti-TryTrip CALPAIN) foi avaliada por *Western blotting* contra o extrato total de *L. braziliensis* e *T. cruzi* (Fig. 14). O anticorpo reconheceu uma proteína de aproximadamente 50 kDa nas formas recém-isoladas de *L. braziliensis* (Fig. 14, linha B). O extrato total de amastigotas do *T. cruzi* foi utilizado como controle positivo (ENNES-VIDAL, dados não publicados) revelando uma banda

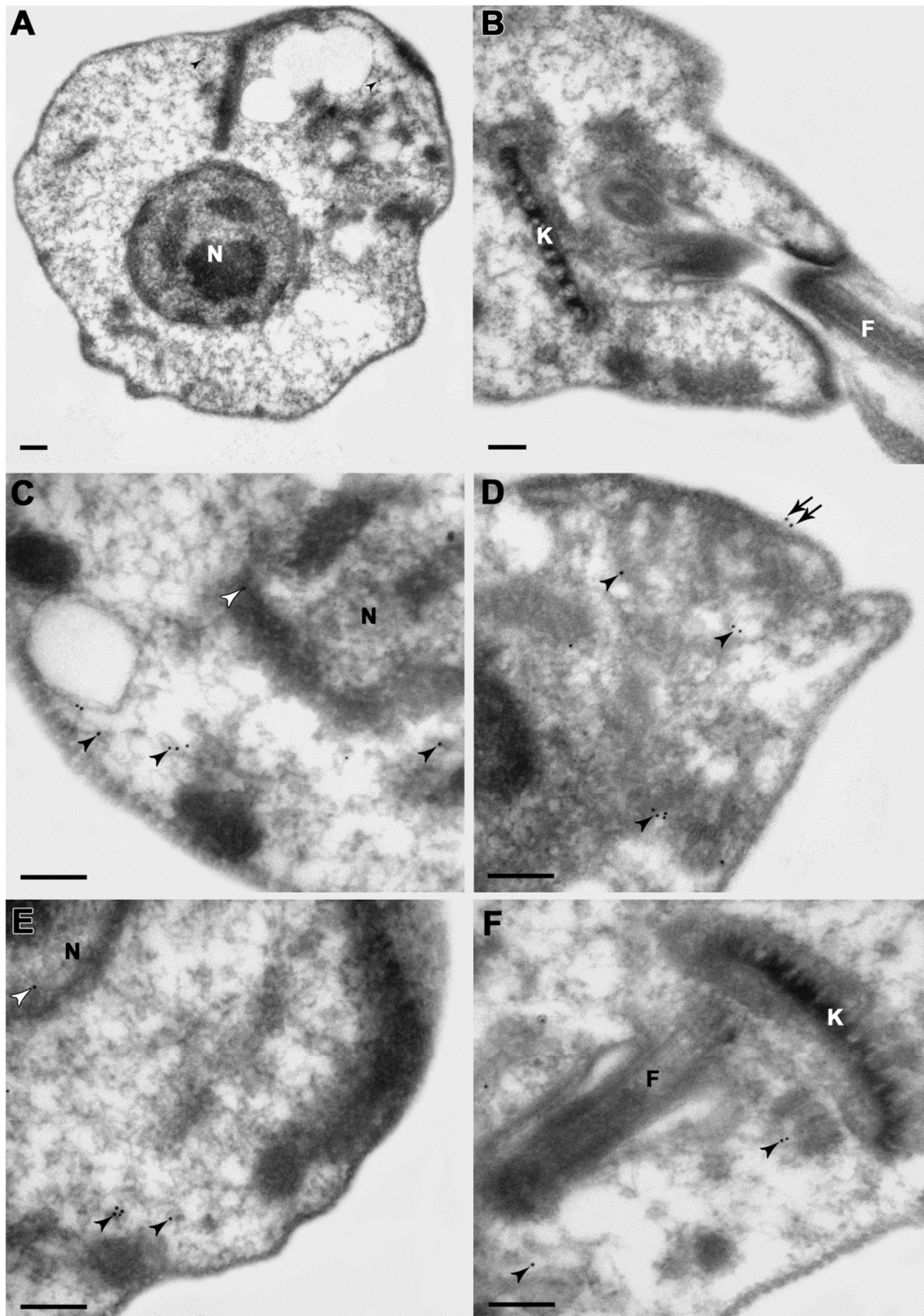
de aproximadamente 50 kDa (Fig. 14 linha A). O soro pré-imune não apresentou reatividade contra o extrato de *Leishmania* (Fig. 14 linha C).



**Figura 14.** Análise por *Western blotting* da reatividade dos polipeptídeos do extrato total de *L. braziliensis* *T. cruzi*, contra o anticorpo anti-TryTrip CALPAIN. Os polipeptídeos de *L. braziliensis* (B) e de *T. cruzi* (A), utilizado como controle positivo (A) foram separados por SDS-PAGE 12% e transferidos para uma membrana de nitrocelulose e marcados com anticorpo anti-TryTrip CALPAIN 1:250 (A, B) e soro pré-imune 1:250 (C). Posteriormente as membranas foram reveladas pelo DAB, segundo as instruções do fabricante. O número a esquerda indica a massa molecular expressa em kDa.

#### 4.6. Imunolocalização das calpaínas em *L. braziliensis*.

A Figura 15 apresenta imagens das formas procíclicas de *L. braziliensis* a fim de verificar a imunolocalização ultraestrutural das calpaínas no parasito com o anticorpo anti-TryTrip CALPAIN. A marcação demonstrou calpaínas dispersas no citoplasma, na membrana e no núcleo (Fig.15 C, D, E, F). A marcação apenas com o anticorpo secundário (Fig.15 A, B) apresentou pouca marcação, o que indica a especificidade do ensaio.



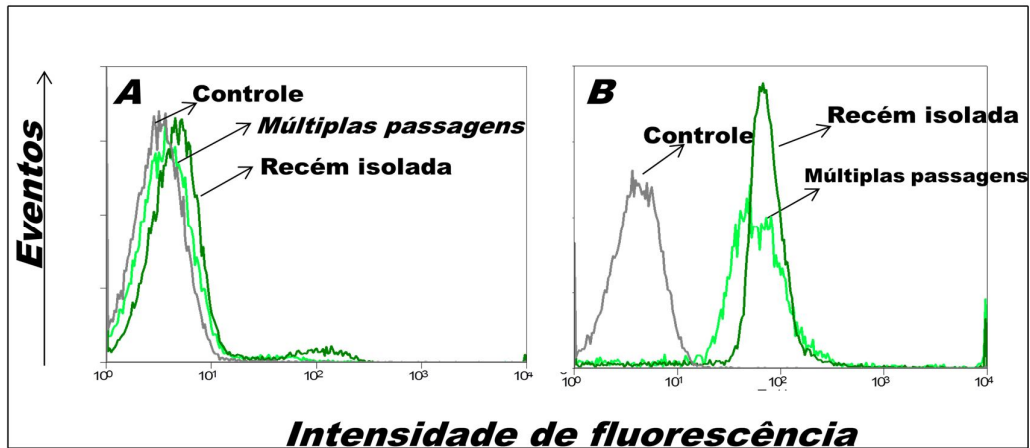
**Figura 15.** Imunocitoquímica ultraestrutural de calpaínas nas formas procíclicas de *L. braziliensis*. As células foram fixadas, desidratadas e emblocadas em Lowicryl. Após a polimerização, foram realizados cortes ultrafinos, que foram incubados com o anticorpo anti-TriTryp CALPAIN por 2 h (1:100), seguidos pela incubação com anticorpo secundário conjugado a partícula de ouro coloidal por 1 h (1:100). Após uma branda contrastação com

acetato de uranila, os cortes foram analisados em microscópio eletrônico de transmissão. (A, B) A apresentação da morfologia típica de tripanossomatídeos (N) núcleo, (K) cinetoplasto, (F) flagelo. A omissão do anticorpo primário apontou a presença de rara marcação inespecífica citoplasmática (cabeças de seta preta) nas células tratadas com o anticorpo secundário apenas. (C, D, E, F) As células incubadas com o anti-TryTrip CALPAIN indicam a marcação na membrana plasmática (seta preta), por todo citoplasma (cabeças de seta preta) e no núcleo (cabeças de seta branca). A Figura corresponde a uma imagem representativa de uma replicata biológica. Barra: 0,2 µm.

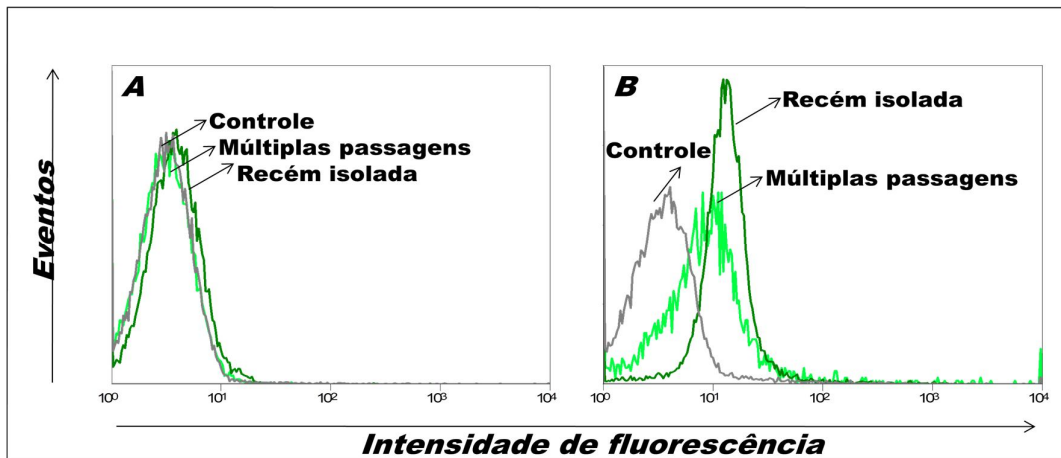
#### **4.7. Avaliação das diferenças nos níveis de expressão de moléculas similares acalpaínas em formas promastigotas recém isoladas e após múltiplas passagens *in vitro* através de citometria de fluxo.**

O objetivo deste experimento foi verificar a influência da manutenção *in vitro* de formas promastigotas de *L. braziliensis* sobre a expressão de moléculas similares acalpaínas. Inicialmente, os parasitos foram isolados a partir de patas de fêmeas de hamster infectadas, e as formas promastigotas obtidas foram mantidas através de passagens sucessivas em culturas axênicas. Os parasitos recém isolados ou obtidos após trinta passagens *in vitro* foram fixados com paraformaldeído. As células foram permeabilizadas ou não com Triton X-100 e incubadas na presença dos anticorpos anti-TryTrip CALPAIN (Fig.16 A, B), CDPIIb (Fig.17 A, B), anti-C21 (Fig.18 A, B), anti-C23 (Fig.19 A, B), e anti-C24 (Fig. 20 A, B). A manutenção das formas promastigotas de *L. braziliensis* em culturas axênicas não alterou de maneira significativa a exposição de epítomos reconhecidos pelos diferentes anticorpos anti-calpaína empregados. As moléculas homólogas às calpaínas foram detectadas em maior abundância no interior das células com todos os anticorpos analisados, o que está em consonância com a localização intracelular das calpaínas em outros sistemas biológicos. O anticorpo anti-C24 não reconheceu nenhum epítomo tanto na superfície quanto no interior das células. Assim, para fins comparativos, definimos utilizar como recém-isolados os parasitos obtidos de lesões de hamster e passados em cultura *in vitro* por no máximo seis repiques e múltiplas passagens acima de trinta passagens *in vitro*.



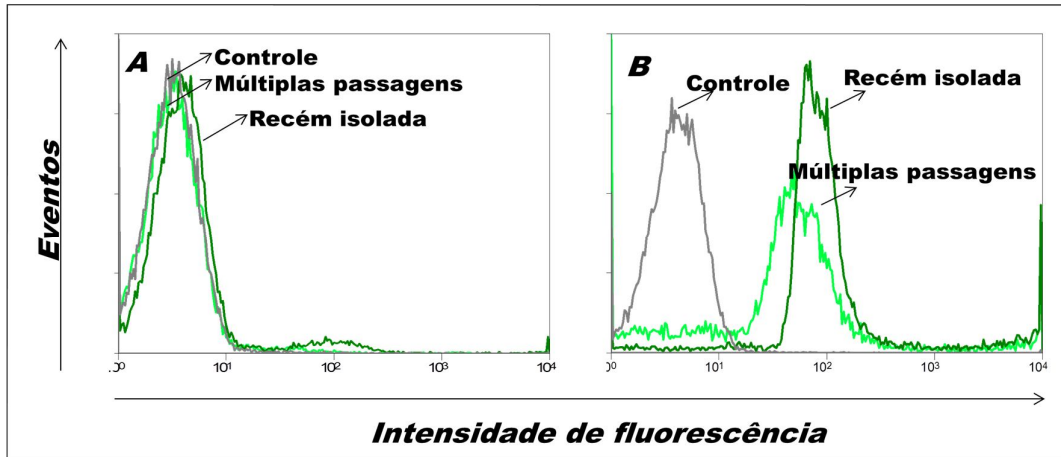


**Figura 16.** Expressão de moléculas similares a calpaínas em formas promastigotas recém-isoladas de *L. braziliensis* e após diferentes passagens *in vitro*. Os parasitos foram lavados, fixados em paraformaldeído e permeabilizadas (B) ou não com Triton-X100 0,01% (A). Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo primário **anti-TryTrip CALPAIN** na diluição de 1:100 e após, incubadas com o anticorpo secundário conjugado à Alexa Fluor 488 na diluição 1:750 e analisados por citometria de fluxo. O controle refere-se à cepa sem incubação com o anticorpo primário. Controle linha cinza, ceparecém isoladaem verde escuro e cepas com múltiplas passagemsem verde claro. Os dados apresentados nos gráficos são representativos da análise de 10,000 células de experimentos realizados em triplicata biológica.

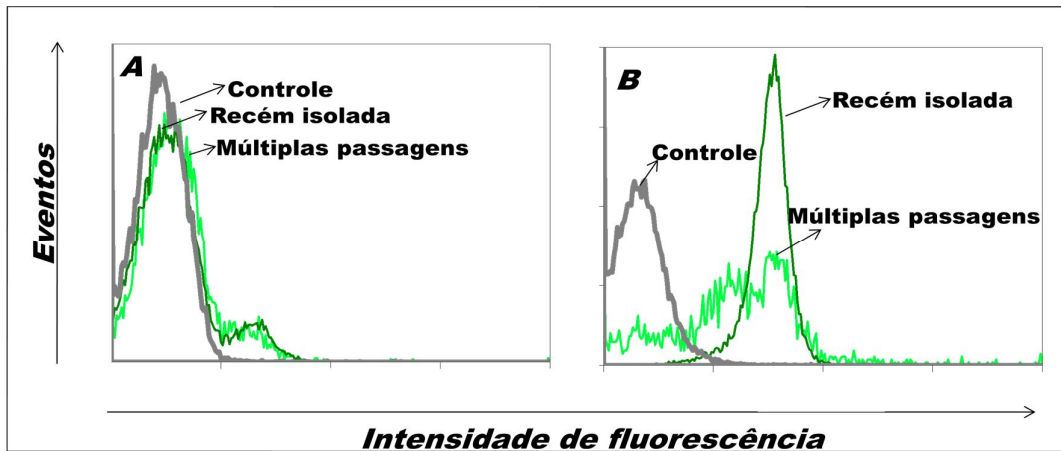


**Figura 17.** Expressão de moléculas similares a calpaínas em formas promastigotas recém-isoladas de *L. braziliensis* e após diferentes passagens *in vitro*. Os parasitos foram lavados, fixados em paraformaldeído e permeabilizadas (B) ou não com Triton-X100 0,01% (A). Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo primário **anti-CDPIIb** na diluição de 1:250 e após, incubadas com o anticorpo secundário conjugado à Alexa Fluor 488 na diluição

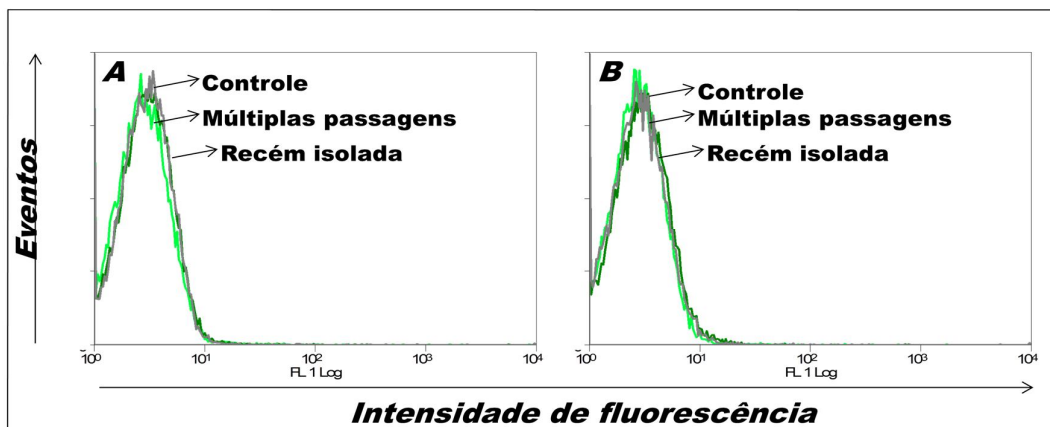
1:750 e analisados por citometria de fluxo. O controle refere-se à cepa sem incubação com o anticorpo primário. Controle linha cinza, ceparecém isolada em verde escuro e cepas com múltiplas passagens em verde claro. Os dados apresentados nos gráficos são representativos da análise de 10,000 células de experimentos realizados em triplicata biológica.



**Figura 18.** Expressão de moléculas similares a calpaínas em formas promastigotas recém-isoladas de *L. braziliensis* e após diferentes passagens *in vitro*. Os parasitos foram lavados, fixados em paraformaldeído e permeabilizadas (B) ou não com Triton-X100 0,01% (A). Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo primário **anti-C21** na diluição de 1:250 e após, incubadas com o anticorpo secundário conjugado à Alexa Fluor 488 na diluição 1:750 e analisados por citometria de fluxo. O controle refere-se à cepa sem incubação com o anticorpo primário. Controle linha cinza, ceparecém isolada em verde escuro e cepas com múltiplas passagens em verde claro. Os dados apresentados nos gráficos são representativos da análise de 10,000 células de experimentos realizados em triplicata biológica.



**Figura 19.** Expressão de moléculas similares a calpaínas em formas promastigotas recém-isoladas de *L. braziliensis* e após diferentes passagens *in vitro*. Os parasitos foram lavados, fixados em paraformaldeído e permeabilizadas (B) ou não com Triton-X100 0,01% (A). Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo primário **anti-C23** na diluição de 1:250 e após, incubadas com o anticorpo secundário conjugado à Alexa Fluor 488 na diluição 1:750 e analisados por citometria de fluxo. O controle refere-se à cepa sem incubação com o anticorpo primário. Controle linha cinza, ceparecém isoladaem linha verde escuro e cepas com múltiplas passagens em verde claro. Os dados apresentados nos gráficos são representativos da análise de 10,000 células de experimentos realizados em triplicata biológica.

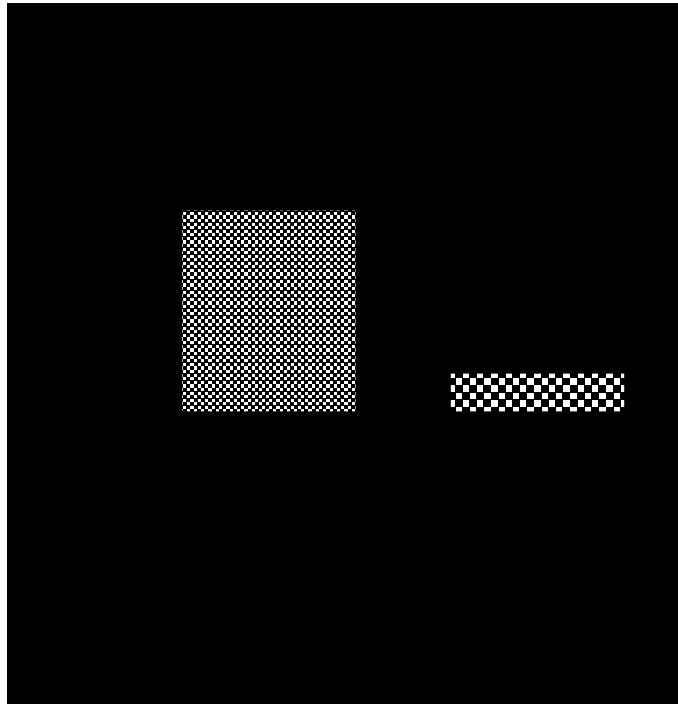


**Figura 20.** Expressão de moléculas similares a calpaínas em formas promastigotas recém-isoladas de *L. braziliensis* e após diferentes passagens *in vitro*. Os parasitos foram lavados, fixados em paraformaldeído e permeabilizadas (B) ou não com Triton-X100 0,01% (A). Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo primário **anti-C24**na diluição de 1:250 e após, incubadas com o anticorpo secundário conjugado à Alexa Fluor 488 na diluição 1:750 e analisados por citometria de fluxo. O controle refere-se à cepa sem incubação com o anticorpo primário. Controle linha cinza, ceparecém isoladaem linha verde escuro e cepas com múltiplas

passagens em verde claro. Os dados apresentados nos gráficos são representativos da análise de 10,000 células de experimentos realizados em triplicata biológica.

#### **4.8. Avaliação da interação de *L. braziliensis* (recém isolada e múltiplas passagens) com macrófagos peritoneais.**

O objetivo deste experimento foi testar o perfil de infectividade de *L. braziliensis* (recém isolada e múltiplas passagens) em macrófagos peritoneais. Inicialmente, os parasitos foram isolados a partir de patas de fêmeas de hamster infectadas, e as formas promastigotas obtidas foram mantidas posteriormente através de passagens sucessivas em culturas axênicas. Os parasitos recém isolados (mantidos até a sexta passagem) ou obtidos após trigésima passagem *in vitro*, foram lavados, contados e colocados para interagir com os macrófagos por uma hora a 37°C/5%CO<sub>2</sub>. Após este período, os parasitos não aderidos foram removidos e as lamínulas foram fixadas e coradas com Panótico. O percentual do índice de associação dos parasitos com os macrófagos está representado na Figura 21. Este resultado demonstra que a cepa com múltiplas passagens *in vitro* teve uma redução no percentual do índice de associação dos parasitos com os macrófagos (redução de 71,6%) comparado com a cepa recém-isolada de hamster.



**Figura 21.** Os macrófagos foram infectados com as formas promastigotas de *L. braziliensis* por 1 h a 37°C/5%CO<sub>2</sub>, as monocamadas foram lavadas para a remoção de parasitas não aderidos, fixadas e coradas com Panótico. O índice de associação(% macrófagos x número médio de leishmania por macrófago) foi determinado pela contagem de pelo menos 100 células em cada triplicata. As barras representam o desvio padrão e os dados representam a média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata. O símbolo (\*) indica que os resultados foram considerados estatisticamente significativos ( $P < 0,05$ ). Aplicado teste t-student.

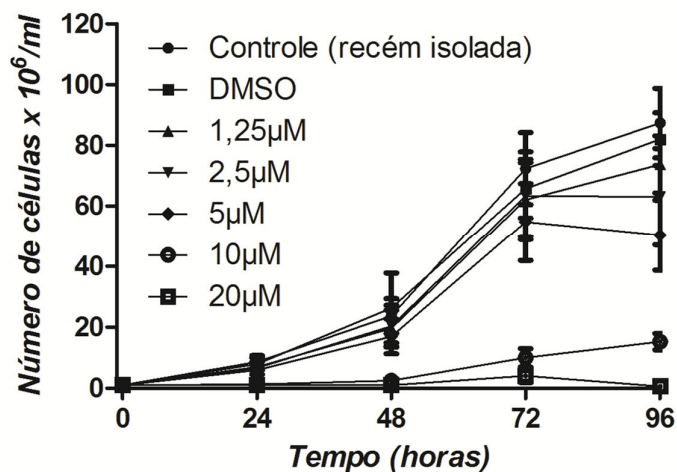
## Parte 2:

### 4.9.Efeitos do inibidor MDL28170 sobre a taxa de multiplicação de formas promastigotasde *L.braziliensis* recém isoladas e após múltiplas passagens.

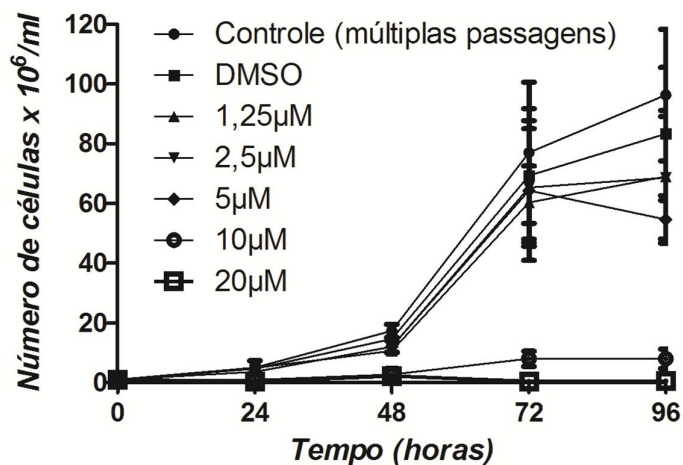
Com o objetivo de avaliar a ação do inibidor de calpaínas MDL28170sobre a proliferação de promastigotas de *L. braziliensis* recém isoladase após múltiplas passagens, o composto foi adicionado as culturas nas concentrações que variaram de 1,25 a 20  $\mu$ M e a taxa de multiplicação foi monitorada por quatro dias *in vitro*. Os ensaios da taxa de crescimento dos parasitosforam realizados através de contagem em câmara de Neubauer. Os resultados demonstraram que o inibidor foi capaz de reduzir o crescimento tanto dos parasitos recém isolados quanto dos parasitos adaptados ao

cultivo *in vitro*, de maneira dose-dependente (Fig. 22 A, B). As maiores concentrações utilizadas, que corresponderam a 10 e 20 $\mu$ M, foram capazes de reduzir a proliferação celular de ambas as cepas, com valores estatisticamente diferentes do controle ( $P < 0,05$ ). O  $IC_{50}$  de ambas as cepas foi igual até o segundo dia ( $IC_{50}$  igual  $7 \pm 0,6 \mu$ M). Os dados apresentados evidenciaram que concentrações menores do inibidor de calpaína a partir do terceiro dia foram capazes de reduzir a taxa de multiplicação das células recém isoladas (terceiro dia  $IC_{50}$   $5,6 \pm 0,3 \mu$ M e no quarto dia  $IC_{50}$   $4,7 \pm 0,4 \mu$ M). Já as formas promastigotas de *L. braziliensis* adaptadas ao cultivo *in vitro* precisaram de concentrações maiores de MDL28170 para a mesma ação; no terceiro dia o  $IC_{50}$  foi  $7,4 \pm 0,3 \mu$ M e no quarto dia foi  $5,4 \pm 0,4 \mu$ M. Estas diferenças foram estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ). O DMSO (na maior concentração utilizada do inibidor) não apresentou nenhum efeito sobre o crescimento dos promastigotas recém isoladas e após múltiplas passagens (Fig. 22 A, B).

A



B



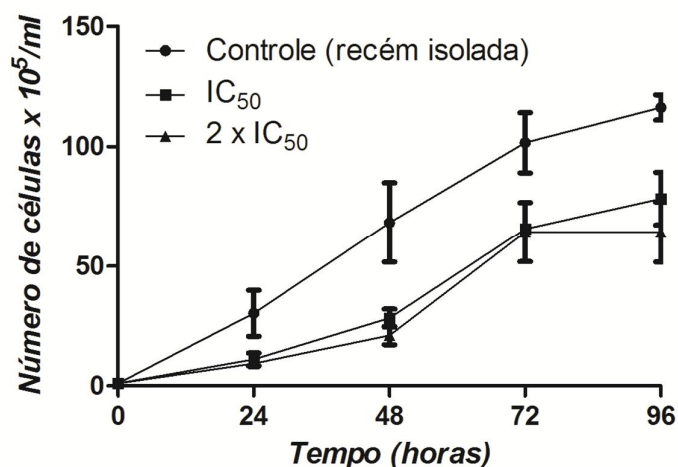
**Figura 22:** Efeito do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a taxa de multiplicação de formas promastigotas de *L. braziliensis* recém isoladas e múltiplas passagens. Os parasitos foram cultivados a 26°C na ausência (controle) ou na presença do inibidor de calpaínas em concentrações que variaram de 1,25 a 20  $\mu M$ . O inibidor foi adicionado às culturas no tempo 0 h e as células foram contadas em câmara de Neubauer diariamente. O DMSO não apresentou efeitos sobre o crescimento dos promastigotas. (A) Tratamento com inibidor em cepas recém isoladas, (B) Tratamento com inibidor em múltiplas passagens. Os dados mostrados representam a média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

#### **4.10. Avaliação do efeito reversível do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a taxa de multiplicação de promastigotas de *L. braziliensis* recém isoladas e após múltiplas passagens.**

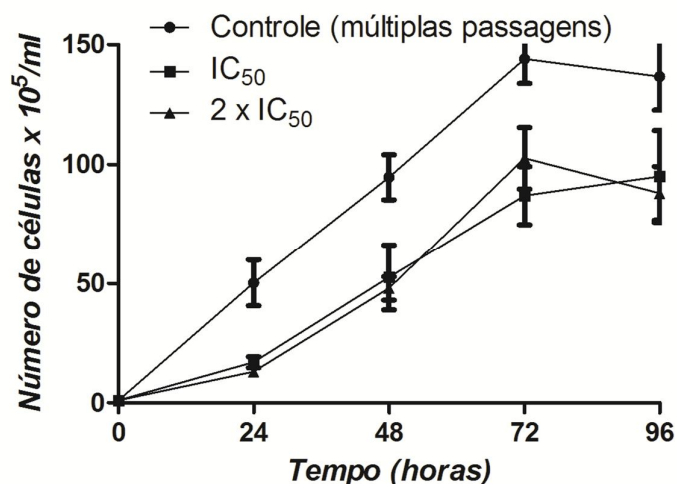
A fim de verificar se o efeito do inibidor era reversível ou irreversível, as células recém isoladas e múltiplas passagens foram incubadas com  $IC_{50}$  e  $2 \times IC_{50}$  do inibidor (7  $\mu M$  e 14  $\mu M$  respectivamente) por 48 h. Após 48 h as células foram lavadas extensivamente, contadas e inoculadas com meio e soro sem inibidor e a taxa de multiplicação foi monitorada por quatro dias *in vitro* através de contagem em câmara de Neubauer. Os resultados demonstraram que as células tratadas com o inibidor foram capazes de restabelecer a proliferação celular em taxas menores, em comparação com o controle (Fig. 23 A, B).



A



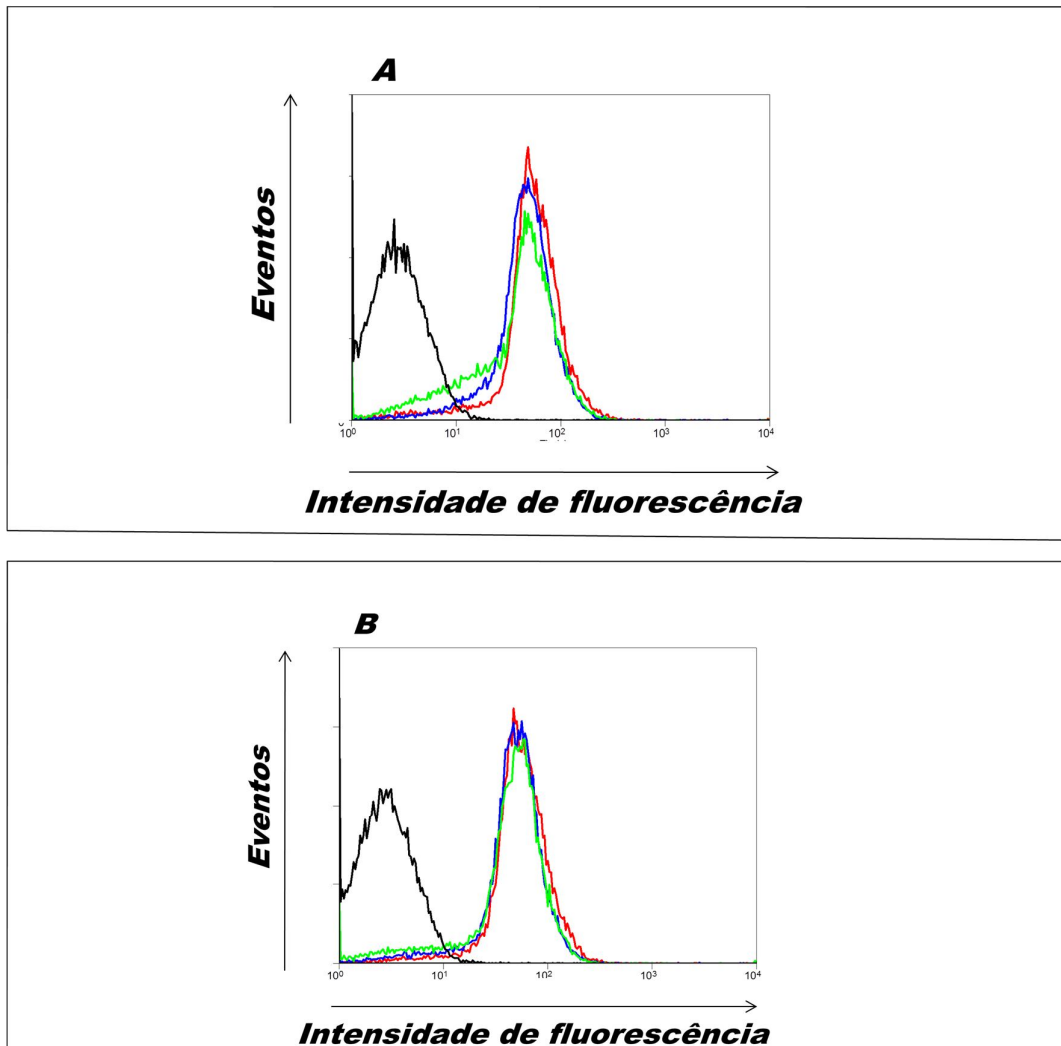
B



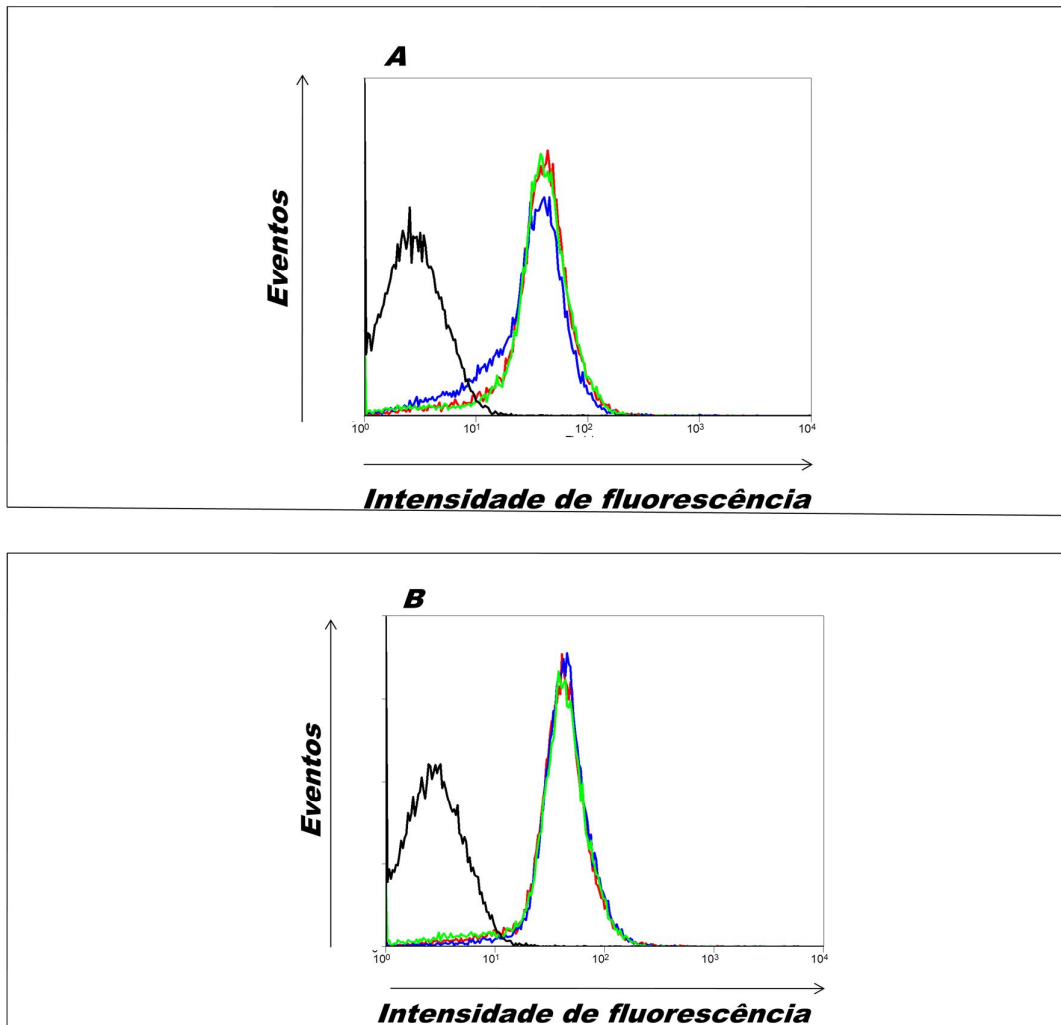
**Figura 23.** Efeito reversível do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a taxa de multiplicação de promastigotas de *L. braziliensis* recém isoladas e após múltiplas passagens. Os parasitos foram cultivados a 26°C na ausência (controle) ou na presença do inibidor de calpaínas por 48 h nas seguintes concentrações: IC<sub>50</sub> e 2×IC<sub>50</sub> (7 μM e 14 μM respectivamente). Após 48 h, as células foram extensivamente lavadas para remoção do inibidor e inoculadas com meio e soro sem o inibidor, e contadas por quatro dias em câmara de Neubauer. O DMSO não apresentou efeito sobre o crescimento das formas promastigotas. (A) Efeito reversível do inibidor em cepas recém isoladas, (B) Efeito reversível do inibidor em cepas com múltiplas passagens. Os dados mostrados representam a média de três experimentos independentes realizados em duplicata, as barras representam o erro padrão.

#### **4.11. Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a expressão de peptidases em promastigotas de *L. braziliensis* recém isoladas e após múltiplas passagens.**

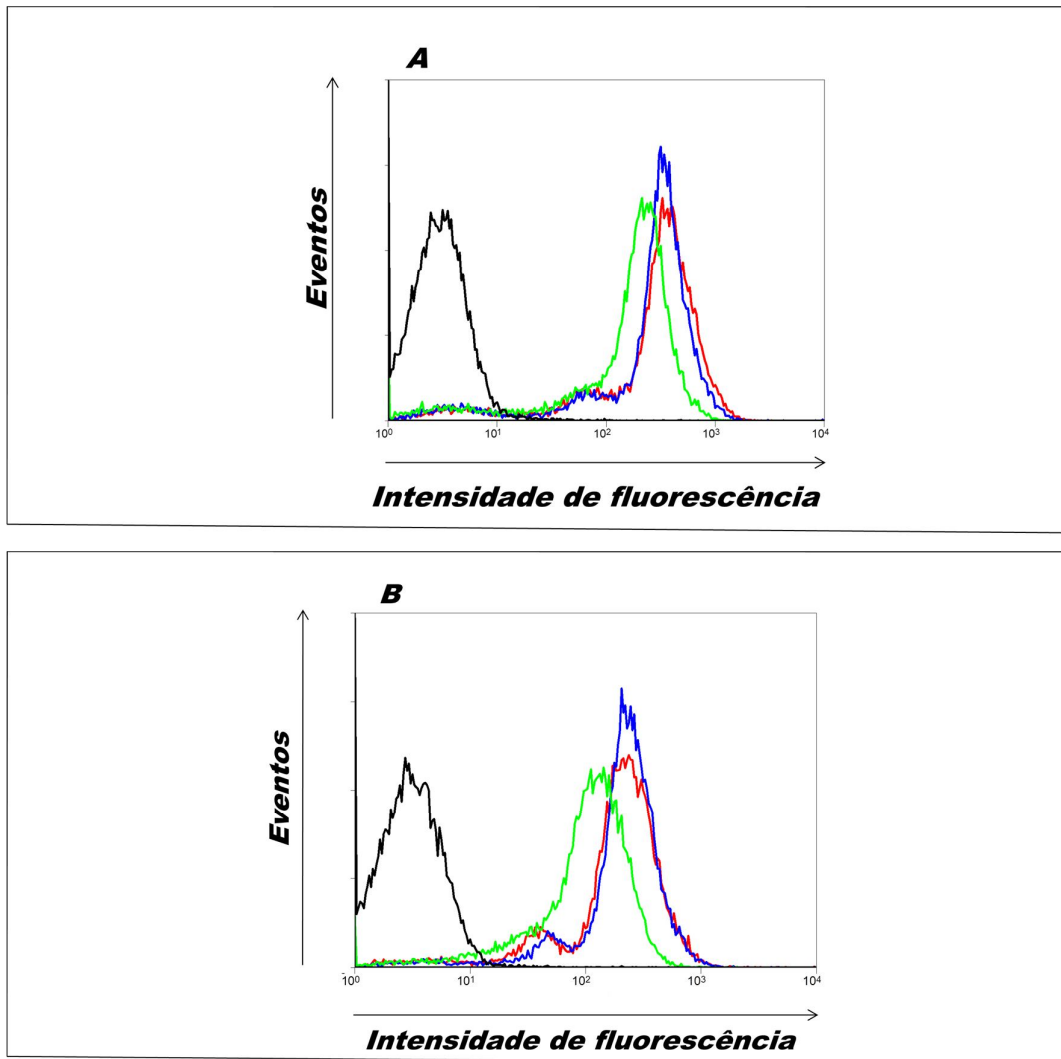
Visando determinar se o estresse induzido pelo inibidor de calpaínas era capaz de alterar o padrão de expressão de peptidases que são conhecidos como fatores de virulência em *Leishmania*, como gp63 e cpb, os parasitos foram incubados ou não na presença do inibidor de calpaínas nas seguintes concentrações IC<sub>50</sub> e o dobro IC<sub>50</sub> (7 e 14 µM, respectivamente) por 48 h. Posteriormente, os parasitos foram lavados, fixados em paraformaldeído e permeabilizados ou não com Triton X-100 0,01%, e os sistemas foram incubados na presença dos anticorpos anti-TryTrip CALPAIN, anti-cpb e anti-gp63, o anticorpo secundário conjugado à Alexa Fluor 488. O perfil de expressão das peptidases é mostrado nas Figuras 24, 25, 26. As autofluorescências apresentadas nos gráficos são representativas das células incubadas na ausência dos anticorpos ou incubadas apenas com o inibidor e posteriormente com o anticorpo secundário. Quando os parasitos foram tratados com o inibidor de calpaínas por 48 h, e posteriormente tratados com o anticorpo anti-TryTrip CALPAIN e anti-Cpb, foi possível observar uma expressão de moléculas com similaridade às calpaínas igual ao controle em ambos os sistemas (permeabilizado ou não) para os dois anticorpos utilizados (Fig. 24, 25). Em relação à expressão de moléculas similares à gp63, foi observado um aumento na expressão após 48 h de incubação com o inibidor de calpaínas na superfície de recém isolada e múltiplas passagens (Fig. 26). O aumento de expressão não é dose-dependente (Fig. 24, 25, 26).



**Figura 24.** Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a expressão de calpaínas em formas promastigotas de *L. braziliensis* recém isolado ou múltiplas passagens. As células foram fixadas com paraformaldeído e permeabilizada (A, B) com Triton X-100 0,01%. As células foram incubadas na ausência do anticorpo primário (autofluorescência, em preto) ou na presença do anticorpo **anti- TryTrip CALPAIN** na diluição de 1:100 (linhas verde, azul e vermelho). Os parasitos foram tratados ou não (linha verde) com o inibidor MDL28170 na concentração do IC<sub>50</sub> (linha azul) e o dobro do IC<sub>50</sub> (linha vermelha). (A) Recém isolada com marcação intracelular, (B) Múltiplas passagens com marcação intracelular. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Os dados apresentados nos gráficos são representativos da análise de 10,000 células de experimentos realizados em duplicata biológica.



**Figura 25.** Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a expressão de Cpb em formas promastigotas de *L. braziliensis* recém isolado ou múltiplas passagens. As células foram fixadas com paraformaldeído e permeabilizada (A, B) com Triton X-100 0,01%. As células foram incubadas na ausência do anticorpo primário (autofluorescência, em preto) ou na presença do anticorpo **anti- Cpb** na diluição de 1:500 (linhas verde, azul e vermelho). Os parasitos foram tratados ou não (linha verde) com o inibidor MDL28170 na concentração do IC<sub>50</sub> (linha azul) e o dobro do IC<sub>50</sub> (linha vermelha). (A) Recém isolada com marcação intracelular, (B) Múltiplas passagens com marcação intracelular. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Os dados apresentados nos gráficos são representativos da análise de 10,000 células de experimentos realizados em duplicata biológica.

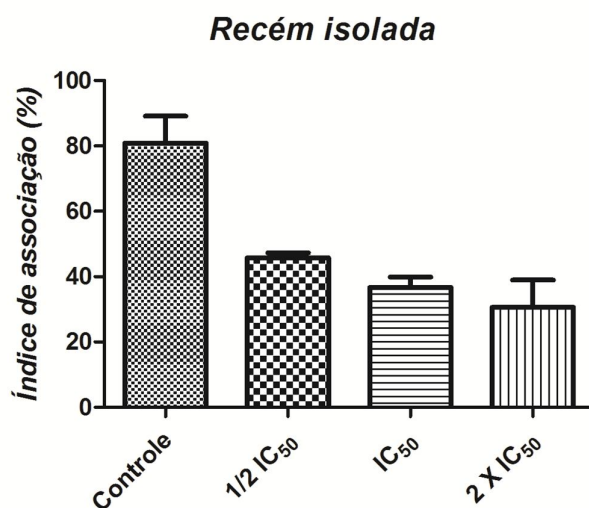


**Figura 26.** Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a expressão de gp63 em formas promastigotas de *L. braziliensis* recém isolado ou múltiplas passagens. As células foram fixadas com paraformaldeído (A, B). As células foram incubadas na ausência do anticorpo primário (autofluorescência, em preto) ou na presença do anticorpo **anti- gp63** na diluição de 1:500 (linhas verde, azul e vermelho). Os parasitos foram tratados ou não (linha verde) com o inibidor MDL28170 na concentração do  $IC_{50}$  (linha azul) e o dobro do  $IC_{50}$  (linha vermelha). (A) Recém isolada com marcação na superfície, (B) Múltiplas passagens com marcação na superfície. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Os dados apresentados nos gráficos são representativos da análise de 10,000 células de experimentos realizados em duplicata biológica.

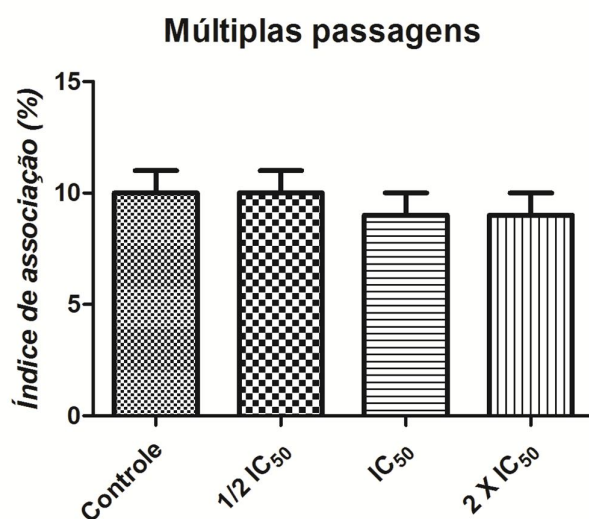
#### **4.12. Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a interação de *L. braziliensis* com macrófagos peritoneais (Pré-tratamento).**

Com o objetivo de verificar a ação do inibidor de calpaínas sobre a interação de promastigotas de *L. braziliensis* com macrófagos peritoneais, os parasitos foram pré-tratados com o inibidor MDL28170 nas seguintes concentrações: metade do IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e o dobro do IC<sub>50</sub> (3,5 µM, 7 µM e 14 µM, respectivamente) por 1 h a 26°C. Em seguida, lavados e colocados para interagir com os macrófagos por mais 1 h a 37°C em 5%CO<sub>2</sub>. Após este período, os parasitos não-aderidos foram removidos e as lamínulas foram fixadas e coradas com Panótico. O percentual do índice de associação dos parasitos com os macrófagos está representado na Figura 27. O inibidor de calpaínas foi capaz de reduzir o índice de associação dos parasitos com os macrófagos quando comparados ao controle não tratado. Estes resultados também demonstraram que quando as células são tratadas com o inibidor de calpaínas, o percentual de células com parasitos aderidos aumenta (Fig. 28). Como demonstrado na Figura 21, a cepa de múltiplas passagens tem uma redução no percentual do índice de associação dos parasitos com os macrófagos comparado com a cepa recém isolada. Assim, na cepa com múltiplas passagens tratada com o inibidor, não foi possível observar diferenças significativas, quando comparada com a cepa recém isolada (Fig. 27, 28).

A

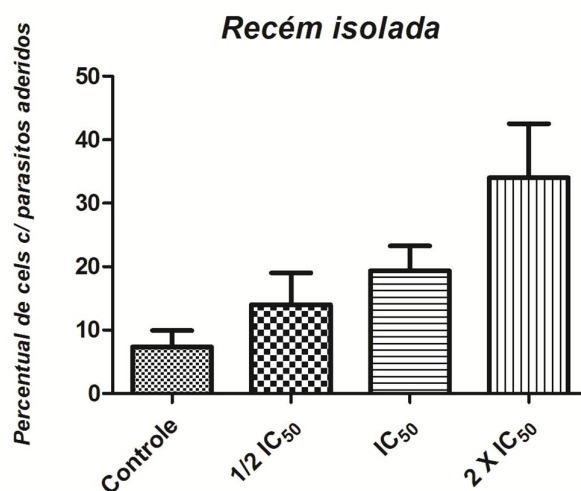


B

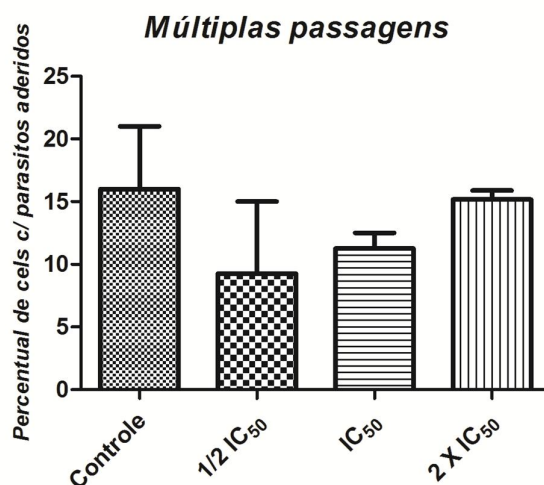


**Figura 27.** Efeitos do pré-tratamento de promastigotas de *L. braziliensis* com o inibidor de calpaínas MDL28170 durante o processo de interação com macrófagos peritoneais. Os macrófagos foram infectados com as formas promastigotas de *L. braziliensis* pré-tratadas por 1 h a 26°C, as monocamadas foram lavadas, fixadas e coradas com Panótico. O índice de associação (% macrófagos x número médio de leishmania por macrófago) foi determinado pela contagem de pelo menos 100 células de cada triplicata. (A) Promastigotas de *L. braziliensis* recém isolada. (B) Promastigotas de *L. braziliensis* múltiplas passagens. As barras representam o desvio padrão e os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. O símbolo (\*) indica que os resultados foram considerados estatisticamente significativos ( $P < 0,05$ ). Aplicado teste t-student.

A



B



**Figura 28.** Efeitos do pré-tratamento de promastigotas de *L. braziliensis* com o inibidor de calpaínas MDL28170 durante o processo de interação com macrófagos peritoneais. Os macrófagos foram infectados com as formas promastigotas de *L. braziliensis* pré-tratadas por 1 h a 26°C, as monocamadas foram lavadas, fixadas e coradas com Panótico. O percentual de células com parasitos aderidos foi determinado pela contagem de pelo menos 100 células de cada triplicata. (A) Promastigotas de *L. braziliensis* recém isolada. (B) Promastigotas de *L. braziliensis* múltiplas passagens. As barras representam o desvio padrão e os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. O símbolo (\*) indica que os resultados foram considerados estatisticamente significativos ( $P < 0,05$ ). Aplicado teste t-student.



## V. Discussão

As espécies de *Leishmania* tem um ciclo de vida complexo, compreendendo ambientes distintos, tais como o tubo digestório do inseto vetor (formas promastigotas) e o fagolisossomo em macrófagos do hospedeiro vertebrado (formas amastigotas). Estes parasitos causam um amplo espectro de manifestações clínicas que dependem das espécies destes protozoários e da resposta do sistema imune do hospedeiro. A terapia para a leishmaniose apresenta efeitos adversos, elevado custo, alta toxicidade e surgimento de cepas resistentes. Apesar dos grandes avanços no tratamento das doenças infecciosas, estes protozoários ainda constituem um grande problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (MATLASHEWSKI, 2001; SANTOS, 2011). Com isso há uma necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos. Nesse contexto, diferentes alvos do parasito são escolhidos para estudos, e as peptidases destes parasitos desempenham papéis cruciais como fatores de virulência, portanto já há relatos da utilização destas moléculas como potencial alvo para quimioterapia no tratamento desta doença (MCKERROW, 1999; SANTOS, 2011.).

Em 2001, o primeiro trabalho que caracterizou uma proteína similar a calpaína (CAP5.5) como uma proteína associada ao citoesqueleto foi encontrada em formas procíclicas de *T. brucei*. Embora haja similaridade com o domínio catalítico das calpaínas, apenas um dos três aminoácidos requeridos para catálise na tríade catalítica é conservado na proteína CAP5.5 (HERTZ-FOWLER *et al.*, 2001). Através de ensaios bioquímicos, nosso grupo de pesquisa identificou e purificou uma proteína similar a cisteína peptidase neutra dependente de cálcio em *A. deanei*, que apresentou reatividade cruzada com anticorpo contra calpaína de *D. melanogaster* (D'AVILA- LEVY *et al.*, 2003). Já em 2005, com a análise do genoma dos três tripanossomatídeos *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*, foi identificado um total de 18 sequências homólogas as calpaínas em *T. brucei*, 27 em *L. major* e 24 em *T. cruzi*. A caracterização das sequências revelaram domínios típicos das calpaínas bem conservados na maioria das proteínas, embora os resíduos críticos para a atividade catalítica estejam alterados (ERSFELD *et al.*, 2005). Em 2009, nas formas sanguíneas de *T. brucei* foi identificada uma proteína paróloga a CAP 5.5, que fora previamente descrita nas formas procíclicas em *T. brucei* (OLEGO-FERNANDEZ *et al.*, 2009). A regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos possui algumas peculiaridades, os mRNAs que são transcritos na unidade policistrônica não são necessariamente relacionados a alguma função e os níveis de mRNA maduros

podem variar entre os transcritos. Acredita-se que a expressão gênica em tripanossomatídeos seja regulada principalmente a nível pós-transcricional, as sequências 3' UTR e 5' UTR são amplamente estudadas e há indícios do seu papel no processamento destes mRNA. O entendimento dos mecanismos moleculares da regulação da expressão gênica nestes tripanossomatídeos é fundamental para que se possa conhecer novos alvos capazes de agir de maneira seletiva e eficaz contra as doenças causadas por estes protozoários. No presente trabalho, através de análises *in silico*, 20 seqüências de calpaínas foram escolhidas para as análises de expressão gênica. Nossos resultados, indicam que cinco alvos são mais expressos na forma procíclica e a expressão de um alvo é maior na forma metacíclica. Também observamos que uma calpaína-símile é expressa por *L. braziliensis*, tendo em vista que um anticorpo capaz de reconhecer uma região consenso de diversas calpaínas apresentou reatividade em ensaios de *Western blotting* e imunocitoquímica. Na análise por *Western blotting* o polipeptídeo reconhecido apresentou uma massa molecular de aproximadamente 50kDa, como verificado também na forma amastigota de *T. cruzi* (ENNES-VIDAL, dados não publicados). A análise *in silico* mostra que a região consenso para a síntese do peptídeo e produção do anticorpo (anti-TryTrip CALPAIN) selecionado para este estudo, demonstra que entre os 20 alvos deste estudo apenas dois não contém o peptídeo consenso, e alguns alvos possuem aproximadamente a massa molecular predita encontrada no ensaio de *Western blotting*. Das sequências analisadas, os genes LbrCALP4 (LbrM20\_V2.5430) e LbrCALP18 (LbrM31\_V2.0600) que possuem o peptídeo consenso e massa molecular predita de 59.97kDa e 53.74kDa, respectivamente, e podem ser os genes responsáveis pela expressão da proteína de 50kDa detectada nos ensaios de *Western blotting*. Nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente que as formas epimastigotas de *T. cruzi* possuem uma calpaína-símile de aproximadamente 80kDa, através de reatividade cruzada contra o anticorpo específico para calpaína de *D. melanogaster* (SANGENITO *et al*, 2009). Uma proteína reativa contra o mesmo anticorpo, de *D. melanogaster*, e com a mesma massa molecular aproximada foi detectada em *L. amazonensis* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006) e *A. deanei* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2003). No presente trabalho, na análise por imunocitoquímica empregando o anticorpo anti-TryTrip CALPAIN, a marcação das proteínas homólogas às calpaínas foi identificada no corpo celular de *L. braziliensis* (citoplasma, membrana e núcleo). As calpaínas estão envolvidas em funções celulares

reguladas por cálcio como apoptose, diferenciação, proliferação e sinalização celular, o que é condizente com esta localização celular (SAEZ *et al*, 2006).

Outra abordagem foi utilizada para identificar moléculas similares às calpaínas em células recém isoladas e múltiplas passagens de *L. braziliensis*, testamos os anticorpos anti-calpaínas: TryTrip CALPAIN, CDPIIb, C21 e C23. Em todos os ensaios, verificamos reatividade cruzada pela técnica citometria de fluxo. Além disso, foi detectado maior abundância no interior das células, em comparação com a superfície, o que está de acordo com os outros sistemas biológicos já estudados (SAEZ *et al*, 2006). No *T. cruzi*, não foi verificado reatividade cruzada com o anticorpo anti-C21, o que indica que não há similaridade imunológica entre a m-calpaína de cérebro humano e as calpaínas de *T. cruzi*. Este resultado é discrepante do observado em *L. braziliensis*, já que houve reatividade com os anticorpos anti-C21 e anti-C23. Ainda em *T. cruzi*, foi verificada reatividade cruzada pela técnica de citometria de fluxo com os seguintes anticorpos: CAP5.5 (calpaína de *T. brucei* caracterizada pelo grupo de Ersfeld e colaboradores) e calpaína de *D. melanogaster*. Entretanto, não identificamos reatividade cruzada por citometria de fluxo com o anticorpo anti-C24 em ambas as cepas utilizadas, tanto em recém isolada como múltiplas passagens, o que sugere diferenças estruturais nestas moléculas, já que este anticorpo reconhece apenas um dos resíduos da tríade catalítica.

Apesar do presente trabalho não ter estabelecido uma relação direta de expressão de calpaínas e virulência, nosso grupo de pesquisa vem mostrando esta possibilidade. Neste estudo, pode ser avaliado que não há diferenças nos níveis de expressão de moléculas similares as calpaínas em formas promastigotas recém isoladas e múltiplas passagens através destas análises por citometria de fluxo. Já em *T. cruzi* e *L. amazonensis*, uma maior expressão de moléculas similares às calpaínas foi detectado em cepas recém isoladas em comparação com as de sucessivas passagens (MARINHO, F.A., 2009; SANGENITO *et al.*, 2009).

Os inibidores de calpaínas têm sido utilizados na pesquisa ou vistos como compostos promissores no tratamento de algumas doenças como: doença de Huntington's, Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, distrofias musculares, lesões cerebrais provenientes de traumas, isquemia, catarata, câncer, diabetes e infecções virais (SAEZ *et al.*, 2006; LESCOP *et al.*, 2005; HIGUCHI *et al.*, 2005; ARAUJO-COUTO *et al.*, 2004; RAY *et al.*, 2003; SAATMAN *et al.*, 1996; CUZZOCREA *et al.*, 2000; NAKAMURA *et al.*, 2003; CARRAGHER, 2006; DE CLERCQ, 2006). Assim a ação

deste inibidor sobre as diferentes formas evolutivas do parasito é uma abordagem promissora, uma vez que compostos com uso clínico aprovado podem ser usados para tratamento de doenças negligenciadas. Vale destacar que as doenças cujas calpaínas estão implicadas recebem um grande aporte financeiro, o que pode acelerar as onerosas e demoradas etapas de triagem clínica, o mesmo não ocorre para as doenças negligenciadas. Nosso grupo de pesquisa vem demonstrando a ação do inibidor de calpaínas MDL28170 em *T. cruzi* e *L. amazonensis*. O inibidor tem efeito tripanostático sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi* e induz importantes alterações estruturais. Além disso, a queda da expressão de um fator de virulência, cruzipaina, para *T. cruzi* também foi avaliada por citometria de fluxo quando o parasito é tratado com o IC<sub>50</sub> do inibidor (SANGENITO *et al.*, 2009). Nas formas amastigotas e tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* também foi avaliado o efeito do inibidor MD28170 na interação com macrófagos peritoneais murinos *in vitro*. No pré tratamento dos tripomastigotas sanguíneos com o inibidor em concentrações crescentes, foi verificada a inibição significativa na infecção de macrófagos. O inibidor apresentou baixa toxicidade para os macrófagos *in vitro*. Logo, o inibidor foi testado nos macrófagos previamente infectados *in vitro*, com concentrações crescentes do inibidor. O inibidor foi capaz de reduzir significativamente tanto o número de macrófagos infectados quanto o número de parasitos internalizados nas células infectadas, de uma forma dose e tempo dependente (ENNES-VIDA *et al.*, 2010).

Ainda em *T. cruzi*, o composto MDL28170 inibiu a metaciclologênese, causou importantes alterações ultraestruturais, e inibiu a interação do parasito ao epitélio intestinal de *R. prolixus* (ENNES-VIDA *et al.*, 2011).

Em *L. amazonensis*, também foi demonstrado o efeito leishmanicida do inibidor MDL28170 (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006). Ainda em *L. amazonensis*, foram demonstradas, alteração no potencial de membrana, externalização de fosfatidilserina, suspensão do ciclo celular verificado por citometria de fluxo, fragmentação do DNA analisado pelo ensaio de TUNEL, a microscopia de transmissão revelou alterações ultraestruturais como perda da integridade da membrana, vacuolização no citoplasma, padrão alterado de condensação de cromatina, encurtamento do flagelo e arredondamento celular (MARINHO *et al.*, 2014). Ainda na avaliação do efeito do inibidor em *L. amazonensis*, o processo de infecção com macrófagos foi inibido de maneira dose-dependente. As formas amastigotas apresentaram moléculas similares às calpaínas em sua superfície, já em formas promastigotas após sucessivas passagens há

uma diminuição na expressão destas moléculas. As amastigotas axênicas tratadas com o inibidor MDL28170 ( $IC_{50}=4,5\mu M$ ) tiveram uma diminuição significativa na viabilidade celular de maneira dose-dependente, e apresentaram importantes alterações ultraestruturais como acúmulo de material eletrodense, presença de vacúolos no citoplasma, presença de material na bolsa flagelar, poros na membrana e agregação celular (MARINHO *et al.*, 2014).

Os resultados do presente estudo em *L. braziliensis* demonstram que o inibidor MDL28170 apresenta um efeito leishmanicida e dose-dependente, tanto nas cepas recém isoladas quanto múltiplas passagens. O  $IC_{50}$  a partir do terceiro dia foi calculado como  $5,6\mu M$  nas formas promastigotas, o que demonstra que a espécie *L. braziliensis* é mais sensível ao inibidor quando comparada com *L. amazonensis* e *T. cruzi*. O inibidor não apresentou efeito sobre a expressão de moléculas similares as calpaínas e outra peptidase conhecida como fator de virulência (cpb) sobre as formas promastigotas de recém isolada e múltiplas passagens de *L. braziliensis* por citometria de fluxo. Na expressão de moléculas similares à gp63 foi observado um aumento na expressão desta peptidase após 48 h de incubação com o inibidor de calpaínas na superfície de recém isolada e múltiplas passagens. Já em *L. amazonensis*, foi verificado o mesmo resultado com o mesmo tratamento e a mesma avaliação para moléculas gp63. O inibidor de calpaínas foi capaz de reduzir o índice de associação de *L. braziliensis* com os macrófagos de maneira dose-dependente e também aumentou o percentual de células com parasitos aderidos de maneira dose-dependente. Estes dados são indicativos que o inibidor estaria bloqueando a entrada do parasito na célula.

Com os dados apresentados neste estudo foi possível contribuir para o conhecimento acerca desta família de proteínas nos tripanossomatídeos. Além disso, o uso de compostos em estágios avançados de triagem clínica para o tratamento de outras doenças é uma abordagem promissora, portanto, os dados com MDL28170 indicam boas perspectivas. A terapia atual para leishmaniose apresenta diversos pontos a serem melhorados, logo há uma necessidade de investir em novos medicamentos. Portanto as calpaínas são um alvo alternativo interessante para o desenvolvimento de novas drogas para a quimioterapia da leishmaniose. Além disso, adicionamos dados acerca da expressão gênica de calpaínas em *L. braziliensis*, esses dados correlacionados com análises de bioinformática robustos das regiões 3'UTR e 5'UTR desses genes poderão ajudar a compreender os mecanismos de regulação gênica em *Leishmania*.

## VI. Conclusões

O presente trabalho conclui que:

### Parte 1:

1. As formas procíclica e metacíclica expressam calpaínas presentes no genoma de *L. braziliensis*;
2. A análise de expressão gênica indicam que treze calpaínas estudadas apresentaram níveis constitutivos de mRNA, uma calpaína apresentou expressão apenas na forma procíclica do parasito, a expressão de cinco genes é maior na forma procíclica e a expressão de um gene é maior na forma metacíclica de *L.braziliensis*;
3. O anticorpo produzido a partir da síntese de um peptídeo das regiões com sequências conservadas das calpaínas de tripanossomatídeos com genoma anotado foi capaz de reagir contra moléculas de *L. braziliensis*;
4. As cepas recém isolada e após múltiplas passagens de *L. braziliensis* possuem moléculas similares às calpaínas no interior das células, capazes de reagir contra anticorpos contra as calpaínas de *Homarus americanus* (CDPIIb) e m-calpaínas de cérebro humano (C21, C23);
5. Através de imunolocalização demonstramos que as calpaínas de *L. braziliensis* estão dispersas no citoplasma, membrana e núcleo;
6. A cepa de *L. braziliensis* com múltiplas passagens *in vitro* apresentou um índice de associação dos parasitos com macrófagos menor que a cepa recém isolada;

### Parte 2:

7. O tratamento das cepas recém isoladas e múltiplas passagens de *L. braziliensis* com o inibidor de calpaínas MDL28170 por quatro dias promoveu a queda da proliferação celular, especialmente quando concentrações mais elevadas foram

utilizadas (concentrações de 1,25 a 20  $\mu\text{M}$ ), o  $\text{IC}_{50}$  do inibidor utilizado foi de 7 $\mu\text{M}$ ;

8. O inibidor de calpaínas MDL28170 não foi capaz de alterar a expressão de cisteína peptidase e de calpaínas em *L. braziliensis*;
9. O inibidor MDL28170 foi capaz de alterar a expressão de uma peptidase clássica, (gp63) em *L. braziliensis*, sugerindo que a superexpressão de algumas peptidases pode compensar o estresse induzido pelo inibidor;
10. Nos ensaios de interação com macrófagos, este mesmo inibidor de calpaínas foi capaz de reduzir o índice de associação dos parasitos com a célula hospedeira de maneira dose-dependente;
11. Nestes ensaios de interação com macrófagos, o inibidor MDL28170 foi capaz de aumentar o percentual de células com parasitos aderidos de maneira dose-dependente.

## VII. Referências bibliográficas

ALVAR J., VÉLEZ I.D., BERN C., HERRERO M., DESJEUX P., CANO J., JANNIN J. & DENBOERM. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 7(5):e35671, 2012.

ARAÚJO-COUTO L., SAMPAIO-NARCISO M., HOKOÇ J.N. & BLANCO-MARTINEZ A.M. Calpain inhibitor 2 prevents axonal degeneration of opossum optic nerve fibers. J. Neurosci Res, 77: 410-419, 2004.

ARAÚJO P. R. & TEIXEIRA S. M. Regulatory elements involved in the post-transcription control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* – A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz, Vol. 106 (3) 257-266, 2011.

ASHFORD, R.W., The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology 30, 1269-1281, 2000.

BARRET, A.J., RAWLINGS, N.D. & O'BRIEN, E.A. The *MEROPS* database as a protease information system. J. Struct. Biol., 134: 95-102, 2001.

BARRETT, A.J, TOLLE, D.P. & RAWLINGS, N.D. Managing peptidases in the genomic era. Biol Chem., 384: 873-82, 2003.

BART G., FRAME M.J., CARTER R., COOMBS G.H. & MOTTRAM J.C. Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. Mol Biochem Parasitol. 88(1-2): 53-61, 1997.

BHATTACHARYA J., DEY R. & DATTA S.C. Calcium dependent thiol protease caldonopain and its specific endogenous inhibitor in *Leishmania donovani*. Mol. Biochem. Parasitol., 126, 9-16, 1993.

BERMAN, J.D. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. Clinical Dermatology 14: 519-522, 1996.



BEYNON R.J. & BOND J.S. Proteolytic Enzymes: A Practical Approach, 2nd ed.; Oxford University, Press: London, 2001.

BOND, J.S. & BUTLER, P.E. Intracellular proteases. *Annu. Rev. Biochem.*, 56: 333-364, 1987.

BORGHESAN, T.C., FERREIRA, R.C., TAKATA, C.S., CAMPANER, M., BORDA, C.C., PAIVA, F., MILDER, R.V., TEIXEIRA, M.M. & CAMARGO, E.P. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist*, 164 , 129-52, 2013.

BOUCHER N., Y.WU, C. DUMAS, M. DUBÉ, D. SERENO, M. BRETON & B. PAPADOPOULOU. A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *Journal of Biological Chemistry*, vol.277, no.22, pp 19511-19520, 2002.

BRANQUINHA M.H., MARINHO F.A., SANGENITO L.S., OLIVEIRA S.S.C., GONÇALVES K.C., ENNES-VIDAL V., D'AVILA-LEVY C.M. & SANTOS A.L.S. Calpains: potential targets for alternative chemotherapeutic intervention against human pathogenic trypanosomatids. *Current Medicinal Chemistry*, 20: 00-00, 2013.

BRANQUINHA M.H., VERMELHO A.B., GOLDENBERG S. & BONALDO M.C. Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*, 43(2):131-135, 1996.

CaMPDB [homepage da internet] Calpain for Modulatory Proteolysis, acesso em 2014. Disponível em [calpain.org](http://calpain.org)

CAMPBELL R.L. & DAVIES P.L. Structure–function relationships in calpains. *Biochem. J.* 447: 335–351, 2012.

CARAFOLI E. & MOLINARI M. Calpain: A Protease in search of a function? *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 277: 193-203, 1998.

CARRAGHER N.O. Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states. *Curr Pharm Des*, 12: 615-638, 2006.

CONVIT, J. & KERDEL-VEGAS, F. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis; Inoculation to Laboratory Animals, Electron Microscopy and Fluorescent Antibodies Studies. *Archives of Dermatology* 91: 439-447, 1965.

CORRÊA, J.R., BRAZIL, R.P. & SOARES, M.J. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus a mini review. *Mem Int Oswaldo Cruz*, 100(6): 587-92, 2005.

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., The current status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhao. II. The epidemiological and clinico-evolutionary aspects. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 25:115-123, 1992.

CUZZOCREA S., MCDONALD M.C., MAZZON E., SIRIWARDENA D., SERRAINO I. & DUGO L. Calpain inhibitor I reduces the development of acute and chronic inflammation. *Am J Pathol*, 157(6): 2065-2079, 2000.

D'AVILA-LEVY C.M., MARINHO F.A., SANTOS L.O., MARTINS J.L., SANTOS A.L.S. & BRANQUINHA, M.H. Antileishmanial activity of MDL28170, a potential calpain inhibitor. *Int. J. Parasitol.* 28: 138-142, 2006.

D'AVILA-LEVY C.M., SANTOS L.O., MARINHO F.A., MATTEOLI F.P., LOPES A.H., MOTTA M.C., SANTOS A.L. & BRANQUINHA M.H. *Crithidia deanei*: influence of parasite gp63 homologue on the interaction of endosymbiont-harboring and aposymbiotic strains with *Aedes aegypti* midgut. *Exp. Parasitol.* 118(3): 345-53, 2008.

D'AVILA-LEVY C.M., SOUZA R.F., GOMES R.C., VERMELHO A.B. & BRANQUINHA M.H. A novel extracellular calcium-dependent cysteine proteinase from *Crithidia deanei*. Arch. Biochem. Biophys. 420: 1-8, 2003.

DE CLERCQ E. Potential antivirals and antiviral strategies against SARS coronavirus infections. Expert Rev Anti Infect Ther, 4(2), 291-302, 2006.

DENISE H., POOT J., JIMÉNEZ M., AMBIT A., HERRMANN D.C., VERMEULEN A. N., COOMBS G.H. & MOTTRAM J.C. Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. BMC Mol Biol. 13;7:42, 2006.

DE SALDANHA, R.R., MARTINS-PAPA, M.C., SAMPAIO, R.N. & MUNIZ JUNQUEIRA, M.I. Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and TNF- $\alpha$  production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. Transactions and Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 06, 596-603, 2012.

DEY R., BHATTACHARYA J., DATTA S.C. Calcium-dependent proteolytic activity of a cysteine protease caldonopain is detected during *Leishmania* infection. Mol Cell Biochem, 281(1-2), 27-33, 2006.

DIMITRIOS-ALEXIOS K., SCHOLTE, R. G. C., GUIMARÃES, L.H., UTZINGER, J. & VOUNATSOU, P. Bayesian Geostatistical Modeling of Leishmaniasis Incidence in Brazil. PLOS Neglected Tropical Diseases, 7, e2213, 2013.

DORVAL M.E., OSHIRO E.T., CUPOLLILO E., CASTRO A.C. & ALVES T.P. Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Rev Soc Bras Med Trop. 39(1):43-6, 2006.

DUTTA, A., BANDYOPADHYAY, S., MANDAL, C. & CHATTERJEE, M. *Aloe vera* leaf exudate induces a caspase independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. Journal of Medical Microbiology, 56: 629–636, 2007a.

DUTTA, A., GHOSHAL, A., MANDAL, D., MONDAL, N.B., BANERJEE, S., SAHU, N.P. & MANDAL, C. Racemoside A, na anti-leishmanial, water-soluble, naturalsteroidal saponin, induces programmed cell death in *Leishmania donovani*. Journal of Medical Microbiology, 56: 1196-1204, 2007b.

ENNES-VIDAL V., MENNA-BARRETO R.F., SANTOS A.L.S., BRANQUINHA M.H., D'AVILA-LEVY C.M. MDL28170, a potent Calpain Inhibitor, Affects *Trypanosoma cruzi* Metacyclogenesis, Ultrastructure and Attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. Plos One, 6(4): e18371, 2011.

ENNES-VIDAL V., MENNA-BARRETO R.F., SANTOS A.L.S., BRANQUINHA M.H., D'AVILA-LEVY C.M. Effects of the calpain inhibitor MDL28170 on the clinically relevant forms of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. J Antimicrob Chemother 65: 1395–8, 2010.

ERSFELD K., BARRACLOUGH H., GULL K. Evolutionary relationships and protein domain architecture in an expanded calpain superfamily in kinetoplastid parasites. J Mol Evol, 61(6):742-757, 2005.

FRAME, M.J., MOTTRAM, J.C. & COOMBS, G.H. Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. Parasitology, 121(Pt4): 367-377, 2000.

GENTIL L.G., CORDERO E.M., DO CARMO M.S., DOS SANTOS M.R. & DA SILVEIRA J.F. Posttranscriptional mechanisms involved in the control of expression of the stage-specific GP82 surface glycoprotein in *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop 109: 152-158, 2009.

GOLL D. E., THOMPSON V. F., LI H., WEI W. & Cong J. The calpain system. Physiol. Rev. 83: 731–801, 2003.

GONTIJO, B. & DE CARVALHO MED, L. American cutaneous leishmaniasis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36: 71-80, 2003.

GULL K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol*, 53, 629-655, 1999.

HANNA R.A., CAMMPBELL R.L. & DAVIES P.L. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. *Nature*, 456: 409-412, 2008.

HERTZ-FOWLER C., ERSFELD K., GULL K. CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosomabrucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 116: 25-34, 2001.

HIGUCHI M., IWATA N. & SAIDO T.C. Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions. *Biochem Biophys Acta*, 1751: 60-67, 2005.

HOARE C.A. & WALLACE F.G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature*, 212, 1385-1386, 1966.

HOSFIELD C. M., ELCE J. S., DAVIES P. L., JIA Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *EMBO J.*, 18: 6880-6889, 1999.

JANOVY J.R., LEE K.W. & BRUMBAUGH J.A. The differentiation of *Herpetomonas megaseliae*: ultrastructural observations. *J Protozool*, 21, 53-59, 1974.

JHA, T. K., S. SUNDAR, C. P., THAKUR, P., BACHMANN, J., KARBWANG, C., FISCHER, A. & J. BERMAN. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.*, 341: 1795-1800, 1999.

KAMHAWI S. *Phlebotomine* sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology* 22: 439-445, 2006.

KOTERA M., OKUNO Y., HATTORI M., GOTO S. & KANEHISA M. Computational assignment of the EC numbers for genomic-scale analysis of enzymatic reactions. *Journal of the American Chemical Society* 126: 16487-16498, 2004.

KRAMER S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of Kinetoplastids. *Molecular & Biochemical Parasitology* 181: 61-72, 2012.

LAINSON R. & SHAW J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The leishmaniasis in Biology and Medicine*, 1-120. Edited by Killick-Kendric, R., Peters, W., London, Academic Press, 1987.

LAISON, R. & SHAW, J.J. Leishmaniasis of New World: taxonomic problems. *British Medical Bulletin* 28: 44-48, 1972.

LAINSON, R. & SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: *Biology of the Kinetoplastida*, 1-116. Edited by Lumsden, W.H.R., Evans, D.A., London and New York, Academic Press, 1979.

LANDFEAR S.M. & IGNATUSHCHENKO M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*, 115(1): 1-17, 2001.

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília DF. Ministério da Saúde, 2007, 179p.

LESCOP C., HERZNER H., SIENDT H., BOLLIGER R., HENNEBOHLE M. & WEYERMANN P. Novel cell-penetrating alpha-keto-amide calpain inhibitors as potential treatment for muscular dystrophy. *Bioorg Med Chem Lett*, 15(23): 5176-5181, 2005.

LIMA, A.K.C., ELIAS, C.G.R., SOUZA, J.E.O., SANTOS, A.L.S. & DUTRA, P. M. L. Dissimilar peptidase production by avirulent and virulent promastigotes of *Leishmania braziliensis*: inference on the parasite proliferation and interaction with macrophages. *Parasitology*, 136: 1-13, 2009.

LIU W., APAGYI K., MCLEAVY L. & ERSFELD K. Expression and cellular localisation of calpain-like proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*, 169: 20-26, 2010.

LOPES, A.G., SOUTO-PADRÓN T., DIAS, F.A., GOMES, M.T.; RODRIGUES, G.C., ZIMMERMANN, L.T., SILVA, T.L.A. & VERMELHO, A. Trypanosomatids : Oddorganisms, devastating diseases. Open Parasitology Journal, 4, 30-59, 2010.

LYNN M.A., MARR, A.K. & MCMASTER, W.R. Differential quantitative proteomic profiling of *Leishmania infantum* and *Leishmania mexicana* density gradient separated membranous fractions. Journal of Proteomics, 82: 179-92, 2013.

MARINHO F.A. Indução de morte celular e inibição da interação de *Leishmania amazonensis* com macrófagos pelo inibidor de calpaínas. 07/2009. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências-microbiologia) Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2009.

MARINHO F.A., GONÇALVES K.C., OLIVEIRA S.S.C., GONÇALVES D.S., MATTEOLI F.P., SEABRA S.H., OLIVEIRA A.C.S., BELLIO M., OLIVEIRA S.S., SOUTO-PADRÓN T., D'AVILA-LEVY C.M., SANTOS A.L.S. & BRANQUINHA M.H. The calpain inhibitor MDL28170 induces the expression of apoptotic markers in *Leishmania amazonensis* promastigotes. Plos One, 9(1): e87659, 2014.

MARTÍNEZ-CALVILLO S., JUAN C. VIZUET-DE-RUEDA, LUIS E. FLORENCIO-MARTÍNEZ, REBECA G. MANNING-CELA, ELISA E. & FIGUEROA-ÂNGULO. Gene expression in Trypanosomatid parasites. Journal of Biomedicine and Biotchnology, Article ID 525241,15pages, 2010.

MARZOCHI, M.C. Leishmaniose no Brasil. Jornal Brasileiro de Medicina 63:82-104,1992.

MASLOV, D.A.& SIMPSON, L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa.Parasitol Today, 1, 30-32, 1995.

MATLASHEWSKI G. Leishmania infection and virulence.Med Microbiol Immunol, 190: 37-42, 2001.

MAYHO, M. K. FENN, CRADDY P., CROSTHWAITE S. & MATTHEWS K. Post-transcriptional control of nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in *Trypanosoma brucei*: evidence for genome-wide conservation of cycle stage-specific regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, vol.34, no.18, pp. 5312-5324, 2006.

MCKERROW J.H., CAFFREY C., KELLY B., LOKE P.& SAJID M. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol*, 1: 497-536, 2006.

MCKERROW, J.H. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *International Journal for Parasitology* 29: 833-837, 1999.

MCKERROW J.H., SUN E., ROSENTHAL P.J. & BOUVIER J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol*, 47:821-853, 1993.

MEROPS [homepage da internet] MEROPS The Peptidase Database, acesso em 2014. Disponível em <http://merops.sanger.ac.uk>

MICHELS, P.A.M., HANNAERT, V. & BRINGAUND, F. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae – new data and views. *Parasitol.Today*, 16, 482-89, 2000.

MOTTRAM, J.C., COOMBS, G.H. & ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol.*, 7(4): 375-381, 2004.

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. Immunochemotherapy of persistent post-kala-azar dermal leishmaniasis: a novel approach to treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2007.



MYLER P.J., AUDLEMAN L., DEVOS, T, HIXSON G., KISER P., LEMLEY C., MAGNESS C., RICKEL E., SISK S., SWARTZELL S., WESTLAKE T., BASTIEN P., FU G., IVENS A. & START K. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has a unusual distribution of protein-coding genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.96(6): p.2902-2906, 1999.

NAKAMURA M., MIYASHITA H., YAMAGUCHI M., SHIRASAKI Y., NAKAMURA Y. & INOUE J. Novel 6-hydroxy-3-morpholinones as cornea permeable calpain inhibitors. *BioorgMed Chem*, 11(24): 5449-5460, 2003.

OLEGO-FERNANDEZ S., VAUGHAN S., SHAW M.K., GULL K. & GINGER M.L. Cell morphogenesis of *Trypanosoma brucei* requires the paralogous, differentially expressed calpain-related proteins CAP5.5 and CAP5.5V. *Protist*, 160(4): 576-590, 2009.

OVERATH P., STIERHOF Y.D. & WIESE M. Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol*, 7, 27-33, 1997.

PALUMBO, E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12 (1): 2-4, 2008.

PARIS, C., LOISEAU, P.M., BORIES, C. & BREARD, J. Miltefosine induces apoptosislike death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.*,48: 852–859, 2004.

PIMENTA, P.F., MODI, G.B., PEREIRA, S.T., SHAHABUDDIN, M., SACKS, D.L., A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115 (Pt 4), 359-369,1997.

PITALUGA A.N.,BETEILLE V., LOBO A.R., ORTIGÃO-FARIAS J.R., DÁVILA A.M., SOUZA A.A., RAMALHO-ORTIGÃO J.M. &TRAUB-CSEKO Y.M. EST sequencing of blood-fed and *Leishmania*-infected midgut of *Lutzomyia longipalpis*, the

principal visceral leishmaniasis vector in the Americas. *Mol Genet Genomics*. 282(3): 307-17, 2009.

RALSTON, K.S., KABUTUTU, Z.P., MELEHANI, J.H., OBERHOLZER, M. & HILL, K.L. The *Trypanosoma brucei* flagellum: moving parasites in new directions. *Annual Review of Microbiology*, 63, 335-62, 2009.

RAMESH, V. & MUKHERJEE, A. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *International Journal of Dermatology* 34: 85-91, 1995.

RAWLINGS NEIL D., MATTHEW WALLER, ALLAN J. BARRET & ALEX BATEMAN. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids Research*, vol. 42: D503-D509, 2014.

RAY S.K., MATZELLE D.D., SRIBNICK E.A., GUYTON M.K., WINGRAVE J.M. & BANIK N.L. Calpain inhibitor prevented apoptosis and maintained transcription of proteolipid protein and myelin basic protein genes in rat spinal cord injury. *J Chem Neuroanat*, 26(2): 119-124, 2003.

REITHINGER, R., DUJARDIN, J.C., LOUZIR, H., PIRMEZ, C., ALEXANDER, B. & BROOKER, S., Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 7: 581-596, 2007.

REVEIZ, L., MAIA-ELKHOURY, A.N., NICHOLLS, R.S., ROMERO, G.A. & YADON, Z.E. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. *PLoS One*. 29, 8, e61843, 2013.

RODRIGUES D.C., SILVA R., RONDINELLI E. & URMÉNYI T.P. *Trypanosoma cruzi*: modulation of HSP70 mRNA stability by untranslated regions during heat shock. *Exp. Parasitology*, 126 (2): 245-53, 2010.

RODRIGUEZ-BONFANTE, C., BONFANTE-GARRIDO, R., GRIMALDI, G., Jr., MOMEN, H. & CUPOLILLO, E. Genotypically distinct *Leishmania colombiensis*

isolates from Venezuela cause both cutaneous and visceral leishmaniasis in humans. *Infect Genetic Evolution* 3: 119-124, 2003.

RUSSELL D.G. & WILHELM H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J Immunol* 136: 2613-20, 1986.

SAATMAN K.E., MURAI H., BARTUS R.T., SMITH, D.H., HAYWARD N.J., PERRI B.R. & MCINTOSH T.K. Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 3428-3433, 1996.

SACKS D.L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology* 69: 100-103, 1989.

SACKS, D.L. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell Microbiology* 3: 189-196, 2001.

SAEZ M.E., RAMIREZ-LORCA R., MORON F.J. & RUIZ A. The therapeutic potential of the calpain family: new aspects. *Drug Discovery Today* Volume 11, Numbers 19/20, 2006.

SAF'JANOVA, V. Classification of the genus *Leishmania* Ross, In: *Academy of Sciences, U.A.U.S.o.P. (Ed.) The Leishmaniasis. Protozoology*, pp. 95-101, 1982.

SAJID M. & MCKERROW J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*, 120: 1-21, 2002.

SALOTRA P., DUNCAN R.C., SINGH R., RAJU B.V.S., SREENIVAS G. & NAKHASI H.L. Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Microbes and Infection.*, 8: 637-644, 2006.

SANGENITO L.S., ENNES-VIDAL V., MARINHO F.A., DA MOTA F.F., SANTOS A.L.S., D'AVILA-LEVY C.M., BRANQUINHA M.H. Arrested growth of *Trypanosomacruzi* by the calpain inhibitor MDL28170 and detection of calpain homologues in epimastigote forms. *Parasitology*, 136: 433–41, 2009.

SANTOS A.L.S., ABREU C.M., ALVIANO C.S. & SOARES R.M.A. Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. *Parasitology*, 130: 79-88, 2005.

SANTOS L.O., MARINHO F.A., ALTOÉ E.F., VITÓRIO B.S., ALVES C.R., BRITTO C., MOTTAM.C., BRANQUINHA M.H., SANTOS A.L.S. & D'AVILA-LEVY C.M. HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. *PLoS One.*, 4, e4918, 2009.

SANTOS A.L.S. Protease expression by microorganisms and its relevance to crucial physiological/pathological events. *World Journal of Biological Chemistry*, 2 (3), 2011.

SARAIVA, E.M., PINTO-DA-SILVA, L.H., WANDERLEY, J.L., BONOMO, A.C., BARCINSKI, M.A. & MOREIRA, M.E. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. *Experimental Parasitology* 110: 39-47, 2005.

SILVEIRA, F.T., ISHIKAWA, E.A., DE SOUZA, A.A. & LAINSON, R., 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, 2002.

SOARES, D.C., PEREIRA, C.G., MEIRELES, M.A.A. & SARAIVA, E.M. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. *Parasitology International*, 56: 135-139, 2007.

SOARES, R.M.A., SANTOS, A.L.S., BONALDO, M.C., ANDRADE, A.F.B., ALVIANO, C.S., ANGLUSTER, J. & GOLDENBERG, S. *Leishmania*

(*Leishmania*)*amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. *Experimental Parasitology*, 104: 104-112,2003.

SOARES, R.P., CARDOSO, T.L., BARRON, T., ARAUJO, M.S., PIMENTA, P.F., TURCO, S.J.*Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International Journal for Parasitology* 35: 245-253, 2005.

SONGTHAMWAT D., KAJIHARA K., KIKUCHI M., UEMURA H., TRAN S. P., YANAGI, T., HIGO H. & HIRAYAMA K. Structure and expression of three gp82 gene subfamilies of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Int* 56: 273-280, 2007.

SOTO, J., REA, J., BALDERRAMA, M., TOLEDO, J., SOTO, P., VALDA, L. & BERMAN, J.D. Short Report: Efficacy of miltefosine for bolivian cutaneous leishmaniasis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 78 (2): 210-211, 2008.

SOTO, J., J. TOLEDO, P., GUTIEREZ, R. S., NICHOLLS, J., PADILA, J., ENGEL, C., FISCHER, A., VOSS J. & BERMAN J.D. Treatment of American cutaneousleishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clin. Infect. Dis.*, 33: E57-E61, 2001.

SPATH G.F. & BEVERLEY S.M.A Lipophosphoglycan-Independent Method for Isolation of Infective *Leishmania* Metacyclic Promastigotes by Density Gradient Centrifugation. *Experimental Parasitology* 99:97–103, 2001.

STORR, S.J., CARRAGHER, N.O., FRAME, M.C., PARR, T. & MARTIN, S.G.The calpain system and cancer. *Natural Reviews Cancer*, 11: 364-74, 2011.

STUART K., BRUN R., CROFT S., FAIRLAMB A. & GURTLER R.E. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118: 1301–1310, 2008.

SUNDAR, S. A., MAKHARIA, D.K., MORE, G., AGRAWAL, A., VOSS, C., FISCHER, P., BACHMANN H.W. & MURRAY W. Short-course of oral miltefosine fortreatment of visceral leishmaniasis. Clin. Infect. Dis., 31: 1110–1113, 2000.

SUNDAR, S., GUPTA, L.B., MAKHARIA, M.K., SINGH, M.K., VOSS, A.,ROSENKAIMER, F., ENGEL, J.& MURRAY, H.W. Oral treatment of visceralleishmaniasis with miltefosine. Ann. Trop. Med. Parasitol., 93: 589–597, 1999.

SUNDAR, S.F., ROSENKAIMER, M.K., MAKHARIA, A.K., GOYAL, A.K., MANDAL, A., VOSS, P., HILGARD, H. & MURRAY, W. Trial of oral miltefosine for visceralleishmaniasis.Lancet, 352: 1821–1823, 1998.

TEIXEIRA D.E., BENCHIMOL M., RODRIGUES G.C., CREPALDI P.H., PIMENTA P.F. & DE SOUZA W. The cell biology of Leishmania: how to teach using animations. Plos Pathog. 9 (10), 2013.

TEIXEIRA M.M.G., TAKATA C.S.A., CONCHON I., CAMPANER M. & CAMARGO E.P. Ribosomal and kDNA markers distinguish two subgroups of *Herpetomonas* among old species and new trypanosomatids isolated from flies. J. Parasitol, 83, 58-65, 1997.

TELLERIA J., BIRON D.G., BRIZARD J.P., DEMETTRE E., SÉVENO M., BARNABÉ C., AYALA F.J.& TIBAYRENC M. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosomacruzi*. ProcNatlAcadSci U S A. 107(47): 20411, 2010.

TURCO S.J. & DESCOTEAUX A.The lipophosphoglycan of Leishmania parasites. Annu Rev Microbiol 46: 65–94, 1992.

UENO N. & WILSON M.E. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. Trends Parasitol 28: 335–44, 2012.

VERMA N.K. & DEY C.S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. Antimicrobi Agents Chemoter., 48: 3010-5, 2004.

VERMA, N.K., SINGH, G. & DEY, C.S. Miltefosine induces apoptosis in arseniteresistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Experimental Parasitology*, 116: 1–13, 2007.

VERMELHO A.B., GIOVANNI-DE-SIMONE S., D'AVILA-LEVY C. M., SANTOS A.L.S., NOGUEIRA DE MELO A.C., SILVA J.R., F.P., BOM E.P.S. & BRANQUINHA M.H. Trypanosomatidae peptidases: a target for drugs development. *Curr.Enz.Inhib.* 3: 19-48, 2007.

VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int. J.Parasitol.*, 24, 1317-1331, 1994.

VICKERMAN K.& PRESTON T.M. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In: *Biology of the kinetoplastida*. Academic Press, New York, 1, 35-130, 1976.

VICKERMAN K & TETLEY L. Flagellar surfaces of parasitic protozoa and their roles in attachment. In: *Ciliary and flagellar membranes* (Edited by Bloodgood R.A.) Plenum Press, New York, 267-304, 1990.

VILLALTA F., MADISON M.N., KLESHCHENKO Y.Y., NDE P.N. & LIMA M.F. Molecular analysis of early host cell infection by *Trypanosoma cruzi*. *Front Biosci*,13: 3714-3734, 2008.

WALLACE F.G. Development stages of trypanosomatids flagellates: a new terminology revisites. *J Protozool*, 3, 51-56, 1977.

WALTERS, L.L., IRONS, K.P., MODI, G.B. & TESH, R.B., 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, 1992.

WILLIAMS R.A., TETLEY L., MOTTRAM J.C. & COOMBS G.H. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Molecular Microbiology*. 61(3): 655-674, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Leishmaniasis: report of the meeting of the WHO Expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva: 949, 2010.

YAO C. Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? *Infect Immun*. 78: 22-31, 2011.

YAO C., DONELSON J.E. & WILSON M.E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol*. 132(1):1-16, 2003.

YOSHIDA N., JANKEVICIUS J.V., ROITMAN I. & CAMARGO E.P. Enzymes of the ornithine-arginine metabolism of trypanosomatids of the genus *Herpetomonas*. *J Protozool*, 25, 550- 555, 1978.



## VIII. Anexo

Alinhamento múltiplo das sequências parciais dos genes calpaínas de *L. braziliensis* obtidas nesse estudo e depositadas sequências no banco de dados trytrip.

