

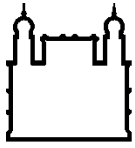
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária

*Leishmania (Viannia) braziliensis*, CEPA MCAN/BR/1998/R619:  
VARIABILIDADE NO PERFIL BIOLÓGICO E EXPRESSÃO GÊNICA  
DE PROTEASES

MARIANA SILVA DE ALMEIDA

Rio de Janeiro  
Novembro de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

MARIANA SILVA DE ALMEIDA

***Leishmania (Viannia) braziliensis*, cepa MCAN/BR/1998/R619: variabilidade  
no perfil biológico e expressão gênica de proteases**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Doutor em Biologia Parasitária

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Roberto Alves

**RIO DE JANEIRO**

Novembro de 2014

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

A447 Almeida, Mariana Silva de

*Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, cepa MCAN/BR/1998/R619:  
variabilidade no perfil biológico e expressão gênica de proteases /  
Mariana Silva de Almeida. – Rio de Janeiro, 2014.

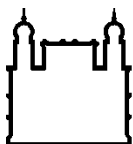
xv, 186 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 106-131

1. *Leishmania*. 2. *Leishmania braziliensis*. 3. Protease.  
4. Metaloprotease. 5. Serina protease. 6. Cisteína protease. 7. Aspártico  
protease. 8. Expressão gênica. 9. Reprodução clonal. I. Título

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

MARIANA SILVA-ALMEIDA

***Leishmania (Viannia) braziliensis*, cepa MCAN/BR/1998/R619: variabilidade  
no perfil biológico e expressão gênica de proteases**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Roberto Alves**

**Aprovada em: 21/11/2014**

**EXAMINADORES:**

<b>Prof. Dr. Sergio Coutinho Furtado de Mendonça</b>	(revisor, IOC)
<b>Prof. Dr. Kátia da Silva Calabrese</b>	(membro, IOC)
<b>Prof. Dr. Célia Maria Ferreira</b>	(membro, CPqRR)
<b>Prof. Dr. Maria de Fátima Madeira</b>	(suplente, INI)
<b>Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil</b>	(suplente, IOC)

Rio de Janeiro, 21 de novembro de 2014.



Aos meus pais, irmãos, cunhado e  
amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Carlos Alves pela oportunidade de realizar este trabalho e compartilhar seus conhecimentos e experiência tão importantes para meu crescimento.

À Dra Léa Cysne Finkelstein pela sua incansável colaboração e amizade.

Aos amigos do grupo Biomarcadores, Luzia Côrtes, Franklin Souza-Silva, Raquel Santos-Souza, Francisco Oliveira, Cinthia Bernardes, Luiz Filipe Oliveira e em especial Bernardo Pereira. Obrigada por tornar esses quatro anos muito mais divertidos!

À Dra Constança Britto e toda equipe do LABIMDOE por todo suporte. Cada um a seu jeito foi muito importante para realização deste trabalho. Em especial Angélica Cardoso.

Às amigas Myllena Melo, Natália Lins e Carla Pereira que representam todos os amigos que tornaram os dias no laboratório mais leves.

Ao Dr. Leonardo Bastos pelas análises de agrupamento, à Dra Luzia Pinto pela ajuda com os ensaios no Luminex, à Dra Mirian Pereira pela assistência nas análises de microscopia eletrônica de varredura, ao Dr Francisco Oliveira pelas capturas das imagens dos ensaios de infecção e ao Dr Álvaro Bertho pelos ensaios de citometria de fluxo.

Às secretárias Aliny Vitória e Fernanda Vasconcellos por sempre nos receber com um sorriso no rosto!

À toda equipe da Pós-graduação em Biologia Parasitária.

Aos membros da banca, suplentes e revisor por contribuírem para a melhoria da qualidade deste trabalho.

Às agências de fomento e fontes de financiamento, cujo apoio permitiu a realização desse estudo: PAPES IV (Fiocruz/CNPq) e FAPERJ, e à CAPES pela bolsa de doutorado.

Às Plataformas Tecnológicas de Sequenciamento de DNA, de Luminex, de citometria de Fluxo e de PCR em Tempo Real da Fiocruz.

Aos meus amigos e familiares que torceram por mim. Em especial tia Creusa e tio Celso com seus incentivos constantes.

Aos meus pais, irmãos, Filipe Borel e Maria José pelo carinho e apoio essenciais na minha vida.

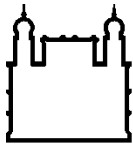
Ao meu companheiro, melhor amigo e amor, Everton Cavalcante que compartilhou cada minuto destes quatro anos e não tem ideia da importância que teve para a conclusão deste trabalho. Meu eterno obrigada.

“O homem semeia um pensamento e colhe um hábito. Semeia um hábito e colhe um caráter. Semeia um caráter e colhe um destino.”  
(Swami Sivananda)



## ***Leishmania (Viannia) braziliensis*, cepa MCAN/BR/1998/R619: variabilidade no perfil biológico e expressão gênica de proteases RESUMO**

Os parasitos do gênero *Leishmania*, protozoários veiculados por insetos flebotomíneos e responsáveis pelas leishmanioses visceral e tegumentar, se encontram amplamente distribuídos pelo mundo. O potencial adaptativo destes protozoários é um reflexo da diversidade biológica do gênero *Leishmania*, em especial a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que se encontra em diversos biomas acometendo diferentes animais e vetores de acordo com a região que se encontra. Os estudos biológicos e de expressão gênica de fatores de virulência do parasito são importantes para auxiliar na elucidação destes mecanismos de adaptação. Portanto este trabalho tem o objetivo de avaliar variações biológicas e na expressão de genes de proteinases de *L. (V.) braziliensis*, cepa MCAN/BR/1998/R619 e seus clones. Inicialmente foi realizada uma análise do genoma de *L. (V.) braziliensis* frente aos de *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana*, com o propósito de identificar características espécie-específicas que possam contribuir para compreender as diferenças fenotípicas ou de virulência entre as espécies estudadas. Foi observado que todos os cromossomos das quatro espécies apresentam genes de proteases em diferentes quantidades; alto grau de conservação entre os alelos de proteases; e as sequências dos genes de proteases dos parasitos não apresentam similaridade entre as de genes de proteases de mamíferos. Portanto, a análise dos genomas das *Leishmania* spp. indica uma grande diversidade de genes da protease nestas espécies. Posteriormente foram obtidos clones da cepa em estudo oriundos de um único promastigota e avaliados seu comportamento *in vitro* e o potencial biológico destes parasitos na infecção experimental *in vitro*. A cepa em estudo reúne vários clones de parasitos e estas produzem padrões distintos de infecção *in vitro* de macrófagos de camundongos BALB/c; com produção de citocinas no sobrenadante de forma heterogênea. Algumas são menos indutoras de IL-1 $\beta$  e IL-6, e as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-12p70, bem como o óxido nítrico, são induzidas de forma equilibrada pelos clones estudados. Uma análise de agrupamento permitiu a classificação de dois grupos distintos dos clones obtidos neste estudo. O conjunto de dados que mais influenciou para a definição destes grupos foi os relativos à infecção em macrófagos peritoneais murinos. Isto ressalta a possibilidade de haver outros marcadores, não contemplados neste estudo, que influenciam no sucesso da adaptação da cepa em estudo ao hospedeiro vertebrado. Também foi observado que os clones da cepa expressam diferentemente os genes das quatro classes de proteinases. Os amastigotas expressam mais proteinases que os promastigotas. Entre os promastigotas há maior expressão de aspártico e metaloproteinase enquanto que os amastigotas expressam mais metalo e serino proteinases. A diversidade da espécie vista entre isolados pôde ser comprovada também dentro de uma única cepa. O conjunto de resultados agrupados aqui enfatiza a capacidade da *L. (V.) braziliensis* utilizar a plasticidade de seu genoma para modular seu fenótipo e aumentar suas chances de sobrevivência nos hospedeiros.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

***Leishmania (Viannia) braziliensis*, strain MCAN/BR/1998/R619: variability of biological profile and expression of proteases genes**

**ABSTRACT**

Parasites of the genus *Leishmania* are protozoans transmitted during the bite of female phlebotomines and are the causative agents of visceral or tegumentary leishmaniasis, presenting a worldwide distribution. The adaptative potential of these protozoa is a reflection of their biological diversity, especially that of the species *Leishmania (Viannia) braziliensis*, which is found in many biomes and affect different animals and vectors. Studies about the biology of parasites and their expression of virulence factor genes are important to help on the elucidation of their mechanisms of adaptation. Therefore, the purpose of this work is to evaluate the the biology and expression of protease genes of *L. (V.) braziliensis*, strain MCAN/BR/1998/R619, checking for variations among clones of this strain. Initially, we performed a comparative analysis of *L. (V.) braziliensis* genome against *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major* and *L. (L.) mexicana* genomes to identify species-specific features that could potentially relate to characteristic phenotypic and virulence traits of the species. We could observe that protease genes are present in all chromosomes of the studied species, but in different frequencies. Additionally, a high degree of alleles conservation was noted, as well as a prominent distinction among the protease gene sequences of parasites and those of mammals, with no similarity detected. Thus, the analysis of genome of *Leishmania* spp. pointed to a great diversity of protease genes in these species. In an additional analysis, we obtained clones from single promastigotes isolated from *L. (V.) braziliensis* strain MCAN/BR/1998/R619 and evaluated their behaviors *in vitro* as well as their potential to cause infection in BALB/c macrophage cultures. Our results suggested that this strain is, in fact, composed by many clones with different characteristics, as they are able to promote distinct patterns of infection in macrophages *in vitro*, with a heterogenic production of cytokines by these cells. While some clones induced lower IL-1 $\beta$  or IL-6 production, TNF- $\alpha$ , IL-12p70 and nitric oxide production were homogeneously induced by the clones. A cluster analysis led to the classification of two distinct groups of clones in this study. Data analysis indicated that the capacity to promote infection in murine macrophages was the feature that most contributed to the clusters definition. However, the possibility remain that other features, no analyzed in the present study, could also play important roles regarding the success the studied strain's adaptation to the vertebrate host. It was also observed that the clones differentially expressed genes related to the four main protease classes of *Leishmania*: cysteine, serine, metallo and aspartic-proteinases. Generally, the amastigotes expressed higher levels of proteinases-related mRNAs than promastigotes. Also, it was observed that promastigotes express more aspartic and metalloproteinases mRNAs, while amastigotes express more metallo and serine proteinases mRNAs. Therefore, a reflection of the features diversity already reported among isolates of *L. (V.) braziliensis* can also be noted among clones of a single strain. The results gathered herein emphasize the ability of *L. (V.) braziliensis* to apply its genome plasticity to modulate its phenotype and, thus, increase its odds to survive in the vertebrate host.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AcPs - *acid phosphatase*  
BLAST – *basic alignment search tool*  
cDNA – *complementary deoxyribonucleic*  
CPA – cisteína protease A  
CPB – cisteína protease B  
CPC – cisteína protease C  
Ct – *threshold cycle*  
DNA – *deoxyribonucleic acid*  
dNTPs – dexorribonucleotídeos fosfatados  
DEPC – *dietil pirocarbonato*  
DNase I - *Deoxyribonuclease I*  
FSC – *Forward Angle Light Scatter*  
gp63 – glicoproteína 63  
GPI – glicosilfosfatidilinositol  
GIPL – *glycoinositolphospholipid*  
HASP - *hydrophilic acylated surface*  
IFN – interferon  
IL – interleucina  
KMP-11 - Kinetoplastid membrane protein 11  
LbrM – *Leishmania (Viannia) braziliensis*  
LinJ – *Leishmania (Leishmania) infantum*  
LmjF – *Leishmania (Leishmania) major*  
LmxM – *Leishmania (Leishmania) mexicana*  
LPG – lipofosfoglicano  
LPS - lipopolissacarídeo  
LT – Leishmaniose Tegumentar  
LTA – Leishmaniase Tegumentar Americana  
mRNA – messenger ribonucleic acid  
NNN - *Neal, Novy, Nicolle*  
NO – nitric oxid  
OPB – oligopeptidase B

ORF – open read frame  
 $\rho$  - coeficiente de correlação de *Pearson*  
pb – par de base  
PBS – *phosphate buffered saline*  
PCR – *polimerase chain reaction*  
PKC – *protein kinase C*  
PLH – proteínas que se ligam a heparina  
PMN – polimorfonucleares  
PPG - Proteofosfoglicano  
PTP – proteína tirosina fosfatase  
PSG – promastigote secreted gel  
RNA – *ribonucleic acid*  
RNA pol II – ribonucleic acid polymerase II  
RPMI – Roswell Park Memorial Institute  
RQ - quantidade relativa ou níveis de expressão normalizados  
RT – *reverse transcriptase*  
SFB – soro fetal bovino  
SSC – *side scatter*  
Th1 – *T helper cell type 1*  
Th2 – *T helper cell type 2*  
Th3 – *T helper cell type 3*  
Th17 – *T helper cell type 17*  
TNF – *tumor necrosis factor*  
Treg – *regulatory T cell*  
UTR – untranslated region  
xg – aceleração da gravidade



## ÍNDICE

<b>1 - Introdução</b>	16
1.1 – Leishmaniose tegumentar – considerações gerais	17
1.2 – Leishmaniose tegumentar – características biológicas	19
1.3 – <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	27
1.4 – Organização do genoma e variabilidade genética de <i>Leishmania</i> spp.	29
1.5 – Proteinases como fatores de virulência	33
<b>2 – OBJETIVOS</b>	39
2.1 – Objetivo Geral	40
2.2 – Objetivos específicos	40
<b>3 – MATERIAL E METÓDOS</b>	41
3.1 – Estudos <i>in silico</i> das proteinases de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	42
3.2 – Cepa utilizada e cultivo	42
3.3 – Obtenção de clones por citometria de fluxo	42
3.4 – Isolamento de macrófagos peritoneais de camundongos	43
3.5 – Infecção experimental em macrófagos peritoneais	43
3.6 – Estratégia para diferenciação dos parasitos <i>in vitro</i>	44
3.7 – Avaliação da expressão de citocinas por células de macrófagos peritoneais de camundongos	44
3.8 – Avaliação da expressão de óxido nítrico por células de macrófagos peritoneais de camundongos	45
3.9 - Análise estatística dos dados	45
3.10 – Extração de RNA	45
3.11 – Tratamento do RNA com DNase	46
3.12 – Síntese de cDNA a partir das amostras de RNA total	47
3.13 – Seleção das sequências de nucleotídeos de interesse	47
3.14 – Desenho e obtenção dos iniciadores para os ensaios de PCR	48
3.15 – Ensaios de PCR convencional	48
3.16 – Ensaios de PCR em tempo real	49
3.17 – Determinação da expressão relativa de genes	51
3.18 – Análise de agrupamento	52

<b>4 – RESULTADOS</b>	<b>53</b>
<b>4.1 – Caracterizações do perfil de proteases de <i>Leishmania</i></b>	<b>54</b>
<b>4.1.1 – Comparações dos genes de proteases de diversas espécies de <i>Leishmania</i></b>	<b>54</b>
<b>4.2 – Obtenções de clones da cepa Thor por citometria de fluxo</b>	<b>62</b>
<b>4.3 – Caracterização biológica dos parasitos em cultura</b>	<b>62</b>
<b>4.3.1 – Curva de crescimento dos parasitos <i>in vitro</i></b>	<b>62</b>
<b>4.3.2 – Infecção de macrófagos peritoneais de camundongos</b>	<b>66</b>
<b>4.3.3 – Obtenção de amastigotas extracelulares</b>	<b>69</b>
<b>4.3.4 – Seleção dos iniciadores oligonucleotídicos e padronização das condições de termociclagem para ensaios de PCR</b>	<b>70</b>
<b>4.3.5 – Padronizações para os ensaios em PCR em tempo real</b>	<b>74</b>
<b>4.3.6 – Expressão relativa dos genes de proteases em promastigotas e amastigotas da cepa de origem Thor e seus clones</b>	<b>74</b>
<b>4.4 – Análises de agrupamento dos clones</b>	<b>80</b>
<b>4.5 – Caracterizações da resposta do hospedeiro</b>	<b>83</b>
<b>4.6 – Correlações entre os dados biológicos dos grupos e expressão dos fatores do hospedeiro e do parasito</b>	<b>87</b>
<b>5 – DISCUSSÃO</b>	<b>93</b>
<b>6 - CONCLUSÕES</b>	<b>103</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>106</b>
<b>8 - ANEXOS</b>	<b>132</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil nos últimos 21 anos.	18
<b>Figura 2.</b> Total de genes de proteases em <i>Leishmania</i> spp	55
<b>Figura 3.</b> Frequência de cromossomos nas diferentes classes de proteases em <i>Leishmania</i> spp	58
<b>Figura 4.</b> Análise de alelos conservados no genoma de <i>Leishmania</i> spp	60
<b>Figura 5.</b> Clans e famílias de proteases de <i>Leishmania</i> spp.	61
<b>Figura 6.</b> Análise da população de promastigotas <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> , cepa Thor (MCAN/BR/1998/R619)	64
<b>Figura 7.</b> Curvas de crescimento de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	65
<b>Figura 8.</b> Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c com a cepa Thor (MCAN/BR/1998/R619) e seus clones.	67
<b>Figura 9.</b> Índice endocítico de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c	68
<b>Figura 10.</b> Exemplares de amastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> , da cepa Thor (MCAN/BR/1998/R619), transformadas <i>in vitro</i>	69
<b>Figura 11.</b> Análise dos produtos de amplificação em gel de agarose a 2%	72
<b>Figura 12.</b> Curva de dissociação dos iniciadores	76
<b>Figura 13.</b> Níveis de expressão dos genes de protease	78
<b>Figura 14.</b> Níveis de expressão dos genes de proteases dos clones Thor 17 e Thor 25	79
<b>Figura 15.</b> Agrupamento dos parasitos da cepa MCAN/BR/1998/R619	81
<b>Figura 16.</b> Diagrama de caixa para definição do agrupamento hierárquico	82
<b>Figura 17.</b> Detecção de citocinas durante a infecção de macrófagos peritoneais	85
<b>Figura 18.</b> Detecção de óxido nítrico durante a infecção de macrófagos peritoneais	86
<b>Figura 19.</b> Infecção de macrófagos peritoneais de camundongos infectados por parasitos do grupo (I)	88
<b>Figura 20.</b> Infecção de macrófagos peritoneais de camundongos por parasitos do grupo (II)	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Principais componentes de superfície de <i>Leishmania</i> spp. e suas atuações nos hospedeiros	24
<b>Tabela 2.</b> Informações quantitativas do genoma de <i>Leishmania</i> sp	31
<b>Tabela 3.</b> Ações imunológicas das proteinases no sistema imunológico mamífero que dirigem as manifestações clínicas das leishmanioses	36
<b>Tabela 4.</b> Pares de iniciadores desenhados para a análise da expressão de genes-alvo de proteases e genes endógenos em <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> por ensaios de PCR em tempo real	71
<b>Tabela 5.</b> Resultados da análise de produtos de PCR dos genes-alvo de <i>Leishmania</i> pela ferramenta NCBI BLAST	73
<b>Tabela 6.</b> Análise da especificidade dos pares de iniciadores e da eficiência de amplificação das combinações de pares de iniciadores e amostras de cDNA nos ensaios de PCR em tempo real	77
<b>Tabela 7.</b> Produção de mediadores inflamatórios na etapa inicial de infecção	90
<b>Tabela 8.</b> Expressão de proteinases formas metacíclicas	91
<b>Tabela 9.</b> Expressão de proteinases no início da infecção	92

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os parasitos do gênero *Leishmania*, protozoários veiculados por insetos flebotomíneos e responsáveis pelas leishmanioses visceral e tegumentar, se encontram amplamente distribuídos pelo mundo. Os dados mais recentes apontam um total de 98 países e três territórios endêmicos para a transmissão das leishmanioses, totalizando 220 mil casos por ano de leishmaniose tegumentar (LT). Os dez países mais afetados, que juntos albergam 70 a 75% dos casos, são: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (Alvar et al., 2012).

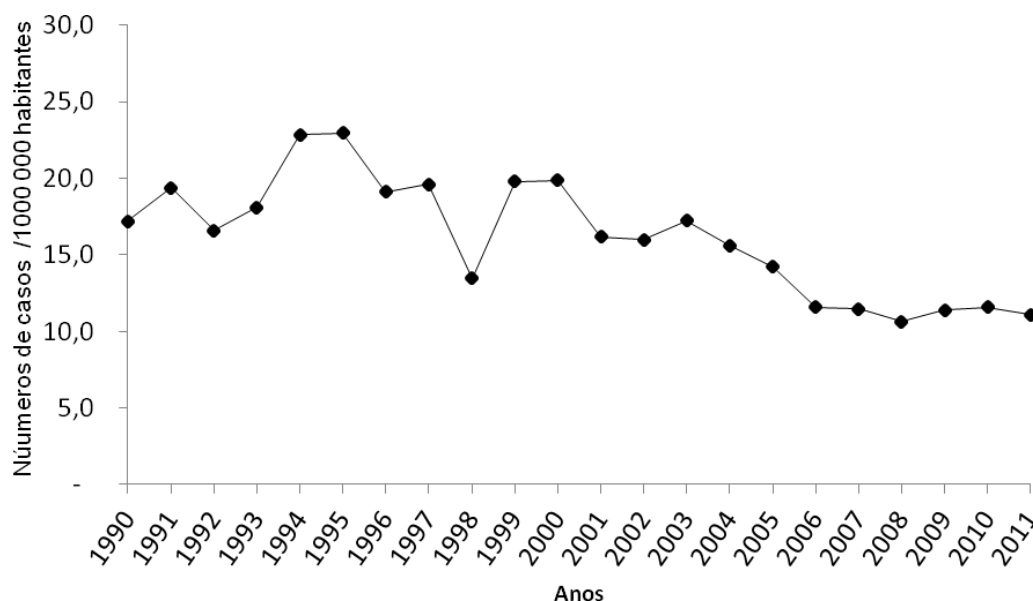
A forma tegumentar da leishmaniose no Velho Mundo é conhecida há milênios, podemos encontrar referências a ela nos textos bíblicos e em manuscritos orientais. O papiro de Ebers, um dos tratados médicos mais antigos de aproximadamente 2000 anos a.C, relata uma doença com características semelhantes à leishmaniose tegumentar (LT), denominada botão do Nilo (Oumeish, 1999). Na Ásia Central a enfermidade era conhecida como “úlceras de Balkh”, referência ao nome da cidade de Balkh no Norte do Afeganistão, área de alta endemecidade de LT. Outras denominações já foram dadas às lesões típicas da doença, tais como “botão de Biskra”, “botão do Oriente”, “úlceras de Bagdad”, “úlceras de Delhi”, “úlceras de Ashkabad” entre outros. Comumente eram referências ao nome do local onde ocorriam de forma endêmica (Brumpt & Pedroso 1913, Grevelink & Lerner, 1996).

Os primeiros relatos científicos datam de 1903, trata-se da descrição de protozoários isolados de uma lesão cutânea de uma criança, feita pelo patologista James Homer Wright que foi classificado como *Helcosoma tropicum* (Wright, 1903). A espécie foi reclassificada por Luhe (apud Altamirano-Enciso et al., 2003) em 1906. Entretanto os parasitos foram observados anteriormente no ano de 1885 por David Cunningham e em 1898 por Piotr Borovsky (apud Cox, 2002).

Em uma revisão de 1925, dos Annaes Brasileiros de Dermatologia e Syphilographia, intitulada “Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil”, Eduardo Rabello dividiu a história da leishmaniose tegumentar no Brasil em três períodos. O primeiro tem a origem incerta e vai até 1895 e

corresponde à observação clínica do “botão da Bahia” e sua associação ao “botão do Oriente” como era descrita a forma tegumentar no Velho Mundo; o segundo vai até 1909 quando o agente etiológico é descrito por Adolpho Lindenberg em São Paulo (Lindenberg, 1909) e o terceiro com início em 1910 destaca a associação do parasito à forma mucosa devido ao seu achado em lesões deste tipo, até a publicação do artigo com a descrição da espécie *Leishmania braziliensis* por Gaspar Vianna, em 1911. (Vale & Furtado, 2005).

A julgar pelos dados notificados recentemente pelo Ministério da Saúde no Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresentou de 1985 a 2005 uma média de 28.568 novos casos anuais (Ministério da Saúde, 2010), de 2007 a 2011 a incidência anual foi de 11,3 casos a cada 100 mil habitantes (Data SUS, 2014) (Figura 1).



**Figura 1:** Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil nos últimos 21 anos. O gráfico representa a taxa de incidência de LTA entre o ano de 1990 e 2011, número de casos por 100.000 habitantes. Os dados para construção deste gráfico foram obtidos na página eletrônica do Ministério da Saúde no DATASUS, Informações de Saúde (TABNET) no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?idb2012/d0202.def>) pesquisa em 22/05/2014.

## 1.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR – CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

Os protozoários agentes etiológicos da LT possuem ciclo de vida heteroxênico, alternando estágios de vida entre hospedeiros mamíferos e invertebrados. As principais espécies causadoras da LT no Brasil são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, todas transmitidas por fêmeas de flebotomíneos (Grimaldi et al., 1989). A *L. (V.) braziliensis* é o principal agente etiológico da forma mucocutânea da doença nas Américas, e o mais frequente agente da LT no Brasil (Rangel & Laison, 2003). Sendo uma das afecções dermatológicas que merecem mais atenção devido ao risco de causarem deformidades e seu consequente envolvimento psicológico refletindo nas áreas social e econômica, já que é classificada como uma doença ocupacional (Ministério da Saúde, 2010).

Nas áreas endêmicas, as leishmanioses demonstram uma distribuição difusa, composta por três principais tipos de padrões epidemiológicos: (i) um silvestre, onde se apresenta como uma zoonose, que pode acometer o ser humano quando em contato com este ambiente; (ii) um ocupacional ou de lazer, associado a áreas onde houve derrubada de mata para construção de novos empreendimentos; (iii) e um rural e periurbano, em áreas de colonização de matas secundárias ou residuais (Ministério da Saúde, 2010). A diversidade dos ciclos de transmissão, com diferentes vetores, parasitos e espécies hospedeiras, contribui para a complexidade epidemiológica da doença. Entretanto, alterações ambientais causadas pelo homem ou por eventos naturais afetam as populações de espécies envolvidas influenciando no risco de se contrair a doença (Patz et al., 2000; Dujardin et al., 2006).

Os protozoários do gênero *Leishmania* se apresentam sob duas formas principais: (i) células de 5-15µm, alongadas e com flagelo livre, encontradas no tubo digestório do hospedeiro flebotomíneo e denominadas promastigotas; (ii) e as amastigotas, células ovoides de 3-5µm, imóveis com pequeno flagelo restrito à bolsa flagelar, encontradas no interior de células do hospedeiro mamífero (Bates, 2008; Kamhawi, 2006).



Ambas as formas do parasito podem ser mantidas em laboratório, *in vitro*, utilizando diferentes meios de cultura. O mais comumente empregado para o isolamento de parasitos de lesão é o ágar sangue de Novy e McNeal, modificado por Nicolle, conhecido como NNN, e suas modificações, os promastigotas são mantidos a 24-28°C (Gontijo & Carvalho, 2003). A obtenção de amastigotas também é possível, esta é alcançada com a diferenciação e replicação *in vitro* através de cultura de macrófagos humanos e murinos (Gantt et al., 2001), macrófagos J774 (Chang et al, 2003; Wanderley et al., 2009), fibroblastos (Corte-Real et al., 1995; Bogdan et al., 2000; Pessotti et al., 2004; Hespanhol et al., 2005), células dendríticas (Jebbari et al., 2002, Colmenares et al., 2004), neutrófilos (Laskay, Zandbergen, Slobach, 2003). Entretanto também é possível o cultivo de amastigotas axênicas. Ao mimetizar as condições de pH e temperatura ocorridas no meio intracelular, habitat natural das amastigotas de *Leishmania*, pode se induzir as transformações morfológicas do parasito. Estudos demonstraram que somente a elevação da temperatura possibilitou as alterações morfológicas (Hunter et al., 1982; Darling & Blum, 1987; Bates, 1992), e até mesmo alteração no perfil antigênico (Fehniger et al., 1990; Rainey & Spithill, 1991). Com a estratégia de acidificar o pH do meio de cultura foi possível a diferenciação das formas metacíclicas de *L. (L.) mexicana* em amastigotas (Bates, 1994). Utilizando tanto a meio de cultura mais ácido, quanto a elevação da temperatura para 32°C foi possível gerar formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Cysne-Finkelstein et al., 1998).

Os vetores das leishmanioses são as fêmeas de insetos pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae (Young & Duncan, 1994). Estas se infectam quando ingerem as amastigotas, encontradas livres no tecido ou em fagolisossomos de macrófagos e outros fagócitos, ao realizarem o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado (Handman & Bullen, 2002). No intestino do inseto vetor os parasitos se diferenciam em promastigotas procíclicos, que são formas ovoides de flagelo curto, pouco móveis (Pimenta et al., 1997; Soares et al., 2005). Estas formas se multiplicam por divisão binária, escapam do espaço endoperitófrico (Sádlová & Volf, 2009) e se fixam em porções específicas do tubo digestivo, de acordo com o subgênero a

que pertençam para evitar que sejam expulsas pela defecação com o bolo alimentar (Bates & Rogers, 2004).

No subgênero *Viannia* os parasitos se aderem preferencialmente à região peripilárica e no subgênero *Leishmania* à região suprapilárica do intestino do inseto vetor (Nieves & Pimenta, 2000). Em uma etapa seguinte, alguns parasitos se diferenciam em promastigotas metacíclicos, forma infectante para mamíferos, num processo conhecido como metaciclogênese. Estas formas migram para o intestino anterior do inseto onde secretam quitinases (Ramalho-Ortigão & Traub-Cseko, 2003; Ramalho-Ortigão et al. 2005), que causa danos a válvula estomodeal do inseto, e PSG (*promastigote secreted gel*), ambos dificultam o processo de sucção sanguínea e, em um próximo repasto, o flebotomíneo regurgita o sangue recém ingerido, contaminado com formas promastigotas metacíclicos, na pele de um hospedeiro vertebrado levando à continuidade do ciclo do protozoário (Bates, 2008; Bates, 2007; Rogers et al., 2002).

Estudos visando conhecer a quantidade de promastigotas depositados na derme do hospedeiro vertebrado por um único flebotomíneo já foram realizados e ambos demonstraram que esta quantidade pode variar bastante de um inseto para outro. Enquanto um demonstrou que alguns insetos transmitem baixas doses, menos de 600 parasitos, enquanto outros variavam de mais de 1.000 a 100 mil parasitos (Kimblin et al., 2008); outro estudo demonstrou que o número de parasito transmitido por um único inseto variava de 4 a  $4,19 \times 10^{14}$  promastigotas (Maia et al, 2011).

Uma vez na derme para sobreviverem e se multiplicarem neste novo microambiente, os promastigotas passam por profundas alterações bioquímicas e morfológicas (Turco & Descoteaux, 1992). Devem resistir à ação lítica do complemento e serem fagocitados por células mononucleares, onde se diferenciam em amastigotas que se multiplicam por fissão binária até romperem a célula densamente parasitada, infectando novas células e, desta forma, perpetuando a infecção (Lodge & Descoteaux, 2005).

Em recente publicação de um capítulo de livro dedicado aos componentes de superfície do parasito e o papel destes na interação parasito-hospedeiro,

descrevemos que parasitos do gênero *Leishmania* possuem um arsenal variado de componentes estruturais e funcionais, essenciais para sua adaptação nos hospedeiros vertebrados e invertebrados (ANEXO I). De fato, a superfície celular desses parasitos representa o primeiro contato com os diferentes microambientes dos seus hospedeiros, e os componentes de superfície proporciona o sucesso do ciclo biológico da *Leishmania* spp.

A camada mais externa da membrana plasmática desses protozoários constituída por uma rede entrelaçada de carboidratos ligados covalentemente aos lipídeos e proteínas, conhecida como glicocálice, de forma geral, é rico em glicosilfosfatidilinositol (glycosylphosphatidylinositol – GPI), lipofosfoglicanos (lipophosphoglycan – LPG), glicoinositolfosfolipídeos (glycoinositolphospholipids – GIPLs), proteínas e enzimas (Tabela 1).

Dentre estes componentes de superfície destaca-se o LPG com uma gama de atuações no hospedeiro vertebrado e invertebrado, sendo uma vantagem adaptativa destes parasitos. A estrutura e a expressão do LPG variam entre as diferentes espécies e estágios evolutivos do protozoário, mostrando-se uma importante ferramenta na adaptação do parasito ante os diferentes microambientes dos hospedeiros (Pimenta, Saraiva & Sacks, 1991; Saraiva et al., 1995; Olivier, Gregory & Forget, 2005; de Assis et al., 2012). Estudos *in vitro* utilizando *L. (L.) major* indicaram que a forma específica de LPG de amastigota desaparece após 48 horas da transformação amastigota-promastigota, enquanto durante a transformação promastigota-amastigota, a forma específica de LPG de amastigota foi detectada 12 horas após a infecção (Glaser et al., 1991). Em outras espécies, como *L. (L.) donovani*, a forma específica de amastigota não é detectada (McConville & Blackwell, 1991).

O tipo de ancoramento do LPG à superfície da membrana plasmática é realizado por um grupamento GPI [1-O-alkil-2-lisofosfatidil(mio)inositol] presente em todas as espécies de *Leishmania* analisadas até o momento (McConville & Ralton, 1997; Turco & Descoteaux, 1992). Variações na estrutura do LPG podem ser detectadas dentro de uma mesma espécie e entre espécies de *Leishmania*, revelando um polimorfismo dos oligossacarídeos que as constituem, servindo, assim, como marcador específico de espécies ou do estágio em que se encontra

o parasito, como proposto para *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) major*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) chagasi* (Turco & Sacks, 1991; Ilg et al., 1992; Mahoney et al., 1999; Soares et al., 2002). O LPG das formas procíclicas de *L. (V.) braziliensis* foi caracterizado por não conter cadeias laterais de açúcares, diferentes das espécies do subgênero *Leishmania*. Essa modificação foi descrita como um novo mecanismo na regulação da estrutura do LPG durante a metaciclogênese (Soares et al., 2005).

No hospedeiro vertebrado, o LPG é um importante ligante de macrófagos, estando diretamente envolvido nas etapas iniciais da infecção. Promastigotas lpg1- de *L. (L.) major* se mostraram altamente suscetíveis à ação do sistema complemento, além de terem sido afetados por agentes oxidantes produzidos pelas células do hospedeiro e perderem a capacidade de inibir a fusão do fagolisossomo (Spath, 2000; Handman & Goding, 1985; Spath et al., 2003). Sabe-se também que o LPG de *Leishmania* spp. exerce uma ação inibitória sobre a atividade da proteína quinase C (PKC) de macrófagos, favorecendo o estabelecimento e manutenção da infecção, uma vez que essa enzima é um componente-chave do processo de ativação de tais células (Turco, 1999; Delgado-Domínguez et al., 2010). Um estudo avaliando ação de três tipos de LPG de *L. (L.) infantum* indicou que apenas uma variante é capaz de estimular a produção de óxido nítrico em macrófagos murinos (Coelho-Finamore et al., 2011). Em relação ao sistema complemento, o LPG de promastigotas metacíclicas de *L.(L.) major* inibe a formação do complexo de ataque à membrana em virtude de suas longas cadeias de açúcar (Puentes et al., 1988; 1990; Sacks, 1992).

Destacam-se também as proteases de superfície com importantes atuações no hospedeiro mamífero, como nas funções de macrófagos, e no inseto vetor, como proteger os promastigotas da ação de proteases do inseto. E, é cada dia evidente o papel das cisteíno-proteinases na resposta imune da LT do hospedeiro vertebrado, como enzima e como indutor de resposta imune celular (Tabela 1).

**Tabela 1:** Principais componentes de superfície de *Leishmania* spp. e suas atuações nos hospedeiros.

Componentes	Função	
	Hospedeiro Vertebrado	Hospedeiro Invertebrado
LPG	Ligante de macrófagos; Inibe a atividade da PKC de macrófagos; Em metacíclicos: (a) inibe a formação do complexo de ataque a membrana; e (b) ativa complemento proporcionando a ligação ao macrófago via C3bi; Atua na resposta imune inata via células NK e células dendríticas através do receptor <i>toll-like 2</i> e pelo aumento de INF- $\gamma$ e TNF- $\alpha$	Fixa promastigotas procíclicas ao epitélio intestinal
GIPLs	Inibe síntese de óxido nítrico em macrófagos; Inibe atividade de PKC; Influencia a taxa de infecção de macrófagos;	FNd
<b>Proteínas e enzimas:</b>		
KMP-11	Imunomodulação	FNd
HASP	Imunomodulação	FNd
Amastina	Invasão e multiplicação intracelular	FNd
Receptor de adenil ciclase	Indução de mudança de estágio de promastigota a amastigota	Induz a mudança de estágio de amastigota a promastigota
gp46/M-2	FNd	FNd
PPG	mPPG - Ligante de receptores de macrófagos	mPPG - ligante de células do tubo digestório
	aPPG - contribuir para manutenção do vacúolo parasitóforo	FNd
	aPPG - ativa complemento via proteína ligadora de manose	FNd
	FNd	fPPG – dificulta ingestão de alimento do flebótomo;
AcPs	MAcPs/SAcPs - interferem na produção de metabólitos oxidativos ( $H_2O_2$ , $OH^-$ , $O_2^-$ )	Idem
3'-nucleotidase e 5'-nucleotidase	Papel nutricional – hidrólise de nucleotídeos a ácidos nucléicos (3'-AMP e 5'-AMP)	Idem
Ca <sup>2+</sup> -ATPase	Manutenção dos níveis de Ca <sup>2+</sup> citoplasmático e do fagossomo;	Manutenção dos níveis de Ca <sup>2+</sup> citoplasmático
Mg <sup>2+</sup> -ATPases	Função de bomba de extrusão de H <sup>+</sup> ; Acumulação de glicose e potássio Pré-adaptação dos promastigotas no macrófago	FNd
Metaloproteinase	Hidrólise e inativação de imunoglobulinas G; Inativação do fator C3b em C3bi do complemento; Adesão e interiorização nos macrófagos	Protege os promastigotas da ação de tripsina e quimiotripsina do intestino do inseto;
Cisteína proteinase	Imunorregulador na leishmaniose cutânea: com atividade enzimática sobre componentes do sistema imune e pela atuação da região C-terminal na indução resposta Th2.	FNd
PLH	Ligação dos promastigotas aos macrófagos	Ligação dos promastigotas ao trato digestório de flebótomos;

FNd – função não determinada

As glicoproteínas de superfície do parasito estão envolvidas no processo de ligação com os receptores da célula hospedeira, sendo a glicoproteína 63 (gp63) e o LPG maiores glicoconjugados envolvidos no processo (Murray et al., 2005). Embora não possua um mecanismo ativo de entrada na célula, o parasito se utiliza desses ligantes de superfície, sendo fagocitados por meio de endocitose mediada por receptores (Alexander, Satoskar, Russell, 1999). Estudos demonstram que os polimorfonucleares (PMN) são os primeiros leucócitos a chegarem ao sítio de infecção, fagocitando os parasitos; os macrófagos são capazes de fagocitar PMN infectados, portanto as *Leishmania spp.* utilizariam os granulócitos como “cavalos de Tróia” para entrarem nas células hospedeiras de forma “silenciosa” (van Zandbergen et al., 2004; Laskay, Zandbergen, Solbach, 2008). Estudos *in vivo* de lesão experimental demonstraram a presença de parasitos degradados no interior de neutrófilos que não pertenciam ao infiltrado celular inicial (Andrade et al., 1984; Beil et al., 1992). Há evidência, mesmo que indireta da destruição de parasitos por neutrófilos devido ao grande número de parasitos lisados observados no espaço extracelular entre debris de neutrófilos e leucócitos (Pompeu et al., 1991). Ribeiro-Gomes e Sacks (2012) sugerem que a influência da resposta dos neutrófilos no resultado da infecção depende principalmente do tempo do recrutamento e ambiente tecidual onde ocorre.

Dependendo do estágio e espécie, estes parasitos podem se evadir da resposta inata, remodelar compartimentos intracelulares e vias metabólicas e prejudicar ações de macrófagos e células dendríticas (McMahon-Pratt & Alexander, 2004).

As estratégias do parasito para invadir as células hospedeiras e manter-se neste ambiente hostil são eficientes e caracterizam o seu sucesso adaptativo. Somente uma resposta celular efetiva seria capaz de combater o parasito, com a ativação de linfócitos T CD4+ capazes de ativar a função leishmanicida de macrófagos e monócitos. A ativação, ou não, da função leishmanicida dos macrófagos durante a infecção por *Leishmania sp* é um delicado equilíbrio na relação parasito hospedeiro, onde a diferenciação de subpopulações de células T CD4+, linfócitos T helper 1 (Th1), linfócitos T helper 2 (Th2) dependem de citocinas presentes no microambiente durante a ativação de células T CD4+ não

primados. Dependendo deste balanço de citocinas, moléculas co-estimulatórias, genética do hospedeiro e estímulos antigênicos (Ettinger et al., 2009; Blackwell et al., 2009; Kaye & Scott, 2011), as células T se diferenciam em determinadas subpopulações Th e produzem um painel de citocinas. Estas, por sua vez, agem nos macrófagos hospedeiros e os preparam para serem efetivos ou não contra *Leishmania* (Gollob, Viana, Dutra, 2014).

O uso de linhagens de camundongos resistentes e suscetíveis à leishmaniose é bastante importante como modelo para avaliação e compreensão da polarização das respostas imunológicas Th1 e Th2 (Tacchini-Cottier, Weinkopff, Launois, 2012). As linhagens *inbred* utilizadas, incluindo os camundongos BALB/c, em geral são resistentes à infecção por *L. (V.) braziliensis*. Atualmente é estabelecido que o hamster é um modelo apropriado para estudos da imunopatogênese da leishmaniose tegumentar causada por *L. (V.) braziliensis* justificando seu uso em protocolos que envolvem avaliações clínicas, desenvolvimento de vacinas e quimioterapia (Martinez et al., 2000; Gomes-Silva et al., 2013). Entretanto, estudos que utilizam diferentes vias de inoculação demonstram que estratégias deste tipo podem variar o grau de suscetibilidade das diversas linhagens de camundongos às espécies do subgênero *Viannia* (de Moura et al., 2005).

Durante a infecção por *Leishmania* spp. o lipopolissacarídeo (LPS) e IFN- $\gamma$  podem promover a ativação clássica de macrófagos. Uma vez ativadas estas células passam a produzir mais IL-12 e IL-23 e menos IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Os macrófagos são capazes de produzir moléculas efetoras, como espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, citocinas inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6. Quando ativados se comportam como indutores de resposta imunológica celular, promovendo diferenciação de linfócitos Th1, e mediando resistência de patógenos intracelulares e células tumorais (Raes et al., 2007).

A resistência ou suscetibilidade às leishmanioses tem sido associada ao balanço entre as respostas celular e humoral (Belosevic et al., 1989). Vários estudos com *L. (L.) major* utilizando camundongos BALB/c e C57/BL6 como modelos de infecção têm demonstrado que um prognóstico associado à resposta que é predominantemente Th1 é determinado pela produção de citocinas IL-12 e

TNF- $\alpha$ . A suscetibilidade a manifestações mais sérias da doença estão associadas à ativação de linfócitos Th2 e está baseada na produção de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10 (Bogdan et al., 1996; Launois et al., 1998; Sacks & Noben-Trauth, 2002; Mansueto et al., 2007). Já em *L. (V.) braziliensis*, outro quadro é observado. Uma resposta Th1 exacerbada (hiperergia) pode ser vista e promove um aumento do dano tecidual próximo a regiões onde há altos níveis de antígenos de parasitos. Esta observação é característica da forma mucosa da doença que é associada a altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Cavalho et al., 1985; Da-Cruz et al., 1996; Ribeiro-de-Jesus et al., 1998; Amato et al., 2003) e uma regulação deficiente relacionada à baixa produção de IL-10 (Bacellar et al., 2002) e expressão reduzida de receptores desta interleucina (Faria et al., 2005).

### **1.3 *Leishmania (Viannia) braziliensis***

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie na qual o presente estudo está focado, pertence ao complexo que leva o mesmo nome e foi descrita pela primeira vez em 1911 por Gaspar Viannia (Vianna, 1911; Deane, 1985). Sua classificação taxonômica é a seguinte:

**Reino:** Kinetoplastida

**InfraReino:** Excavata Cavalier-Smith, 2002 emend. Simpson 2003

**Classe:** Kinetoplastea Honigberg 1963

**Ordem:** Trypanosomatida Kent 1980, emend. Vickerman in Moreira et al. 2004

**Família:** Trypanosomatidae Doflein, 1951

**Subfamília:** Leishmaniinae Maslov and Lukes in Jirku et al. 2012

**Gênero:** *Leishmania*

**Subgênero:** *Viannia* (Laison and Shaw, 1987).

**Espécie:** *Leishmania braziliensis* Vianna, 1911 emend. Matta, 1916.



Esta espécie é o agente mais importante de LT nas Américas, os limites de ocorrência são ao Norte, América Central e ao Sul, o norte da Argentina, incluindo todos estados do Brasil. Acomete diversas ordens de mamíferos, incluindo roedores, canídeos, felídeos, equídeos e o homem (Ministério da Saúde, 2010). Pequenos mamíferos silvestres já tiveram a infecção natural comprovada como *Oryzomys capito* (Forattini et al., 1973) *Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamipes* (Brandão-Filho et al., 2003), *Oryzomys subflavus* (Oliveira et al., 2005), *Dideplphis albiventris* (Brandão-Filho et al., 2003; Schallig et al., 2007), além do *Rattus rattus* (Alencar, Pessoa, Fontenele, 1960, Brandão-Filho et al., 2003, Oliveira et al., 2005).

Quanto aos seus vetores, diversos flebotomíneos são incriminados como vetores da *L. (V.) braziliensis* (Ministério da Saúde, 2010), no entanto somente *Psychodopygus wellcomei* tem a competência vetorial comprovada (Ryan et al., 1987). Para serem considerados vetores devem obedecer a alguns critérios como: antropofilia, infecção natural pelo parasito ou quando os parasitos identificados são do subgênero *Viannia*, sendo que todos estes devem estar associados a áreas onde há ocorrência de casos humanos. Os demais vetores foram incriminados devido a esses fatores, sendo alguns deles: *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia neivai*, *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia migonei*, *Pintomyia fischeri* e *Pintomyia pessoai* (Diniz et al., 2014).

A infecção por *L. (V.) braziliensis* apresenta um período de incubação que pode variar de duas semanas a vários meses e as lesões cutâneas constituem úlceras rasas, circulares, com bordas elevadas e bem definidas e com assoalho da úlcera de aspecto granular. Nas infecções pela *L. (V.) braziliensis*, a linfadenopatia regional geralmente precede o surgimento de ulcerações por uma a doze semanas (Gontijo & Carvalho, 2003).

As formas clínicas de leishmaniose mais comuns causadas por *L. (V.) braziliensis* incluem a cutânea localizada, a forma mucosa e a disseminada. É importante distinguir a forma disseminada da forma localizada com múltiplas lesões, nesta última os pacientes apresentam lesões que aparecem em diferentes épocas da infecção. Já na forma disseminada apresentam uma úlcera inicialmente isolada, que dentro de poucos dias se desenvolve para mais de cem

lesões que podem ser, pápulas, úlceras, acneiformes ou nodulares. (Carvalho et al., 1994; Turetz et al., 2002; Guimarães et al., 2009). O diagnóstico definitivo depende do encontro e identificação de amastigotas em tecido ou promastigotas em meio de cultura (Gontijo & Carvalho, 2003), entretanto na prática clínica nem sempre é possível.

Até a década de 1950 a expansão da LTA por todo Brasil foi associada a grandes desmatamentos para a construção de estradas, moradias, indústrias, a partir de 1960 o que se viu foi a diminuição no número de casos. Entretanto novos casos eram sempre observados, em áreas de colonização antiga. A partir da década 1980 a incidência voltou a crescer em áreas de novos desmatamentos (Vale & Furtado, 2005).

Atualmente pacientes que não exercem atividades ligadas à agricultura e não residem em áreas rurais vem sendo mais frequentemente afetados que antigamente, o que demonstra o crescente processo de adaptação dos vetores ao peridomicílio e a áreas periurbanas (Jimarnus et al., 2012).

#### **1.4 Organização do genoma e variabilidade genética de *Leishmania* spp.**

A regulação da expressão gênica é um mecanismo fundamental para o desenvolvimento, homeostase, e adaptação ao meio ambiente de qualquer célula. Nos eucariotos em geral, cada etapa deste processo envolve pontos que podem ser controlados, conhecidos como pontos de regulação, estes incluem alteração estrutural da cromatina, transcrição do DNA em RNA, processamento do transcrito, transporte do transcrito ao citoplasma e tradução do RNA mensageiro (mRNA) em proteína. Investigações recentes da expressão gênica em tripanosomatídeos apontam que estes organismos possuem a mesma maquinaria empregada para eucariotos superiores para o controle da expressão gênica, em níveis transcricionais, pós-transcricionais e epigenéticos, entretanto eles contêm além destes, mecanismos exclusivos. (Gomez et al., 2010).

A transcrição, processo pelo qual uma molécula de RNA é sintetizada de um molde de DNA, pode ser dividido em três etapas: iniciação, alongamento da cadeia de RNA e término. Dentre estes o primeiro é o passo que mais sofre regulação e para que ocorra é necessário que um complexo de proteínas, os fatores de

transcrição, se liguem ao DNA através de promotores. Em metazoários, vários elementos recrutam componentes do complexo de preiniciação da transcrição que facilitam o posicionamento e montagem da RNA polimerase II aos promotores (RNA pol II) (Gomez et al., 2010).

*Leishmania* spp, assim como todos os demais tripanosomatídeos possuem mecanismos de transcrição peculiares entre os eucariotos uma vez que não apresentam em cada gene um sítio definido de ligação da RNA pol II (Myler et al., 1999; Monnerat et al., 2004). O genoma destes protozoários é organizado em grandes unidades policistrônicas, estruturas contínuas de transcrição em tandem (Tschudi & Ullu, 1988; Gomez et al., 2010). Os genes são usualmente separados por algumas poucas centenas de pares de base e salvo raras exceções, não contém íntrons (Berriman et al., 2005; Peacock et al., 2007), de forma que a transcrição se inicia em um ponto e prossegue continuamente ao longo do cromossomo (Landfear et al., 1983; Myler et al., 1999; Worthey et al., 2003). O que se observa é que a RNA pol II tem uma especificidade baixa em tripanosomatídeos e a transcrição pode iniciar indiscriminadamente em qualquer local ao longo das unidades policistrônicas (McAndrew et al., 1998).

Os demais eucariotos se utilizam de mecanismos de expressão que aumentam ou diminuem a taxa de transcrição, no entanto a ausência das sequências promotoras de RNA pol II nos tripanosomatídeos os levou a apresentar a regulação da expressão gênica em outros níveis como na maturação do mRNA (poliadenilação e “*trans-splicing*”) ou na estabilidade de seus mRNAs (Flinn & Smith, 1992). Sequências nas regiões não transcritas 5’ e 3’ UTR da fase aberta de leitura (ORF) podem controlar a sinalização para a degradação do mRNA, controlando assim a quantidade de mRNA disponível (Clayton & Shapira, 2007).

Pode-se considerar que o genoma de *Leishmania* spp. é expresso constitutivamente com um número limitado de genes estágio-específicos (Papadopoulou et al., 2003; Cohen-Freue et al., 2007). Estudos de genômica comparativa demonstram alta sintonia entre espécies de *Leishmania*, o que se caracteriza pela conservação da ordem entre segmentos de cromossomos entre duas ou mais espécies (Peacock et al., 2007; Smith et al., 2007; Rogers et al.,

2011). A conservação desta característica foi objetivo de estudo neste trabalho de tese para os genes de proteases (ANEXOIII).

Nos últimos anos o genoma de algumas espécies de *Leishmania* vem sendo sequenciado (Tabela 2). Em *L. (V.) braziliensis*, espécie alvo deste estudo, o total de cromossomos se diferencia das demais espécies devido a eventos de fusão que ocorreram entre os cromossomos 20 e 34 (Britto et al., 1998; Peacock et al. 2007).

**Tabela 2:** Informações quantitativas do genoma de *Leishmania* spp.

Espécie	Cromossomos	Genes	Proteínas
<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	36	8195	8032
<i>Leishmania (Leishmania) major</i>	36	9686	8316
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	36	8383	8150
<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	34	8249	8147
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	35	7837	7555

Dentre os estudos sobre variabilidade genética de amostras e *Leishmania (Viannia) braziliensis* existentes, nenhum utilizou um painel significativo de isolados oriundos de focos de LTA de diferentes biomas do Brasil e boa parte deles utilizou isoenzimas como método de análise.

Estudos de taxonomia de isolados de *Leishmania* spp. apontam grande diversidade e também heterogeneidade entre diferentes populações e o que subgênero *Viannia* parece ser monofilético (Cupolillo, Grimaldi, Momen, 1994; Cupolillo, Grimaldi, Momen, 1997). Utilizando a técnica de tipagem da região intergênica, o mesmo grupo observou diferentes padrões do subgênero *Viannia* (Cupolillo et al., 1995). E em outro trabalho utilizando esta técnica associada à análise de isoenzimas demonstrou heterogeneidade populacional entre 15 zimodemas de *L. (V.) braziliensis* e 11 de *Leishmania (Viannia) naiffi* (Cupollilo et al., 1998). Enquanto Gomes et al. (1995), demonstraram diferenças entre cepas do Pará e Minas Gerais, as primeiras apresentando grande variabilidade genética e as últimas mostrando-se mais homogêneas.

É considerado que para os tripanosomatídeos a reprodução seja predominantemente clonal sendo, em um ambiente sobre condições ideais, um mecanismo de propagação exponencial dos parasitos. Entretanto em situações de estresse, a troca de material genético seria importante para a geração de novos fenótipos, alguns com vantagem seletiva e subsequente expansão dos parasitos numa dada população, contribuindo para diversidade fenotípica em populações naturais (Miles et al., 2009).

Evidências de recombinação genética foram identificadas entre populações naturais de diferentes espécies e cepas, como *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) arabica*, *L. (L.) major* e entre cepas de *L. (L.) infantum* no Velho Mundo (Kelly et al., 1991; Belli et al., 1994; Ravel et al., 2006; Chargui et al., 2009). Já em condições experimentais foi possível observar a existência de um ciclo sexual de *L. (L.) major* (Akopyants et al., 2009), e a presença de indivíduos híbridos de *L. (L.) donovani* (Sadovlá et al., 2011), no trato digestório do inseto vetor.

Mesmo para espécies onde são claras as evidências de troca de material genético, há dados indicando que a propagação evolutiva clonal deve ter sido o modo predominante nessas linhagens (Tibayrenc & Ayala, 1999). A teoria clonal de 1990 (Tibayrenc, Kjellberg, Ayala, 1990), não diz que o “sexo” entre os protozoários parasitos está ausente em espécies basicamente clonais. A teoria propõe que a troca de material genético ocorre, entretanto numa frequência tão baixa que impossibilita a quebra do padrão de população clonal predominante (Tibayrenc & Ayala, 2002).

Muitos parasitos têm estratégias reprodutivas bastantes complexas e dependendo da situação pode ser vantajoso ter os dois tipos de reprodução. A sexual, que de forma rápida gera variabilidade genética, ou a propagação clonal, que estabiliza de forma bem sucedida genótipos multilocus, entretanto há limitações, uma vez que não tem sido demonstrado que estas estratégias são tão flexíveis ou dirigidas por pressões do ambiente (Levin, Lipsitch & Bonhoeffer, 1999).

## 1.5. Proteinases como fatores de virulência

O envolvimento de diversos componentes do parasito na sua sobrevivência no interior de células do hospedeiro mamífero é confirmado através de dados obtidos de análises biológicas de pacientes e de ensaios com modelos animais, a esses componentes damos o nome de fatores de virulência. Dentre eles se destacam as proteinases, uma vez que são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas e, portanto degradam proteínas e peptídeos que participam de diversas funções biológicas, incluindo o processo infeccioso (Tabela 3). Estas enzimas ocorrem em variados sistemas biológicos e têm funções que vão desde a digestão de proteínas para fins nutritivos a refinados controles de funções de proteína hidrolisando ligações peptídicas específicas em determinados substratos (Barret, 1994).

De forma geral, as peptidases microbianas, nome mais geral dado a esta classe de enzimas, são classificadas em vários grupos de acordo com as características físico-químicas, tais como: e atividade ótima em pH alcalino, ácido ou neutro, tipo de reação catalisada, natureza química do sítio catalítico e relação evolutiva com a estrutura de referência (Barrett, 1994).

Já o termo proteinases se refere a uma subdivisão de peptidases que são as endopeptidases. Estas clivam ligações peptídicas internas da molécula de proteína e não nas porções externas amino- ou carboxi- terminais, sendo este tipo de enzimas denominadas exopeptidases. Portanto o termo *in* de prote<sup>*in*</sup>ase vem da língua inglesa que significa dentro, e se refere ao local de clivagem, no interior da molécula proteica. (Barrett, Rawlings, O'Brien, 2001; Barrett, Tolle, Rawlings, 2003). As proteinases são então classificadas quanto ao aminoácido liberado na catálise e natureza do sítio catalítico, como são subdivididas em serina- (EC 3.4.21.), cisteína- (EC 3.4.22), aspártico- (EC 3.4.23), metalo- (EC 3.4.24) e treonina-peptidases (EC 3.4.25) (Rawlings, Barret, Bateman, 2010).

Há um banco de dados disponível online, o MEROPS, que apresenta um sistema de classificação e nomenclatura para as peptidases e seus inibidores. Nele as enzimas estão agrupadas levando-se em conta a homologia na sequência de aminoácidos, as famílias de acordo com a ancestralidade são

agrupadas em clãs, estes de acordo com a estrutura terciária das peptidases (Rawlings, Barrett, Bateman, 2012).

Recentemente revisamos estudos que exploram o papel das proteinases como fatores de virulência que promovem a sobrevivência do parasito e imunomodulação do hospedeiro mamífero, além do envolvimento direto de proteinases do hospedeiro na evolução da lesão. Os dados reunidos nesta revisão demonstram que proteinases do parasito, como também do hospedeiro, estão envolvidas na manifestação clínica das leishmanioses (ANEXO II). É interessante notar que apesar da maioria das classes de proteinases estarem presentes em *Leishmania* spp., somente cisteína- e metaloproteinases e, em menor escala, serina-proteinases tem sido adequadamente estudadas (Sajid & McKerrow, 2002; Silva-Lopez et al., 2004; Alves et al., 2005; McKerrow et al., 2006; Valdivieso et al., 2007;). Membros destas classes participam da invasão tecidual, sobrevivência nos macrófagos e imunomodulação dos parasitos. Portanto este apanhado, resumido na Tabela 3, reforça a importância das proteinases de *Leishmania*, que são candidatos interessantes para novas quimio- e imunoterapia.

Após a publicação da nossa revisão (ANEXO III) novos estudos relacionando as proteases como importantes agentes na relação parasito-hospedeiro foram publicados. Dentre eles, um que foi o primeiro a estabelecer cultura 3D de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e demonstrar que os parasitos interagem com fibras de colágeno do tipo I remodelando a organização destas em matriz 3D. Na presença de macrófagos também foi possível observar o que eles chamam de invasão trans-matriz. O estudo ainda conclui que pelo menos duas classes de proteases, metalo e cisteína-proteases, estão envolvidas na degradação das fibras, uma vez que o tratamento com inibidores de proteases reduziu significativamente a invasão e a migração do parasito através da matriz (Petropolis et al., 2014).

A importância da cisteína-protease B (CPB) de *Leishmania* para infectividade e sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado foi mais uma vez apontada por um estudo. Nele, os autores investigaram a influência da heparina, importante ligante para internalização de patógenos, na atividade de cisteína-protease de *L.*

(*L.*) mexicana. E demonstraram que, de acordo com a concentração, a heparina pode estimular ou antagonizar a atividade da CPB durante a infecção, sugerindo que este glicosaminoglicano pode ancorar a CPB à superfície das células do hospedeiro (Judice et al., 2013).

Já outro trabalho, analisando genes de algumas proteases como fatores de virulência, comparou a infectividade de promastigotas de *L. (L.) mexicana* virulentas (recentemente isoladas de camundongos Balb/c) e avirulentas (mesmo isolado mantido por 20 passagens *in vitro*) em monócitos e macrófagos humanos. E observou que múltiplas passagens *in vitro* levam à perda de infectividade do parasito e conseqüentemente a alterações na interação célula-hospedeiro. Com ensaios de expressão gênica foi verificado uma diminuição de genes de proteases como: gp63, cisteína peptidase C, cisteína peptidase B e B2. Além disso, o isolado avirulento não foi capaz de se transformar em amastigotas no interior de macrófagos e monócitos e ao contrário da forma virulenta, não aumentou a expressão de citocinas associadas à resposta Th2 (Ali et al., 2013).

Outro estudo comprovou que a ausência da metaloproteases gp63 altera o conteúdo proteico de exossomos de *Leishmania*. Os exossomos são vesículas secretadas por vários microrganismos eucariotos em rotas não convencionais de secreção de proteínas citosólicas, membranares, bem como em RNA. Estudos anteriores sugerem uma ação imunomoduladora de exossomos de *Leishmania* sobre macrófagos (Hassani et al., 2011; Silverman et al., 2010a; Silverman et al., 2010b). Com o uso de *L. (L.) major* deficientes em gp63 (gp63<sup>-/-</sup>) e selvagens foi possível observar que o exossomo de *Leishmania* é capaz de modular proteína tirosina fosfatase (PTP) e fatores de transcrição de macrófagos de forma dependente de gp63. O que confirma a hipótese de que a gp63 tem importante papel em guiar a resposta inflamatória durante a infecção recente. Também foi observado que o conteúdo proteico dos exossomos dos parasitos que não possuíam gp63 é bastante alterado, o que sugere uma função da gp63 na seleção das proteínas exossomais (Hassani et al., 2014).



**Tabela 3:** Ações imunológicas das proteinases no sistema imunológico mamífero que dirigem as manifestações clínicas das leishmanioses

Classe de Proteinase	Espécie	Atividade no hospedeiro mamífero	Referência	
Cisteína proteinase	<b>CPA</b>	<i>L. (L.) donovani</i>	Relacionado à infectividade de células de mamífero <i>in vitro</i> ;	Denise et al, 2006
		<i>L. (L.) mexicana</i>	Associada ao perfil Th2 em camundongos BALB/c: induzindo lesões; produção de IL-4 e IL-5; inibição da produção de IL-12 pela clivagem de NF-κB; inibição da produção de NO pela clivagem de STAT-1 e transcrição de fatores de AP-1. Associada ao perfil Th1 em camundongos C3HeB/FeJ e C57BL/6: expressão de citocinas associadas à resposta Th1;	Mottram et al. 2004; Alexander J et al. 1998; Denise et al. 2003; Alexander J et al. 2003; Weinheber et al. 1998; Bennett et al. 2001; Cameron et al. 2004; Abu-Dayyeh et al. 2010; Pollock et al. 2003
	<b>CPB</b>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Associado à clivagem de moléculas de MHC de classe II em camundongos; Epítopos da extensão COOH-terminal de CPB modulam a infecção em camundongos BALB/c e CBA: induzem citocinas relacionadas às respostas Th1 or Th2; estimulam linfócitos T CD8+;	De Souza Leao et al. 1995; Alves et al. 2004; Pereira et al. 2011;
		<i>L. (L.) pifanoi</i>	Reduz o percentual de macrófagos murinos infectados quando os parasitos são tratados com anticorpos anti-extensão C-terminal;	Marín-Villa et al. 2008
		<i>L. (L.) chagasi</i>	Associada ao perfil Th1 em pacientes assintomáticos: produção de IFN-γ em cultura de células; Relacionada aos perfis Th1 and Th2 em células de pacientes humanos e cães sintomáticos: produção de IFN-γ, IL-4 e IL-10 em cultura de células;	da Costa Pinheiro et al. 2005
	<b>CPC</b>	<i>L. (L.) mexicana</i>	Contribui na resistência à ação microbicida de macrófagos;	Frame MJ et al. 2000; Bart et al 1997; Mottran et al. 1998
		<i>L. (L.) chagasi</i>	Induz expressão de TGF-β cultura de células humanas;	Somanna et al 2002

**Continuação Tabela 3:** Ações imunológicas das proteinases no sistema imunológico mamífero que dirigem as manifestações clínicas das leishmanioses

Classe de Proteinase	Espécie	Atividade no hospedeiro mamífero	Referência
Metaloproteinases	<i>Leishmania spp</i>	Relacionada à hidrólise e inativação de imunoglobulina G; Inativação do fator C3b factor do complemento C3bi; Adesão e internalização em macrófagos; A diminuição da expressão de gp63 induz o perfil Th1 em camundongos; cliva NF-κB previne a expressão de IL-12 e iNOS em camundongos;	Yao et al. 2003; Yao 2010; Thiakaki et al 2006; Gregory et al. 2008
	<b>M8</b> <i>L. (L.) major</i>	Associada à proliferação de células NK humanas;	Lieke et al. 2008; Hey et al. 1994
	<i>L. (L.) mexicana</i>	Em macrófagos murinos de medula óssea, interfere na sinalização de cascata e afeta fatores de transcrição, pela clivagem de c-Jun, do componente central de AP-1; Altera sinalização de macrófago através da clivagem e ativação da proteína tirosina fosfatase;	Contreras et al. 2010
Serina proteinases	<i>L. (L.) donovani</i>	Facilita infecção de macrófagos murinos;	Swenerton et al. 2011 e 2010
	<b>OPB</b> <i>L. (L.) amazonensis</i>	Relacionado à manutenção da infecção em macrófagos murinos;	Pinheiro et al. 2005
Aspartyl proteinases	<i>Leishmania spp</i>	Até o presente não há ações imunológicas relevantes descritas.	-

Este trabalho é o primeiro a testar a hipótese de que um mesmo isolado de *Leishmania (V.) braziliensis* não é homogêneo quanto: à expressão de suas proteinases, ao comportamento em cultura e à infecção de macrófagos murinos. Assim, nossa intenção é contribuir para o conhecimento da modulação da biologia da *L. (V.) braziliensis* através de estudos biológicos e moleculares que subsidiem a hipótese da heterogeneidade biológica na cepa MCAN/BR/98/R619, denominada Thor.

## **2.OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivo geral:**

Agregar novos conhecimentos sobre variações no comportamento biológico da *Leishmania (Viannia) braziliensis*, tendo como foco a cepa MCAN/BR/1998/R619, sobre a variabilidade da expressão de genes de virulência deste parasito.

## **2.2. Objetivos específicos:**

- Analisar a organização genômica das proteases de *L. (V.) braziliensis* frente a outras espécies de *Leishmania*.
- Obter clones de *L. (V.) braziliensis* (MCAN/BR/1998/R619) oriundas de um único promastigota e avaliar o comportamento *in vitro* e o potencial biológico destes parasitos na infecção experimental *in vitro*.
- Examinar a expressão de mRNA das principais classes de proteinases nos clones obtidos de um único promastigota; bem como nos amastigotas obtidos a partir da transformação de promastigotas, *in vitro*.
- Avaliar o potencial dos clones da cepa MCAN/BR/1998/R619 de modular a expressão de citocinas e óxido nítrico durante a infecção de macrófagos peritoneais de camundongo.

### **3.MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Estudos *in silico* das proteases de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.**

Nesta etapa foi feito um levantamento das sequências preditas de proteinases anotadas no genoma de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum*. A pesquisa foi realizada no banco de dado Genedb utilizando os seguintes termos de busca: protease, peptidase, proteinase, aspártico protease, cysteine protease, metallo protease e serine protease. Posteriormente cada sequência de proteína encontrada foi submetida ao programa BLAST (*basic alignment search tool*) com o objetivo de encontrar proteases não descritas ou hipotéticas.

### **3.2 Cepa utilizada e cultivo**

Os parasitos utilizados no estudo foram da espécie *L. (V.) braziliensis* MCAN/BR/1998/R619, cepa Thor. Esta cepa foi isolada em um estudo de detecção de infecção em cães clinicamente suspeitos para LTA que residiam em áreas de loteamentos recentemente implantados no Município de Maricá - RJ, próximo da mata residual (Serra da Tiririca). O parasito foi isolado a partir da cultura de fragmentos obtidos de lesão ulcerada, localizada na bolsa escrotal de um cão da raça dinamarquês proveniente do bairro Itaipuaçu. O isolado foi caracterizado por isoenzimas apresentando padrão típico de *L. (V.) braziliensis* (Serra et al., 2003).

Os protozoários eram mantidos em meio semi-sólido NNN a 28°C e a ampliação dos mesmos ocorreram em meio Schneider pH 7,2 suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de urina humana mantido a 28°C.

### **3.3 Obtenção de clones por citometria de fluxo**

Para a obtenção precisa dos parasitos, cerca de  $2,6 \times 10^7$  promastigotas da cepa Thor foram previamente lavados três vezes (3.000xg, 15min, 4°C) em salina tamponada por fosfato (PBS) pH 7,2. Após as lavagens, os promastigotas foram purificados (1 promastigota/poço) em placas de 96 poços com fundo liso, contendo 200µL/poço de meio Schneider pH 7,2 (suplementado com 10 % de

(SFB), 200UI de penicilina, 200µg/mL de estreptomicina e 2% de urina), através de um citômetro de fluxo EPICS ALTRA Cell Sorter (Beckman Coulter, FL, EUA), na Plataforma de Citometria de Fluxo, PDTIS/Fiocruz. Os promastigotas assim obtidos serão incubados a 26 °C e a propagação dos parasitos foi acompanhada por microscopia. Após a proliferação parasitária as culturas foram processadas para extração de mRNA dos parasitos e mantidas a -70°C até o momento de uso.

### **3.4 Isolamento de macrófagos peritoneais de camundongos**

Para obtenção de macrófagos foram injetados 5mL de meio RPMI 1640 estéril na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c (com 4 a 8 semanas de idade). Em seguida, o líquido foi aspirado e as células recuperadas após centrifugação (2000 xg, 5 minutos, 4°C) em meio RPMI 1640, contendo 5% de SFB. Posteriormente, cerca de  $4 \times 10^5$   $0,5\text{mL}^{-1}$  foram incubadas (2 horas, 37 °C) em placas de cultura (Lab-Tek®) de 8 poços, em estufa incubadora de CO<sub>2</sub> utilizando atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período as células não aderentes foram removidas por lavagens das placas de cultura com meio RPMI 1640.

### **3.5 Infecção experimental em macrófagos peritoneais**

Para a avaliação da infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, as células foram infectadas com promastigotas (na fase estacionária) na proporção de 5:1 (parasitos:célula). Após a interação parasitos/células (2 horas, 37°C) as placas foram lavadas e meio novo foi adicionado contendo 10% de SFB. Os experimentos foram realizados em triplicata, seguindo o seguinte esquema: 1. Macrófagos (controle da viabilidade celular) e 2. Macrófagos infectados com parasitos. As placas foram retiradas após 24, 48 e 72 horas de experimento, coradas por panóptico rápido e observadas ao microscópio óptico. O percentual de infecção e o número de parasitos/célula, foi determinado pela contagem de 100 macrófagos/lamínula. O índice endocítico foi obtido através da seguinte fórmula:

Índice endocítico = % macrófagos infectados x (amastigota / macrófagos infectados)



### **3.6 Estratégia para diferenciação dos parasitos *in vitro***

A diferenciação *in vitro* iniciou com o cultivo de  $10^6$  promastigotas/mL em fase logarítmica (log) de crescimento em meio Schneider, pH 7,2 (suplementado com 20 % SFB, 200 UI de penicilina, 200µg/mL de estreptomicina e 2% de urina) a 26 °C. Em seguida  $10^6$  promastigotas/mL em fase log de crescimento foram submetidos a choque de pH cultivando-as em meio Schneider, pH 5,5 (suplementado com 20 % de SFB, 200 UI de penicilina, 200 µg/mL de estreptomicina e 2% de urina) à 26 °C. Quando os parasitos atingiram a fase estacionária de crescimento foram submetidos a choque de temperatura, onde  $10^6$  promastigotas/mL foram cultivados em meio Schneider, pH 7,2 (suplementado com 20 % de SFB, 200 UI de penicilina, 200µg/mL de estreptomicina e 2 % de urina) a 32 °C. A transformação foi acompanhada por microscopia e quando atingiam a forma amastigota foram processadas para extração de mRNA, e mantidas a -70 °C até o momento de uso.

### **3.7 Avaliação da expressão de citocinas por macrófagos peritoneais de camundongos**

Os níveis de expressão de citocinas em sobrenadante de culturas de macrófagos peritoneais de camundongo foram avaliados através de *kits* comerciais da linha *ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassays* (Affymetrix, eBioscience, Austria) para a dosagem de: IL-1β, IL-6, IL-12p70, e TNF-α, conforme as instruções do fabricante. Brevemente, microesferas recobertas por anticorpos para cada citocina a ser testada, foram plaqueadas em placa de 96 poços com filtro no fundo de cada poço. Após plaqueamento de cada microesfera a placa foi lavada utilizando um sistema a vácuo. Os sobrenadantes de cultura de macrófago a serem testadas, a curva padrão em duplicata e os controles negativos da reação foram plaqueados seguido de incubação por 2h a temperatura ambiente em agitador orbital. Após lavagens, foram adicionados anticorpos de detecção biotinilados em cada poço, seguido de incubação por 30min a temperatura ambiente em agitador orbital. Após lavagens foi adicionado estreptavidina conjugada à ficoeritrina em cada poço seguido de incubação por 30min em agitador orbital. Após lavagens as microesferas foram ressuspensas em tampão adequado seguido de incubação em agitador orbital por 5min e leitura

da placa feita na Rede de Plataforma de Luminex PDTIS/Fiocruz, Luminex Instrumentation System (Luminex, Austin, TX, USA). As concentrações de citocinas foram expressas em pg/ml.

### **3.8 Avaliação da expressão de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos**

Para a estimativa de produção de óxido nítrico, utilizou-se a dosagem da concentração de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) pela metodologia do reagente de Griess (Green et al., 1982). Utilizando-se placas de 96-poços, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes de cultura foram misturados a 100  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess [1 % sulfanilamida (Merck, Brasil) e 0,1 % de N-(1-naftil) dihidroclorato de etilenodiamina (Merck, Brasil) dissolvidos em 2,5 % de ácido fosfórico, (v/v)] e incubadas por 10 min à temperatura ambiente. Em paralelo uma curva-padrão para a determinação da concentração dos nitritos (em  $\mu\text{M}$ ) foi produzida utilizando-se nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) diluído em meio RPMI.

A determinação da absorbância, equivalente à concentração de NO, foi realizada em um leitor de ELISA Emax (Molecular Devices Inc., EUA) a 540nm.

### **3.9 Análise estatística dos dados**

Para o tratamento estatístico dos resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo* foi aplicado o teste-t de *Student*. Considerou-se que os dados apresentavam diferença estatística significativa quando o valor de *p* retornado era menor ou igual a 0,05.

### **3.10 Extração de RNA**

A extração de RNA de promastigotas e amastigotas da cepa de origem e dos clones foi realizada para os ensaios de expressão de proteases.

As culturas de promastigotas e amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, cepa Thor e seus clones foram mantidos como descrito anteriormente. As amostras dos promastigotas foram obtidas na fase estacionária do ciclo e as de amastigotas quando completada a transformação celular, os parasitos foram lavados e

recolhidos em Trizol (Invitrogen, Life Technologies, EUA) e conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de RNA total.

O protocolo do Trizol foi modificado e adaptado para o uso de um kit de extração de RNA comercial (RNeasy Mini Kit, Qiagen). Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas em Trizol e então foi acrescentado clorofórmio puro (Merck, Brasil) na proporção de 1:5, agitados vigorosamente por 20s e incubados por 3 min à temperatura ambiente, sendo então centrifugados ( $10.000 \text{ xg}$ , 18min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) para permitir a separação de fases.

A fase superior, aquosa, foi reservada, misturada com álcool 100% (Merck, Brasil) na proporção de 1:1 e misturada imediatamente com a pipeta,  $700\mu\text{L}$  da mistura foi transferida para uma coluna *RNeasy* acoplada a um tubo coletor de  $2\text{mL}$  e centrifugado ( $8000 \text{ xg}$ , 1min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). O filtrado foi descartado,  $700\mu\text{L}$  do tampão RW1 foi adicionado à coluna seguido de centrifugação ( $8000 \text{ xg}$ , 1min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), o filtrado foi descartado. Adicionou-se à coluna  $500\mu\text{L}$  de tampão RPE e centrifugou-se ( $8000 \text{ xg}$ , 1min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), o filtrado foi novamente descartado. Foi adicionado  $500\mu\text{L}$  de tampão RPE à coluna, seguido de centrifugação ( $8000 \text{ xg}$ , 2min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) e descarte do filtrado. Acoplou-se a coluna a um novo tubo e centrifugou-se novamente ( $8000 \text{ xg}$ , 1min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) para secar a membrana. Finalmente, com um novo tubo de  $1,5\text{mL}$ , foi adicionado  $30\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  livre de RNase à coluna no centro da membrana seguido de centrifugação ( $8000 \text{ xg}$ , 1min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) para eluir o RNA. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e imediatamente armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Uma alíquota de  $3\mu\text{L}$  foi retirada para dosar o RNA em um espectrofotômetro para microvolumes (Nanodrop, Nova Analítica). O rendimento da extração foi calculado pela absorbância a  $260\text{nm}$ . A pureza foi determinada calculando a razão das absorbâncias a  $260/280\text{nm}$ , o RNA puro possui esta razão entre 1,8 e 2,0.

### **3.11 Tratamento do RNA com DNase**

Antes da síntese de cDNA as amostras de RNA foram tratadas com *Deoxyribonuclease I (DNase I)*, *Amplification Grade* (Invitrogen, Life Technologies, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, a um tubo de  $0,5\text{mL}$  livre de RNase foi adicionado  $1\mu\text{g}$  da amostra de RNA,  $1\mu\text{L}$  de tampão de

reação (10X) e 1µL DNase I, Amp Grade (1U/µL) e 10µL de água tratada com DEPC. Foram preparados dois tubos, um não foi tratado com transcriptase reversa. As amostras foram misturadas gentilmente e incubadas por 20min em temperatura ambiente, seguido da adição de 1 µL de solução de EDTA (25mM) e aquecida a 65°C por 10min e posteriormente resfriado em gelo para síntese do cDNA.

### **3.12 Síntese de cDNA a partir das amostras de RNA**

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

### **3.13 Seleção das sequências de nucleotídeos de interesse**

A fim de realizar os ensaios de expressão de proteases dos parasitos por PCR em tempo real, foi necessário definir as sequências dos genes de interesse e dos genes de controle endógeno para se desenhar o par de iniciadores oligonucleotídicos. Genes housekeeping foram escolhidos para os controles endógenos, com base na literatura: *α-tubulin* gene LbrM.13.0200 (Rebello et al., 2010) e *40S ribosomal protein S8* gene LbrM.24.2160 (Adaui et al., 2011), sendo que os dois últimos foram redesenhados.

Os iniciadores foram desenhados usando como base sequências de *Leishmania (Viannia) braziliensis* anotadas no banco de dados Genedb (<http://www.genedb.org>).

Para todos os iniciadores desenhados foi verificada existência de divergência entre as sequências de mRNA de *Mus musculus* e *Homo sapiens* a fim de se evitar falsos resultados por contaminação com material humano durante os ensaios de PCR, devido ao alto grau de conservação dessas sequências. Tais análises foram realizadas aplicando a ferramenta de BLAST do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando os seguintes parâmetros: BLAST de nucleotídeos através do algoritmo BLASTn.

Para o desenho de todos os iniciadores foram utilizadas sequências do mRNA de *L. (V.) braziliensis* de genes únicos, com exceção do de cisteína protease B e metaloprotease (gp63). Para os de cisteína protease foi definida uma sequência consenso a partir de três genes de CPB de *L. (V.) braziliensis* (códigos do Genedb LbrM.08.0810, LbrM.08.0820 e LbrM.08.0830) (Rebello et al., 2010) e para os de metaloprotease uma sequência consenso a partir dos seguintes genes: LbrM.10.0500, LbrM.10.0550, LbrM.10.0560, LbrM.10.0580, LbrM.10.0590, LbrM.10.0600, LbrM.10.0610, LbrM.10.1690, LbrM.10.1710. (Tabela 6).

### **3.14 Desenho e obtenção dos iniciadores para os ensaios de PCR**

Todos os iniciadores utilizados no presente estudo foram desenhados utilizando o *software online Primer3* v. 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), com todos os parâmetros no ajuste padrão, à exceção de *Product Size Ranges*, o qual foi ajustado para 80-120 pares de bases (pb). Os iniciadores desenhados foram então sintetizados pela empresa Invitrogen Brasil, numa escala de síntese de 50 nM e purificados por dessalinização.

### **3.15 Ensaios de PCR convencional**

Para testar a qualidade das amostras de cDNA e efetividade dos iniciadores desenhados foram realizados ensaios de PCR convencional. Para tanto foram compostas misturas de PCR (45 µL) constituídas por: tampão para PCR *Platinum Taq* (Invitrogen, Life Technologies, EUA) a 1x, 4 mM de MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich Chemical Co., EUA), 0,2 mM de solução de dNTPs (Invitrogen, Life Technologies, EUA), 4 ng/µL do par de iniciadores e 0,025 UI/µL da enzima *Platinum Taq DNA*

*polymerase* (Invitrogen, Life Technologies, EUA) em água tratada com DEPC. A estas misturas foram adicionados 5 µL de cada amostra de cDNA (diluídas 1:50 em água tratada com DEPC) no momento dos ensaios de PCR. As amostras foram ensaiadas em duplicata em cada experimento.

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

Após as PCR, os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado por brometo de etídeo e, então, fotografados utilizando-se o sistema de fotodocumentação *EasyDoc 100* (Bioagency Biotecnologia, Brasil). Os produtos dos ensaios de PCR foram posteriormente purificados pelo uso do *kit Wizard SV Gels and PCR Clean-UP System* (Promega Corporation, EUA). Resumidamente, a solução contendo os produtos da PCR foi misturada com solução de ligação à membrana (1:1) e incubada dentro das mini-colunas SV por 1 min à temperatura ambiente.

As colunas foram então lavadas 2x por centrifugação (10.000xg, 5min, 20°C) com solução de lavagem de membrana (adicionada de etanol), secadas por centrifugação nas mesmas condições e, então, os produtos foram resuspensores em 50 µL de água tratada com DEPC por centrifugação (10.000xg, 1min, 20°C). As sequências dos produtos da PCR purificados foram obtidas e analisadas como descrito anteriormente através da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS/Fiocruz.

Estas sequências foram aplicadas na ferramenta de BLAST do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizando os seguintes parâmetros: BLAST de nucleotídeos através do algoritmo BLASTn, para confirmar a identidade dos produtos amplificados. Os bancos de dados utilizados nestas análises foram: *Leishmania braziliensis* (taxid:5660).

### **3.16 Ensaios de PCR em tempo real**

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados em um termociclador 7500 *Fast Real Time PCR System* e analisados pelo uso do *software* SDS 7500 v. 2.0 (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) da Plataforma de PCR em Tempo Real - RJ (RPT09A), PDTIS/Fiocruz. Para a realização desses ensaios foram compostas misturas de PCR em tempo real (10 µL) constituídas de *mix* 'SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) a 1x e 0.1 µM do par de iniciadores em água tratada com DEPC. A estas misturas foram adicionados 2,5 µL das amostras de cDNA (diluídas em água tratada com DEPC a 10ng/µL para promastigotas e 1ng/µL para amastigotas) no início dos ensaios de PCR. As amostras foram ensaiadas em triplicata em cada experimento.

As condições de termociclagem utilizadas nos ensaios de PCR em tempo real foram as condições padrão do *software* SDS 7500, com exceção dos ciclos de amplificação, nos quais as condições utilizadas foram similares àquelas dos ensaios de PCR convencional.

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

A eficiência dos ensaios de PCR em tempo real, para cada combinação de fonte de amostras acrescida de par de iniciadores, foi determinada pela análise de curvas de diluição seriada (1:2) das amostras de cDNA, variando de 1:2 até 1:64. Amostras de cDNA de promastigotas na fase logarítmica da cepa de origem *L. (V.) braziliensis*, foram utilizadas para as curvas de amplificação dos iniciadores de *Leishmania*.

O valor do ciclo de limiar da fluorescência (*Ct - threshold cycle*) foi obtido e aplicado em um gráfico de semi-log (escala log 10) para o cálculo dos valores de coeficiente angular (slope) e de determinação ( $R^2$ ). Somente experimentos cujas linhas de tendência apresentavam  $R^2 \geq 0,98$  foram utilizados nas análises de eficiência.

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

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

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

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

### 3.17 Determinação da expressão relativa de genes

O método do Ct comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ) foi utilizado para determinar os níveis de expressão dos genes de interesse. O calibrador utilizado para a análise da expressão dos genes de *Leishmania* foram amostras de cDNA de promastigotas da cepa Thor na fase estacionária da proliferação.

Os controles endógenos utilizados foram genes de  $\alpha$ -tubulina e 40S ribosomal protein S8. Os valores de quantidade relativa ou níveis de expressão normalizados (RQ) foram calculados com o auxílio do *software SDS 7500*, aplicando-se a seguinte fórmula:

$$RQ = \frac{(e_{alvo})^{\Delta C_t \text{ alvo}}}{(e_{refs})^{\Delta C_t \text{ refs}}}$$

Onde,

$$e = 10^{(-1/\text{slope})} \text{ e } \Delta C_t = C_t^{\text{controls}} - C_t^{\text{amostra}}$$

E  $e_{refs}$  e  $\Delta C_t^{refs}$  são obtidos da média geométrica dos genes de referência endógenos utilizados.



### **3.18 Análise de agrupamento**

Como forma de avaliar o comportamento dos clones nas diferentes análises biológicas e de expressão gênica foi proposta uma análise de agrupamento utilizando o método de classificação hierárquica (Everitt et al., 2011) baseado na distância euclidiana das variáveis padronizadas dos clones em estudo. A classificação hierárquica foi graficamente representada por diagramas bidimensionais conhecidos como dendogramas. A análise foi realizada no *software* R, versão 3.1.1.

## **4. RESULTADOS**

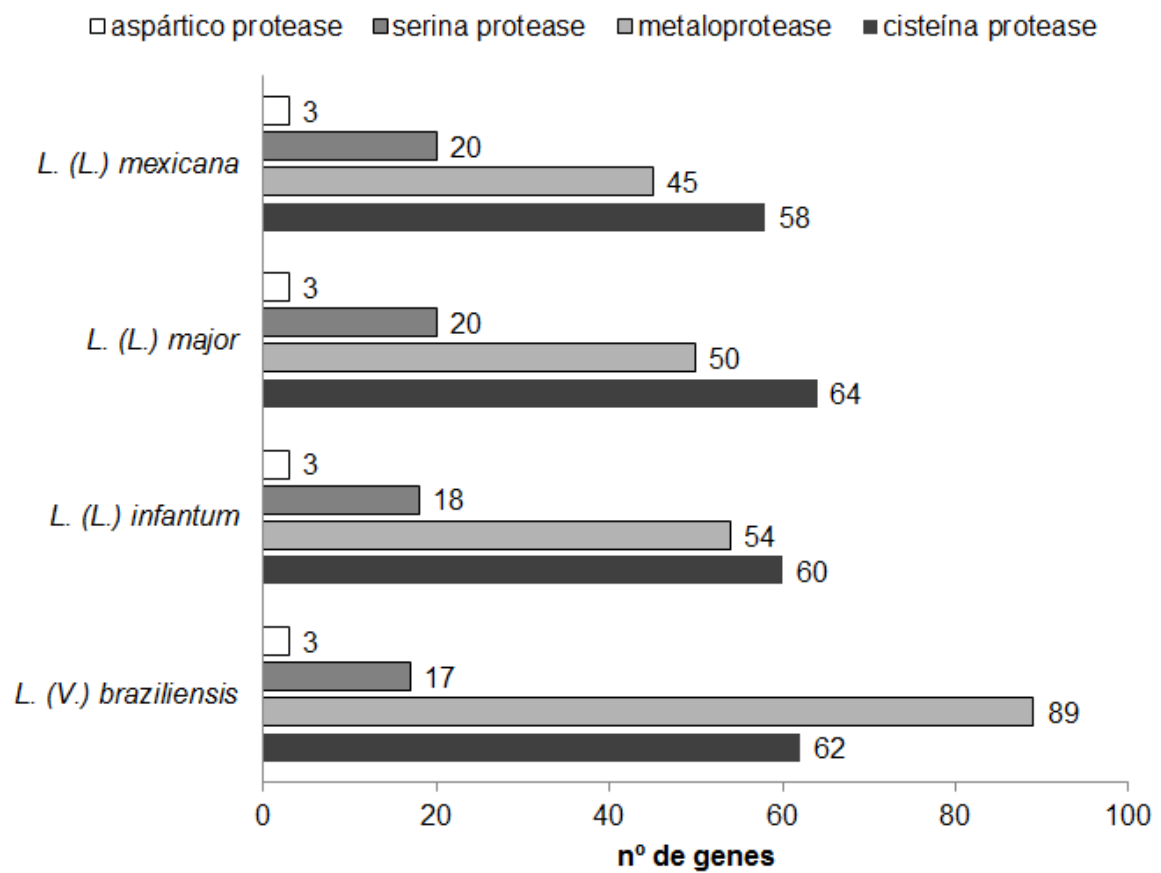
## **4.1 Caracterizações do perfil de proteases de *Leishmania***

Nesta etapa do trabalho foi realizada uma análise genômica comparativa entre os genes de proteases de *Leishmania (Viannia) braziliensis* frente a três outras espécies de *Leishmania*. Esta abordagem foi considerada a fim de se destacar características específicas que podem ser responsáveis por diferenças fenotípicas, ou virulência, relevantes no sucesso adaptativo deste parasito.

### **4.1.1 Comparações dos genes de proteases de diversas espécies de *Leishmania***

Inicialmente foi feito um estudo mais amplo de genômica comparativa dos genes *Leishmania* spp depositados em banco de dados públicos. A busca pelos genes de proteases nos bancos de dados Genedb resultou no levantamento do número total de genes para proteases em *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* (Figura 2), bem como a quantidade de genes das diferentes classes de proteases presentes em cada cromossomo (figura 3). Somente 3 genes para aspártico protease foram identificados no genoma das espécies estudadas, estes se encontram nos cromossomos 1, 15 e 29, nas 4 espécies (dados não mostrados).

Os genes de proteases correspondem a 2,18% do total de genes em *L. (V.) braziliensis*, essa pequena porcentagem também se dá para as demais espécies analisadas: 1,61% em *L. (L.) infantum*, 1,52% em *L. (L.) mexicana* e 1,41% em *L. (L.) major*. Os genes de metaloproteases são predominantes em *L. (V.) braziliensis* correspondendo a 52% dos genes de proteases, já nas outras espécies as cisteína proteases são as mais abundantes, sendo 36 a 47% desse total, enquanto que os genes de serina proteases se encontram em menor quantidade, variando de 10 a 16% do total de genes de proteases nas quatro espécies.



**Figura 2:** Total de genes de proteases em *Leishmania* spp.

Foi possível observar que os genes de proteases estão presentes em todos os cromossomos das *Leishmania* spp. estudadas, em diferentes frequências (figura 13). De todos os cromossomos estudados que identificamos genes de metaloproteases, 18 são comuns às quatro espécies estudadas. A presença de genes desta classe de enzimas nos cromossomos 8 e 30 são exclusivas a espécie *L. (L.) mexicana*. A mesma exclusividade ocorre para o cromossomo 22 em *L. (L.) infantum* e o 20 em *L. (V.) braziliensis*.

Os genes de cisteína proteases estão presentes em 22 cromossomos nas quatro espécies. Estando exclusivamente presentes no cromossomo 7 em *L. (L.) mexicana*, no cromossomo 28 em *L. (V.) braziliensis* e no 35 em *L. (L.) infantum* e *L. (L.) major*.

Já os genes de serina protease estão presentes em 19 cromossomos nas quatro espécies estudadas e o número desses genes não ultrapassa 3 por cromossomo. A presença de genes desta classe de proteínas no cromossomo 29 é exclusiva para *L. (L.) major* e no cromossomo 20 para *L. (V.) braziliensis*.

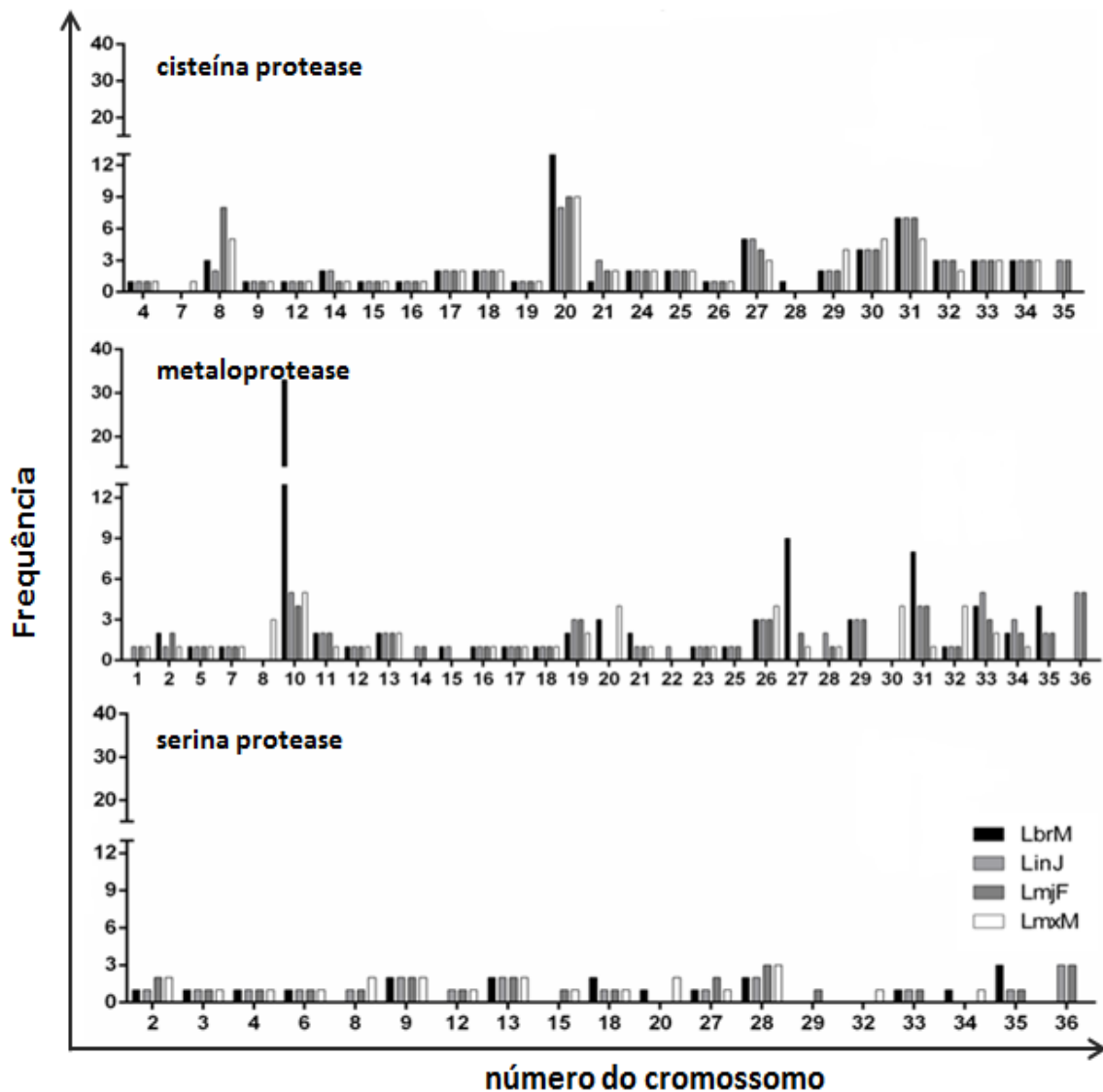
Os cromossomos 3 e 6 contêm somente genes para serina proteases e os cromossomos 5, 11 e 22 contêm somente genes para metaloproteases (Figura 3).

Foi possível analisar a conservação de alguns alelos no mesmo cromossomo nas espécies estudadas. Para cisteína proteases 42 alelos conservados foram encontrados, 35 para metaloproteases e 15 para serina proteases (Figura 4). Os alelos conservados estão predominantemente agrupados no cromossomo 20 para genes de cisteína proteases, no cromossomo 10 para genes de metaloproteases proteases e no cromossomo 28 para serina proteases. Entre os genes de proteases analisados, encontrou-se somente 2 alelos conservados no mesmo cromossomo para as quatro espécies: alelos de cisteína proteases que codificam *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases* (clan CA, família C12) localizadas nos cromossomos 24 e 25 (alelos 0420 e 0190, respectivamente).

As espécies *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* apresentam maior sintonia que as outras espécies, contendo 23, 15 e 13 alelos conservados para cisteína, metalo- e

serina proteases, respectivamente. Por outro lado, *L. (V.) braziliensis* não apresenta sintenia para genes de serina proteases com nenhuma outra espécie.

Além disso, a fim de identificar semelhança a genes de mamíferos, foi realizada uma análise no BLAST (*Blast Local Alignment Search Tool*) para comparar genes que apresentavam maior grau sintenia entre as espécies estudadas (representadas nos diagramas de Veinn na Figura 4) com os genes de mamíferos (taxid: 40674).



**Figura 3:** Frequência de cromossomos nas diferentes classes de proteases em *Leishmania* spp. **LmxM** – *Leishmania (Leishmania) mexicana*, **LmjF** - *Leishmania (Leishmania) major*, **LinJ** – *Leishmania (Leishmania) infantum*, **LbrM** - *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Os genes 05.0960 e 11.0630 de *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* demonstraram o maior grau de similaridade com genes de mamíferos, com aproximadamente 69% de identidade da sequência e uma cobertura maior de 39%. Entretanto no geral, a cobertura era extremamente baixa, com valores em média de 2%.

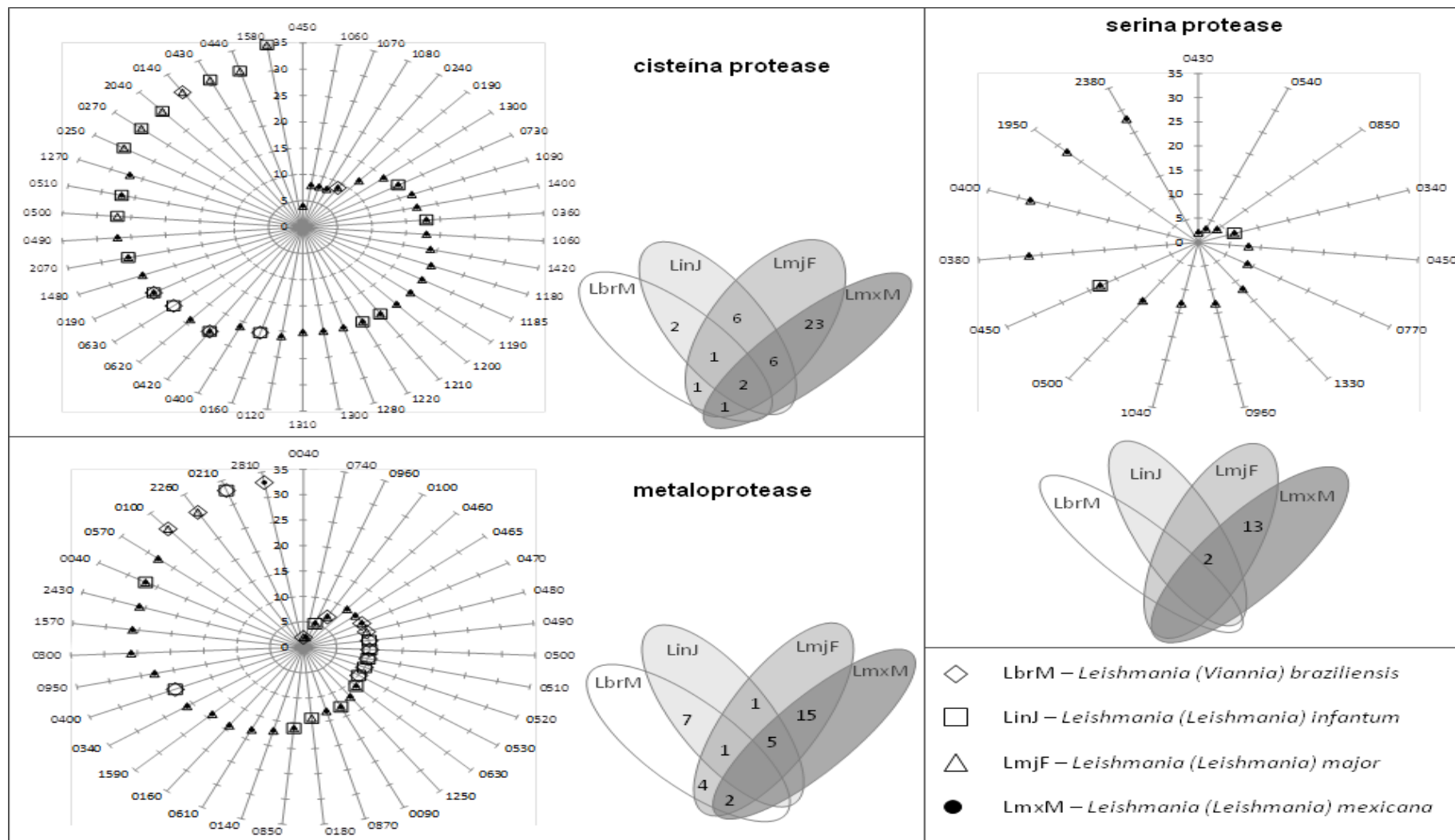
Para os genes que não apresentaram sintonia utilizamos outra estratégia para verificar semelhança a genes de mamíferos. Inicialmente, uma análise múltiplo alinhamento foi realizado entre as sequencias das quatro espécies (*Software CD-HIT* (Li, Jaroszewski & Godzik, 2001), utilizando uma linha de corte de 80% na identidade das sequências para agrupá-las. Como resultado, foi possível definir 28 grupos de genes de metaloproteases, 27 de cisteína proteases, 11 de serina proteases e 1 de aspártico proteases.

A sequência consenso (Figura adicional Tabela S2 do ANEXO 2) de cada grupo foi então utilizada para realizar uma análise no BLAST para encontrar similaridade entre os genes de mamíferos. Foram identificadas sequências de genes de *O-sialoglycoprotein endopeptidase* de hamster, cão, lobo e camundongo com 69% de identidade à sequência consenso dos genes de metaloproteases: LbrM.31.0100, LinJ.31.0110, LmjF.31.0100 e LmxM.31.0100. Sequências de genes de *26S subunit ATPase* de um lagomorfo *Ochotona princeps* e camundongo apresentou 65% de identidade à sequência consenso dos genes de serina protease: LbrM.03.0450, LinJ.03.0520, LmjF.03.0540 e LmxM.03.0540.

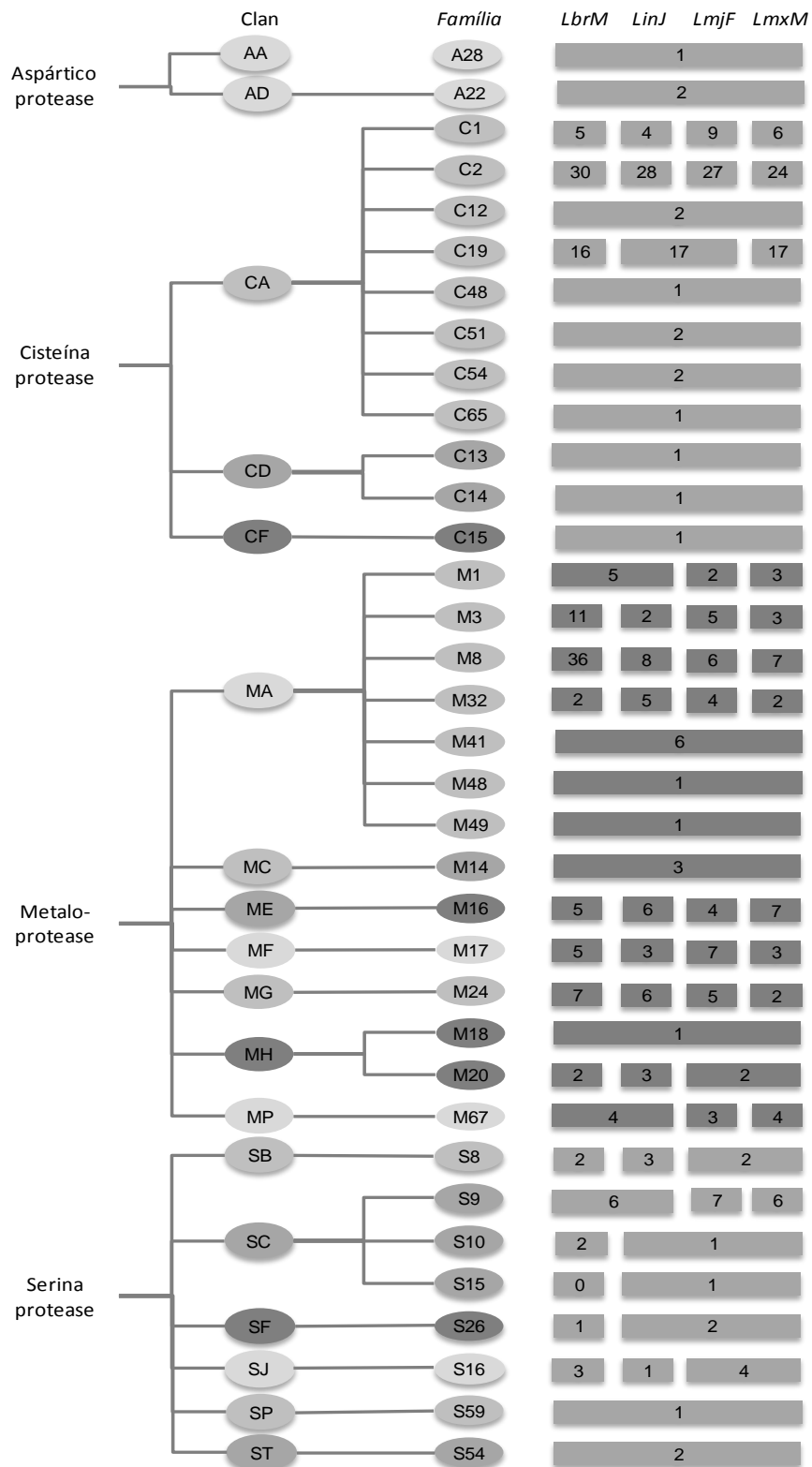
Não foi encontrada similaridade entre sequências de genes de cisteína e aspártico proteases de *Leishmania* spp e mamíferos, com os parâmetros adotados no presente trabalho.

Todos os genes analisados no estudo foram classificados em clan e famílias com base na nomenclatura do banco de dados MEROPS (Dezembro de 2013, release 9.10 - <http://merops.sanger.ac.uk/>) (Figura 5).





**Figura 4:** Análise de alelos conservados no genoma de *Leishmania* spp. Na periferia do gráfico radar estão representados os alelos conservados e no eixo y os números de cromossomos. O diagrama de Venn representa a quantidade de alelos conservados.



**Figura 5:** Clans e famílias de proteases de *Leishmania* spp.. Classificação das proteases anotadas no genoma de *Leishmania* spp.. Nomenclatura baseada na base de dados MEROPS (Dezembro de 2013, release 9.10 - <http://merops.sanger.ac.uk/>). Os números nos quadrados representam o total estimado de proteases em cada família por espécie, os números nos retângulos correspondem a um total de proteases iguais para duas ou mais espécies. **LbrM** - *Leishmania (Viannia) braziliensis*, **LinJ** - *Leishmania (Leishmania) infantum*, **LmjF** - *Leishmania (Leishmania) major*, **LmxM** - *Leishmania (Leishmania) mexicana*.

## **4.2 Obtenções de clones da cepa Thor por citometria de fluxo**

Culturas de promastigotas da cepa Thor na fase estacionária foram utilizadas para o procedimento de separação celular em larga escala (*cell sorting*). Neste experimento foi possível obter culturas de promastigotas a partir de um único parasito. Considerando os parâmetros de tamanho (FSC - *Forward Angle Light Scatter*) e granulosidade (SSC - *side scatter*), que se correlaciona com o volume celular dos promastigotas (Figura 6), foi possível purificar promastigotas através da deposição de apenas um parasito por poço em uma placa de 96 poços de fundo liso. Estes foram mantidos em meio *Schneider* para expansão da cultura. Após este período apenas 21 clones se mantiveram estáveis à manutenção e ampliação *in vitro*, e puderam ser criopreservados em nitrogênio líquido. Destas, 16 culturas denominadas: Thor 03, Thor 04, Thor 05, Thor 06, Thor 08, Thor 10, Thor 12, Thor 15, Thor 16, Thor 17, Thor 21, Thor 22, Thor 24, Thor 25, Thor 26, Thor 27 e Thor 28, resistiram ao processo de criopreservação e foram analisadas neste trabalho quanto ao comportamento em cultura, infectividade de macrófagos peritoneais de camundongos e quanto à expressão de proteinases.

## **4.3. Caracterização biológica dos parasitos em cultura**

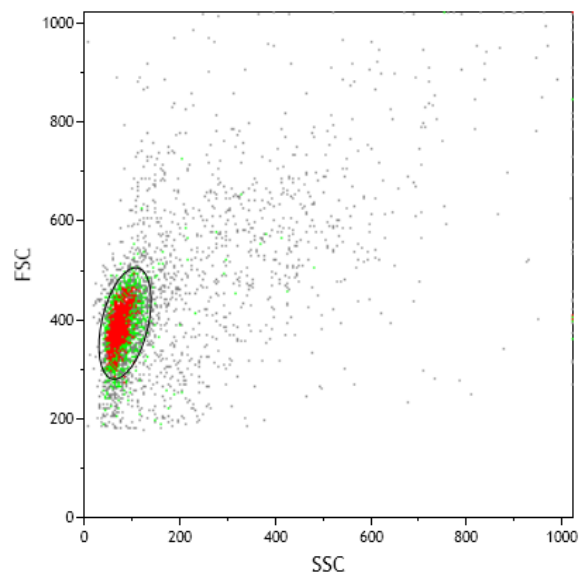
### **4.3.1 Curva de crescimento dos parasitos *in vitro***

Os parasitos isolados por citometria de fluxo, estáveis ao cultivo *in vitro*, bem como a cepa de origem, foram analisados quanto ao comportamento das respectivas curvas de crescimento em meio *Schneider*, com o propósito de identificar as fases logarítmicas e estacionárias de cada cultura (Figura 7).

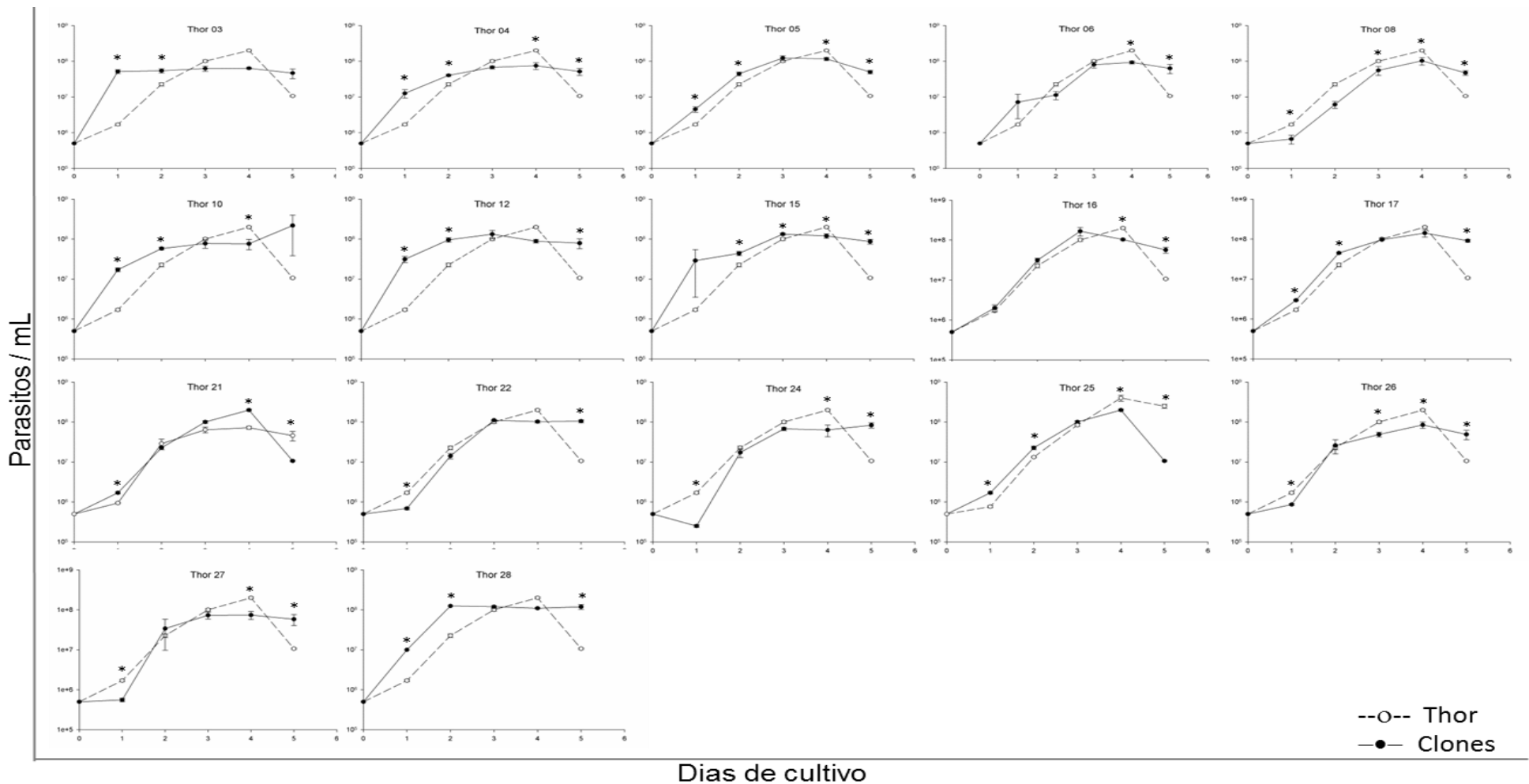
Neste estudo foi possível observar culturas de promastigotas com perfis distintos de crescimento. De maneira geral, os momentos iniciais das culturas (24 e 48h) e os momentos mais tardios (fase estacionária) indicaram diferenças estatisticamente significantes na concentração de parasitos (Tabela 4). Observamos também, que o quarto dia de cultivo mostrou-se como a fase estacionária de todos parasitos estudados (Figura 7). Neste contexto os parasitos Thor 03, 04, 05, 06, 10, 12, 15, 16, 17 e 28, bem como a cepa original Thor, apresentaram rápido crescimento no primeiro dia de cultivo ( $1,70 \times 10^6$

parasitos/mL no Thor a  $5,17 \times 10^7$  parasitos/mL no Thor 03). Por outro lado os parasitos Thor 08, 21, 22, 24, 25, 26 e 27 apresentaram crescimento inicial mais lento ( $2,50 \times 10^5$  parasitos/mL no Thor 24 a  $9,42 \times 10^6$  parasitos/mL no Thor 21).

Ao comparar as características das curvas de crescimento dos clones com a da cepa Thor, o 3º dia de cultivo, final da fase logarítmica, foi o que apresentou a menor variação. Salvo os clones Thor 08, 15 e 26, os demais se comportaram de forma semelhante à cepa Thor. A partir do 4º dia de cultivo houve estabilização da cultura na fase estacionária ( $6,37 \times 10^7$  parasitos/mL no Thor 03 a  $4,0 \times 10^8$  parasitos/mL no Thor 25), ao contrário da cepa de origem Thor, que apresentou pico de crescimento no 4º dia ( $2,0 \times 10^8$  parasitos/mL) e queda abrupta no número de parasitos no 5º dia de cultivo ( $1,07 \times 10^7$  parasitos/mL). Os clones Thor 04, 05, 15 e 25 foram os que apresentaram mais pontos da curva com valores significativamente distintos ao da cepa Thor.



**Figura 6:** Análise da população de promastigotas *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cepa Thor (MCAN/BR/1998/R619). A seleção da região de interesse foi baseada em aspectos morfológicos; tamanho (FSC – dispersão lateral de luz) versus granulosidade (SSC – dispersão frontal de luz). A região demarcada em vermelho identifica homogeneidade da população de interesse. O gráfico é representativo dos experimentos realizados com promastigotas.



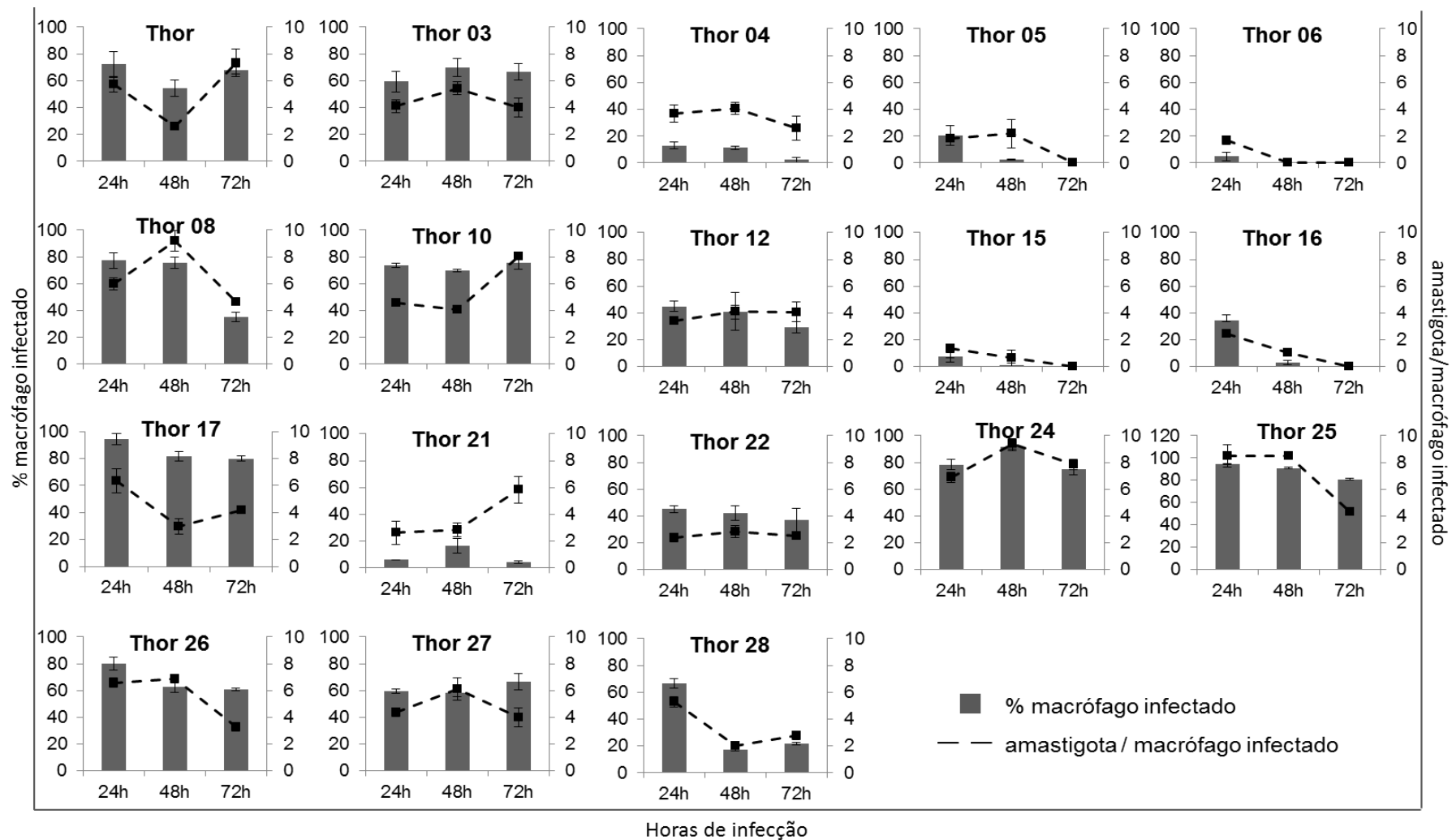
**Figura 7:** Curva de crescimento da cepa Thor (MCAN/BR/1998/R619). A cultura foi iniciada com  $5,0 \times 10^5$  promastigotas/mL da cepa de origem (Thor) e dos clones (Thor 03 - Thor 28), e acompanhadas por 5 dias em meio Schneider enriquecido com 10 % de SFB e urina humana. Cada ponto representa a média da contagem de parasitos/mL/dia de três culturas. As barras representam o desvio padrão e o (\*) a significância estatística no teste T de Student ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.2 Infecção de macrófagos peritoneais de camundongos

O comportamento dos parasitos quanto ao seu potencial de infectar macrófagos da linhagem isogênica de camundongos (BALB/C) foi avaliado a partir da determinação da porcentagem de macrófagos infectados, do número de parasitos intracelulares por macrófago infectado e do cálculo do índice endocítico na 24<sup>a</sup> hora de infecção.

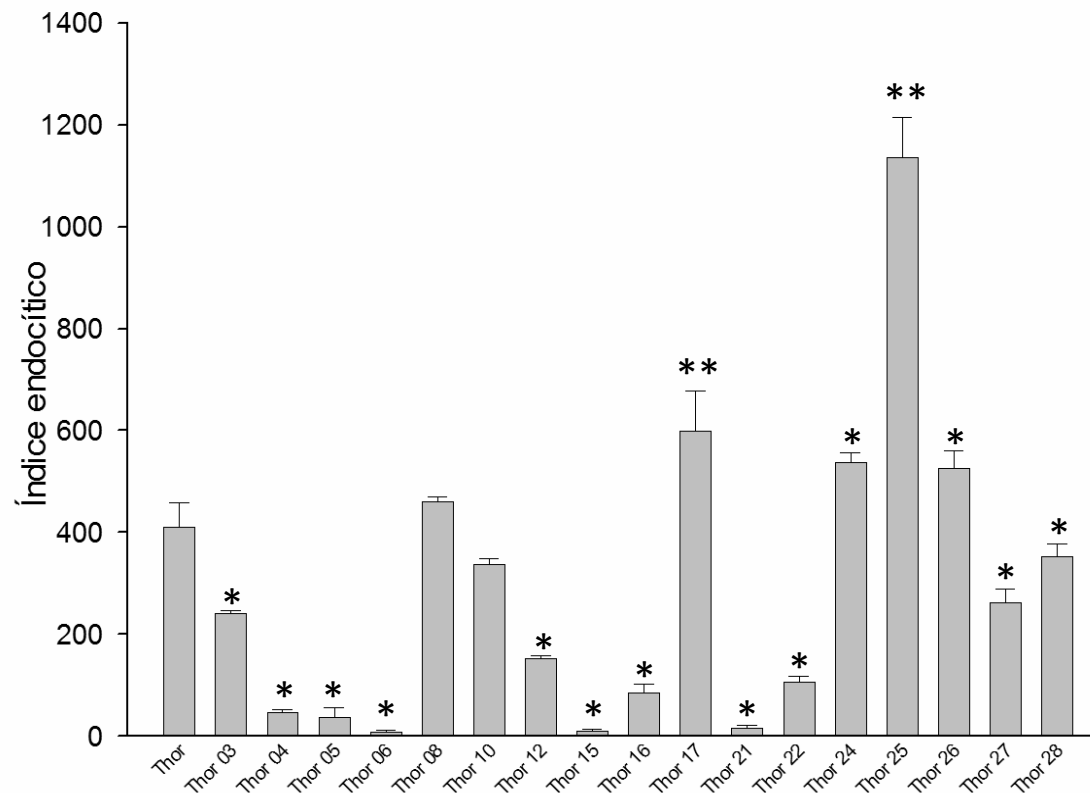
Os parasitos utilizados nestes ensaios se encontravam na fase estacionária de cultivo. Neste estudo foram detectados diferentes padrões de infectividade dos clones avaliados neste trabalho. Os dados indicaram que a porcentagem de macrófagos infectados variou de  $4,67 \pm 3,06$  no Thor 06 a  $94,67 \pm 4,16$  no Thor 17, seguida do Thor 25 ( $94,67 \pm 0,58$ ) na 24<sup>a</sup> hora de infecção. Na 48<sup>a</sup> hora estes valores ficaram entre 0 no Thor 06 a  $91,67 \pm 2,89$  no Thor 24, seguida do Thor 25 ( $91,00 \pm 1,00$ ). Enquanto que na 72<sup>a</sup> hora variou de 0 nos Thor 05, 06, 15 e 16 a  $81,00 \pm 1,00$  no Thor 25.

Além disso, foi estabelecido o número de amastigotas por macrófagos infectados. Na 24<sup>a</sup> hora os dados variaram de  $1,35 \pm 0,23$  para Thor 15 a  $8,49 \pm 0,84$  no Thor 25; na 48<sup>a</sup> hora de 0 no Thor 06 a  $9,39 \pm 0,39$  no Thor 25; e na 72<sup>a</sup> hora de 0 nos Thor 05, 06, 15 e 16 a  $8,06 \pm 0,28$  no Thor 10 (Figura 8). Outra característica avaliada foi o índice endocítico na 24<sup>a</sup> hora de infecção, os resultados variaram de  $7,33 \pm 4,16$  no Thor 06; a  $1135,33 \pm 79,21$  no Thor 25 (Figura 9).



**Figura 8:** Infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c com a cepa Thor (MCAN/BR/1998/R619) e clones. As infecções foram realizadas na proporção de 5 parasitos por macrófago. Os valores expressam a porcentagem de macrófagos infectados e o número de parasitos por macrófagos infectados em 24, 48 e 72h de infecção.

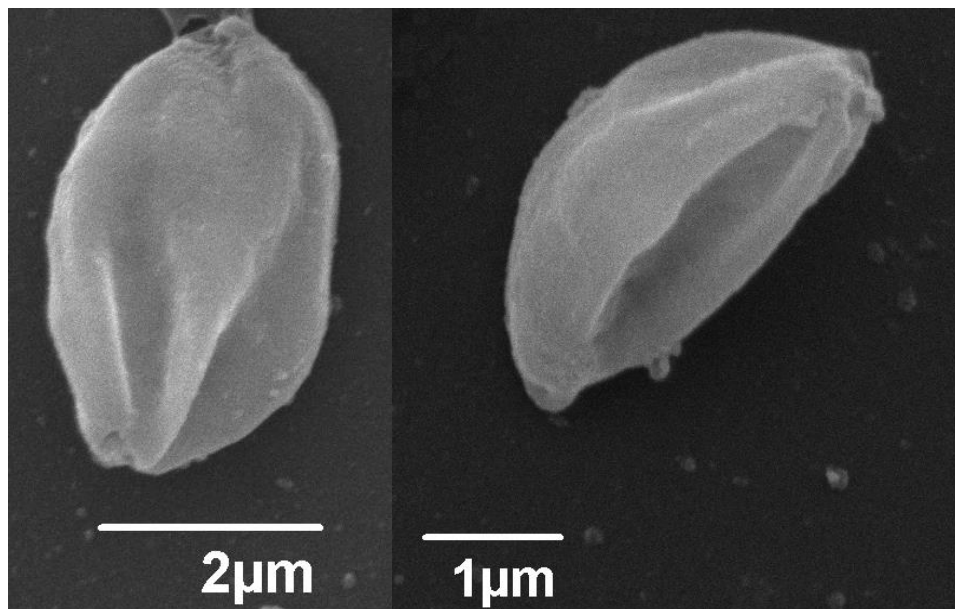




**Figura 9:** Índice endocítico de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Os ensaios foram conduzidos na proporção de 5 parasitos por macrófagos, pela cepa origem Thor e seus clones Thor 3-28 na 24<sup>a</sup> hora de infecção. Valor obtido pela multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados pela média de amastigotas por macrófagos infectados. Teste t de *Student* entre a cepa Thor e cada uma das demais clones (\*)  $p < 0,01$  e (\*\*)  $p < 0,05$ .

### 4.3.3 Obtenção de amastigotas extracelulares

Durante este estudo foi estabelecido condições, *in vitro*, que simulam o microambiente intracelular (temperatura, pH etc), para adaptação de formas amastigotas da *L. (V.) braziliensis*. Desta forma estabelecemos uma estratégia para gerar amastigotas axênicas deste parasito a partir de formas promastigotas metacíclicas, em pH 5.5 e temperatura de 32°C. A estratégia para a obtenção de amastigotas extracelulares foi bem sucedida na cepa original e em 11 dos 17 clones estudados. Os amastigotas axênicos assim obtidos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura, revelando a típica morfologia ovoide com aproximadamente de 2,5 - 4,0µm e “ausência” do flagelo, pois neste estágio está restrito à bolsa flagelar (Figura 10).



**Figura 10:** Exemplares de amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, da cepa Thor (MCAN/BR/1998/R619), transformadas *in vitro*. Os amastigotas foram obtidos após incubação de promastigotas em meio Schneider com pH acidificado para 5,5 seguida da alteração da temperatura de 26°C para 32°C, previstas na mudança de hospedeiros durante o ciclo do parasito. Os amastigotas assim obtidos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e as imagens apresentadas são representativas dos ensaios de diferenciação feitos com os clones da cepa Thor utilizadas no estudo.

#### **4.3.4 Seleção dos iniciadores oligonucleotídicos e padronização das condições de termociclagem para ensaios de PCR**

Para a análise da expressão de proteases dos parasitos da cepa Thor e seus clones, foram selecionados iniciadores para os ensaios de PCR. Depois de escolhidos os genes-alvo e genes controle, suas sequências foram aplicadas no algoritmo online Primer3 para a definição das sequências candidatas a iniciadores. Os mais adequados foram selecionados e sintetizados (Tabela 4).

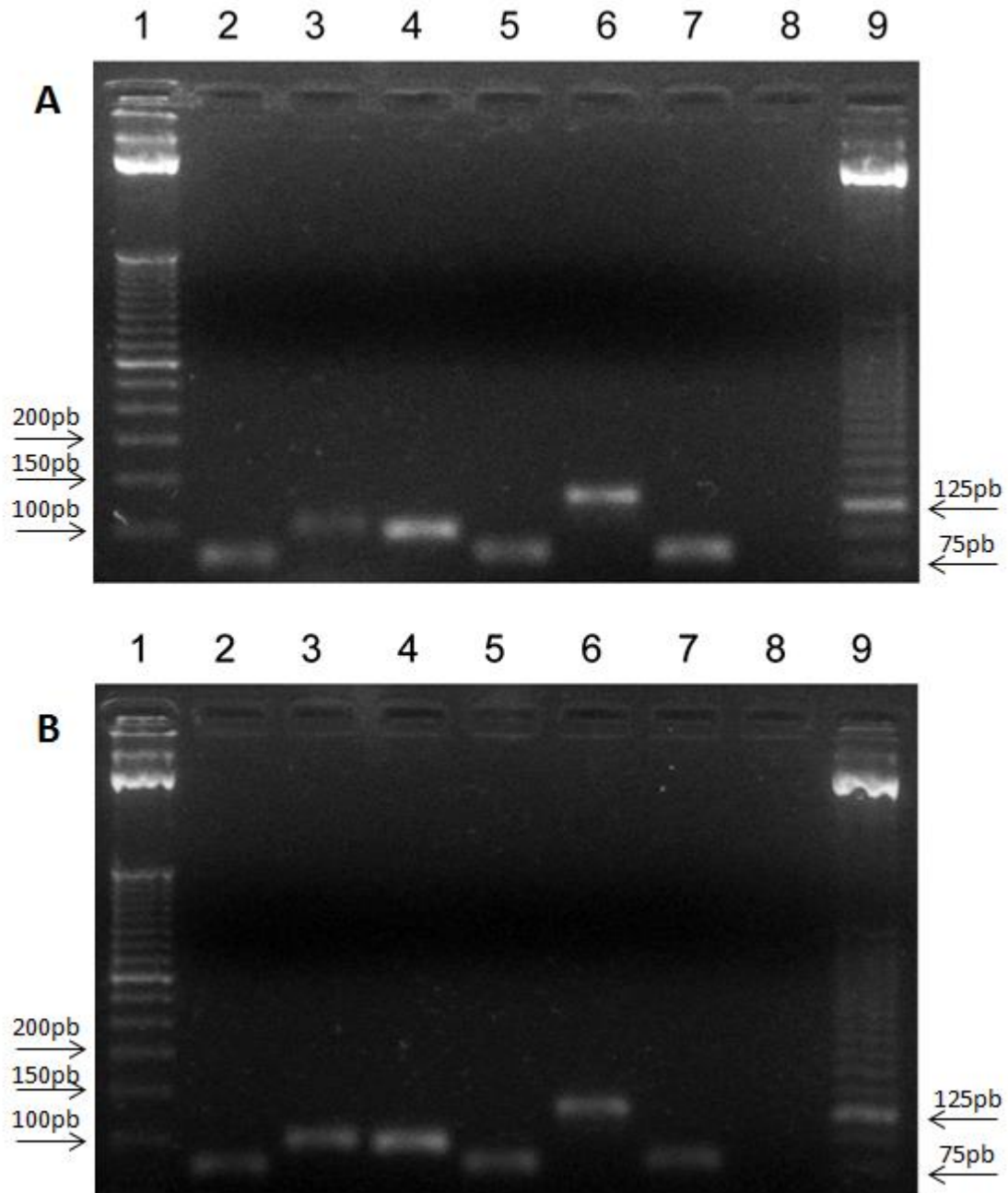
Para verificar a funcionalidade e especificidade dos iniciadores ensaios de PCR convencional foram realizados. E em paralelo definiu-se as condições mais adequadas de termociclagem, bem como as concentrações ideais de reagentes. Os ajustes nas condições dos ensaios de PCR foram considerados satisfatórios quando uma única banda era visível após a eletroforese dos produtos das reações em um gel de agarose a 2%. Sob as condições estabelecidas, os produtos de amplificação de todos os alvos testados apresentavam tamanhos (em pb) compatíveis àqueles previstos na etapa de desenho dos iniciadores (Figura 11).

Subsequentemente, esses produtos foram sequenciados e analisados por BLAST para se verificar a especificidade dos iniciadores desenhados. Os resultados demonstraram que cada produto de amplificação foi alinhado como similar a uma sequência compatível com a sequência-alvo esperada (Tabela 5).

**Tabela 4.** Pares de iniciadores desenhados para a análise da expressão de genes-alvo de proteases e genes endógenos em *Leishmania (Viannia) braziliensis* por ensaios de PCR em tempo real.

Classe de Protease / gene endógeno	Genedb ID	Gene-alvo	Iniciadores Foward / Reverse	Tamanho do Produto
Aspártico Protease	LbrM.15.1530	presenilina-símile	5' – GTT GTG GAT TTG GCT GGA CT – 3' 5' – TCC ACA CAA AGA TGC CCA TA – 3'	80
Cisteína protease	LbrM.08.0810L brM.08.0820 LbrM.08.083 <sup>a</sup>	cisteína protease B	5' – AAC TTC CAG CGT AAC CT – 3' 5' – AAC TCT TCC TCC GAC AG – 3'	101
Serina protease	LbrM.13.0860	subtilisina-símile	5' – CTA CTG CAC ACG AGC ACC AT – 3' 5' – CGC AAT GTG AGA GTC CTT GA – 3'	99
Metaloprotease	LbrM.10.0610 <sup>b</sup>	gp63, leishmanolisina <sup>b</sup>	5' – TTC TCG GAC GAC CAT CCA – 3' 5' – GTG GTG CCC TGG TCG TAG – 3'	80
Gene endógeno	LbrM.13.0200	$\alpha$ -tubulina	5'-TAT CTG CAT TCA CAT CGG -3' 5'- CGT CAT CCT CAA CAC CA -3'	130
Gene endógeno	LbrM.24.2160	proteína ribossomal 40S S8	5'- AGA CGC TGG TGA AGA ACT GC -3' 5'- AAG TCG ATG CCG TAA TGC TT -3'	82

a – sequência consenso entre os genes citados (Rebello et al., 2010); b- sequência consenso entre os seguintes genes de gp63: LbrM.10.0500, LbrM.10.0550, LbrM.10.0560, LbrM.10.0580, LbrM.10.0590, LbrM.10.0600, LbrM.10.0610, LbrM.10.1690, LbrM.10.1710.



**Figura 11:** Análise dos produtos de amplificação em gel de agarose a 2%. Os marcadores de 50pb (1) e de 25pb (9) de DNA foram utilizados para a estimativa do peso molecular dos produtos de PCR e demonstração da amplificação de bandas únicas utilizando os iniciadores para: presinilina símile (2), cisteína protease B (3), subtilisina (4), gp63 (5),  $\alpha$ -tubulina (6) e proteína ribossomal 40S S8 (7) com amostras de cDNA de promastigotas **(A)** e amastigotas axênicas **(B)** de *L. (V.) braziliensis* em fase estacionária de crescimento e controle negativo da reação (8).

**Tabela 5:** Resultados da análise de produtos de PCR dos genes de *Leishmania* pela ferramenta NCBI BLAST

Gene alvo do produto	Sequência resultado com maior índice de similaridade	Valor esperado no Blast <sup>a</sup>	Escore no Blast
Subtilisina	<i>Leishmania braziliensis</i> subtilisin-like serine peptidase (LBRM_13_0860) mRNA [GENE ID: 5413723 LBRM_13_0860]	$1 \times 10^{-9}$	117
gp63	<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904 GP63, leishmanolysin (LBRM_10_0610) mRNA, complete cds	$3 \times 10^{-4}$	50,1
Presenilina	<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904 putative presenilin-like aspartic peptidase (LBRM_15_1530) mRNA, complete cds	$4 \times 10^{-8}$	63,9
cisteína proteínaseB	<i>Leishmania braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (CPB) mRNA, complete cds	$8 \times 10^{-9}$	76,3
$\alpha$ -tubulina	<i>Leishmania braziliensis</i> alpha tubulin (LBRM_13_0210) mRNA [GENE ID: 5413658 LBRM_13_0210]	$4 \times 10^{-33}$	141
proteína ribossomal 40S S8	<i>Leishmania braziliensis</i> putative 40S ribosomal protein S8 (LBRM_24_2160) mRNA [GENE ID: 5416060 LBRM_24_2160]	$1 \times 10^{-4}$	48,2

<sup>a</sup>O valor esperado de BLAST indica o número de vezes que a presente sequência-resultado ou outra com maior índice de similaridade com a sequência do produto analisado surgiria como resultado da análise por BLAST por puro acaso. Um valor esperado baixo indica um alto grau de significância para o resultado. <sup>b</sup>O escore no BLAST (S') é um valor normalizado derivado do valor do escore (S) não tratado, obtido pelo uso da seguinte fórmula:  $S' = (\lambda S - \ln K) / (\ln 2)$ , onde K e  $\lambda$  são parâmetros estatísticos do sistema de pontuação. O valor de escore no BLAST é útil para a comparação do grau de significância dos resultados de análises por BLAST distintas.

#### **4.3.5 Padronizações para os ensaios em PCR em tempo real**

As condições de termociclagem ótimas estabelecidas nos ensaios de PCR convencional foram adaptadas para os ensaios de PCR em tempo real. Sob essas condições foi possível observar um pico único na curva derivativa de dissociação, resultante da reação de amplificação, o que determina a formação de apenas um produto por par de iniciadores utilizados com as amostras de cDNA (Figura 12). Na tabela 8 está discriminada a temperatura de dissociação para cada produto de amplificação. Os produtos desta amplificação desses ensaios também foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, extraídos do gel e sequenciados. Os resultados obtidos foram idênticos aos observados para os produtos dos ensaios de padronização por PCR convencional.

Os pares de iniciadores que apresentaram a eficiência mais baixa foram para:  $\alpha$ -tubulina, com 90,43% e cisteína proteinase B (CPB), a 94,94%; os demais apresentaram índice de eficiência variando de 100,39% a 105,40% (Tabela 6). Todos os índices de eficiência de amplificação foram considerados nos cálculos da expressão relativa dos genes-alvo e utilizados na correção dos valores dos Cts.

#### **4.3.6 Expressão relativa dos genes de proteases em promastigotas e amastigotas da cepa de origem Thor e seus clones**

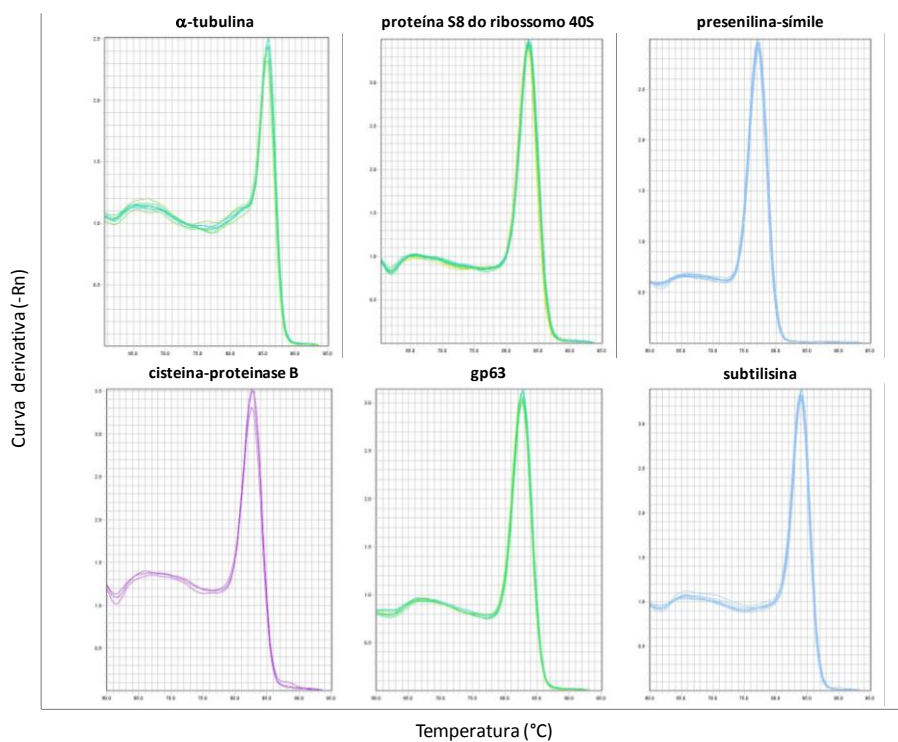
A expressão relativa dos genes de proteases dos clones em relação à cepa original foi avaliada e verificou-se que ocorre de forma distinta. As formas amastigotas apresentaram valores de RQ superiores aos da forma promastigota, enquanto os da primeira variaram de 0,1 a 8,8, os da última variaram de 0,1 a 1,07. Em promastigotas os valores mais elevados de RQ foram para presinilina, uma aspártico proteinase, seguido da metaloprotease gp63 e a serina proteinase subtilisina e em menor valor a cisteína protease B (Figura 13A). Em amastigotas os valores maiores de RQ se apresentaram para gp63, seguida de subtilisina, cisteína protease B e presinilina (Figura 13B).

Na forma promastigota, os clones Thor 15 e 16 se destacaram com maior expressão de presinilina, e a Thor 28 com maior expressão de gp63, todos estes valores acima dos da Thor. A expressão de subtilisina e cisteína ficou abaixo da cepa Thor em todos os clones, o que apresentou maior valor de RQ da primeira foi o Thor 05 e da última o Thor 21.

Nas amastigotas os clones Thor 05, seguida das Thor 22, 26 e 15 e 21, expressaram mais gp63 que a cepa Thor. Em seguida, também acima da cepa Thor, a subtilisina foi mais expressa pelas cepas Thor 22, 08, 05 e 26. A cisteína protease B, com maiores valores de RQ no Thor 22 e a presinilina no Thor 28, foram menos expressas que na cepa Thor.

As cepas Thor 17 e 25 foram as que se destacaram como as mais distintas quanto à expressão das proteases. A forma amastigota do clone Thor 25 apresentou valores de RQ de 842 para subtilisina e 610 para gp63, superiores aos da cepa Thor. Enquanto que a forma promastigota da mesma cepa e da cepa Thor 17 apresentaram valores de RQ muito inferiores aos do Thor (Figura 14), chegando a um valor de RQ mínimo de  $2,8 \times 10^{-8}$ .



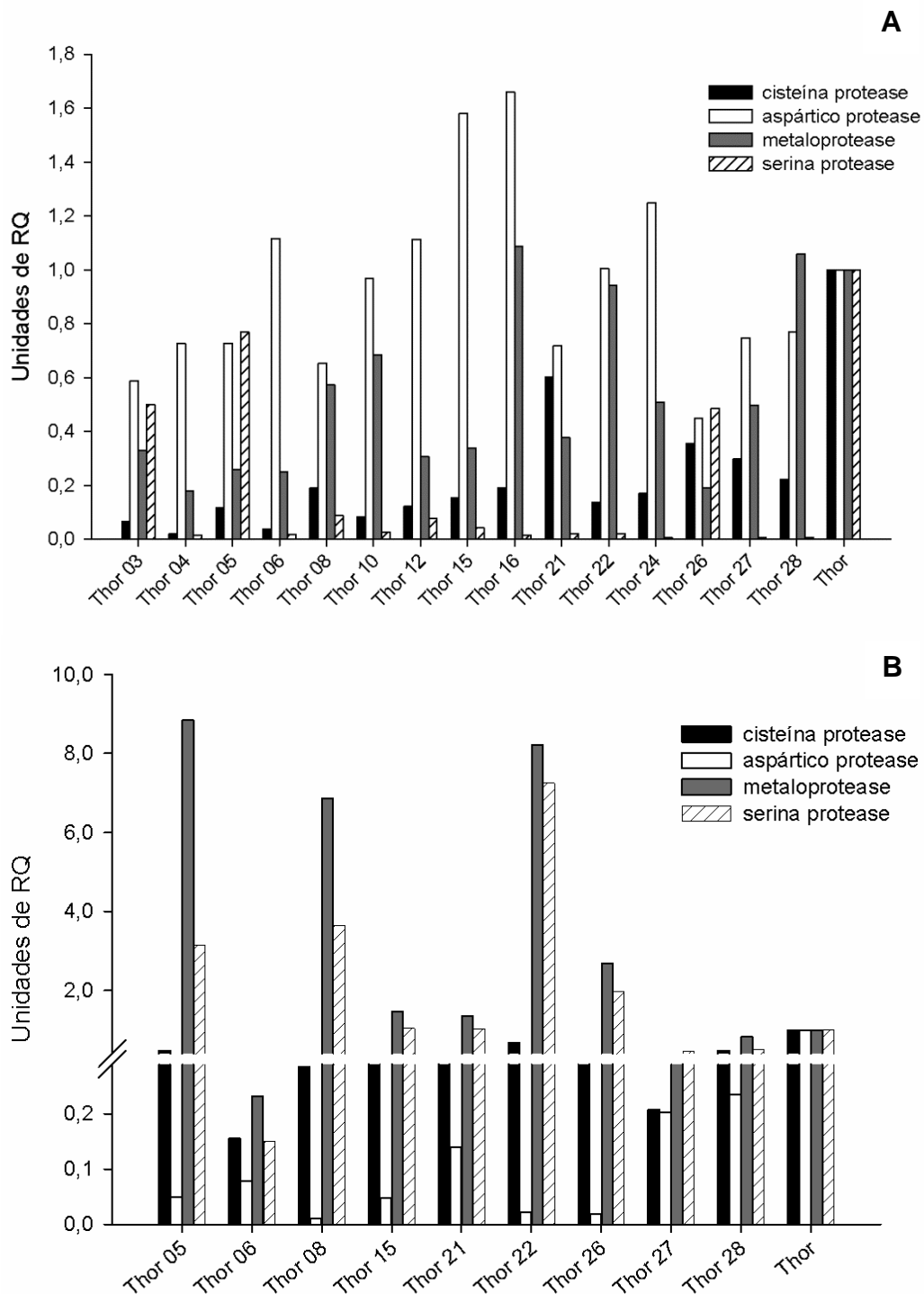


**Figura 12:** Curva de dissociação dos iniciadores. Os gráficos demonstram a curva de dissociação dos iniciadores apresentando um pico único, o que corresponde à amplificação de um único produto. Este ponto define a temperatura de dissociação dos iniciadores e a formação de fita única.

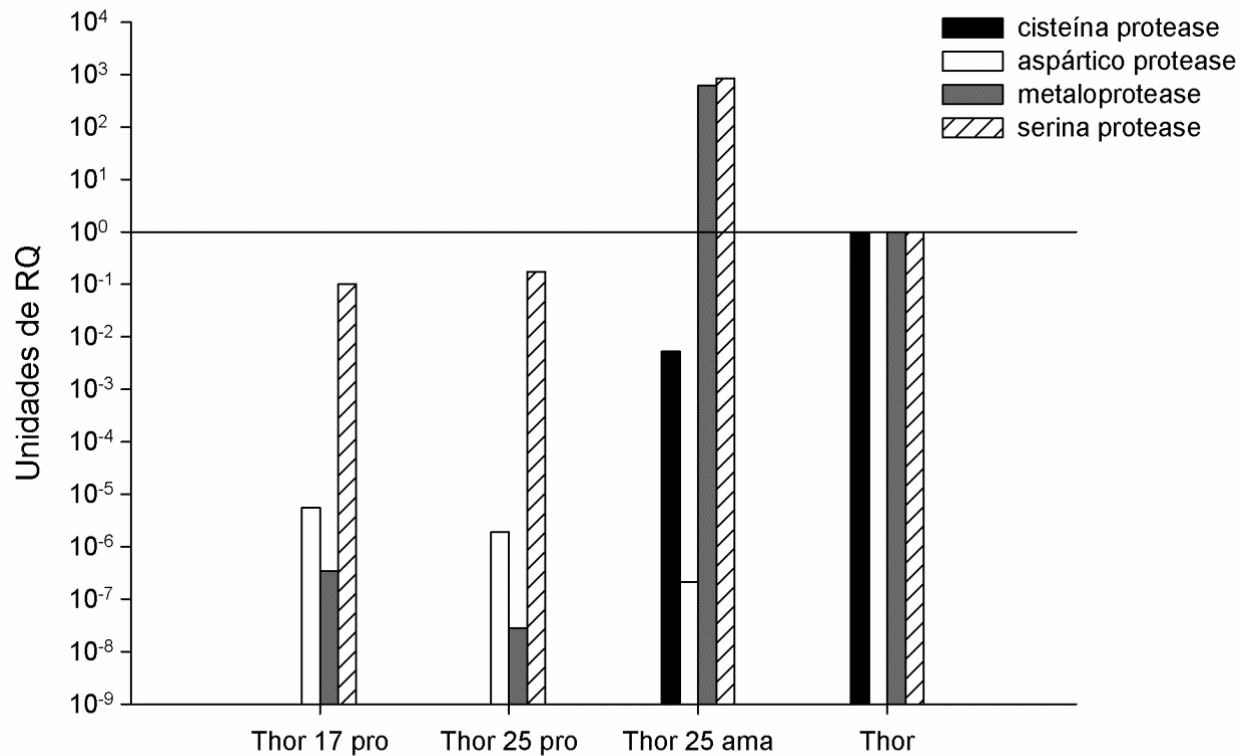
**Tabela 6:** Análise da especificidade dos pares de iniciadores e da eficiência de amplificação das combinações de pares de iniciadores e amostras de cDNA nos ensaios de PCR em tempo real

Gene alvo	Temperatura de dissociação (°C) <sup>a</sup>	R <sup>2</sup> <sup>b</sup>	Nível de eficiência da PCR (%) <sup>c</sup>
presenilina-símile	83,48	0,993	100,92
CPB	82,24	0,991	94,94
subtilisina	83,49	0,993	100,92
gp63	82,03	0,993	105,40
$\alpha$ -tubulina	85,88	0,993	90,43
Proteína ribossomal 40S S8	83,47	0,992	100,39

<sup>a</sup> A temperatura de dissociação é determinada como a temperatura em que 50% dos produtos de amplificação encontram-se dissociados (em fita simples). <sup>b</sup> R<sup>2</sup> é o coeficiente da correlação obtida da curva padrão e deve ser >0.99. <sup>c</sup> O nível de eficiência da PCR representa a porcentagem de cópias dos produtos de amplificação presentes no início de cada ciclo da PCR que se encontra duplicada ao final do ciclo, conforme determinado pela intensidade de fluorescência.



**Figura 13:** Níveis de expressão dos genes de protease. Os experimentos foram realizados com promastigotas (**A**) na fase estacionária de crescimento e de amastigotas (**B**), da cepa de origem (Thor) e suas populações (Thor 03-28). Os resultados estão expressos em unidades de quantidade relativa (RQ). Os genes de  $\alpha$ -tubulina e proteína ribossomal 40S S8 de *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram utilizados como controles endógenos de expressão e amostras de cDNA da cepa de origem como calibradores.



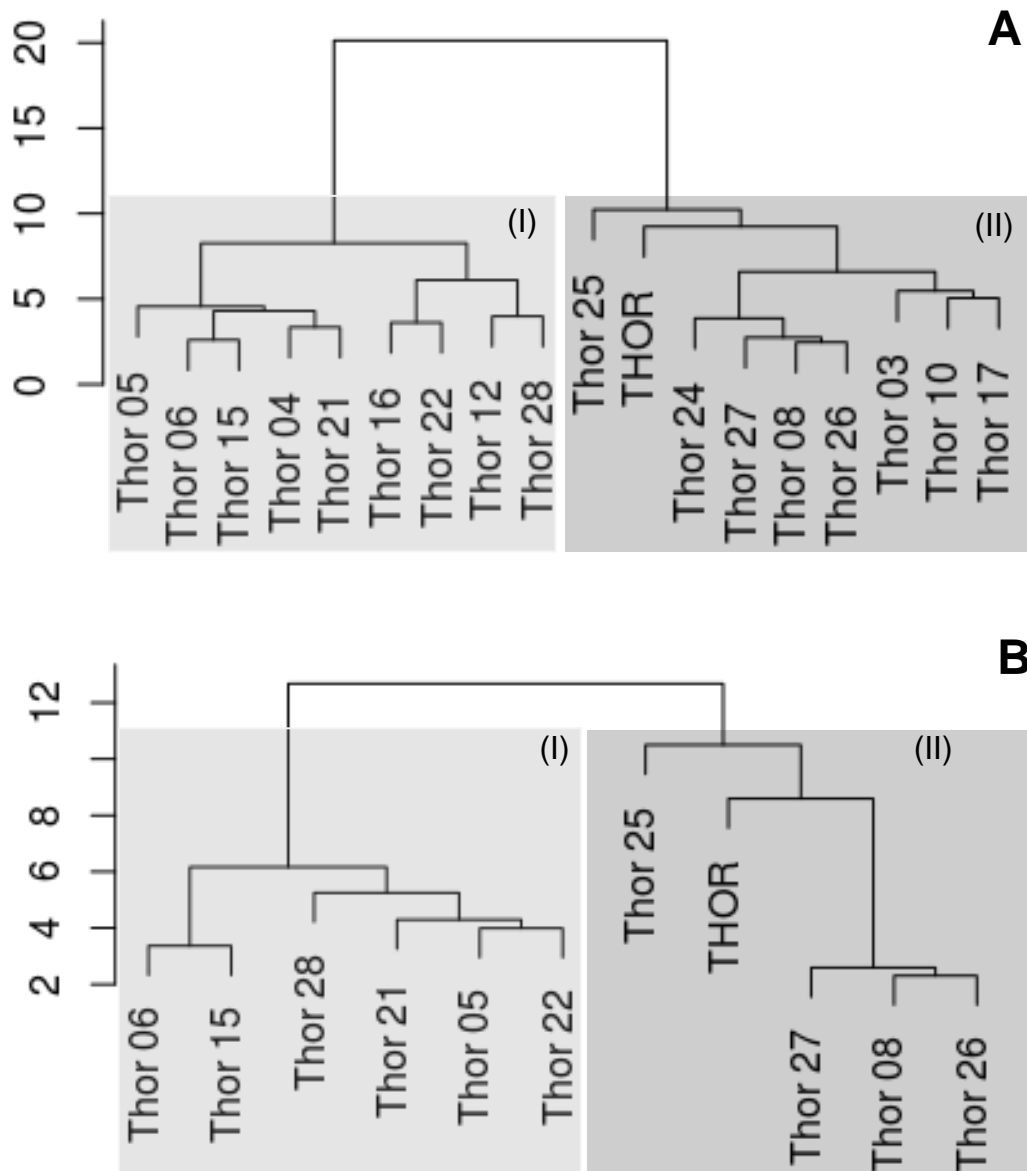
**Figura 14:** Níveis de expressão dos genes de proteases dos clones Thor 17 e Thor 25. Os experimentos foram realizados com promastigotas na fase estacionária de crescimento (Thor 17 pro e Thor 25 pro) e de amastigota (Thor 25 ama) obtidas da cepa de origem (Thor pro). Os resultados estão expressos em unidades de quantidade relativa (RQ). Os genes de  $\alpha$ -tubulina e proteína ribossomal 40S S8 de *Leishmania (Viannia) braziliensis* foram utilizados como controles endógenos de expressão e amostras de cDNA da cepa de origem como calibradores.

#### 4.4 Análises de agrupamento dos clones

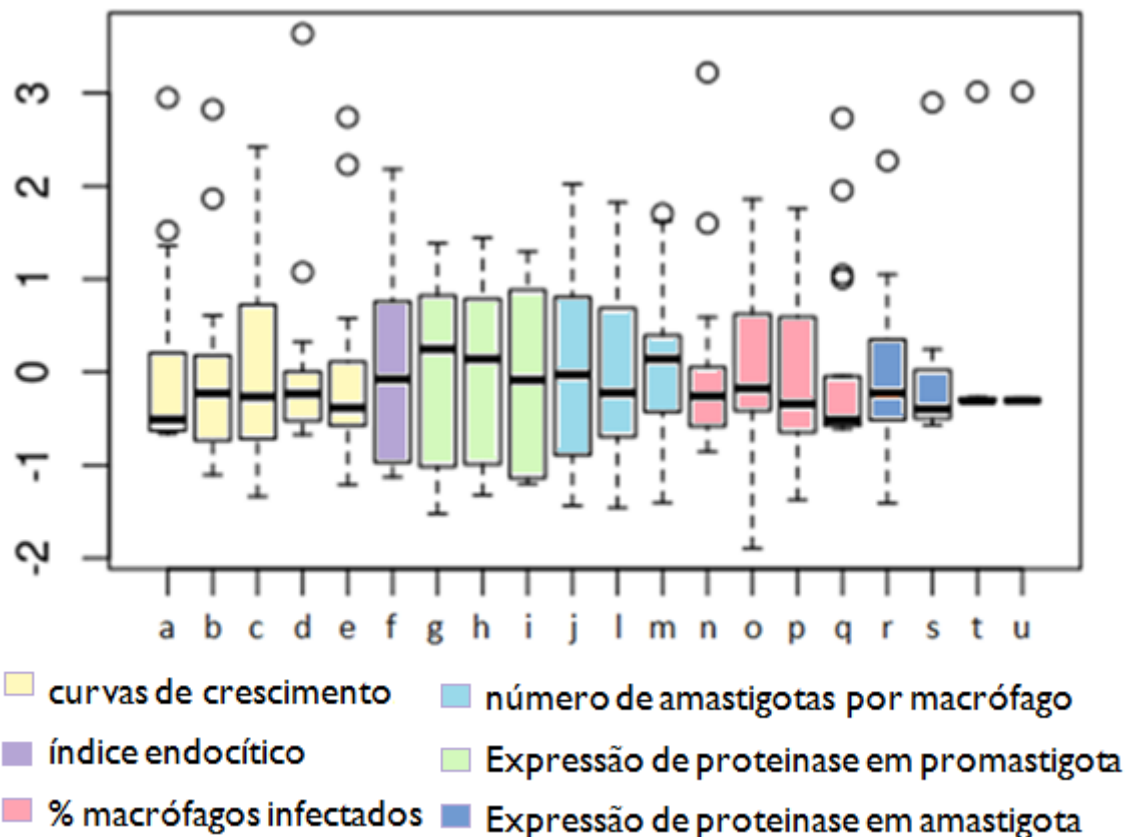
Nesta análise o conjunto de unidades amostrais ( $n = 17$ ), os quais foram medidos segundo as variáveis do estudo [curva de crescimento, índice endocítico (24h), % de macrófagos infectados (24, 48 e 72h), número de amastigotas por macrófagos infectados (24h, 48h e 72h), expressão gênica de cisteína proteinase, aspártico proteinase, metaloproteinase, serina proteinase proteases em promastigotas e amastigotas]. A análise aplicada possibilitou reunir os indivíduos, quanto à homogeneidade dentro do grupo e heterogeneidade entre grupos.

Uma vez que nem todos os clones de promastigotas foram capazes de se diferenciar em amastigotas *in vitro*, as análises de agrupamento foram feitas com (Figura 15A) e sem (Figura 15B) os dados de expressão gênica das proteinases de amastigota. As análises dos dendogramas resultantes indicaram a formação de dois grupos de parasitos. Grupo (I): Thor 04, 05, 06, 12, 15, 16, 21, 22 e 28; Grupo (II): Thor, Thor 03, 08, 10, 17, 24, 25, 26 e 27, destacados em quadrantes na Figura 14.

Uma análise descritiva, aqui representada em um diagrama de caixa (*boxplots* Figura 16), possibilitou a identificação das variáveis que mais contribuíram para a definição dos grupos. Os resultados indicaram que as variáveis mais ao centro do diagrama (índice endocítico a 24h de infecção; % de macrófagos infectados a 24, 48 e 72h; número de amastigotas por macrófago a 24, 48 e 72h) tem a maior variação interquartilica e, portanto tem mais peso no cálculo da distância euclidiana entre os clones.



**Figura 15:** Agrupamento dos parasitos da cepa MCAN/BR/1998/R619. Os dendrogramas demonstram o agrupamento dos clones da cepa THOR, incluindo (A) ou não (B) a análise de expressão gênica de proteases em amastigotas. A escala a esquerda representa a altura de agrupamento com base na distância euclidiana das variáveis padronizadas entre os clones. Os quadrantes destacam a formação de dois grupos distintos: (I) e (II).



**Figura 16:** Diagrama de caixa para definição do agrupamento hierárquico. As variáveis com maior distância interquartílica são as que mais contribuem para o cálculo da distância euclidiana entre os clones. As variáveis foram normalizadas para que estivessem na mesma escala para fins comparativos. Variáveis: **a – e**: dados das curvas de crescimento dia 1 a 5; **f**: índice endocítico a 24h da infecção; **g – i**: dados de % macrófagos infectados a 24, 48 e 72h; **j-m**: número de amastigotas por macrófago a 24, 48 e 72h; Expressão de aspártico, cisteína, metalo e serina protease em promastigota (**n-q**) e em amastigota (**r-u**), respectivamente.

#### 4.5 Caracterizações da resposta do hospedeiro

Com o estabelecimento de dois grupos distintos dos clones estudados, foi possível eleger representantes de cada um deles para seguir as análises. São eles: grupo (I): Thor 15, Thor 21, Thor 22 e Thor 28; e no grupo (II) = Thor, Thor 17, Thor 25 e Thor 27 (Figura 15).

Foram realizados ensaios para detectar citocinas e óxido nítrico produzido por macrófagos peritoneais de camundongos, na infecção *in vitro*, por representantes dos dois grupos. Os sobrenadantes de culturas de macrófagos foram analisados quanto à expressão dos mediadores e reguladores da imunidade inata produzidos pelos macrófagos durante a infecção (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) (Figura 17) e o óxido nítrico (Figura 18).

Com os ensaios de Luminex foi possível detectar a citocina IL-1 $\beta$  nos sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados por parasitos do grupo (I) – Thor 15 e Thor 21 e do grupo (II) – Thor e Thor 27. Nas infecções dos clones Thor 15 a IL-1 $\beta$  foi detectada às 24 e 48h e na cepa Thor somente às 48h, nos demais a citocina pôde ser observada nos três tempos de infecção. O maior nível de expressão desta citocina foi detectado na cepa Thor 15 ( $26,77 \pm 2,62$  pg/mL), em 24h da infecção dos macrófagos. Enquanto que o menor nível foi observado no clone Thor 21 ( $2,38 \pm 1,63$  pg/mL) quando a infecção *in vitro* estava em 24h, (Figura 17).

A citocina IL-6 foi detectada nas infecções por parasitos do grupo (I) – Thor 15, nos três tempos analisados com as maiores taxas da citocina ( $21783 \pm 1732,9$  /pg/mL, 24h), bem como no Thor 21; nos parasitos do grupo (II) – no clone Thor 27, nas duas últimas em níveis mais baixos ( $<319,98 \pm 25,9$  pg/mL, Thor 27 às 72h) (Figura 17).

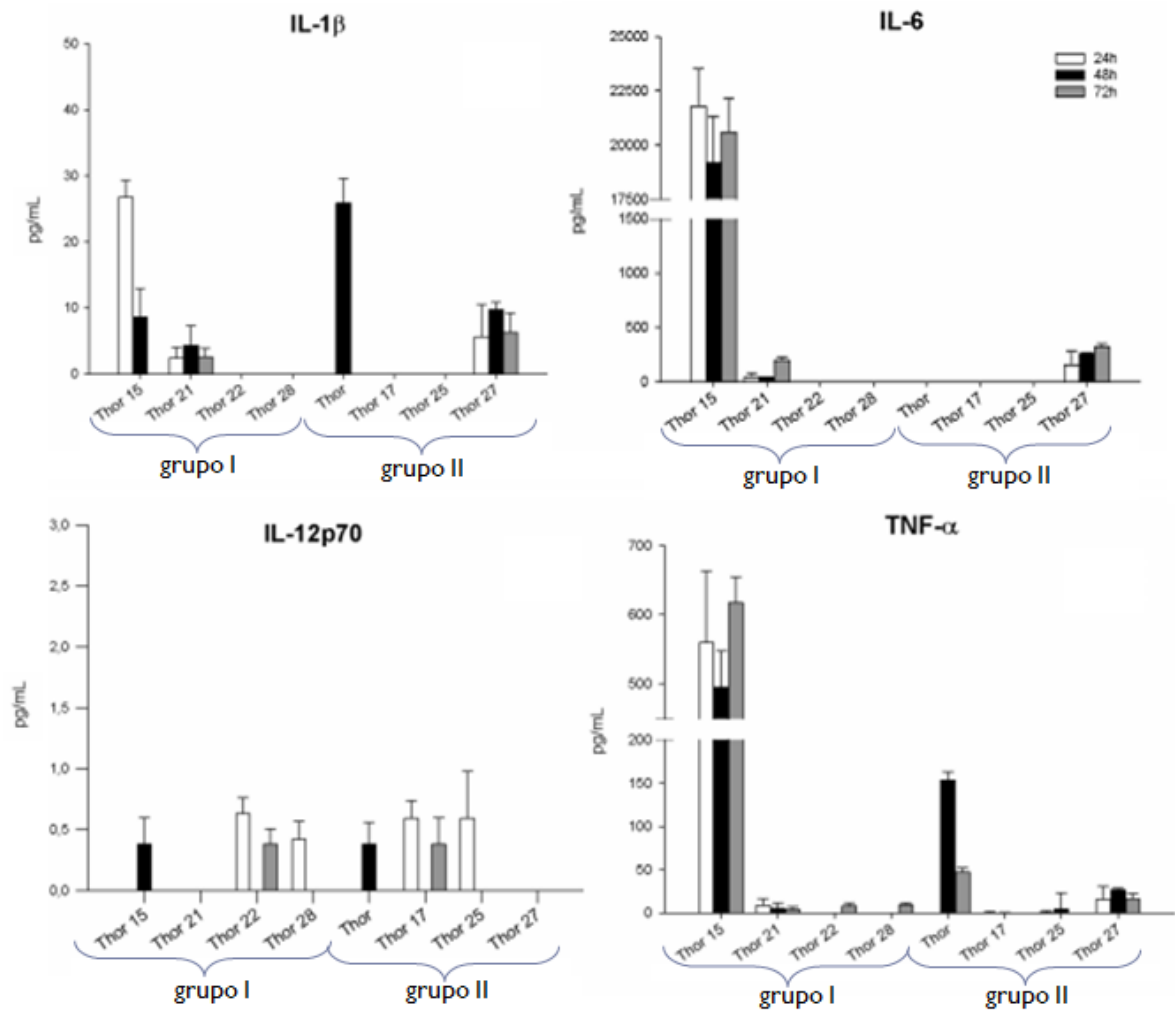
A citocina IL-12p70 foi detectada em quase todas os ensaios de infecção com macrófagos, com valores semelhantes. Os menores valores da citocina foram detectados nos ensaios de infecção por parasitos do grupo (I): Thor 15, somente em 48h ( $0,38 \pm 0,22$  pg/mL), no Thor 22 a 24 ( $0,63 \pm 0,13$  pg/mL) e 72h ( $0,38 \pm 0,13$  pg/mL) e no Thor 28 em 24h ( $0,42 \pm 0,15$  pg/mL); nas do grupo (II) foi



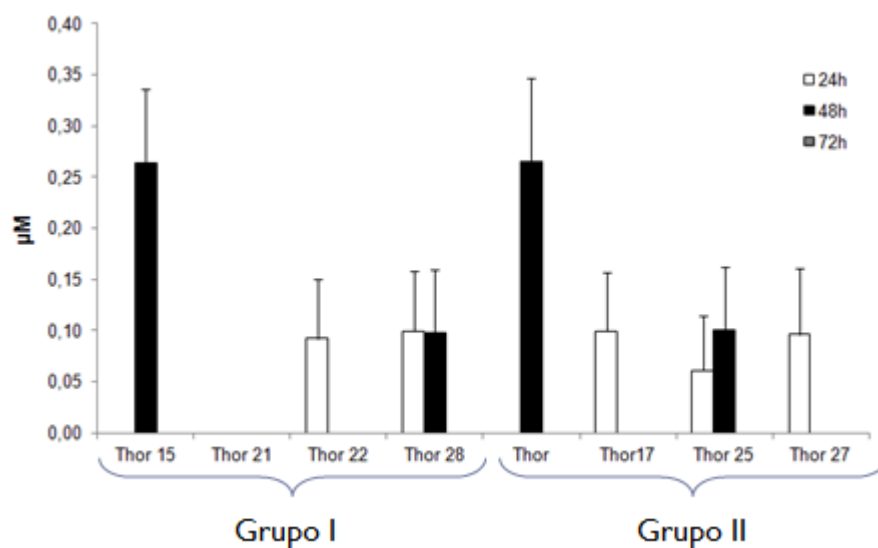
detectada na cepa Thor em 48h ( $0,38 \pm 0,18$ pg/mL), em 24 ( $0,59 \pm 0,15$  pg/mL) e 72h ( $0,38 \pm 0,22$  pg/mL) no Thor 17 e no Thor 25 ( $0,59 \pm 0,39$  pg/mL) em 24h de infecção, (Figura 17).

O TNF- $\alpha$  foi detectado no grupo (I): no Thor 15 em níveis mais altos que as demais, nos três tempos da infecção (24h =  $559,43 \pm 103,9$  pg/mL; 48h =  $495,43 \pm 51,8$  pg/mL e 72h =  $692,99 \pm 37,4$  pg/mL). No grupo (II) destaca-se a expressão da na cepa Thor em 48 ( $153,37 \pm 9,8$  xpg/mL) e 72h ( $125,57 \pm 4,7$  pg/mL) de infecção (Figura 17).

O óxido nítrico não foi detectado nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos infectados pelo clone Thor 21 em nenhum dos tempos analisados, em nossas condições experimentais (Figura 18). Níveis detectáveis e expressão do óxido nítrico foram encontrados nas amostras oriundas das infecções por parasitos do grupo (I): Thor 28 a produção de óxido nítrico foi detectada após 24h ( $0,10 \pm 0,06$   $\mu$ M) e 48h ( $0,10 \pm 0,06$   $\mu$ M) de infecção e nos sobrenadantes dos cultivos com Thor 22 apenas após 24h ( $0,09 \pm 0,06$   $\mu$ M). Neste grupo, nas infecções com Thor 15 foi detectado um dos maiores níveis de óxido nítrico, após 48h ( $0,26 \pm 0,07$   $\mu$ M) após 24h ( $x \pm x$   $\mu$ M). Nos ensaios com os parasitos do grupo (II): Thor (0,26  $\pm$  0,08  $\mu$ M), Thor 17 ( $0,10 \pm 0,06$   $\mu$ M) e Thor 27 ( $0,10 \pm 0,06$   $\mu$ M) induziram a produção de óxido nítrico somente após 48h de cultura, enquanto que este estímulo foi detectado) e 48h ( $0,10 \pm 0,06$   $\mu$ M) de infecção com a Thor 25. Neste grupo foi possível observar que o maior nível de expressão de óxido nítrico foi induzido pela Thor (Figura 18).



**Figura 17:** Detecção de citocinas durante a infecção de macrófagos peritoneais. Ensaio de Luminex avaliaram a presença de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70 e TNF- $\alpha$ ) em sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por parasitos do grupo I e grupo II na proporção 5 parasitos:macrófago. Os tempos de cultura avaliados foram 24, 48 e 72h. Os resultados representam a diferença entre os valores de sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados e controle não infectados. Os dados foram expressos em pg/mL como média e desvio padrão das análises.



**Figura 18:** Detecção de óxido nítrico durante a infecção de macrófagos peritoneais. A concentração de óxido nítrico foi avaliada pela reação colorimétrica de em sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados pela cepa Thor e clones do grupo I e grupo II na proporção 5 parasitos:macrófago. Os tempos de cultura avaliados foram 24, 48 e 72h. Os resultados representam a diferença entre os valores de sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados e controle não infectados. Os dados foram expressos em  $\mu\text{M}$  como média e desvio padrão das análises.

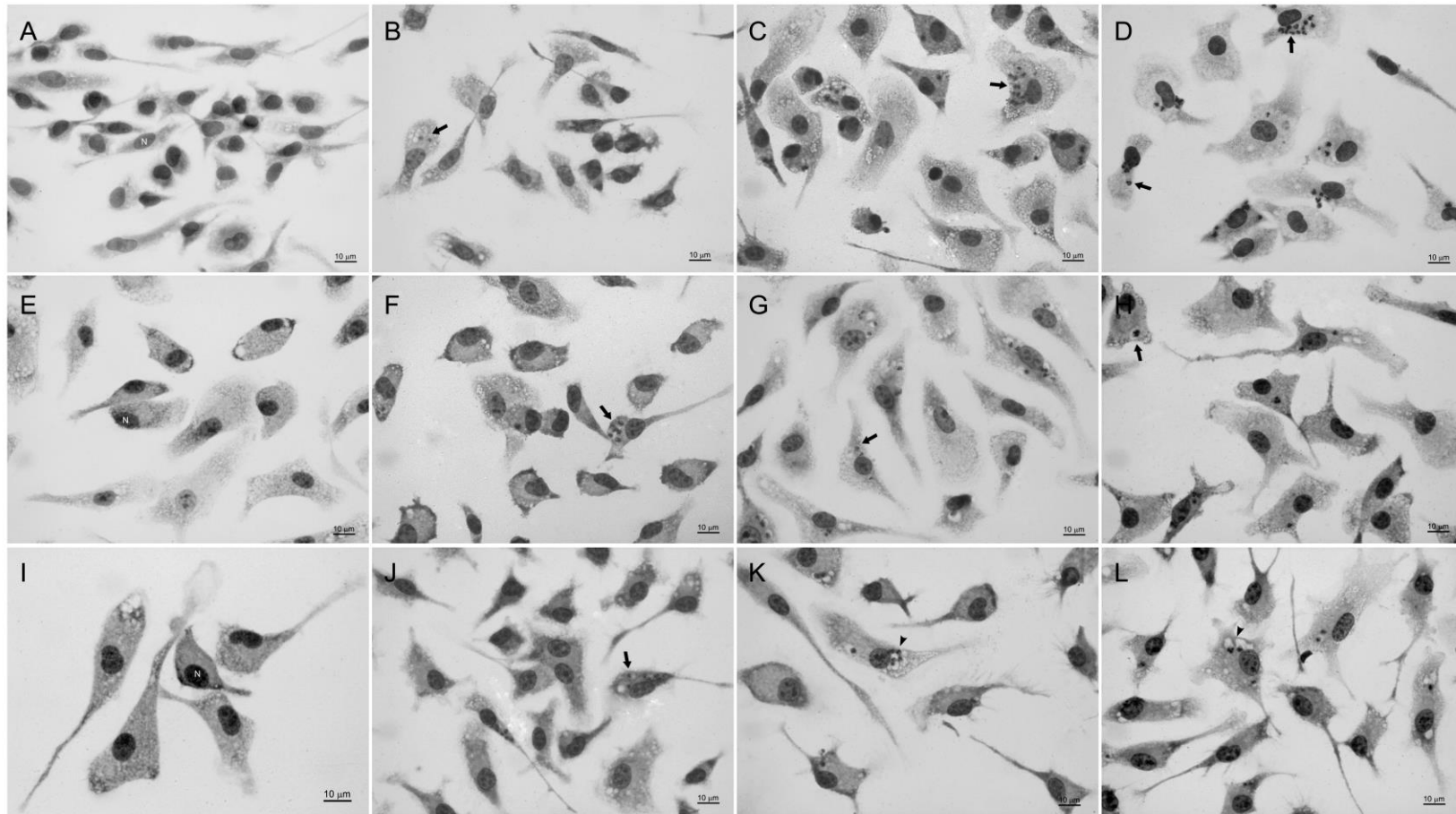
#### **4.6 Correlações entre os dados biológicos dos grupos e expressão dos fatores do hospedeiro e do parasito.**

Na última etapa deste estudo foram propostas análises de correlação de Pearson ( $\rho$ ), com o objetivo de se avaliar possíveis correlações ente os dados biológicos (infecção de macrófagos, curva de crescimento) e os dados de expressão dos genes de proteinases e produção de mediadores inflamatórios. O  $\rho$  mede o grau de correlação e a direção desta correlação, se positiva ou negativa, entre duas variáveis. As análises foram realizadas com os dados do grupo (I) e do grupo (II) previamente definidos, cujas imagens representativas das infecções de macrófagos peritoneais de camundongos são indicadas nas figuras 19 e 20, respectivamente.

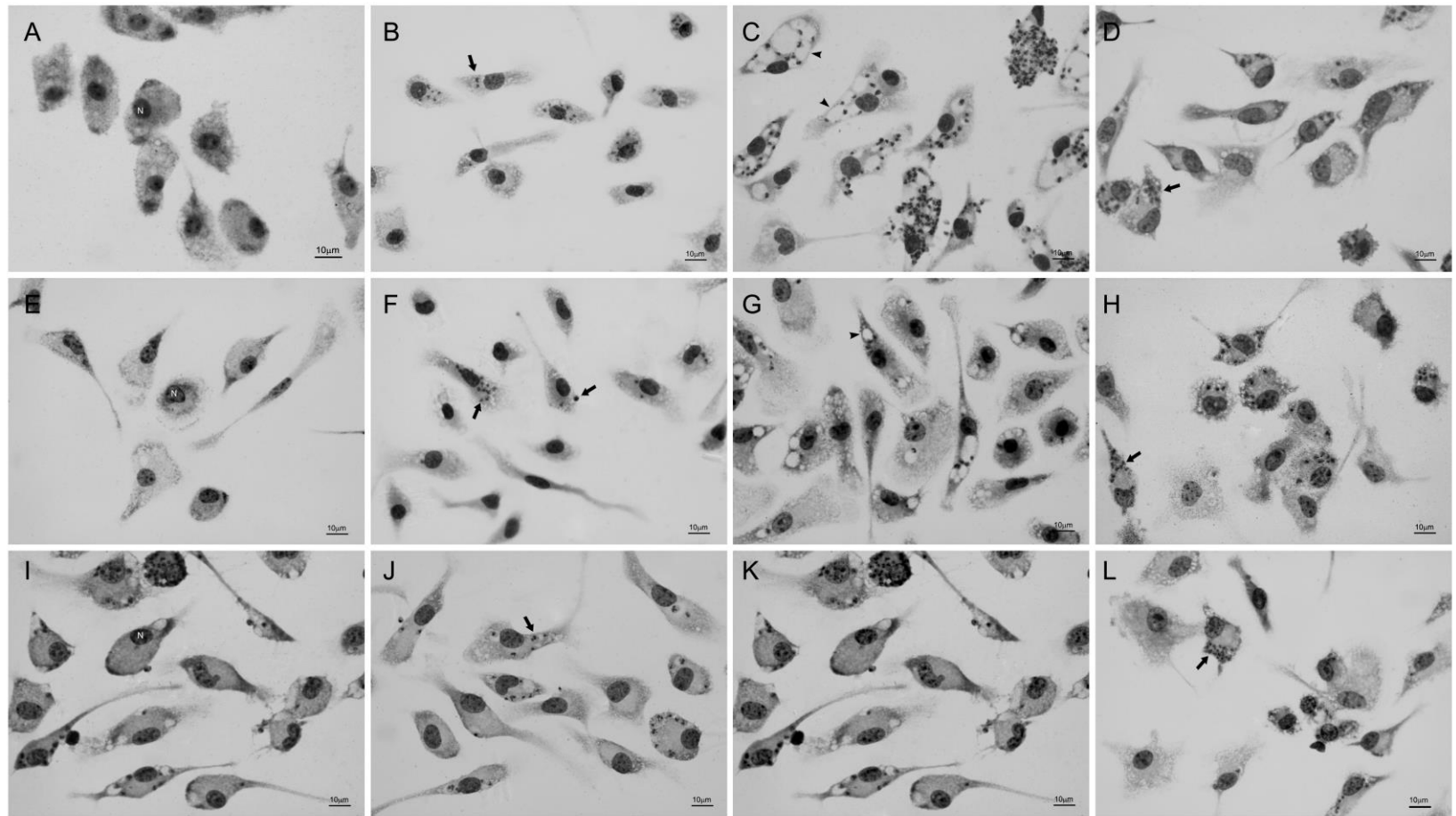
No primeiro grupo de análise foi possível correlacionar os dados de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos com os dados de produção de mediadores inflamatórios nas infecções pela cepa de origem e seus clones. Quanto às citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 foi detectado uma correlação negativa entre os dados enquanto que para citocina IL-12p70 e óxido nítrico uma correlação positiva entre os dados (Tabela 7).

Também foram correlacionados os dados de expressão de proteinases em promastigotas com os dados da curva de crescimento no 4<sup>o</sup> dia de cultura, uma vez que os parasitos se encontravam neste tempo de cultura quando foram preservados em Trizol® para extração de RNAm. Foi possível observar que há uma correlação positiva entre o crescimento em cultura e a expressão de cisteína (0,018) e serina proteinase (0,223), e uma correlação negativa com a expressão de aspártico (-0,434) e metaloproteinase (-0,198) (Tabela 8).

A expressão de proteinases em promastigotas também foi correlacionada aos dados de infecção de macrófagos às 24h, uma vez que os parasitos utilizados para infecção das células de mamíferos se encontravam no mesmo tempo de cultura que os utilizados para análise de expressão das enzimas. Observou-se uma correlação negativa entre os dados de expressão de cisteína (-0,253) e serina (-0,241) proteinase e o índice endocítico e entre os dados de aspártico (0,024) e metaloproteinase (0,815) (Tabela 9).



**Figura 19:** Infecção de macrófagos peritoneais de camundongos por parasitos do grupo (I). Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c não infectados (**A**: 24h, **E**: 48h e **I**: 72h) e infectados por parasitos do grupo (I): Thor 21 (**B**: 24h, **F**: 48h, e **J**: 72h); Thor 22 (**C**: 24h, **G**: 48h, e **K**: 72h) e Thor 28 (**D**: 24h, **H**: 48h, e **L**: 72h). As setas indicam as amastigotas e as cabeças de seta os vacúolos parasitóforos.



**Figura 20:** Infecção de macrófagos peritoneais de camundongos por parasitos do grupo (II). Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c não infectados (**A:** 24h, **E:** 48h e **I:** 72h) e infectados por parasitos do grupo (II): Thor (**B:** 24h, **F:** 48h, e **J:** 72h); Thor 17 (**C:** 24h, **G:** 48h, e **K:** 72h) e Thor 27 (**D:** 24h, **H:** 48h, e **L:** 72h). As setas indicam as amastigotas e as cabeças de seta os vacúolos parasitóforos.

**Tabela 7:** Produção de mediadores inflamatórios na etapa inicial de infecção. Análise de correlação dos dados de mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos durante a infecção *in vitro* pelos clones da cepa Thor.

Mediador inflamatório	Índice endocítico (24h)
TNF- $\alpha$	-0,438
IL-1 $\beta$	-0,374
IL-6	-0,447
IL-12p70	0,539
NO	0,400

\*Valores de  $\rho$  negativo entre duas variáveis indicam que se uma aumenta a outra sempre diminui; Valores de  $\rho$  positivo entre duas variáveis indica que se uma aumenta a outra sempre aumenta. Valores de  $\rho$  para mais ou para menos: de 1.0 a 0.70 indica uma forte correlação; de 0.30 a 0.7 indica correlação moderada; de 0 a 0.30 indica fraca correlação.

**Tabela 8:** Expressão de proteinases formas metacíclicas. Análise de correlação dos dados de expressão relativa de proteinases de clones da cepa Thor e dados da curva de crescimento de promastigotas *in vitro* na fase estacionária.

Proteinases de promastigotas	Parasitas/mL no 4º dia da curva
Cisteína proteinase	0,018*
Serina proteinase	0,223*
Metaloproteinase	-0,198*
Aspártico proteinase	-0,434**

\* fraca; \*\* moderada; \*\*\* forte

\*Valores de  $\rho$  negativo entre duas variáveis indicam que se uma aumenta a outra sempre diminui; Valores de  $\rho$  positivo entre duas variáveis indica que se uma aumenta a outra sempre aumenta. Valores de  $\rho$  para mais ou para menos: de 1.0 a 0.70 indica uma forte correlação; de 0.30 a 0.7 indica correlação moderada; de 0 a 0.30 indica fraca correlação.



**Tabela 9:** Expressão de proteinases no início da infecção. Análise de correlação dos dados de proteinases produzidos pelos clones da cepa Thor e dados da infecção de macrófagos *in vitro* em 24h de infecção.

Proteinases de promastigotas	Índice endocítico (24h)
Cisteína proteinase	-0,058 *
Metaloproteinase	-0,238 *
Aspártico proteinase	-0,637 **
Serina proteinase	0,102 *

\* fraca; \*\* moderada; \*\*\* forte

\*Valores de  $\rho$  negativo entre duas variáveis indicam que se uma aumenta a outra sempre diminui; Valores de  $\rho$  positivo entre duas variáveis indica que se uma aumenta a outra sempre aumenta. Valores de  $\rho$  para mais ou para menos: de 1.0 a 0.70 indica uma forte correlação; de 0.30 a 0.7 indica correlação moderada; de 0 a 0.30 indica fraca correlação.

## **5. DISCUSSÃO**

A Leishmaniose Tegumentar Americana continua um sério problema de saúde pública com o agravante quadro atual de redistribuição geográfica. A doença partiu originalmente de um padrão silvestre, para rural - urbano e pode, como nos casos de leishmaniose visceral em muitos municípios no Brasil hoje, se tornar urbano-urbano (Rotureau, 2006; Costa, 2008; Harhay et al., 2011). Esse cenário só é possível devido à presença de reservatórios com hábitos sinantrópicos e considerável capacidade de adaptação dos parasitos e seus vetores a ambientes periurbanos (Lainson et al., 1994; Carvalho et al., 2010; Saraiva et al., 2011).

O potencial adaptativo destes protozoários é um reflexo da diversidade biológica do gênero *Leishmania* (Cupolillo, Grimaldi, Momen, 1995; 1997; 1998), que apresenta reprodução predominantemente clonal, com propagação exponencial quando num ambiente ideal. Entretanto, em condições de estresse a troca genética pode ser crucial para geração de novos fenótipos, possibilitando aquisição de vantagens seletivas e subsequente expansão numa determinada população, contribuindo para a diversidade fenotípica e os polimorfismos genéticos em populações naturais do parasito (Miles et al., 2009). Atualmente, o estudo destes polimorfismos nas espécies e subespécies utiliza-se de ferramentas baseadas em análises biomoleculares ou de isoenzimas. Além disso, a identificação de marcadores biológicos como virulência e tropismo do parasito, permanece como ferramenta importante tendo em vista a abundante biodiversidade de parasitos do gênero *Leishmania* (Garin et al., 2001). Adicionalmente, enquanto há fortes evidências de polimorfismo genético em populações naturais de diferentes espécies de *Leishmania* (Cupolillo, Grimaldi, Momen, 1998), o que explicaria a adaptação destes parasitos aos diferentes ambientes aos quais estão sujeitos (Cupolillo et al., 2003), o mesmo não se pode dizer para a adaptação do parasito no hospedeiro vertebrado.

Neste contexto, os estudos biológicos e de expressão gênica de fatores de virulência destes parasitos podem auxiliar na elucidação dos seus mecanismos de adaptação, e é neste sentido que os propusemos este trabalho de tese.

Embora existam alguns estudos genéticos utilizando amostras de *L.(V.) braziliensis*, pela primeira vez é proposto um estudo para avaliar a propriedade de

um único isolado de LTA reunir vários potenciais de ação biológica na interação com o hospedeiro vertebrado, tendo como destaque a expressão das proteinases, enzimas envolvidas nas interações finas entre *Leishmania* e seus hospedeiros (Silva-Almeida et al., 2012). Essas enzimas são importantes para virulência e participam de várias fases do desenvolvimento deste parasito, e demais *Leishmania sp*, incluindo proliferação, nutrição, diferenciação, interação com hospedeiro e evasão da resposta imunológica (McKerrow et al., 2006). Desta forma, é importante identificar possíveis variações biológicas nas *Leishmania spp* e correlacionar esta variabilidade com a expressão de genes de virulência do parasito. Estas variações podem ter como consequência a produção de diferentes fenótipos, cujos reflexos podem estar associados à diversidade das manifestações clínicas da doença causada por esses parasitos.

A primeira abordagem deste trabalho trata as proteinases como um dos fatores do parasito que influenciam no ciclo biológico das *Leishmania spp*. Neste tópico foi realizada uma análise genômica comparativa na organização dos genes de proteases entre *L. (V.) braziliensis* frente a três espécies: *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana*, com o propósito de identificar características espécie-específicas que poderiam contribuir para diferenças fenotípicas ou de virulência entre as espécies estudadas. Divergência, aquisição, perda e rearranjo genético dentro e entre regiões sintênicas vêm construindo os genomas dos tripanosomatídeos (El-Sayed et al., 2005) e podem explicar a organização e diversidade do degradoma de *Leishmania spp* (o conjunto de genes codificados pelo genoma de certo organismo) (López-Otín & Overall, 2002).

Um achado interessante deste trabalho foi de que os genes de protease estão presentes em todos os cromossomos nas quatro espécies, porém ocorrem em diferentes quantidades. Fato consistente com a já reportada importância das proteases para estes parasitos, uma vez que revela que genes para estas enzimas são abundantemente dispersos entre os genomas de *Leishmania spp*, e é, complementarmente, uma indicação de que padrões de evolução distintos têm incidido entre as diferentes espécies.

Outros estudos que tratam da organização genômica em *Leishmania spp*. têm sido conduzidos e relacionam a configuração estrutural desses genes com

características funcionais importantes. A organização destes genes em conjuntos repetidos permite os parasitos rapidamente gerarem um grande número de transcritos quando necessários em grande quantidade (Victoir & Dujardin, 2002). Outros autores sugerem que *Leishmania* spp. possuem uma estratégia para aumentar os níveis de RNAm duplicando genes em cromossomos dissômicos ou formando cromossomos supranumerários (Rogers et al, 2011).

Tem sido proposto por Peacock et al (2007) que a ausência de sintenia não necessariamente indica uma diversidade linhagem-específica em *Leishmania* spp. Um dos primeiros estudos de genômica comparativa nestes parasitos indica que a despeito das variações fenotípicas entre as espécies, somente alguns genes são verdadeiramente espécie-específicos (Peacock et al., 2007). Em concordância com esse estudo nós também encontramos alguns genes que não mostravam semelhança a nenhum de outra espécie estudada.

Este achado é importante, uma vez que genes exclusivos podem explicar porque estas espécies causam patologias diversas e se desenvolvem em vetores e hospedeiros específicos. Previamente foi relatado que mais de 99% dos genes estão conservados entre *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) major*, revelando um alto grau de sintenia no genoma de diferentes espécies (Peacock et al., 2007). Nossos dados indicam que, ao analisarmos estritamente genes de proteases, o mesmo cenário é encontrado, uma vez que também observamos alta sintenia entre as espécies estudadas.

Ao contemplarmos a utilidade de proteases dos parasitos como alvos para quimioterapia, é muito importante considerarmos a hipótese de que estas enzimas são únicas para espécies de *Leishmania* e bastante diferentes das enzimas correspondentes em seus hospedeiros mamíferos. Com a estratégia utilizada neste estudo não encontramos similaridade entre sequências de genes de proteases de *Leishmania*, frente a de genes de mamíferos, o que confirma a possibilidade das aspártico, cisteína, serina e metaloproteases serem bons alvos para quimioterapia.

Uma observação que chamou a atenção foram os 36 genes para metaloproteases em *L. (V.) braziliensis* relacionados à zinco metaloprotease,

gp63. Esta metaloprotease é um fator de virulência muito bem caracterizado para *Leishmania* spp. e têm sido relatadas diversas funções na interação com seus hospedeiros (Olivier et al., 2012). Nas outras espécies esta diversidade foi menor: somente 6, 7 e 8 genes em *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum*, respectivamente. A organização dos genes de metaloproteases em espécies do subgênero *Viannia* é bastante diferente das espécies do subgênero *Leishmania* (Voth et al., 1998). Esta predominância em *L. (V.) braziliensis*, peculiaridade também observada em *L. (V.) guyanensis* (Steinkraus et al., 1993), possui significado biológico ainda não completamente compreendido (Victoir & Dujardin, 2002; Victoir et al., 2005). A amplificação de genes é um fenômeno comum em *Leishmania* (Iovannisci & Beverley, 1989; Inga et al., 1998; Kebede et al., 1999) e é uma fonte provável das diferenças entre os dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*. Esta variação curiosa deve ter implicações fundamentais para a maneira como cada espécie interage com seus hospedeiros.

As peculiaridades dos genes de proteases observadas no genoma de *L. (V.) braziliensis* nos levaram a investigar a possibilidade da expressão desses genes de virulência estar relacionada a variações biológicas dentro de uma mesma cepa deste parasito. Na continuidade deste trabalho foi possível testar a hipótese de que um mesmo isolado de *L. (V.) braziliensis* não é homogêneo quanto à expressão de suas proteinases e quanto ao comportamento em cultura e na infecção de macrófagos murinos.

Os parasitos *L. (V.) braziliensis* MCAN/BR/1998/R619, cepa Thor, foi o modelo escolhido para testar esta hipótese. A cepa foi isolada em um estudo de detecção de infecção em cães clinicamente suspeitos para LTA que residiam em áreas de loteamentos recentemente implantados no Município de Maricá - RJ, próximo da mata residual (Serra da Tiririca). O parasito foi isolado a partir da cultura de fragmentos obtidos de lesão ulcerada, localizada na bolsa escrotal de um cão da raça dinamarquês proveniente do bairro Itaipuaçu. O isolado foi caracterizado por isoenzimas apresentando padrão típico de *L. (V.) braziliensis* (Serra et al., 2003).

Um fato novo e importante observado nesse estudo é que nossos resultados apontam para uma expressão heterogênea de proteinases pelos clones da cepa

Thor nas formas amastigotas e promastigotas. Pela primeira vez é descrito que um mesmo isolado de *L. (V.) braziliensis* contém clones expressando diferentemente genes das quatro classes de proteinases majoritárias anotadas no genoma deste parasito. Ainda, os amastigotas, de forma geral, expressaram mais proteinases que os promastigotas. Interessantemente, os dados deste estudo indicaram que em promastigotas a maior expressão foi de aspártico e metaloproteinase enquanto que nos amastigotas houve maior expressão de metaloproteinase e serina protease. Como proteinases são enzimas que atuam nas duas fases do ciclo biológico deste parasito, e são reconhecidos fatores de virulência na interação do parasito com o hospedeiro vertebrado (Silva-Almeida et al., 2012), o significado biológico destes achados pode ser interpretado como um potencial da cepa Thor de *L. (V.) braziliensis* de se adaptar aos diferentes hospedeiros.

Os promastigotas metacíclicos e amastigotas são bioquimicamente pré-adaptados para sobrevivência em pH ácido e, nestas condições, estão sujeitas à ação de proteinases diversas do hospedeiro e expressão de suas próprias proteinases. A atividade de proteinases em *Leishmania* é conhecida, e essas enzimas são essenciais ao ciclo de vida destes protozoários (Coombs, 1982; Pral et al., 1993; Silva-Lopez et al., 2004; Alves et al., 2005; Morgado-Diaz et al., 2005; Rebello et al., 2009). Desta forma, a maior expressão destes genes em amastigotas é um forte indício da importância destas enzimas na etapa do ciclo evolutivo nos hospedeiros vertebrados, em virtude das novas necessidades metabólicas e dos mecanismos de escape nestes hospedeiros (Silva-Almeida et al., 2012; Pereira et al., 2014). Ressalta-se ainda nosso achado de que a correlação positiva entre os dados de expressão de metaloproteinase em amastigotas e o índice endocítico reforça a importância desta classe de enzima nas primeiras horas da infecção.

Chama a atenção que a maior expressão destas enzimas em amastigotas na cepa Thor e clones, está atrelada à mudança de ambiente, aqui representado pelo choque de temperatura e pH necessários para indução das formas amastigotas em cultura (Hunter et al., 1982; Darling et al., 1987; Bates, Robertson & Coombs 1992; Cysne-Finkelstein et al., 1998). Este é outro achado novo, pois

os estudos clássicos de proteinases nas fases evolutivas das *Leishmania* spp são relativos a experimentos que informam sobre diferenças na atividade destas enzimas. Foi demonstrado que a atividade de metalo-, serina e aspártico proteinases foi menor durante a transformação de promastigotas em amastigotas induzida pelo choque térmico. Em contraste, a atividade de cisteína proteinase apresenta aumento concomitante à diferenciação de promastigota de *L.(L.) amazonensis* (Alves et al., 2005). Em relação à espécie *L. (V.) braziliensis* foi demonstrado, em recente estudo, que há uma modulação da expressão dos genes de cisteína proteinase durante o cultivo *in vitro*, com aumento relativo dos transcritos do gene *cpb* de promastigotas destes parasitos (Rebello et al., 2010).

Ainda sob a ótica do comportamento do parasito acompanhamos as curvas de crescimento dos clones comparando-as com a da cepa Thor. Com esta abordagem foi possível determinar as fases de crescimento exponencial e estacionário, sabendo que nesta última predominam as formas promastigotas metacíclicas (Cysne-Finkelstein et al., 1998). O comportamento *in vitro* dos clones confirma a constituição heterogênea da cepa. Embora não tenha havido diferença no dia em que os clones alcançaram a fase estacionária, todos no quarto dia da curva, foram observadas diferenças quanto ao tempo de replicação celular entre os clones. Algumas tendo crescimento mais rápido no início da curva e outras mais lento.

Na continuidade deste estudo foram realizados ensaios biológicos com a cepa Thor e clones, que avaliassem fatores do hospedeiro que influenciam no ciclo biológico do parasito. Na infecção de macrófagos peritoneais de camundongos pudemos ver diferentes padrões de infecção variando desde alta carga parasitária em 24h de infecção a baixos índices de infecção no mesmo tempo, até resolução da infecção em 72h de experimento. Como em ensaios *in vitro* os macrófagos são capazes de destruir os parasitos quando no seu interior (Pearson et al., 1981), um ensaio experimental que acompanhe a infecção até 72h dá um panorama mais real do potencial infectante dos parasitos estudados (Sacks & Perkins, 1984). Um estudo com outras cepas *Leishmania* spp. do subgênero *Viannia* verificou que estas são capazes de infectar macrófagos, entretanto não tem capacidade de se replicar quando no meio intracelular (Matta



et al., 2010). Diferente do que observamos no nosso estudo, uma vez que alguns clones tiveram capacidade de persistir no interior das células de mamíferos até 72h.

Um achado interessante foi a formação de grandes vacúolos parasitóforos nas infecções causadas por alguns clones, diferente do que é observado comumente na infecção pela espécie *L. (V.) braziliensis* (Zauli-Nascimento et al., 2010). Vale ressaltar que a presença de grandes vacúolos ocorreu nas infecções com as maiores taxas. É senso comum entre os que trabalham com a espécie de que *L. (V.) braziliensis* produz vacúolos parasitóforos pequenos, difícil de observar pela microscopia óptica, de fato a literatura sobre a caracterização de vacúolos parasitóforos em espécies do subgênero *Viannia* é escassa, ao contrário do que ocorre com espécies como *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* (Chang et al., 2003, Castro et al., 2006; Menezes et al., 2013).

As evidências apontadas neste estudo, de que a infecção *in vitro* dos macrófagos de camundongos BALB/c pelos parasitos estimulam diferentemente a produção de mediadores/reguladores da resposta imune inata é um indicativo do diversificado potencial de adaptação do parasito *L. (V.) braziliensis* (MCAN/BR/1998/R619) ao hospedeiro vertebrado. A infecção de macrófagos residentes desempenha um importante papel de sentinela nos estágios iniciais da infecção por *Leishmania*, pois respondem ao estresse infeccioso tendendo ou não ao controle a infecção (Lopes et al., 2014). De fato, os clones do parasito Thor revelaram tendências distintas na infecção de macrófagos, desde a eliminação total dos parasitos até taxas crescentes de infecção, o que significa que a *L.(V.) braziliensis* consegue manter um alto grau de variabilidade fenotípica no combate às ações deletérias do sistema imunológico do hospedeiro.

Este diversificado perfil pôde ser agrupado, e constatamos que houve uma tendência indicando que os parasitos do grupo I são menos indutores de IL-1 $\beta$  e IL-6 do que os parasitos do grupo II, e que as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-12p70 são induzidas pelos dois grupos de parasitos. As análises que demonstram correlação entre o índice de infecção e produção de IL-12p70 e NO corroboram com os achados de infecção mais brandas nas infecções causadas pelos parasitos do grupo I e mais intensas pelos do grupo II.

Possivelmente, o equilíbrio da infecção em macrófagos no modelo BALB/c seria influenciado pela complexa composição dos clones da cepa MCAN/BR/1998/R619. De maneira geral, estes camundongos são descritos como pertencentes a uma linhagem sensível à infecção por *L. (L.) major* (Scott et al., 1988) e *L. (L.) amazonensis* (Pereira et al., 2008). No entanto, no caso da infecção por *L. (V.) braziliensis* o BALB/c consegue manter maior controle da infecção (DeKrey, Lima, Titus, 1998). Que pode ser explicado pelos achados deste trabalho quanto à predominância de parasitos com distintos potenciais de infecção de macrófago *in vitro*, simulando os possíveis eventos iniciais da infecção.

Esta complexidade fornece distintos fatores que influenciam os eventos após a invasão das leishmanias, com indução da produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos e posterior potencialização da ação do IFN- $\gamma$  que vai promover a ativação dos macrófagos, a depender do clone do parasito resistente aos eventos iniciais da infecção (Scott et al., 1988). De maneira geral, as citocinas da família IL-12 estão envolvidas no direcionamento de uma resposta do tipo Th1 em camundongos resistentes. Em infecção experimental com *L. (L.) donovani* foi proposto que citocinas como IL-6 e IL-12p40 cooperam para mediar proteção do hospedeiro na infecção, mas que agem de forma independente para regular a produção de IL-10<sup>+</sup> e a expansão de CD4<sup>+</sup> no controle da infecção (Stäger et al., 2006). Também é descrito que a infecção por *L. (L.) major* reduz substancialmente a produção de NO e IL-12p40 por macrófagos B6 derivados de medula óssea de camundongos (Lopes et al., 2014). Possivelmente, a combinação dos clones de parasitos pode ser importante para o direcionamento final da infecção, pois há tendências distintas e complementares na indução das citocinas da resposta imune inata.

O estudo aqui apresentado traz um novo olhar aos parasitos da espécie *L. (V.) braziliensis*. Ao indicarmos que um mesmo isolado deste parasito pode ser visto como um complexo de clones estamos afirmando que há distintas tendências em um único isolado. Não obstante o pequeno número de clones analisados, o agrupamento indicado pelo método de classificação hierárquica foi capaz de definir a complexidade destes parasitos. Ressalta-se que o conjunto de dados que mais influenciou para a definição dos grupos I e II da cepa Thor foi

aquele relativo à infecção em macrófagos. O que nos alerta para outros possíveis componentes do parasito e/ou hospedeiro envolvidos nos eventos iniciais da infecção.

A diversidade da *L. (V.) braziliensis* provenientes de focos de diferentes regiões e biomas brasileiros sugere que possa existir uma relação entre origem geográfica e diversidade (Britto et al., 2009; Rocha-Lima, 2010). E o presente estudo ressalta particularidades dentro de um mesmo isolado e que tais particulares podem contribuir para diferentes perfis de infecção e adaptação a vetores e hospedeiros. Ainda assim, não é claro como a organização atual dos genomas de *Leishmania* spp. evoluiu, mas o conjunto de resultados agrupados aqui enfatiza a capacidade das espécies de *Leishmania* utilizar a plasticidade de seus genomas para modular seus fenótipos e aumentar suas chances de sobrevivência nos hospedeiros.

## **6. CONCLUSÕES**

- Os genes de proteases ocorrem em todos os cromossomos de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* e apresentam alto grau de conservação entre os alelos correspondentes;
- Os genes de proteases de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* apresentam baixa similaridade entre os genes de proteases de mamíferos;
- A cepa MCAN/BR/1998/R619 de *L. (V.) braziliensis* é composta por vários clones de parasitos e a obtenção e manutenção deles em cultura é possível;
- *L. (V.) braziliensis* (cepa MCAN/BR/98/R619) e seus clones apresentam curvas de crescimento distintas, sendo os primeiro e quinto dia da curva os mais distintos.
- *L. (V.) braziliensis* (cepa MCAN/BR/98/R619) e seus clones produzem padrões distintos de infecção *in vitro* de macrófagos de camundongos BALB/c;
- A produção de citocinas em sobrenadantes de infecção de macrófagos murinos é heterogênea entre os clones da cepa MCAN/BR/1998/R619. Algumas são menos indutoras de IL-1 $\beta$  e IL-6, e as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-12p70, bem como o óxido nítrico, são induzidas de forma distribuída pelos clones estudados;
- A análise de agrupamento permitiu a classificação de dois grupos distintos de clones da cepa MCAN/BR/1998/R619, obtidas neste estudo. O conjunto de dados que mais influenciou para a definição destes grupos foi o relativo à infecção em macrófagos peritoneais murinos.
- Os clones de *L. (V.) braziliensis* cepa MCAN/BR/1998/R619 apresentam distintos perfis biológicos e quanto à expressão dos genes de protease;

- Os clones da cepa MCAN/BR/1998/R619 expressam diferentemente os genes das quatro classes de proteinases. Os amastigotas expressam mais proteinases que os promastigotas.

- Entre os promastigotas da cepa MCAN/BR/1998/R619 há maior expressão de aspártico e metaloproteinase e entre os amastigotas há maior expressão de metalo- e serina proteinases.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adaui V, Schnorbusch K, Zimic M, Gutiérrez A, Decuypere S, Vanaerschot M, DE Doncker S, Maes I, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Arévalo J, Dujardin JC. Comparison of gene expression patterns among *Leishmania braziliensis* clinical isolates showing a different in vitro susceptibility to pentavalent antimony. *Parasitology* 2011;138(2):183-93.

Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, Dobson DE, Beverley SM, Sacks DL. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science*. 2009;324(5924):265-8.

Alencar JE; Pessoa EP, Fontenele ZF. Infecção natural de *Rattus rattus alexandrinus* por *Leishmania* (provavelmente *L. braziliensis*) em zona endêmica de Leishmaniose Tegumentar do Estado do Ceará, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1960;2(6): 347-8.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Biol*. 1999;112:2993-3002.

Ali KS, Rees RC, Terrell-Nield C, Ali SA. Virulence loss and amastigote transformation failure determine host cell responses to *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol*. 2013;35(12):441-56.

Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MC, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KB. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *Hist Cienc Saude Manguinhos* 2003;10:852-82.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.

Alves CR, Corte-Real S, Baourguignon SC, Chaves CS, Saraiva, EMB. *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. *Exp Parasitol* 2005;109: 38-48.



Amato VS, Andrade HF, Duarte MI. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop* 2003; 85:39–49.

Amorim FM, Rodrigues YK, Barbosa TP, N ris PL, Caldas JP, Sousa SC, et al. Morita-Baylis-Hillman adduct shows in vitro activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. *Parasitology*. 2013 Jan; 140(1):29-38.

Andrade ZA, Reed SG, Roters SB, Sadigursky M. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol*. 1984 Jan;114(1):137-48.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM.. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 2002; 70:6734–40.

Baldwin TM, Elso C, Curtis J, Buckingham L, Handman E. The site of *Leishmania major* infection determines disease severity and immune responses. *Infect Immun* 2003;71:6830-4.

Barrett AJ. Classification of peptidases. *Methods Enzymol*. 1994;244:1–15.

Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA. The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol*. 2001;34:95-102.

Barrett AJ, Tolle DP, Rawlings ND. Managing peptidases in a post genomic era. *Biol Chem*. 2003;384:873-82.

Bates PA, Robertson CD, Tetley L, Coombs GH .Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology*. 1992;105 ( Pt 2):193-202.

Bates PA. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology*. 1994;108:1-9.

Bates PA, Rogers ME. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med*. 2004;4(6):601-9.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007;37(10):1097-106.

Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr Opin Microbiol.* 2008;11(4):340-4.

Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol.* 1992 Aug;52(2):135-42.

Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med.* 1998;188:1941-53.

Belli AA, Miles MA Kelly JM. A putative *Leishmania panamensis* / *Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology.* 1994;109,435–42.

Belosevic M, Finbloom DS, Van Der Meide PH, Slayter MV, Nacy CA. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J Immunol.* 1989;143(1):266-74.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science.* 2005;15;309(5733):416-22.

Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memorias Inst Oswaldo Cruz* 1991;86:51–6.

Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, et al. 2009. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol.* 2009;31(5):254-66.

Bogdan C, Gessner A, Werner S, Martin R. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. *Curr Opin Immunol*. 1996;8(4):517–25.

Bogdan C, Donhauser N, Döring R, Röllinghoff M, Diefenbach A, Rittig MG. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *J Exp Med*. 2000;191:2121-30.

Brandão-Filho SP, Brito Carvalho, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeterwinter L, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003;97:291-6.

Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pagès M, Dedet JP, Wincker P. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*. 1998;222:107–17.

Brito ME, Andrade MS, Mendonca MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS, et al.,. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop Med Int Health*. 2009;14:1278–86.

Brumpt E, Pedroso AM. Pesquisas epidemiológicas sobre a leishmaniose americana das florestas no estado de São Paulo (Brasil). *An Paul Med Cir*. 1913;1:97-136.

Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 1985;135:4144–8.

Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. 1994;56(4):315-25.

Carvalho GM, Gontijo CM, Falcão AL, Andrade Filho JD. Study of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) collected in a *Leishmania*-endemic area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. *J Med Entomol*. 2010;47(6):972-6.

Castro R, Scott K, Jordan T, Evans B, Craig J, Peters EL, Swier K. The ultrastructure of the parasitophorous vacuole formed by *Leishmania major*. J Parasitol. 2006 Dec;92(6):1162-70.

Castro-Pinto DB, Lima EL, Cunha AS, Genestra M, De Léo RM, Monteiro F, Leon LL. *Leishmania amazonensis* trypanothione reductase: evaluation of the effect of glutathione analogs on parasite growth, infectivity and enzyme activity. J Enzyme Inhib Med Chem. 2007 Feb;22(1):71-5.

Chang KP, Reed SG, McGwire BS, Soong L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. Acta Trop. 2003;85:375-390.

Chargui N, Amro A, Haouas N., Schönian G, Babba H, Schmidt S, et al. Population structure of Tunisian *Leishmania infantum* and evidence for the existence of hybrids and gene flow between genetically different populations. Int J Parasitol. 2009;39:801–11.

Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol Biochem Parasitol. 2007;156(2):93-101.

Coelho-Finamore JM, Freitas VC, Assis RR, Melo MN, Novozhilova N, Secundino NF, et al. *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. Int J Parasitol. 2011;41(3-4):333-42.

Cohen-Freue G, Holzer TR, Forney JD, McMaster WR. Global gene expression in *Leishmania*. Int J Parasitol. 2007;37(10):1077-86.

Colmenares M, Corbi AL, Turco SJ, Rivas J. The dendritic cells receptor DCSIGN discriminates among species and life cycle forms of *Leishmania*. J Immunol. 2004;172:1186-90.

Coombs GH. 1982. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. *Parasitology*, 84: 149-155.

Corte-Real S, Santos CB, Meirelles MN. Differential expression of the plasma membrane Mg<sup>2+</sup> ATPase and Ca<sup>2+</sup> ATPase activity during adhesion and interiorization of *Leishmania amazonensis* in fibroblasts in vitro. J Submicrosc Cytol Pathol. 1995;27:359-66.

Costa CH. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saude Publica. 2008 Dec;24(12):2959-63.

Cox FE. History of human parasitology. Clin Microbiol Rev. 2002;15:595-612.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg 50(3):296-311.

Cupolillo E, Grimaldi Júnior G, Momen H, Beverley SM 1995. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol 73(1-2):145-55.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H 1997. Genetic diversity among *Leishmania* (*Viannia*) parasites. Ann Trop Med Parasitol 91(6):617-626.

Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G Jr 1998. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz 93(5):663-668.

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. J Clin Microbiol. 2003 Jul;41(7):3126-32.

Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon LL. *Leishmania amazonensis*: Long-Term Cultivation of Axenic Amastigotes is Associated to Metacyclogenesis of promastigotes. Exp. Parasitol. 1998;89:58-62.

Da-Cruz AM, Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SC, Coutinho SG. Tumor necrosis factor-alpha in human American tegumentary leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91:225-9.

Darling TN, Blum JJ. In vitro reversible transformation of *Leishmania braziliensis* panamensis between promastigote and ellipsoidal forms. J Protozool. 1987;34:166-8.

DATASUS [homepage na internet]. Indicadores e Dados Básicos [acesso em 24 abr 2014]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2012/matriz.htm#mort>

Deanne LM. Gaspar Vianna, in the centennial of his birth. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1985;80(2):253-5.

de Assis RR, Ibraim IC, Nogueira PM, Soares RP, Turco SJ. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(9):1354-65.

de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira C. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*. 2005;73(9):5827-34.

DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*. 1998;66(2):827-9.

Delgado-Domínguez J, González-Aguilar H, Aguirre-García M, Gutiérrez-Kobeh L, Berzunza-Cruz M, Ruiz-Remigio A, et al. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC $\alpha$ -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasite Immunol*. 2010;32(6):440-9.

Diniz MM, Ovallos FG, de Castro Gomes CM, de Oliveira Lavitschka C, Galati EA. Host-biting rate and susceptibility of some suspected vectors to *Leishmania braziliensis*. *Parasit Vectors*. 2014;31;7:139.

Dujardin JC. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol*. 2006;22(1):4-6.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, et al: Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*. 2005, 309:404–9.

Ettinger NA, Duggal P, Braz RF, Nascimento ET, Beaty TH, Jeronimo SM, et al. Genetic admixture in Brazilians exposed to infection with *Leishmania chagasi*. *Annals of human genetics*. 2009;73:304-13.

Everitt BS, Landau S, Leese M, Stahl D. Cluster Analysis. 5<sup>a</sup> ed. Balding D, Cressie NAC, Fitzmaurice GM, Goldstein H, Molenberghs G, Scott DW, Smith AFM, Tsay RS, Weisberg S, editors. London: Wiley, 2011.

Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 2005; 73:7853–9.

Fehniger TE, Mengistu G, Gessesse A, Gabtr-Mariaam H, Akuffo H. Changes in the antigenic profile of *Leishmania* parasites following shifts in temperature. *Acta Trop*. 1990;47:227-36.

Flinn HM, Smith DF. Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(4):755-62.

Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SMB, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J Immunol*. 2001;167:893-901.

Garin YJ, Sulahian A, Pratlong F, Meneceur P, Gangneux JP, Prina E, et al. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. *Infect Immun*. 2001;69(12):7365-73.

Glaser TA, Moody SF, Handman E, Bacic A, Spithill TW. An antigenically distinct lipophosphoglycan on amastigotes of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;45(2):337-44.

Genestra M, Guedes-Silva D, Souza WJ, Cysne-Finkelstein L, Soares-Bezerra RJ, Monteiro FP, Leon LL. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. Arch Med Res. 2006;37(3):328-33.

Giudice A, Vendrame C, Bezerra C, Carvalho LP, Delavechia T, Carvalho EM, Bacellar O. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. BMC Infect Dis. 2012;29:12:75.

Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. Parasite Immunol. 2014;36(8):367-76.

Gomes RF, Macedo AM, Pena SD, Melo MN. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. Exp Parasitol. 1995;80(4):681-7.

Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da-Cruz AM. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. Parasitology. 2013;140(6):771-9.

Gomez C, Esther Ramirez M, Calixto-Galvez M, Medel O, Rodríguez MA. Regulation of gene expression in protozoa parasites. J Biomed Biotechnol. 2010;2010:726045.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Brasileira Med Trop. 2003;36(1):71-80.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.

Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. J Am Acad Dermatol. 1996;34:257-72.



Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41:687–725.

Guimarães LH, Machado PR, Lago EL, Morgan DJ, Schriefer A, Bacellar O, Carvalho EM. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009;103: 712–5.

Handman E, Goding JW. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO J.* 1985;4(2):329-36.

Handman E, Bullen DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 2002;18(8):332-4.

Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 2011 Sep;27(9):403-9.

Hassani K, Shio MT, Martel C, Faubert D, Olivier M. Absence of Metalloprotease GP63 Alters the Protein Content of *Leishmania* Exosomes. *PLoS One.* 2014;9(4):e95007.

Hellemans J, Mortier G, Paepe A, Speleman F, Vandesompele Jo. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007;8(2): R19.

Hespanhol RC, de Nazaré C Soeiro M, Meuser MB, de Nazareth SL Meirelles M, Corte-Real S. The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. *J Histochem Cytochem.* 2005;53:35-44.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Savioli L 2007. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med* 6;357(10):1018-1027.

Hotez PJ, Remme JH, Buss P, Alleyne G, Morel C, et al. 2004 Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin Infect Dis* 38:871–878.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Ehrlich Sachs S, et al. 2006. Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria. *PLoS Med* 3: e102.

Hunter KW, Cook CL, Hensen SA. Temperature induced *in vitro* transformation of *Leishmania mexicana*. I ultrastructural comparison of culture-transformed and intracellular amastigotes. *Acta Trop*. 1982;39:143-50.

Ilg T, Etges R, Overath P, McConville MJ, Thomas-Oates J, Thomas J, Homans SW, Ferguson MA. Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. *J Biol Chem*; 1992;267(10):6834-40.

Inga R, De Doncker S, Gomez J, Lopez M, Garcia R, Le Ray D, et al. Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus *Viannia*. *Mol Bioch Parasitol* 1998, 92:219–28.

Iovannisci DM, Beverley SM: Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. *Mol Bioch Parasitol* 1989, 34:177–88.

Jebbari H, Stagg AJ, Davidson RN, Knight SC. *Leishmania major* promastigotes inhibit dendritic cell motility in vitro. *Infect Immun* 2002;70:1023-6.

Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg* 2012;86(3):426-33.

Judice WA, Manfredi MA, Souza GP, Sansevero TM, Almeida PC, Shida CS, et al. Heparin modulates the endopeptidase activity of *Leishmania mexicana* cysteine protease cathepsin L-Like rCPB2.8. *PLoS One*. 2013;8(11):e80153.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? Trends Parasitol. 2006;22(9):439-45.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol. 2011;9(8):604-15.

Kebede A, De Doncker S, Arevalo J, Le Ray D, Dujardin JC: Size-polymorphism of mini-exon gene-bearing chromosomes among natural populations of *Leishmania*, subgenus *Viannia*. Int J Parasitol 1999, 29:549–57.

Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Van Eys, GJ, Evans DA. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 1991 46:253–3.

Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, Fay MP, Kamhawi S, Sacks D. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:10125-30.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz E, Kamysz W, Engman DM, McGwire BS. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. Mol Microbiol. 2006;62(5):1484–97.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W, McGwire BS. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. J Biol Chem. 2009;284(23):15496–504.

Kulkarni MM, Karafova A, Kamysz W, McGwire BS 2014. Design of protease-resistant pexiganan enhances antileishmanial activity. *Parasitol Res* 113(5):1971-1976.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994;89:435–43.

Landfear SM, McMahon-Pratt D, Wirth DF. Tandem arrangement of tubulin genes in the protozoan parasite *Leishmania enriettii*. *Mol Cell Biol*. 1983;3(6):1070-6.

Launois P, Tacchini-Cottier F, Parra-Lopez C, Louis JA. Cytokines in parasitic diseases: the example of cutaneous Leishmaniasis. *Int Rev Immunol*. 1998;17(1-4):157-80.

Laskay T, Zandbergen G, Slobach W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*. 2003;11:210-4.

Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*. 2008;213(3-4):183-91.

Levin BR, Lipsitch M, Bonhoeffer S. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. *Science*. 1999;283(5403):806-9.

Li W, Jaroszewski L, Godzik A 2001. Clustering of highly homologous sequences to reduce the size of large protein databases. *Bioinformatics* 17(3):282–283.

Lindenberg A 1909. A úlcera de Bauru e o seu micróbio. Comunicação preventiva. *Rev Méd de S Paulo* 12:116-120.

Lira R, Rosales-Encina JL, Argüello C: *Leishmania mexicana*: binding of promastigotes to type I collagen. *Exp Parasitol* 1997, 85(2):149–57.

Lodge R, Descoteaux. A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol*. 2005;114:256-65.

Lopes MF, Costa-da-Silva AC, DosReis GA. Innate immunity to *Leishmania* infection: within phagocytes. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:754965.

López-Otín C, Overall CM: Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3(7):509–519.

Mahoney AB, Sacks DL, Saraiva E, Modi G, Turco SJ. Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry*. 38(31):9813-23.

Maia C, Seblova V, Sadlova J, Votypka J, Volf P. Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6):e1181.

Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S, Cillari E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007; 20(3):435-445.

Martinez JE, Valderrama L, Gama V, Leiby DA, Saravia NG. Clonal diversity in the expression and stability of the metastatic capability of *Leishmania guyanensis* in the golden hamster. *J Parasitol*. 2000;86:792–9.

Marzochi MCA, Marzochi KBF, Carvalho RW. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. *Parasitol Today*. 1994;10:37- 40.

Matta NE, Cysne-Finkelstein L, Machado GM, Da-Cruz AM, Leon L. Differences in the antigenic profile and infectivity of murine macrophages of *Leishmania (Viannia)* parasites. *J Parasitol*. 2010;96(3):509-15.

Matlashewski G. *Leishmania* infection and virulence. *Med Microbiol Immunol* 2001;190:37–42.

McAndrew M, Graham S, Hartmann C, Clayton C. Testing promoter activity in the trypanosome genome: isolation of a metacyclic-type VSG promoter, and unexpected insights into RNA polymerase II transcription. *Exp Parasitol*. 1998;90(1):65-76.

McConville MJ, Blackwell JM. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem*. 1991;266(23):15170-9.

McConville MJ, Ralton JE. Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of *Leishmania* parasites. *Behring Inst Mitt*. 1997;(99):34-43.

McGwire BS, Chang KP, Engman DM: Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect Immun* 2003, 71(2):1008–10.

McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:497-536.

McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Ver.* 2004;201:206–24.

Mendes DS, Dantas ML, Gomes JM, dos Santos WL, Silva AQ, Guimaraes LH, et al. Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4+, CD20+, CD68+, CD31+ and vW+ cells in non-ulcerated lesions of disseminated leishmaniasis. *Memorias Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108:18–22.

Menezes JP, Almeida TF, Petersen AL, Guedes CE, Mota MS, Lima JG, et al. Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. *Microbes Infect.* 2013 Jul-Aug;15(8-9):579-91.

Miles MA, Yeo M, Mauricio IL 2009. *Leishmania* exploit sex. *Science.* 2009;324:187–9.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.

Monnerat S, Martinez-Calvillo S, Worthey E, Myler PJ, Stuart KD, Fasel N. Genomic organization and gene expression in a chromosomal region of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol.* 2004;134(2):233-43.

Myler PJ. Genome Structure and Content In: Myler PJ, Fasel N. *Leishmania: After The Genome*. Poole: Caister Academic Press; 2008. p. 15-27.

Myler PJ, Audleman L, deVos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C et al. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96, 2902–6.

Molyneux DH, Hotez PJ, Fenwick A 2005. Rapid-impact interventions: how a policy of integrated control for Africa's neglected tropical diseases could benefit the poor. *PLoS Med* 2(11):e336.

Morgado-Diaz JA, Silva-Lopez RE, Alves CR, Soares MJ, Corte-Real S, De Simone SG. Subcellular localization of an intracellular serine proteinase of 68 kDa in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 Jul;100(4):377-83.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366:1561-77.

Nieves E, Pimenta PF. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol*. 2000;37(1):134-40.

Oliveira FS.; Pirmez C, Pires MQ; Brazil RP, Pacheco RS 2005. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from na endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*. 2005;129-227.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):293-305.

Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT: *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect*. 2012;14(15):1377–89.

Oumeish OY. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. *Clin Dermatol*. 1999;17:249-54.

Papadopoulou, B., Huang, X.F., Boucher, N., McNicoll, F. Stage-specific regulation of gene expression in *Leishmania*. *ASM News*. 2003;69 (6), 282–8.

Patz JA, Thaddeus KG, Geller N, Vittor AY. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol.* 2000;30:1395–1405.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al: Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease.

*Nat Genet.* 2007;7:839–47.

Pearson RD, Romito R, Symes PH, Harcus JL. 1981. Interaction of *Leishmania donovani* promastigotes with human monocyte-derived macrophages: Parasite entry, intracellular survival, and multiplication. *Infection and Immunity* 32:1249-1253.

Pessotti JH, Zaverucha Do Valle T, Corte-Real S, Conçaves da Costa SC. Interaction of *Leishmania (L.) chagasi* with the vero cell line. *Parasite.* 2004; 11:99-102.

Petropolis DB, Rodrigues JC, Viana NB, Pontes B, Pereira CF, Silva-Filho FC. *Leishmania amazonensis* promastigotes in 3D Collagen I culture: an *in vitro* physiological environment for the study of extracellular matrix and host cell interactions. *PeerJ.* 2014;3;2:e317.

Pereira BA, Alves CR. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Vet Parasitol.* 2008 Dec 20;158(4):239-55.

Pimenta PF, Saraiva EM, Sacks DL. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Exp Parasitol.* 1991;72(2):191-204.

Pimenta PF, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology.* 1997;115 ( Pt 4):359-69.

Pompeu ML, Freitas LA, Santos ML, Khouri M, Barral-Netto M. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. *Acta Trop.* 1991 Jan;48(3):185-93.



Pral EM, Bijovsky AT, Balanco JM, Alfieri SC. *Leishmania mexicana*: proteinase activities and megasomes in axenically cultivated amastigote-like forms. *Exp Parasitol*. 1993 Aug;77(1):62-73.

Puentes SM, Sacks DL, da Silva RP, Joiner KA. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J Exp Med*. 1988;167(3):887-902.

Puentes SM, Da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol*. 1990;145(12):4311-6.

R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/>.]

Raes G, Beschin A, Ghassabeh GH, De Baetselier P. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(4):454-9.

Rainey PM, Spithill TW, McMahon-Pratt D. Biochemical and molecular characterization of *Leishmania pifanoi* amastigotes in continuous culture. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;49:111-8.

Ramalho-Ortigao JM, Traub-Cseko ZM. Molecular characterization of Llchit1, a midgut chitinase cDNA from the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis*. *Insect Biochem Mol*. 2003;33:279–87.

Ramalho-Ortigao JM, Kamhawi S, Joshi MB, Reynoso D, Lawyer PG, Dwyer DM, Sacks DL, Valenzuela JG. Characterization of a blood activated chitinolytic system in the midgut of the sand fly vectors *Lutzomyia longipalpis* and *Phlebotomus papatasi*. *Insect Mol Biol*. 2005;14:703–12.

Rangel E; Lainson R (org). *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora da Fiocruz, 2003. 368 pp.

Ravel C, Cortes S, Pratlong F., Morio F, Dedet JP, Campino L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int J Parasitol*. 2006;36:1383–8.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A: MEROPS: the peptidase database. 862 Nucleic Acids Res. 2010;38:D227–D233.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Res. 2012;40(D1): D343–D350.

Rebello KM, Cortes LM, Pereira BA, Pascarelli BM, Corte-Real S, Finkelstein LC, et al. Cysteine proteinases from promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Parasitol Res. 2009 Dec;106(1):95-104.

Rebello KM, Britto C, Pereira BA, Pita-Pereira Dd, Moraes MO, Ferreira AB, Cysne-Finkelstein L, Otto TD, Côrtes LM, da-Silva GG, Alves CR. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: influence of successive in vitro cultivation on the expression of promastigote proteinases. Exp Parasitol. 2010 Dec;126(4):570-6.

Ribeiro-Gomes FL, Sacks D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. Front Cell Infect Microbiol. 2012 May 4;2:59.

Rocha-Lima ACVM. Estudo da Variabilidade Genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 de Diferentes Regiões do Brasil [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. Parasitology. 2002;124:495-507.

Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. Genome Res 2011, 21(12):2129–42.

Rotureau B. Are New World leishmaniasis becoming anthroponoses? Med Hypotheses. 2006;67(5):1235-41.

Ryan L, Lainson R, Shaw JJ: Leishmaniasis in Brazil. XXIV. Natural flagellate infections of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Pará state, with particular reference to the role of *Psychodopygus wellcomei* as the vector of *Leishmania*

*braziliensis* in the Serra dos Carajás. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1987;81:353–5.

Schallig HDFH, Silva ES.; van der Meide WF, Gontijo CMF. *Didelphis marsupialis* (common opossum): a potencial reservoir host for zoonotic leishmaniasis in the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais, Brazil). Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2007;7(3):387-93.

Sacks D & Perkins P. 1984. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science 223:1417-1419.

Sacks DL. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. Infect Agents Dis. 1992;1(4):200-6.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat Rev Immunol. 2002;2(11):845-58.

Sádlová J, Volf P. Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. Cell Tissue Res. 2009;337:313–25.

Sadlova J, Yeo M, Seblova V, Lewis MD, Mauricio I, Volf P, Miles MA. Visualisation of *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. PLoS One. 2011;6(5):e19851.

Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. Mol Biochem Parasitol. 2002;120(1):1–21.

Saraiva EM, Pimenta PF, Brodin TN, Rowton E, Modi GB, Sacks DL. Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. Parasitology. 1995;111:275-87.

Saraiva L, Andrade Filho JD, Falcão AL, de Carvalho DA, de Souza CM, Freitas CR, et al. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. Acta Trop. 2011 Feb;117(2):137-45.

Stäger S, Maroof A, Zubairi S, Sanos SL, Kopf M, Kaye PM. Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against *Leishmania donovani* and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. Eur J Immunol. 2006 Jul;36(7):1764-71.

Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. J Exp Med 1988;168:1675–84.

Selzer PM, Pingel S, Hsieh I, Ugele B, Chan VJ, Engel JC, et al. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96(20):11015–22.

Serra CM, Leal CA, Figueiredo F, Schubach TM, Duarte R, Uchôa CM, Silva RM, Madeira Mde F. Canine tegumentary leishmaniasis in Morada das Aguias (Serra da Tiririca), Maricá, Rio de Janeiro, Brazil. Cad Saude Publica. 2003;19(6):1877-80.

Sherlock IA. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in Bahia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996;91:671-8.

Silva-Almeida M, Pereira BA, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. Parasit Vectors. 2012;7;5:160.

Silva-Lopez RE, Morgado-Diaz JA, Alves CR, Corte-Real S, Giovanni-De-Simone S. Subcellular localization of an extracellular serine proteinase in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Parasitol Res. 2004;93(4):328-31.

*Leishmania* exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells.

Silverman JM, Clos J, Horakova E, Wang AY, Wiesgigl M, Kelly I, et al. J Immunol. 2010;1;185(9):5011-22.

Silverman JM, Clos J, de'Oliveira CC, Shirvani O, Fang Y, Wang C, Foster LJ, Reiner NE. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein

export from *Leishmania* and communication with macrophages. J Cell Sci. 2010;123(Pt 6):842-52.

Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. Int J Parasitol. 2007;37(11):1173-86.

Soares RP, Macedo ME, Ropert C, Gontijo NF, Almeida IC, Gazzinelli RT, et al. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. Mol Biochem Parasitol. 2002;121(2): 213-24.

Soares RP, Cardoso TL, Barron T, Araújo MS, Pimenta PF, Turco SJ. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. Int J Parasitol. 2005;35(3):245-53.

Späth GF, Epstein L, Leader B, Singer SM, Avila HA, Turco SJ, Beverley SM. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(16):9258-63.

Späth GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(16):9536-41.

Steinkraus HB, Greer JM, Stephenson DC, Langer PJ: Sequence heterogeneity and polymorphic gene arrangements of the *Leishmania guyanensis* gp63 genes. Mol Bioch Parasitol 1993;62:173–85.

Tacchini-Cottier F, Weinkopff T, Launois P. Does T Helper Differentiation Correlate with Resistance or Susceptibility to Infection with *L. major*? Some Insights From the Murine Model. Front Immunol. 2012;3:32.

Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma*, and its medical and taxonomical consequences. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87, 2414–8.

- Tibayrenc M, Ayala FJ. Evolutionary genetics of Trypanosoma and Leishmania. *Microbes Infect.* 1999;1(6):465-72.
- Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol.* 2002;18(9):405-10.
- Tschudi C, Ullu E. Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes. *EMBO J.* 1988;7(2):455-63.
- Turco SJ, Sacks DL. Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 1991;45(1):91-99.
- Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1992;46:65–94.
- Turco SJ. Adversarial relationship between the leishmania lipophosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Parasite Immunol.* 1999;21(12):597-600.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002;186(12):1829-34.
- Valdivieso E, Dagger F, Rascón A: *Leishmania mexicana*: identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. *Exp Parasitol.* 2007;116(1):77–82.
- Vale ECS, Furtado T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. *An Bras Dermatol.* 2005;80(4):421-8.
- van Zandenberg G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 2004;173:6521-5.
- Vianna G. Sobre uma nova espécie de leishmania. *Brazil Medico.* 1911;25:411-415.

Victoir K, Dujardin JC: How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. Trends Parasitol 2002, 18(2):81–5.

Victoir K, Arevalo J, De Doncker S, Barker DC, Laurent T, Godfroid E, et al. Complexity of the major surface protease (msp) gene organization in *Leishmania (Viannia) braziliensis*: evolutionary and functional implications. Parasitology 2005, 131:207–14.

Voth BR, Kelly BL, Joshi PB, Ivens AC, McMaster WR: Differentially expressed *Leishmania major* gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment. Mol Biochem Parasitol 1998, 93(1):31–41.

Wanderley JL, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VW, Prates DB, de Souza AP, Barral A, Balanco JM, do Nascimento MT, Saraiva EM, Barcinski MA. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of leishmaniasis. PLoS One. 2009;4:e5733.

Westerhoff HV, Juretic D, Hendler RW, Zasloff M. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. Proc Natl Acad Sci 1989, 86(17):6597–6601.

Wright JH. Protozoa in a Case of Tropical Ulcer (“Delhi Sore”). J Med Res. 1903;10:472–82.

Worthey E, Martinez-Calvillo S, Schnauffer A, Aggarwal G, Cawthra J, Fazelinia G, et al. *Leishmania major* chromosome 3 contains two long ‘convergent’ polycistronic gene clusters separated by a tRNA gene. Nucleic Acids Res. 2003;31:4201–10.

Young DG, Ducan NA. Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sandflies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Mem Am Entomol Inst. 1994;54:1-881.

Zasloff M 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. Proc Natl Acad Sci 84(15):5449–5453.

Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, et al. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. Trop Med Int Health. 2010 Jan;15(1):68-76.



## **8. ANEXOS**

**ARTIGOS E CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS E ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO:**

**Anexo I (pág. 134):** Alves CR, Silva-Almeida M, Silva FS, Pereira BAS, Azevedo-Pereira RL, Côrtes LMC. Componentes de Superfície do Parasito e o Papel na Interação Parasito-Hospedeiro. In: Fátima Conceição Silva & Carlos Roberto Alves. (Org.). Leishmanioses do Continente Americano. Rio de Janeiro: Fiocruz Editora, 2014, v.1, p. 139-157.

**Anexo II (pág. 153):** Silva-Almeida M, Souza-Silva F, Pereira BA, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. *Parasit Vectors*. 2014 Aug 20;7(1):387.

**Anexo III (pág. 160):** Silva-Almeida M, Pereira BA, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasite & Vectors*. 2012 Aug 7;5:160.

**Anexo IV (pág. 170):** Pereira BAS, Silva FS, Silva-Almeida M, Santos-de-Souza R, Oliveira LFG, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Proteinase inhibitors: a promising drug class to leishmaniasis treatment. *Current Drug Targets*, 2014 Oct 16.

**Anexo V (pág. 181):** Alves CR, Pereira BA, Silva-Almeida M, da Silva FS. Why strategies to control *Leishmania* spp. multiplication based on the use of proteinase inhibitors should consider multiple targets and not only a single enzyme. *J Mol Model*. 2014 Oct;20(10):2465.

## Componentes de Superfície do Parasito e o Papel na Interação Parasito-Hospedeiro

Carlos Roberto Alves | Mariana Silva de Almeida | Franklin Souza da Silva  
Bernardo Acácio Santini Pereira | Ricardo Luiz de Azevedo Pereira | Luzia Monteiro de Castro Côrtes

Protozoários, como os parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*, apresentam sua superfície recoberta por uma complexa membrana celular, que é a responsável pela manutenção da integridade do meio intracelular, mantendo-o distinto do meio extracelular. Dessa forma, a membrana celular também rege a interação do protozoário com o meio extracelular, atuando na captação de nutrientes e vias de sinalizações que definem mecanismos de adaptação do protozoário.

Como a superfície celular desses protozoários representa o primeiro contato com os diferentes microambientes dos seus hospedeiros (invertebrados e vertebrados), a expressão regulada de componentes de superfície está diretamente relacionada ao sucesso da infecção. Desse modo, os componentes de superfície dos promastigotas e amastigotas são os determinantes da interação parasito/hospedeiro nas leishmanioses e podem significar alvos de ação sobre a cadeia de transmissão da doença em ambos os hospedeiros.

A membrana plasmática desses protozoários apresenta ainda uma camada mais externa, constituída por uma rede entrelaçada de carboidratos ligados covalentemente aos lipídeos e proteínas – o glicocálice ou glicocálix (*glycocalyx* = glicídios e *calyx* = envoltório). Esse envoltório é secretado pela membrana plasmática, por vesículas secretoras, e se mantém aderido a ela, atuando nas interações entre os protozoários e as células dos hospedeiros. Uma vez que a constituição do glicocálice pode variar entre diferentes espécies e entre as formas evolutivas de uma mesma espécie, esta pode ser utilizada para a caracterização de espécies e para o acompanhamento da mudança das formas evolutivas. De maneira geral, o glicocálice dos protozoários *Leishmania* é rico em glicosilfosfatidilinositol (*glycosylphosphatidylinositol* – GPI), lipofosfoglicanos (*lipophosphoglycan* – LPG), glicoinositolfosfolipídeos (*glycoinositolphospholipids* – GIPLs), proteínas e enzimas.

Ao longo deste capítulo será relatada a composição da membrana de superfície de *Leishmania*, com enfoque na atuação desses componentes no ciclo de vida do protozoário. O capítulo pretende apresentar o estado da arte desses componentes nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, principalmente nas espécies que ocorrem no continente americano.

## LIPOFOSFOGLICANO

O lipofosfoglicano (LPG) é um dos principais componentes da superfície dos promastigotas de *Leishmania* sp., participando na constituição do glicocálice desses parasitos (Moody *et al.*, 1993). Foi identificado inicialmente em promastigotas por meio de anticorpos monoclonais, sendo caracterizado como um lipopolissacarídeo com propriedades anfipáticas (Handman, Greenblatt & Goding, 1984). A estrutura e a expressão do LPG variam entre as diferentes espécies e estágios evolutivos do protozoário, mostrando-se uma importante ferramenta na adaptação do parasito ante os diferentes microambientes dos hospedeiros (Pimenta, Saraiva & Sacks, 1991; Saraiva *et al.*, 1995; Olivier, Gregory & Forget, 2005; Assis *et al.*, 2012). Estudos *in vitro* utilizando *Leishmania (Leishmania) major* indicaram que a forma específica de LPG de amastigota desaparece após 48 horas da transformação amastigota-promastigota, enquanto durante a transformação promastigota-amastigota, a forma específica de LPG de amastigota foi detectada 12 horas após a infecção (Glaser *et al.*, 1991). Em outras espécies, como *Leishmania (Leishmania) donovani*, a forma específica de amastigota não é detectada (McConville & Blackwell, 1991).

O tipo de ancoramento do LPG à superfície da membrana plasmática é realizado por um grupamento GPI [1-O-alkil-2-lifosfatidil(mio)inositol] presente em todas as espécies de *Leishmania* analisadas até o momento (McConville & Ralton, 1997; Turco & Descoteaux, 1992). O GPI apresenta um núcleo fosfossacarídico com galactofuranose (Gal $\beta$ ) interna. Uma das características do gênero *Leishmania* é o fato de o GPI dispor de um esqueleto formado por unidades repetitivas de fosfodissacarídeos e na região mais extrema, uma cobertura de oligossacarídeos (Turco *et al.*, 1987; Ilg *et al.*, 1992; McConville & Homans, 1992). Variações dessas estruturas podem ser detectadas dentro de uma mesma espécie e entre espécies de *Leishmania*, revelando um polimorfismo dos oligossacarídeos que as constituem, servindo, assim, como marcador específico de espécies ou do estágio em que se encontra o parasito, como proposto para *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *L. (L.) major*.

A presença de resíduos de Glu $\beta$ 1,3 nas ramificações das unidades repetitivas de Gal $\beta$ 1,4 Man $\alpha$ 1-PO $_4$  é um dos aspectos que distingue o LPG das formas promastigotas procíclicas de *Leishmania (Leishmania) infantum* das metacíclicas. Tais modificações são significativas na interação desse parasito com seu vetor, o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, visto que, em contraste às formas procíclicas, as formas metacíclicas não são capazes de se ligar ao intestino do inseto vetor (Soares *et al.*, 2002).

O LPG das formas procíclicas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* foi caracterizado por não conter cadeias laterais de açúcares. Diferente das espécies do subgênero *Leishmania*, as formas metacíclicas de *L. (V.) braziliensis* produzem menos LPG e adicionam resíduos de 1-2 ( $\beta$ 1-3)Glicose nas ramificações das unidades repetitivas de Gal $\beta$ 1,4 Man $\alpha$ 1-PO $_4$  do LPG. Essa modificação foi descrita como um novo mecanismo na regulação da estrutura do LPG durante a metaciclo gênese (Soares *et al.*, 2005).

No hospedeiro invertebrado, o LPG é importante para a fixação de promastigotas procíclicos ao epitélio intestinal, o que representa uma etapa essencial à manutenção do ciclo de vida do parasito no inseto vetor (Mahoney *et al.*, 1999; Sacks *et al.*, 1995; Pimenta *et al.*, 1992). *L. (V.) braziliensis* apresenta um padrão de adesão ao epitélio intestinal de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani*, que caracteriza-se como um vetor bastante competente, diferente do observado em *Lu. (N.) intermedia*, sendo que neste último, o LPG parece ter uma importância menor no processo de adesão (Soares *et al.*, 2010). Estudos recentes avaliando a permanência de uma linhagem mutante para LPG de *L. (L.) major* (*null* para o gene *lpg1* que codifica para enzima transferase da galactofuranose) (Spath *et al.*, 2000) no intestino de *Phlebotomus duboscqi* evidenciaram que a ausência da expressão de LPG reduz expressivamente a presença de parasitos 72 horas após a infecção, sendo que após 15 a 21 dias não se detecta a presença de parasitos (Secundino *et al.*, 2010). É interessante notar que a infecção com a cepa mutante em *Lu. longipalpis*, vetor não natural desse parasito, mostrou-se

mais efetiva do que com a cepa selvagem, indicando que o LPG não é necessário para infecções em vetores não naturais, fato também observado em outros estudos (Secundino *et al.*, 2010; Myskova *et al.*, 2007).

Um polipeptídeo de 65 kDa no epitélio do trato digestório de *Phlebotomus papatasi* foi descrito como ligante de LPG das formas procíclicas *L. (L.) major* (Dillon & Lane, 1999). Posteriormente, em uma série de experimentos, a PpGalec, uma galectina expressa no epitélio intestinal de *P. papatasi*, demonstrou ser crucial para sobrevivência e transmissão de *L. (L.) major* por meio de sua ligação com LPG (Kamhawi *et al.*, 2004). No inseto vetor – após o escape da matriz peritrófica –, os promastigotas necessitam aderir ao epitélio intestinal. Essa adesão evita a excreção dos promastigotas do interior da luz do intestino, assim como permite a sua multiplicação e posterior diferenciação, sendo um fenômeno essencial à manutenção do ciclo de vida.

No hospedeiro vertebrado, o LPG é um importante ligante de macrófagos, estando diretamente envolvido nas etapas iniciais da infecção. A utilização de uma cepa mutante de *L. (L.) major*, deficiente no gene *lpg1* (*lpg1-*), revelou que o parasito apresenta uma atenuação de sua virulência nas infecções de macrófagos de camundongo. Os promastigotas *lpg1-* se mostraram altamente suscetíveis à ação do sistema complemento, além de terem sido afetados por agentes oxidantes produzidos pelas células do hospedeiro e perderem a capacidade de inibir a fusão do fagolisossomo (Spath, 2000; Handman & Goding, 1985; Spath *et al.*, 2003).

Sabe-se também que o LPG de *Leishmania* spp. exerce uma ação inibitória sobre a atividade da proteína quinase C (PKC) de macrófagos, favorecendo o estabelecimento e manutenção da infecção, uma vez que essa enzima é um componente-chave do processo de ativação de tais células (Turco, 1999; Delgado-Domínguez *et al.*, 2010). Embora esse efeito do LPG seja um fato estabelecido, o mecanismo de sinalização intracelular envolvido na resposta oxidativa que lesa o parasito ainda não foi esclarecido. Um avanço na compreensão da via de ação do LPG foi a descrição de que na infecção murina por *L. (L.) donovani* há uma ação seletiva sobre a isoforma PKC  $\beta$  dependente de cálcio, com diminuição da expressão e atividade dessa enzima (Bhattacharyya *et al.*, 2001). Além disso, estudo avaliando ação de três tipos de LPG de *L. (L.) infantum* indicou que apenas uma variante é capaz de estimular a produção de óxido nítrico em macrófagos murinos (Coelho-Finamore *et al.*, 2011).

Em relação ao sistema complemento, o LPG de promastigotas metacíclicas de *L. (L.) major* inibe a formação do complexo de ataque à membrana em virtude de suas longas cadeias de açúcar. As modificações que ocorrem na superfície dos promastigotas durante a transição entre o estágio não infectivo (forma procíclica) ao infectivo (forma metacíclica) obstruem a inserção do componente lítico C5b-9 na membrana dos promastigotas infectivos (Puentes *et al.*, 1990; Puentes *et al.*, 1988; Sacks, 1992). Por sua vez, LPG também pode atuar na ativação do complemento, com deposição de C3b covalentemente ligado à membrana celular, o que proporciona a ligação dos promastigotas ao macrófago via receptor C3bi, com a posterior endocitose das formas metacíclicas do parasito e lise das formas não infectivas (Puentes *et al.*, 1988; Mosser, Springer & Diamond, 1992).

Além de atuar sobre macrófagos, o LPG de *L. (L.) major* promove também a ativação da resposta imune inata com a participação de linfócitos *natural killer* (NK) e de células dendríticas por intermédio do receptor *toll-like 2* (Becker *et al.*, 2003; Brandonisio, Spinelli & Pepe, 2004; Soong, 2008). Em linfócitos NK, esta interação do LPG com o receptor *toll-like 2* leva a um aumento da síntese de interferon gama (INF- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alfa* – TNF- $\alpha$ ), estimulando subpopulações de linfócitos T, o que conferiu certo grau de imunidade à infecção em animais de experimentação (Becker *et al.*, 2003).

Além dessas características indicarem o LPG como um dos possíveis candidatos à vacina contra as leishmanioses (Moody *et al.*, 1993; Tonui *et al.*, 2001), estudos em camundongos infectados previamente com cepas mutantes de *L. (L.) major*, deficientes nos genes *lpg*, indicaram uma resposta imune protetora contra infecção de cepas virulentas na ausência de uma forte resposta Th1 (Uzonna *et al.*, 2004).



## GLICOINOSITOLFOSFOLIPÍDEOS

Os glicolipídeos majoritariamente estudados em *Leishmania* são os glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs). Também denominados GPIs livres, são glicolipídeos de baixo peso molecular e altamente expressos na superfície do parasito tanto nas formas promastigotas como nas amastigotas. Os GIPLs de *L. (L.) major* contêm de quatro a seis resíduos de açúcar ligados ao lipídeo liso-álquil-fosfatidilinositol (McConville *et al.*, 1990).

Estudos vêm demonstrando que os GIPLs auxiliam na sobrevivência de *L. (L.) major* dentro de macrófagos, inibindo a síntese de óxido nítrico principalmente pela região álcool-acil-glicerol (Proudfoot, O'Donnell & Liew, 1995; Zuffery *et al.*, 2003). Além disso, os GIPLs, de modo semelhante ao LPG, provavelmente pela porção GPI comum aos dois, atuam na inibição da atividade de PKC (Zuffery *et al.*, 2003). Diferenças na estrutura do GIPLs sugerem que sejam espécie-específica, cepa-específica e estágio-específico (McConville & Blacwell, 1991; McConville *et al.*, 1994).

A taxa de infecção de macrófagos por *L. (V.) braziliensis* tem sido relacionada com microdomínios de lipídeos da membrana externa (*detergent-resistant membranes* – DRMs) de promastigotas contendo GIPLs. A desestruturação desses domínios é capaz de induzir a uma diminuição na taxa de infecção de macrófagos por *L. (V.) braziliensis*, sugerindo uma relação entre os microdomínios contendo GIPLs e a infectividade desses parasitos (Yoneyama *et al.*, 2006).

## PROTEÍNAS E ENZIMAS

Inúmeras proteínas têm sido verificadas na superfície das formas amastigotas e promastigotas de espécies de *Leishmania*, com base em estudos com marcações radioativas associadas às técnicas de imunoprecipitação, ou *Western blotting*, utilizando anticorpos monoclonais e soro imune de paciente e animais. Assim, uma faixa muito ampla de proteínas, com massa molecular relativa de 10 kDa até 120 kDa, tem sido encontrada. Poucas dessas proteínas têm sua função conhecida, sendo uma notável exceção a proteína ligante de laminina com 67 kDa, identificada na superfície de promastigota e amastigota de *L. (L.) donovani* (Bandyopadhyay *et al.*, 2001). Assim como o observado para as diferentes formas de LPG e GIPLs, muitas das proteínas encontradas parecem ser estágio-específicas, como é o caso da proteína de 116 kDa presente em promastigotas infectivas de *L. (L.) major* (Sacks, Hieny & Sher, 1985) e das proteínas de 23 kDa, 52 kDa e 68 kDa em promastigotas e 38 kDa, 70 kDa e 74 kDa em amastigotas de *L. (L.) pifanoi* (Pan, 1986).

Um dos primeiros estudos sobre as proteínas de superfície de *L. (V.) braziliensis*, realizado em 1985, foi uma simples comparação entre a superfície celular dos promastigotas patogênicos e os não patogênicos. Nesse estudo foi constatado que a superfície celular desses promastigotas é diferente quanto aos receptores de lectinas e quanto às cargas (Ayesta, Arguello & Hernandez, 1985). Nesse mesmo ano foi descrita outra estratégia para a análise das proteínas de superfície desse parasito, a qual inclui a iodinação da superfície celular seguida do procedimento de fracionamento com detergente não iônico e cromatografia de troca iônica, para isolar uma proteína de 65 kDa de promastigotas infectivos (Misle, Márquez & Hernandez, 1985). No ano seguinte foram isoladas duas glicoproteínas da membrana celular de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, uma de 53 kDa com afinidade de ligação à concanavalina A e à *Ricinus communis* e outra de 47 kDa com afinidade de ligação a *Dolichos biflorus* (Nagakura *et al.*, 1986).

A proteína de 11 kDa de cinetoplastídeos (*Kinetoplastid membrane protein of 11 kDa* –KMP-11) e as hidrofílicas aciladas (*hydrophilic acylated surface protein* – HASP) também estão localizadas na membrana plasmática de *Leishmania* spp.. Tais proteínas não apresentam domínio transmembrana, peptídeo sinal e nem âncora de GPI, e são isoladas por solventes orgânicos juntamente com o LPG. A KMP-11 apresenta fortes características hidrofóbicas e está associada ao LPG na superfície celular do parasito (Jardim *et al.*, 1995). Já foi descrita em diversos gêneros de tripanossomatídeos (Stebeck *et al.*, 1995), contudo suas propriedades imunorregulatórias foram confirmadas somente em pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa, uma vez que induzem a expressão de interleucina-10

(Carvalho *et al.*, 2005). Um estudo recente demonstrou sua presença em amastigotas e promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e também que sua expressão aumenta na superfície dos parasitos durante a metacicloênese (Matos *et al.*, 2010).

As proteínas hidrofóbicas aciladas de superfície (*hydrophobic acylated surface proteins* – HASPs) têm características hidrofílicas além de serem distintamente reguladas nas formas evolutivas do parasito e encontradas com predominância em amastigotas e em abundância na superfície de formas infectivas de *L. (L.) major* (Flinn, Rangarajan & Smith, 1994). Estas proteínas são expressas em genes em uma mesma região cromossômica nas espécies do gênero *Leishmania* (Depledge *et al.*, 2010). Provavelmente a dupla acilação que apresentam deve mediar a associação com a membrana, agindo como uma âncora de superfície. Entre 70% a 80% das HASPs são observadas na face citosólica da membrana celular (Denny *et al.*, 2000). Já foi proposto que em pacientes com leishmaniose visceral causada pela *Leishmania (Leishmania) chagasi*, as HASPs estariam atuando na imunomodulação da infecção (Vinhas *et al.*, 1994).

A caracterização de genes por meio de métodos moleculares tem possibilitado a associação de sequências de nucleotídeos com proteínas presentes em tripanossomatídeos. É o caso de uma sequência de nucleotídeos obtida de *L. (L.) donovani*, a qual codifica para uma proteína com 198 aminoácidos, que apresentou 36% de identidade com a proteína amastina da superfície de *Trypanosoma cruzi* (Wu *et al.*, 2000). No *T. cruzi* a amastina foi caracterizada com glicoproteína e atua na invasão e proliferação intracelular desse parasito (Jackson, 2010). Em razão de ausência de estudos sobre a funcionalidade dessa proteína em *Leishmania* spp., não se pode afirmar que tenha a mesma função da amastina de *T. cruzi*. Porém, sabe-se que o gene dessa proteína, semelhante à amastina, é mais expresso na fase estacionária e principalmente em amastigotas de *L. (L.) donovani*, podendo, dessa forma, estar relacionado à sobrevivência de amastigotas dentro do fagolisossomo (Wu *et al.*, 2000).

Certas proteínas presentes na superfície do parasito parecem ter um papel na via de sinalização que leva à mudança de estágio dentro do ciclo de vida dos mesmos, como os receptores de adenilato ciclase (receptor AC). Essa enzima cataliza a conversão de adenosina trifosfato (ATP) a adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e, assim, participam de uma via de sinalização do AMPC já descrita em protozoários kinetoplastida (Seebeck, Schaub & Johner, 2004). Esses receptores foram descritos em *L. (L.) donovani* e podem induzir a mudanças de estágio pela elevação de AMPC intracelular, fato observado em *T. cruzi* (Sanchez *et al.*, 1995; Biswas, Bhattacharya & Das, 2011).

A glicoproteína de 46 kDa, chamada de gp46/M-2, descrita na superfície de *L. (L.) amazonensis* (Kahl & McMahon-Pratt, 1987), apresenta notável resistência à digestão proteolítica. Sua estrutura contém uma sequência repetitiva de 24 aminoácidos, a qual corresponde a 22% do total da proteína madura, e um teor glicídico de 7%, correspondente a 3 kDa, além de ser ligada à membrana pela âncora de GPI (Lohman, Langer & McMahon-Pratt, 1990). A gp46/M-2 é codificada pela mesma família de genes polimórficos do complexo de antígenos-2 de superfície de promastigotas, descrito previamente em *L. (L.) major*, e observa-se em sua estrutura regiões conservadas com esses antígenos (Murray, Spithill & Handman, 1989).

Dentre todas as espécies de *Leishmania* já estudadas, os genes que codificam gp46/M-2 não foram encontrados em somente duas espécies: *L. (V.) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) enrittii* (Hanekamp & Langer, 1991; McMahon-Pratt *et al.*, 1992). Além disso, a expressão de RNA mensageiro (mRNA) da gp46/M-2 de *L. (L.) chagasi* apresenta indícios de ser mais elevada em promastigotas de fase estacionária de cultura, levando a crer que seria um fator de virulência desse estágio evolutivo do parasito (Beetham *et al.*, 1997). Outro fato importante é que gp46/M-2 de *L. (L.) amazonensis* proporciona uma proteção contra a infecção dessa espécie em camundongos susceptíveis (Champsí & McMahon-Pratt, 1988; McMahon-Pratt *et al.*, 1993). Tal observação sugere que a gp46/M-2 seria outro antígeno candidato a vacina contra a leishmaniose (Liew & O'Donnell, 1993).

As espécies de *Leishmania* têm várias proteínas reconhecidas como membros de famílias conservadas durante a evolução (Requena, Alonso & Soto, 2000). Dentre essas, se destacam os proteofosfoglicanos (*proteophosphoglycan* – PPG), caracterizados como polipeptídeos altamente glicosilados. São proteínas que apresentam ligação de fosfossacarídeos à cadeia peptídica por *O*-glicosilação. Os PPGs podem ser encontrados na membrana celular do parasito ancoradas por GPI, sendo dessa forma denominadas mPPGs (Ilg *et al.*, 1999). A função dos mPPGs ainda não está totalmente clara, porém especula-se que, em razão da sua longa cadeia cobrindo a membrana plasmática dos parasitos, tenha papel importante como ligante a receptores de macrófagos e de células do trato digestório do inseto vetor (Ilg, 2000).

Em promastigotas, um PPG secretado e filamentososo (fPPG) forma um agregado viscoso, estabelecendo uma rede de filamentos fibrosos como um gel. O fPPG é secretado pela bolsa flagelar (Stierhof *et al.*, 1994) com 95% de sua composição de fosfoglicanos e a porção peptídica apresentando abundância de serina, alanina e prolina. Sua extensiva glicosilação potencialmente confere capacidade de resistir à ação de proteinases, embora ainda não existam claras evidências nesse sentido. Além disso, sua participação parece ser importante no bloqueio do intestino anterior do inseto vetor, o que impede a ingestão de alimento e leva o inseto a sucessivas tentativas de se alimentar, aumentando as chances de infecção dos hospedeiros vertebrados por *Leishmania* spp. (Ilg, 2000; Walters *et al.*, 1989).

Amastigotas secretam dentro do vacúolo parasitóforo outro tipo de PPG, que estruturalmente são definidos como uma cadeia polipeptídica modificada com fosfoglicanos ligados a resíduos de serina (Ilg, 2000) e contêm açúcares semelhantes aos encontrados em LPG e nas fosfatases ácidas. A secreção deste PPG modificado dentro de macrófagos parece contribuir para manutenção do vacúolo parasitóforo (Peters, Stierhof & Ilg, 1997). Adicionalmente, essa molécula também é capaz de ativar o complemento via proteína ligadora de manose (Peters *et al.*, 1997), podendo assim contribuir para ligação da *Leishmania* spp. à célula hospedeira.

Várias espécies de *Leishmania* estudadas revelaram a expressão de fosfatases ácidas (*acid phosphatase* – ACP) durante seu ciclo biológico (Shakarian & Dwyer, 2000). Três destas ACP foram descritas na membrana de *L. (L.) donovani* com 128, 132 e 108 kDa e pH ótimo de atividade próximo a 5,5 (Remaley *et al.*, 1985). O genes de *Leishmania* para as fosfatases ácidas secretadas (SACP) e de membrana (MACP) mostraram-se homólogos tanto em espécies viscerotrópicas como dermatotrópicas (Shakarian & Dwyer, 2000; Shakarian *et al.*, 2002).

Tanto as MACPs (que apresentam peso molecular 120 kDa e 134 kDa) quanto as SACP podem ser apontadas como uma das estratégias de sobrevivência do parasito no trato alimentar do inseto vetor, e também no interior do macrófago, uma vez que interferem na produção de metabólitos oxidativos ( $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $O^{\cdot 2}$ ) tóxicos ao protozoário (Buchmuller-Rouiller & Mauel, 1987; Glew *et al.*, 1988). Essas ectoenzimas são monoesterases capazes de hidrolisar uma variedade de substratos fosforilados, principalmente fosfolípidios e fosfoproteínas e, dessa forma, interferem na produção de radicais livres pelos macrófagos (Glew *et al.*, 1988). Contudo, seu papel na resposta imunológica ainda não está completamente elucidado. Estudos com amostras de soro de pacientes com leishmaniose visceral (Ellis, Shakarian & Dwyer, 1998) detectaram anticorpos contra SACP de *L. (L.) donovani*, sugerindo que sua expressão em amastigotas induz a um estímulo da resposta imune humoral.

Outras classes de enzimas presentes na membrana plasmática, no flagelo e na bolsa flagelar de diversas espécies de *Leishmania* são as 3'-nucleotidases (~43 kDa) (Côrte-Real *et al.*, 1993) e 5'-nucleotidases (~70 kDa) (Campbell *et al.*, 1991). Essas enzimas hidrolisam nucleotídeos a ácidos nucleicos 3'-AMP e 5'-AMP, respectivamente (Farajnia *et al.*, 2004; Gottlieb & Dwyer, 1983; Hansen *et al.*, 1982). As nucleotidases teriam papel nutricional importante, já que esses parasitos não são capazes de sintetizar purina via síntese *de novo* (Debrabant, Gottlieb & Dwyer, 1995). A identificação de genes homólogos dessa enzima em várias espécies de *Leishmania* confirma que a 3'-nucleotidase é conservada nesse gênero (Debrabant, Gottlieb & Dwyer, 1995), corroborando o seu papel crítico na captação de purinas. A remoção de porção C-terminal da enzima causa sua liberação da membrana plasmática de *L. (L.) donovani*, demonstrando que



esse domínio é responsável por seu ancoramento. Ainda assim, sua atividade enzimática não sofre interferência com a remoção desse domínio e nem com a remoção de suas *N*-glicosilações (Debrabant, Ghedin & Dwyer, 2000). Como a 3'-nucleotidase não foi detectada em células de mamíferos, ela surge como outra possibilidade de alvo para ação de quimioterápicos mais seletivos (Farajnia *et al.*, 2004; Gbenle & Dwyer, 1992).

As enzimas transportadoras de íons  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) também foram descritas na membrana de superfície da *Leishmania* spp. e atuam como uma bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tais enzimas apresentam alta afinidade com esse íon e sua atividade está estritamente relacionada com a calmodulina, visto que antagonistas da calmodulina bloqueiam completamente sua atividade (Banerjee, Sarkar & Bhaduri, 1999; Benaim *et al.*, 1993). Com duas subunidades (51 kDa e 57 kDa) fortemente associadas à membrana plasmática (Ghosh *et al.*, 1990), conta com um sítio aloestérico ao  $\text{Mg}^{2+}$  capaz de modular sua atividade cinética (Mazumder *et al.*, 1992).

A homeostase da concentração submicromolar de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de *L. (V) braziliensis*, *L. (L.) mexicana*, *T. cruzi* e *Trypanosoma brucei* é mantida pela atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase presente na membrana plasmática desses parasitos (Benaim & Romero, 1990). Também foi proposto que o aumento da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase presente na membrana plasmática de *L. (L.) amazonensis* pode determinar a regulação dos níveis de cálcio no interior do fagossomo (Côrte-Real, Santos & Meirelles, 1995).

Enzimas transportadoras de íons  $\text{Mg}^{2+}$  também foram descritas na membrana celular de *Leishmania* spp., sendo denominadas  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPases. As  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPases de *L. (L.) donovani* têm sua atividade modulada pela fluidez da membrana (Dutta *et al.*, 1990). Tais enzimas parecem ter uma função de bomba de extrusão de  $\text{H}^+$ , além de ter um possível papel na acumulação de glicose e potássio no meio intracelular (Dutta *et al.*, 1990; Mukherjee, Mandal & Bhaduri, 2001). Alterações na atividade dessas proteínas podem estar relacionadas com a virulência do parasito, participando da pré-adaptação dos promastigotas para sobrevivência dentro dos macrófagos (Berredo-Pinho *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 1997).

As proteinases consistem em outra categoria de proteínas descrita na membrana celular de *Leishmania* spp. Entre as quatro classes de proteinase descritas nesse parasito (Alves *et al.*, 2005; Silva-Lopez *et al.*, 2004; Bouvier, Etges & Bordier, 1985; Silva-Lopez & Giovanni-De-Simone, 2004), somente as metaloproteinases e as cisteína-proteinases foram localizadas na membrana plasmática de várias espécies de *Leishmania*, até o momento.

A gp63 é uma das principais glicoproteínas encontradas na superfície de promastigotas de *Leishmania* spp., com massa molecular aproximada de 63 kDa. É uma zinco-metaloproteinase e está fixada à membrana plasmática por meio de âncora de GPI, evidenciando polimorfismo entre espécies, além de ter uma expressão reduzida em amastigotas (Olivier & Hassani, 2010; Davies *et al.*, 1990; Muskus & Marin, 2002). Nos últimos anos, tem sido demonstrado que a massa molecular das metaloproteinases de *Leishmania* spp. não é muito homogênea, podendo ser detectadas enzimas desde 50 kDa e mesmo acima de 63 kDa (Alves, Mendonça-Lima & Alves, 2004; Yao *et al.*, 2004; Cuervo *et al.*, 2006).

Não obstante as metaloproteinases terem sido descritas como proteinases de membrana em espécies de *Leishmania*, estudos recentes indicam que isoformas dessas enzimas têm localização intracelular em *L. (L.) mexicana* e em *L. (L.) chagasi* (Weise *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2005). Também uma análise por microscopia confocal sobre a distribuição dessas enzimas em *L. (V) braziliensis* demonstrou a existência intracelular de metaloproteinases com domínios homólogos a gp63, localizados próximos à bolsa flagelar (Cuervo *et al.*, 2008).

A importância das metaloproteinases no ciclo biológico da *Leishmania* spp. ainda é alvo de muitos estudos. As metaloproteinases têm atividade proteolítica sobre numerosos substratos, podendo estar envolvidas na degradação de macromoléculas do hospedeiro. Essas enzimas estão associadas à hidrólise e inativação de imunoglobulinas G (Etges, Bouvier & Bordier, 1986; Mendonça-Lima & Atta, 1992) e têm propriedade de inativar o fator C3b, em C3bi, do complemento (Bogdan & Rollinghoff, 1998; Chaudhuri & Chang, 1988). Essa última atividade pode auxiliar a

internalização dos promastigotas no macrófago, tendo como consequência C3bi atuar como opsonina, ligando ao LPG ou à própria gp63 (Bogdan & Rollinghoff, 1998).

Protótipos de vacina oral usando *Salmonella typhimurium* atenuada contendo o gene da gp63 induziram um fenótipo Th1 de proteção, com linfócitos T CD4<sup>+</sup>, para infecção por *L. (L.) major* em camundongos BALB/c (Xu *et al.*, 1995). O êxito de vacinas de cDNA também foi observado no controle da infecção de BALB/c por *L. (L.) mexicana* com indução de linfócitos T citotóxicos (Ali *et al.*, 2009). Também camundongos BALB/c vacinados com gp63 em lipossomos catiônicos induz proteção contra infecção por *L. (L.) donovani* (Bhowmick, Ravindran & Ali, 2008). Por sua vez, a vacinação de cães com plasmídeos de DNA codificante da gp63, e outras proteínas de *Leishmania*, não induziu proteção desses animais contra a infecção experimental por *L. (L.) infantum* (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007). Mesmo sem uma clara definição do perfil de proteção que a gp63 pode induzir, ainda é plausível o uso dessa proteína na construção de vacinas para as leishmanioses.

Estudos *in silico*, com sequência da *L. (V.) braziliensis*, indicaram que regiões do sítio catalítico da metaloproteinase apresentam sequências conservadas e que regiões que codificam os domínios de superfície estão possivelmente envolvidas nas interações parasito-hospedeiro: sítios de adesão a macrófago e epitópos de linfócitos T e B imunodominantes (Victoir *et al.*, 2005).

Além disso, já foi proposta uma função protetora da gp63 contra a ação de tripsina e quimiotripsina do inseto vetor, enzimas cuja expressão aumenta após o repasto sanguíneo e, dessa forma, podem interferir no desenvolvimento de parasitos no intestino do inseto. Observou-se que a atividade de tripsina e quimiotripsina acarreta a diminuição da subpopulação de promastigotas com expressão menor de gp63 no intestino do vetor, quando este se encontra repleto de sangue (Pimenta *et al.*, 1997).

Várias cisteína-proteinases (CPS) foram descritas em espécies de *Leishmania* que causam a forma tegumentar e visceral da doença. Inicialmente essas enzimas foram descritas em amastigotas de *L. (L.) mexicana*, que são particularmente ricas em CPS, principalmente encontrada em megassomas, com possível papel na virulência no hospedeiro vertebrado (Pupkis & Coombs, 1984; Robertson & Coombs, 1990).

Posteriormente verificou-se que essa enzima poderia ser detectada em outras espécies de *Leishmania* e que a mesma não estaria exclusivamente relacionada às formas infectivas do parasito (Alves, Marzochi & Giovanni-de-Simone, 1993; Omara-Opyene & Gedamu, 1997). Com a descrição do genoma de *L. (L.) major*, foi observada a existência de genes que codificam um total de 65 CPS, agrupadas em quatro clãs e 13 famílias (Mottram, Coombs & Alexander, 2004).

A possibilidade de CPS na superfície celular foi inicialmente demonstrada utilizando-se o método de extração com o detergente Triton X-114 (Alves, Marzochi & Giovanni-de-Simone, 1993). Nesse trabalho, os autores demonstraram que promastigotas não infectivos de *L. (L.) major* apresentam uma proteína hidrofóbica (20 kDa) com atividade enzimática sensível à presença de um inibidor de cisteína-proteinases [L-trans-epoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino) butano]. Estudos posteriores, nos quais foi utilizado soro de coelho antipapaína, uma CP de *Caryca papaia*, demonstraram a presença de proteínas reconhecidas por esse antissoro na superfície da membrana celular e na bolsa flagelar de *L. (L.) amazonensis* (Alves *et al.*, 2005; Mottram, Coombs & Alexander, 2004). Hoje, sabe-se que algumas isoformas de CP estão presentes na membrana de superfície de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* associadas a âncoras GPI (Rebello *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos sobre a atividade das CPS está centrada nos grupos das enzimas denominadas CPA, CPB e CPC, e cada um deles apresenta características que lhes são próprias: CPA – constituído por enzimas da subfamília das catepsinas L. Esse grupo caracteriza-se por ser codificado por um gene de cópia única e pela ausência de uma longa extensão COOH-terminal antes de seu processamento final (Mottram *et al.*, 1992; Mottram & Coombs, 1998); CPB – constituído por enzimas da subfamília das catepsinas L. Esse grupo caracteriza-se por uma longa extensão

COOH-terminal nas formas das enzimas antes de seu processamento final. Além disso, as enzimas CPB são expressas por genes com múltiplas cópias, organizados em sequências em *tandem*. Essas isoformas apresentam variações entre suas especificidades por substratos e propriedades catalíticas (Brooks *et al.*, 2001); CPC – constituído por enzimas da subfamília das catepsinas B. Esse grupo, de forma similar ao grupo CPA, é codificado por um gene em cópia única e não apresenta uma extensão COOH-terminal como as enzimas CPB (Bart, Coombs & Mottram, 1995).

As CPS de *Leishmania* spp. podem atuar como moduladores da resposta imune nas infecções tegumentares. Nesse particular, é válido ressaltar que sequências peptídicas da região COOH-terminal das CPBs têm potencial imunorregulador na resposta imune celular para casos humanos de LTA causados por *L. (V.) braziliensis* (Alves *et al.*, 2001) e no desenvolvimento da infecção experimental murina por *L. (L.) amazonensis* (Alves *et al.*, 2004, Pereira *et al.*, 2011).

Existem evidências da ação de CPS de *Leishmania* atuando na regulação do sistema imune do hospedeiro, tanto induzindo este a apresentar uma resposta tipo Th2 quanto inibindo uma resposta do tipo Th1. As CPS de *L. (L.) mexicana* e de *L. (L.) amazonensis* são capazes inibir a apresentação de antígenos pela degradação da molécula do complexo principal de histocompatibilidade classe II no vacúolo parasitóforo do hospedeiro (Souza Leão *et al.*, 1995).

A geração de mutantes deficientes nos genes das CPB ( $\Delta cpb$ ) permitiu a obtenção de informações sobre a importância dessas CPS na interação parasito-hospedeiro. Mutantes de *L. (L.) mexicana*  $\Delta cpb$  apresentaram virulência reduzida e pouca capacidade de promover lesões em camundongos BALB/c (Alexander, Coombs & Mottram, 1998) e somente a reinserção de múltiplos genes CPB nesses mutantes por um cosmídeo foi capaz de efetivamente restaurar sua virulência, sugerindo que tais genes têm funções complementares (Denise *et al.*, 2003).

Além disso, existem indícios de que a enzima CPB de *L. (L.) mexicana* ativa é capaz de clivar os receptores de IL-2 e de IGE e de induzir à expressão de IL-4 em camundongos, promovendo a resposta Th2. Camundongos infectados com parasitos mutantes  $\Delta cpb$  foram capazes de apresentar uma resposta do tipo Th1 e, dessa forma, debelar a infecção (Pollock *et al.*, 2003). Também já foi descrita a capacidade de diferentes espécies de *Leishmania*, inclusive da *L. (L.) mexicana*, de inibir a produção de IL-12 em macrófagos e células dendríticas (Weinheber *et al.*, 1998). Esse processo é, ao menos em parte, dependente da CPB, uma vez que parasitos do tipo selvagem contam com uma capacidade maior de inibir a produção de IL-12 do que mutantes  $\Delta cpb$ , e inibidores de CPB são capazes de impedir essa ação dos parasitos. É possível que tal capacidade seja resultado da clivagem proteolítica tanto do fator de transcrição kappa B do hospedeiro quanto de seu inibidor I $\kappa$ B pela CPB (Cameron *et al.*, 2004).

Não obstante homólogos de CPB terem sido detectados na membrana celular de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (Rebello *et al.*, 2009), assim como outras cisteína-proteínases em *L. (L.) amazonensis* (Alves *et al.*, 2000), essas enzimas estão presentes nos grandes lisossomos do estágio amastigota e também podem ser liberadas na matriz extracelular, o que pode facilitar alguns de seus efeitos (Mottram, Brooks & Coombs, 1998).

Proteínas que ligam à heparina (PLHs) também foram descritas na superfície de *Leishmania* spp. (Butcher *et al.*, 1990; Azevedo-Pereira *et al.*, 2007; Mukhopadhyay *et al.*, 1989) e outros tripanossomatídeos (Kock *et al.*, 1997; Ortega-Barria & Pereira, 1991). A maior parte dos estudos com PLHs de *Leishmania* spp. tem sido desenvolvida com *L. (L.) donovani*, *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, e só recentemente foi proposto o estudo dessa proteína em *L. (V.) braziliensis*. Nesta espécie, a PLH sinalizou uma possível participação na interação com proteínas do intestino de *Lu. intermedia* e de *Lu. whitmani* (Azevedo-Pereira *et al.*, 2007).

Nos parasitos nos quais as PLHs foram estudadas, verificou-se que essas moléculas agem como proteínas de adesão e podem promover a interiorização dos mesmos com as células hospedeiras. Experimentos realizados com promastigotas de *L. (L.) donovani* demonstraram que em torno de 860 mil moléculas de PLHs são encontradas na



superfície do parasito, mais precisamente na porção flagelar dos promastigotas, e que por meio de ligação com heparina pudesse induzir a inibição da atividade de PKCs sobre a superfície celular do parasito (Butcher *et al.*, 1990; Mukhopadhyay *et al.*, 1989).

As PLHs estariam relacionadas às formas infectivas de *L. (L.) donovani*, já que estas predominam em promastigotas de fase estacionária de cultivo e que sucessivas passagens desses parasitos em meio de cultivo levam à perda da capacidade de os mesmos se ligarem à heparina (Kock *et al.*, 1997; Butcher *et al.*, 1992). Amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e de *L. (L.) major* têm maior capacidade de se ligar à heparina do que promastigotas das mesmas espécies (Volf, Svobodova & Dvorakova, 2001). Além disso, glicosaminoglicanos como heparina influenciam o desenvolvimento de *L. (L.) major* no intestino do inseto vetor, aumentando a carga parasitária dos insetos experimentalmente infectados.

Uma recente discussão alerta para o fato de que as PLHs, assim como o LPG, estariam participando dos fenômenos moleculares de ligação entre promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e o trato digestório de espécies de *Lutzomyia* que atuam como vetores na leishmaniose tegumentar americana (Alves, Córtes & Brazil, 2010). Assim, outros componentes da superfície dos promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, como as proteínas, podem estar envolvidos nas etapas de ligação desse parasito ao intestino do vetor. A habilidade de os promastigotas estarem aderidos às microvilosidades do trato digestório dos flebotômíneos é um passo essencial para manutenção do ciclo de vida do parasito, sendo um fator que distingue parasitos infectivos dos não infectivos.

Demonstrou-se, em ensaios *in vitro*, que a heparina e o sulfato de heparan são os principais GAGs envolvidos no fenômeno de inibição da ligação de promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp. às células hospedeiras (Butcher *et al.*, 1992; Volf, Svobodova & Dvorakova *et al.*, 2001). Curiosamente, também demonstrou-se que a heparina pode aumentar a ligação de promastigotas aos macrófagos (Butcher *et al.*, 1992). Tal fato é um indicativo de que a heparina poderia influenciar duas atividades distintas sobre a infecção celular por *Leishmania* spp., sendo também uma sugestão para heterogeneidade funcional das proteínas que ligam a heparina presente na superfície do parasito.

Embora certas proteínas e proteinases de *Leishmania* spp. sejam ancoradas por GPI e têm ações definidas no ciclo de vida do parasito, ressalta-se que nem todas as proteínas ancoradas por GPI são essenciais ao crescimento ou infectividade no hospedeiro vertebrado. Mutantes  $\Delta GPI8$  de *L. (L.) mexicana* foram capazes de promover a infecção em camundongos (Hilley *et al.*, 2000). Esses mutantes não têm o gene GPI8 que codifica a enzima transamidase, a qual é responsável pela adição da porção proteica à ancora de GPI.

## CONCLUSÕES

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam uma série de peculiaridades adaptativas nas diferentes fases de seu ciclo biológico. Como as superfícies celulares dos promastigotas e amastigotas estão em contato direto com tecidos e células dos hospedeiros, é razoável que a organização destas seja uma das estratégias para aumentar as chances de sucesso do parasitismo.

Ao fazer uma síntese do conhecimento atual sobre o papel funcional dos componentes do parasito é possível indicar o envolvimento desses componentes nos eventos iniciais da dinâmica de interação finas e vitais que se estabelecem entre os protozoários *Leishmania* e os seus hospedeiros (Tabela 1). Assim, quando os promastigotas ou amastigotas mudam de hospedeiro ocorre ativação de receptores presentes na superfície celular, que sinalizam para transformação do parasito (receptor de adenilciclase). Nessa mudança de hospedeiros, permanecem ativas nos parasitos enzimas que favorecem o equilíbrio e a adaptação às condições iônicas ( $Ca^{2+}$  - e  $Mg^{2+}$ - ATPases) e a captação de nutrientes essenciais (3'-nucleotidase e 5'-nucleotidase).

Tabela 1 – Principais componentes da membrana de superfície das espécies de *Leishmania* e suas atuações nos hospedeiros

Componentes	Função	
	Hospedeiro Vertebrado	Hospedeiro Invertebrado
LPG	Ligante de macrófagos; Inibe a atividade da PKC de macrófagos; Em metacíclicos: (a) inibe a formação do complexo de ataque à membrana; e (b) ativa complemento proporcionando a ligação ao macrófago via C3bi; Atua na resposta imune inata via células NK e célula dendríticas por meio de receptor <i>toll-like 2</i> e pelo aumento de INF- $\gamma$ e TNF- $\alpha$ .	Fixa promastigotas procíclicos ao epitélio intestinal
GIPLs	Inibe síntese de óxido nítrico em macrófagos; Inibe atividade de PKC; Influencia a taxa de infecção de macrófagos;	FNd
Proteínas e enzimas:		
KMP-11	Imunomodulação	FNd
HASP	Imunomodulação	FNd
Amastina	Invasão e multiplicação intracelular	FNd
Receptor de adenilciclase	Induz a mudança de estágio de promastigota a amastigota	Induz à mudança de estágio amastigota a promastigota
gp46/M-2	FNd	FNd
PPG	mPPG – ligante de receptores de macrófagos	mPPG – ligante de células do tubo digestório
	aPPG – contribuir para manutenção do vacúolo parasitóforo	FNd
	aPPG – ativa complemento via proteína ligadora de manose	FNd
	FNd	fPPG – dificulta ingestão de alimento do flebótomo
AcPs	MAcPs/SAcPs – interferem na produção de metabólitos oxidativos ( $H_2O_2$ , OH $^-$ , O $^{2-}$ )	Idem
3'-nucleotidase e 5'-nucleotidase	Papel nutricional – hidrólise de nucleotídeos a ácidos nucleicos (3'-AMP e 5'-AMP)	Idem
Ca $^{2+}$ -ATPase	Manutenção dos níveis de Ca $^{2+}$ citoplasmático e do fagossomo	Manutenção dos níveis de Ca $^{2+}$ citoplasmático
Mg $^{2+}$ -ATPases	Função de bomba de extrusão de H $^+$ Acumulação de glicose e potássio Pré-adaptação dos promastigotas no macrófago	FNd
Metaloproteinases	Hidrólise e inativação de imunoglobulinas G; Inativação do fator C3b em C3bi do complemento; Adesão interiorização nos macrófagos	Protege os promastigotas da ação da tripsina e quimiotripsina do intestino do inseto;
Cisteína-proteinases	Imunorregulador na leishmaniose cutânea: com atividade enzimática sobre componentes do sistema imune e pela atuação da região C-terminal na indução resposta Th2	FNd
PLH	Ligação dos promastigotas aos macrófagos	Ligação dos promastigotas ao trato digestório de flebôtomos

Obs: FNd (função não determinada).

A superfície celular desses protozoários é capaz de controlar atividades específicas para viverem em um ou outro hospedeiro. Até o presente momento, a maioria dos componentes de superfície dos parasitos, já descritos anteriormente, tem o papel biológico relacionado ao hospedeiro mamífero, enquanto apenas um escasso número voltado à interação com o inseto vetor foi estudado. Nesse cenário, o LPG é o componente de superfície mais diversificado em funções direcionadas à manutenção do ciclo de vida do parasito, com atuação no vertebrado (influenciando na resposta imune inata e adquirida e subvertendo as funções do macrófago) e no inseto vetor (realizando a fixação do promastigota ao trato digestório).

No hospedeiro vertebrado, o parasito tem a capacidade de controlar ou subverter a ação de diversos componentes do sistema imune. A superfície celular reúne fatores como proteínas, enzimas e/ou glicoconjugados voltados à imunomodulação da resposta imune do hospedeiro vertebrado, favorecendo assim a sobrevivência do parasito.

Também as proteínas de superfície, como metaloproteinases e proteínas que ligam à heparina, têm ações no vertebrado (nas funções do macrófago), mas somente as metaloproteinases atuam no inseto vetor (protege os promastigotas da ação de proteinase do inseto); e é nítido o papel das cisteína-proteinases na resposta imune da leishmaniose cutânea do hospedeiro vertebrado, como enzima e como indutor de resposta imune celular.

Mesmo com os conhecimentos aqui reunidos sobre os componentes de *Leishmania* spp., para uma real compreensão dos fenômenos de interação entre os parasitos e seus hospedeiros faz-se necessário levar em consideração a ação de todos os componentes de superfície – aqueles já descritos e os que ainda estão em estudo, uma vez que uma categorização artificial da importância destes pode acarretar uma interpretação incorreta de tais fenômenos.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H. & MOTTRAM, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *The Journal of Immunology*, 161(12): 6.794-6.801, 1998.
- ALI, S. A. *et al.* CTL responses to *Leishmania mexicana* gp63-cDNA vaccine in a murine model. *Parasite Immunology*, 31(7): 373-383, 2009.
- ALVES, C. R., CÔRTEZ, L. M. & BRAZIL, R. P. The vectorial potential of *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* and *Lutzomyia (N.) whitmani* in the transmission of *Leishmania (V.) braziliensis* can also be related to proteins attaching. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010.
- ALVES, C. R.; MARZOCHI, M. C. & GIOVANNI-DE-SIMONE, S. Heterogeneity of cysteine proteinases in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 26(2): 167-171, 1993.
- ALVES, C. R. *et al.* Detection of cysteine-proteinases in *Leishmania amazonensis* promastigotes using a cross-reactive antiserum. *FEMS Microbiology Letters*, 186(2): 263-267, 2000.
- ALVES, C. R. *et al.* A strategy for the identification of T-cell epitopes on *Leishmania* cysteine proteinases. *Cytobios*, 104(405): 33-41, 2001.
- ALVES, C. R. *et al.* Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine Leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 26(3): 127-135, 2004.
- ALVES, C. R. *et al.* *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. *Experimental Parasitology*, 109(1): 38-48, 2005.
- ALVES, J. L.; MENDONÇA-LIMA, F. W. & ALVES, C. R. The use of metal chelate affinity chromatography on the isolation of *Leishmania chagasi* promastigote hydrophobic proteinases. *Veterinary Parasitology*, 119(2-3): 137-145, 2004.
- ASSIS, R. R. *et al.* Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820(9):1.354-1.365, 2012.

- AYESTA, C.; ARGUELLO, C. & HERNANDEZ, A. G. *Leishmania braziliensis*: cell surface differences in promastigotes of pathogenic and nonpathogenic strains. *Experimental Parasitology*, 59(2): 185-191, 1985.
- AZEVEDO-PEREIRA, R. L. *et al.* Heparin binding proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *Veterinary Parasitology*, 145(3-4): 234-239, 2007.
- BANDYOPADHYAY, K. *et al.* Role of 67 kDa cell surface laminin binding protein of *Leishmania donovani* in pathogenesis. *Journal of Biochemistry*, 130(1): 141-148, 2001.
- BANERJEE, C.; SARKAR, D. & BHADURI, A. Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein phosphatase from *Leishmania donovani*. *Parasitology*, 118(6): 567-573, 1999.
- BART, G.; COOMBS, G. H. & MOTTRAM, J. C. Isolation of *lmcpc*, a gene encoding a *Leishmania mexicana* cathepsin-B-like cysteine proteinase. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 73(1-2): 271-274, 1995.
- BECKER, I. *et al.* *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130(2): 65-74, 2003.
- BEETHAM, J. K. *et al.* Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(28): 17.360-17.366, 1997.
- BENAIM, G. & ROMERO, P. J. A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1.027(1): 79-84, 1990.
- BENAIM, G. *et al.* Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania mexicana*. Identification and characterization of a plasma membrane calmodulin-dependent Ca(2+)-ATPase. *Biological Research*, 26(1-2): 141-150, 1993.
- BERREDO-PINHO, M. *et al.* A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391(1): 16-24, 2001.
- BHATTACHARYYA, S. *et al.* Selective impairment of protein kinase C isoforms in murine macrophage by *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 216(1-2): 47-57, 2001.
- BHOWMICK, S.; RAVINDRAN, R. & ALI, N. gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Infection and Immunity*, 76(3): 1.003-1.015, 2008.
- BISWAS, A.; BHATTACHARYA, A. & DAS, P. K. Role of cAMP Signaling in the Survival and Infectivity of the Protozoan Parasite, *Leishmania donovani*. *Molecular Biology International*, 2.011: 1-9, 2011.
- BOGDAN, C. & ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*, 28(1): 121-134, 1998.
- BOUVIER, J.; ETGES, R. J. & BORDIER, C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(29): 15.504-15.509, 1985.
- BRANDONISIO, O.; SPINELLI, R. & PEPE, M. Dendritic cells in *Leishmania* infection. *Microbes and infection*, 6(15): 1.402-1.409, 2004.
- BROOKS, D. R. *et al.* The stage-regulated expression of *Leishmania mexicana* CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(50): 47.061-47.069, 2001.
- BUCHMULLER-ROUILLER, Y. & MAUEL, J. Impairment of the oxidative metabolism of mouse peritoneal macrophages by intracellular *Leishmania* spp. *Infection and Immunity*, 55(3): 587-593, 1987.
- BUTCHER, B. A. *et al.* *Leishmania donovani*: cell-surface heparin receptors of promastigotes are recruited from an internal pool after trypsinization. *Experimental Parasitology*, 71(1): 49-59, 1990.
- BUTCHER, B. A. *et al.* Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal macrophages. A fluorescence flow cytometric analysis. *The Journal of Immunology*, 148(9): 2.879-2.886, 1992.
- CAMERON, P. *et al.* Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *The Journal of Immunology*, 173(5): 3.297-3.304, 2004.



- CAMPBELL, T. A. *et al.* Purification and characterization of the 3'-nucleotidase/nuclease from promastigotes of *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 47(1): 109-117, 1991.
- CARVALHO, L. P. *et al.* Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal Leishmaniasis patients. *Scandinavian Journal of Immunology*, 61(4): 337-342, 2005.
- CHAMPSI, J. & MCMAHON-PRATT, D. Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. *Infection and Immunity*, 56(12): 3.272-3.279, 1988.
- CHAUDHURI, G. & CHANG, K. P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 27(1): 43-52, 1988.
- COELHO-FINAMORE, J. M. *et al.* *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. *The Journal of Parasitology*, 41(3-4): 333-342, 2011.
- CÔRTE-REAL, S. *et al.* Immunogold labeling and cerium cytochemistry of the enzyme ecto-5'-nucleotidase in promastigote forms of *Leishmania* species. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(3): 407-412, 1993.
- CÔRTE-REAL, S.; SANTOS, C. B. & MEIRELLES, M. N. Differential expression of the plasma membrane Mg<sup>2+</sup> ATPase and Ca<sup>2+</sup> ATPase activity during adhesion and interiorization of *Leishmania amazonensis* in fibroblasts in vitro. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 27(3): 359-366, 1995.
- CUERVO, P. *et al.* A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Parasitology*, 132(2): 177-185, 2006.
- CUERVO, P. *et al.* Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Acta Tropica*, 106(3): 143-148, 2008.
- DAVIES, C. R. *et al.* Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*, 101(3): 337-343, 1990.
- DEBRABANT, A.; GHEDIN, E. & DWYER, D. M. Dissection of the functional domains of the *Leishmania* surface membrane 3'-nucleotidase/nuclease, a unique member of the class I nuclease family. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(21): 16.366-16.372, 2000.
- DEBRABANT, A.; GOTTLIEB, M. & DWYER, D. M. Isolation and characterization of the gene encoding the surface membrane 3'-nucleotidase/nuclease of *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 71(1): 51-63, 1995.
- DELGADO-DOMÍNGUEZ, J. *et al.* *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC $\alpha$ -induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasite Immunology*, 32(6): 440-449, 2010.
- DENISE, H. *et al.* Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. *Infection and Immunity*, 71(6): 3.190-3.195, 2003.
- DENNY, P. W. *et al.* Acylation-dependent protein export in *Leishmania*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(15): 11.017-11.025, 2000.
- DEPLEDGE, D. P. *et al.* *Leishmania*-specific surface antigens show sub-genus sequence variation and immune recognition. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(9): e829, 2010.
- DILLON, R. J. & LANE, R. P. Detection of *Leishmania* lipophosphoglycan binding proteins in the gut of the sandfly vector. *Parasitology*, 118(1): 27-32, 1999.
- DUTTA, M. *et al.* Fluidity-dependent Mg<sup>2+</sup>(+)-ATPase activity in membranes from *Leishmania donovani* promastigotes. *The Biochemical Journal*, 265(3): 923-926, 1990.
- ELLIS, S. L.; SHAKARIAN, A. M. & DWYER, D. M. *Leishmania*: amastigotes synthesize conserved secretory acid phosphatases during human infection. *Experimental Parasitology*, 89(2): 161-168, 1998.
- ETGES, R.; BOUVIER, J. & BORDIER, C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(20): 9.098-9.101, 1986.



- FARAJNIA, S. *et al.* Molecular characterization of a novel amastigote stage specific Class I nuclease from *Leishmania major*. *International Journal for Parasitology*, 34(8): 899-908, 2004.
- FLINN, H. M.; RANGARAJAN, D. & SMITH, D. F. Expression of a hydrophilic surface protein in infective stages of *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 65(2): 259-270, 1994.
- GBENLE, G. O. & DWYER, D. M. Purification and properties of 3'-nucleotidase of *Leishmania donovani*. *The Biochemical Journal*, 285(1): 41-46, 1992.
- GHOSH, J. *et al.* A high affinity Ca<sup>2+</sup>-ATPase on the surface membrane of *Leishmania donovani* promastigote. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(19): 11.345-11.351, 1990.
- GLASER, T. A. *et al.* An antigenically distinct lipophosphoglycan on amastigotes of *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 45(2): 337-344, 1991.
- GLEW, R. H. *et al.* Biochemistry of the *Leishmania* species. *Microbiological Reviews*, 52(4): 412-432, 1988.
- GOTTLIEB, M. & DWYER, D. M. Evidence for distinct 5'- and 3'-nucleotidase activities in the surface membrane fraction of *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 7(4): 303-317, 1985.
- HANDMAN, E. & GODING, J. W. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *The Embo Journal*, 4(2): 329-336, 1985.
- HANDMAN, E.; GREENBLATT, C. L. & GODING, J. W. An amphipathic sulphated glycoconjugate of *Leishmania*: characterization with monoclonal antibodies. *The Embo Journal*, 3(10): 2.301-2.306, 1984.
- HANEKAMP, T. & LANGER, P. J. Molecular karyotype and chromosomal localization of genes encoding two major surface glycoproteins, gp63 and gp46/M2, hsp70, and beta-tubulin in cloned strains of several *Leishmania* species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 48(1): 27-37, 1991.
- HANSEN, B. D. *et al.* The specificity of purine base and nucleoside uptake in promastigotes of *Leishmania braziliensis panamensis*. *Parasitology*, 85(2): 271-282, 1982.
- HILLEY *et al.* *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosylphosphatidylinositol (GPI): protein transamidase provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 11(4): 1.183-1.195, 2000.
- ILG, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitology Today*, 16(11): 489-497, 2000.
- ILG, T. *et al.* Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(10): 6.834-6.840, 1992.
- ILG, T. *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania major* gene, ppg1, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(44): 31.410-31.420, 1999.
- JACKSON, A. P. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. *Molecular Biology and Evolution*, 27(1): 33-45, 2010.
- JARDIM, A. *et al.* Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *The Biochemical Journal*, 305(1): 307-313, 1995.
- KAHL, L. P. & MCMAHON-PRATT, D. Structural and antigenic characterization of a species- and promastigote-specific *Leishmania mexicana amazonensis* membrane protein. *The Journal of Immunology*, 138(5): 1.587-1.595, 1987.
- KAMHAWI, S. *et al.* A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*, 119(3): 329-341, 2004.
- KOCK, N. P. *et al.* Receptors for carbohydrate ligands including heparin on the cell surface of *Leishmania* and other trypanosomatids. *Tropical Medicine & International Health*, 2(9): 863-874, 1997.
- LIEW, F. Y. & O'DONNELL, C. A. Immunology of Leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 32: 161-259, 1993.
- LU, H. G. *et al.* Intracellular Ca<sup>2+</sup> pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(14): 9.464-9.473, 1997.

- MAHONEY, A. B. *et al.* Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. *Biochemistry*, 38(31): 9.813-9.823, 1999.
- MATOS, D. C. *et al.* Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(3): 341-347, 2010.
- MAZUMDER, S. *et al.* Allosteric modulation of *Leishmania donovani* plasma membrane Ca(2+)-ATPase by endogenous calmodulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(26): 18.440-18.446, 1992.
- MCCONVILLE, M. J. & BLACKWELL, J. M. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(23): 15.170-15.179, 1991.
- MCCONVILLE, M. J. & HOMANS, S. W. Identification of the defect in lipophosphoglycan biosynthesis in a non-pathogenic strain of *Leishmania major*. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(9): 5.855-5.861, 1992.
- MCCONVILLE, M. J. & RALTON, J. E. Developmentally regulated changes in the cell surface architecture of *Leishmania* parasites. *Behring Institute Mitteilungen*, 99: 34-43, 1997.
- MCCONVILLE, M. J. *et al.* Structures of the glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*. A family of novel galactofuranose-containing glycolipids. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(13): 7.385-7.394, 1990.
- MCCONVILLE, M. J. *et al.* The developmental regulation and biosynthesis of GPI-related structures in *Leishmania* parasites. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27(2): 139-144, 1994.
- MCMAHON-PRATT, D. *et al.* Loss of the GP46/M-2 surface membrane glycoprotein gene family in the *Leishmania braziliensis* complex. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 50(1): 151-160, 1992.
- MCMAHON-PRATT, D. *et al.* Recombinant vaccinia viruses expressing GP46/M-2 protect against *Leishmania* infection. *Infection and Immunity*, 61(8): 3.351-3.359, 1993.
- MENDONCA-LIMA, F. W. & ATTA, A. M. Partial characterization of *Leishmania chagasi* promastigote peptidases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87(2): 307-308, 1992.
- MISLE, J. A.; MARQUEZ, M. E. & HERNANDEZ, A. G. Solubilization and partial purification of a cell surface component of *Leishmania braziliensis*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 71(4): 419-428, 1985.
- MOODY, S. F. *et al.* The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(25): 18.457-18.466, 1993.
- MOSSER, D. M.; SPRINGER, T. A. & DIAMOND, M. S. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *The Journal of Cell Biology*, 116(2): 511-520, 1992.
- MOTTRAM, J. C. & COOMBS, G. H. *Leishmania* cysteine proteinases: virulence factors in quest of a function-reply. *Parasitology Today*, 14(6): 251-252, 1998.
- MOTTRAM, J. C.; BROOKS, D. R. & COOMBS, G. H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 1(4): 455-460, 1998.
- MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. & ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(4): 375-381, 2004.
- MOTTRAM, J. C. *et al.* A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Molecular Microbiology*, 6(14): 1.925-1.932, 1992.
- MUKHERJEE, T.; MANDAL, D. & BHADURI, A. *Leishmania* plasma membrane Mg<sup>2+</sup>-ATPase is a H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-antiporter involved in glucose symport. Studies with sealed ghosts and vesicles of opposite polarity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(8): 5.563-5.569, 2001.
- MUKHOPADHYAY, N. K. *et al.* Heparin binds to *Leishmania donovani* promastigotes and inhibits protein phosphorylation. *The Biochemical Journal*, 264(2): 517-525, 1989.

- MURRAY, P. J.; SPITHILL, T. W. & HANDMAN, E. The PSA-2 glycoprotein complex of *Leishmania major* is a glycosylphosphatidylinositol-linked promastigote surface antigen. *The Journal of Immunology*, 143(12): 4.221-4.226, 1989.
- MUSKUS, C. E. & MARIN VILLA, M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica*, 22(2): 167-177, 2002.
- MYSKOVA, J. *et al.* A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes and Infection*, 9(3): 317-324, 2007.
- NAGAKURA, K. *et al.* *Leishmania braziliensis*: localization of glycoproteins in promastigotes. *Experimental Parasitology*, 61(3): 335-342, 1986.
- OLIVIER, M. & HASSANI, K. Protease inhibitors as prophylaxis against Leishmaniasis: new hope from the *major* surface protease gp63. *Future Medicinal Chemistry*, 2(4): 539-542, 2010.
- OLIVIER, M.; GREGORY, D. J. & FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2): 293-305, 2005.
- OMARA-OPYENE, A. L. & GEDAMU, L. Molecular cloning, characterization and overexpression of two distinct cysteine protease cDNAs from *Leishmania donovani* chagasi. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 90(1): 247-267, 1997.
- ORTEGA-BARRIA, E. & PEREIRA, M. E. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell*, 67: 411-421, 1991.
- PAN, A. A. *Leishmania mexicana pifanoi*: analysis of the antigenic relationships between promastigotes and amastigotes by gel diffusion, immunoelectrophoresis, and immunoprecipitation. *The Journal of Protozoology*, 33(2): 192-197, 1986.
- PEREIRA, B. A. *et al.* *In silico* predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during *Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection. *BMC Immunology*, 8(12): 44, 2011.]
- PETERS, C.; STIERHOF, Y. D. & ILG, T. Proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes causes vacuole formation in macrophages. *Infection and Immunity*, 65(2): 783-786, 1997.
- PETERS, C. *et al.* Secreted proteophosphoglycan of *Leishmania mexicana* amastigotes activates complement by triggering the mannan binding lectin pathway. *European Journal of Immunology*, 27(10): 2.666-2.672, 1997.
- PIMENTA, P. F.; SARAIVA, E. M. & SACKS, D. L. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. *Experimental Parasitology*, 72(2): 191-204, 1991.
- PIMENTA, P. F. *et al.* Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science*, 256(5.065): 1.812-1.815, 1992.
- PIMENTA, P. F. *et al.* A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*, 115(4): 359-369, 1997.
- POLLOCK, K. G. *et al.* The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. *The Journal of Immunology*, 170(4): 1.746-1.753, 2003.
- PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, C. A. & LIEW, F. Y. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *European Journal of Immunology*, 25(3): 745-750, 1995.
- PUENTES, S. M. *et al.* Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine*, 167(3): 887-902, 1988.
- PUENTES, S. M. *et al.* Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *The Journal of Immunology*, 145(12): 4.311-4.316, 1990.
- PUPKIS, M. F. & COOMBS, G. H. Purification and characterization of proteolytic enzymes of *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes and promastigotes. *Journal of General Microbiology*, 130(9): 2.375-2.383, 1984.
- REBELLO, K. M. *et al.* Cysteine proteinases from promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitology Research*, 106(1): 95-104, 2009.



- REMALEY, A. T. *et al.* Characterization of *Leishmania donovani* acid phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(2): 880-886, 1985.
- REQUENA, J. M.; ALONSO, C. & SOTO, M. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitology Today*, 16(6): 246-250, 2000.
- ROBERTSON, C. D. & COOMBS, G. H. Characterisation of three groups of cysteine proteinases in the amastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 42(2): 269-276, 1990.
- RODRIGUEZ-CORTES, A. *et al.* Vaccination with plasmid DNA encoding KPPII, TRYP LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine*, 25(46): 7.962-7.971, 2007.
- SACKS, D. L. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. *Infectious Agents and Disease*, 1(4): 200-206, 1992.
- SACKS, D. L.; HIENY, S. & SHER, A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *The Journal of Immunology*, 135(1): 564-569, 1985.
- SACKS, D. L. *et al.* Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *The Journal of Experimental Medicine*, 181(2): 685-697, 1995.
- SANCHEZ, M. A. *et al.* A family of putative receptor-adenylate cyclases from *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(29): 17.551-17.558, 1995.
- SARAIVA, E. M. *et al.* Changes in lipophosphoglycan and gene expression associated with the development of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi*. *Parasitology*, 111(3): 275-287, 1995.
- SECUNDINO, N. *et al.* Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. *Cellular Microbiology*, 12(7): 906-918, 2010.
- SEEBECK, T.; SCHAUB, R. & JOHNER, A. cAMP signalling in the kinetoplastid protozoa. *Current Molecular Medicine*, 4(6): 585-599, 2004.
- SHAKARIAN, A. M. & DWYER, D. M. Structurally conserved soluble acid phosphatases are synthesized and released by *Leishmania major* promastigotes. *Experimental Parasitology*, 95(2): 79-84, 2000.
- SHAKARIAN, A. M. *et al.* Molecular dissection of the functional domains of a unique, tartrate-resistant, surface membrane acid phosphatase in the primitive human pathogen *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20): 17.994-18.001, 2002.
- SILVA-LOPEZ, R. E. & GIOVANNI-DE-SIMONE, S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: purification and characterization of a promastigote serine protease. *Experimental Parasitology*, 107(3-4): 173-182, 2004.
- SILVA-LOPEZ, R. E. *et al.* Subcellular localization of an extracellular serine protease in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology Research*, 93(4): 328-331, 2004.
- SOARES, R. P. *et al.* *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121(2): 213-224, 2002.
- SOARES, R. P. *et al.* *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International Journal for Parasitology*, 35(3): 245-253, 2005.
- SOARES, R. P. *et al.* Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2.010: 1-7, 2010.
- SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *The Journal of Immunology*, 180(7): 4.355-4.360, 2008.
- SOUZA LEÃO, S. *et al.* Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *Journal of Cell Science*, 108(10): 3.219-3.231, 1995.
- SPATH, G. F. *et al.* Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97(16): 9.258-9.263, 2000.

- SPATH, G. F. *et al.* The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(16): 9.536-9.541, 2003.
- STEBECK, C. E. *et al.* Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 71(1): 1-13, 1995.
- STIERHOF, Y. D. *et al.* Characterization of polymer release from the flagellar pocket of *Leishmania mexicana* promastigotes. *The Journal of Cell Biology*, 125(2): 321-331, 1994.
- TONUI, W. K. *et al.* Transmission blocking vaccine studies in Leishmaniasis: II. Effect of immunization using *Leishmania major* derived 63 kilodalton glycoprotein, lipophosphoglycan and whole parasite antigens on the course of *L. major* infection in BALB/c mice. *East African Medical Journal*, 78(2): 90-92, 2001.
- TURCO, S. J. Adversarial relationship between the *Leishmania* lipophosphoglycan and protein kinase C of host macrophages. *Parasite Immunology*, 21(12): 597-600, 1999.
- TURCO, S. J. & DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annual Review of Microbiology*, 46: 65-94, 1992.
- TURCO, S. J. *et al.* Structure of the major carbohydrate fragment of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *Biochemistry*, 26(19): 6.233-6.238, 1987.
- UZONNA, J. E. *et al.* Vaccination with phosphoglycan-deficient *Leishmania major* protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response. *The Journal of Immunology*, 172(6): 3.793-3.797, 2004.
- VICTOIR, K. *et al.* Complexity of the major surface protease (msp) gene organization in *Leishmania (Viannia) braziliensis*: evolutionary and functional implications. *Parasitology*, 131(2): 207-214, 2005.
- VINHAS, V. *et al.* Characterization of T cell responses to purified *Leishmania* antigens in subjects infected with *Leishmania chagasi*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27(5): 1.199-1.205, 1994.
- VOLF, P. *et al.* Bloodmeal digestion and *Leishmania major* infections in *Phlebotomus duboscqi*: effect of carbohydrates inhibiting midgut lectin activity. *Medical and Veterinary Entomology*, 15(3): 281-286, 2001.
- WALTERS, L. L. *et al.* Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(3): 295-317, 1989.
- WEINHEBER, N. *et al.* Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. *European Journal of Immunology*, 28(8): 2.467-2.477, 1998.
- WEISE, F. *et al.* Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *Journal of Cell Science*, 113(24): 4.587-4.603, 2000.
- WU, Y. *et al.* A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 110(2): 345-357, 2000.
- XU, D. *et al.* Protection against *Leishmania major* infection in genetically susceptible BALB/c mice by gp63 delivered orally in attenuated *Salmonella typhimurium* (AroA- AroD-). *Immunology*, 85(1): 1-7, 1995.
- YAO, C. *et al.* Multiple products of the *Leishmania chagasi* major surface protease (MSP or GP63) gene family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 135(2): 171-183, 2004.
- YAO, C. *et al.* Internal and surface subpopulations of the major surface protease (MSP) of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 139(2): 173-183, 2005.
- YONEYAMA, K. A. *et al.* Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. *Journal of Lipid Research*, 47(10): 2.171-2.178, 2006.
- ZUFFEREY, R. *et al.* Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(45): 44.708-44.718, 2003.

**SHORT REPORT**

**Open Access**

## Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp

Mariana Silva-Almeida<sup>†</sup>, Franklin Souza-Silva<sup>†</sup>, Bernardo Acácio Santini Pereira, Michelle Lopes Ribeiro-Guimarães and Carlos Roberto Alves\*

### Abstract

**Background:** The genus *Leishmania* includes protozoan parasites that are able to infect an array of phlebotomine and vertebrate species. Proteases are related to the capacity of these parasites to infect and survive in their hosts and are therefore classified as virulence factors.

**Findings:** By analyzing protease genes annotated in the genomes of four *Leishmania* spp [*Leishmania (Leishmania) infantum*, *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* and *L. (Viannia) braziliensis*], these genes were found on every chromosome of these protozoa. Four protease classes were studied: metallo-, serine, cysteine and aspartic proteases. Metalloprotease genes predominate in the *L. (V.) braziliensis* genome, while in the other three species studied, cysteine protease genes prevail. Notably, cysteine and serine protease genes were found to be very abundant, as they were found on all chromosomes of the four studied species. In contrast, only three aspartic protease genes could be detected in these four species. Regarding gene conservation, a higher number of conserved alleles was observed for cysteine proteases (42 alleles), followed by metalloproteases (35 alleles) and serine proteases (15 alleles).

**Conclusions:** The present study highlights substantial differences in the organization of protease genes among *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* and *L. (V.) braziliensis*. We observed significant distinctions in many protease features, such as occurrence, quantity and conservation. These data indicate a great diversity of protease genes among *Leishmania* species, an aspect that may be related to their adaptations to the peculiarities of each microenvironment they inhabit, such as the gut of phlebotomines and the immune cells of vertebrate hosts.

**Keywords:** *Leishmania*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, Proteases

### Background

The World Health Organization classifies the leishmaniasis, infections caused by parasites of the genus *Leishmania*, among emerging diseases that lack effective control. Annually, an estimated 1.3 million new cases occur and 20,000 to 30,000 deaths are attributed to these diseases [1]. The clinical forms range in severity and are classified as follows: punctuate skin lesions to oronasal disfigurement are classified as cutaneous leishmaniasis (CL), whereas fatal systemic infections are classified as visceral leishmaniasis (VL). *Leishmania* spp are distributed worldwide and are organized into subgenera and species complexes. Their

transmission to mammalian hosts occurs during the blood meal of infected sandflies, which in turn acquire the parasites when feeding on an infected host, thus maintaining the cycle of the disease. The species grouped into the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex, including *L. (L.) infantum*, are the agents of VL. As for the species commonly associated with CL, *L. (L.) major* is reported in the Old World, whereas *L. (L.) mexicana* and *L. (Viannia) braziliensis* are the main species reported in the New World. This latter species is also associated with the mucocutaneous form of the disease.

In a recent review study, we have highlighted the pivotal roles of proteases as virulence factors for *Leishmania* spp [2]. Such enzymes have been implicated in many parasitic activities, such as tissue invasion, survival in macrophages and host immune response modulation.

\* Correspondence: calves@ioc.fiocruz.br

<sup>†</sup>Equal contributors

Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro CEP 21040-900, Brasil



© 2014 Silva-Almeida et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



Proteases are classified according to their physicochemical features as: optimal pH for activity, kind of catalytic activity, nature of catalytic site and homology with reference structure [3]. According to the enzymatic nomenclature committee, the Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), peptidases are allocated into the Enzyme Class (EC) 3 (hydrolases) and subclass 3.4 (peptidases). They can be subdivided into exopeptidases (EC 4.11 - EC4.19) and endopeptidases (EC 3.4.21 - 3.4.25), and the latter are organized according to the amino acids related to catalysis and the nature of catalytic site [4]. In addition, endopeptidases are further divided into classes according to the main catalytic mechanism involved in their hydrolytic activities, e.g., serine, threonine, aspartate, metallo- and cysteine proteases [4].

The aim of the present study is to analyse the genomic organization of proteases in four *Leishmania* species known to cause disease in humans: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* and *L. (L.) infantum*, and, concomitantly, to evaluate their diversity among these species. Due to the importance of these enzymes in the life cycle of these parasites, the genomic data gathered here would be very useful as a basis for further studies correlating infection characteristics of each of the studied species with their protease richness. Understanding how these enzymes are organized and conserved (or diverged) in the different *Leishmania* subgenera and species is very useful in helping to identify new targets with the most potential for chemotherapy or vaccination strategies.

### Findings and discussion

We performed a comparative genomic analysis on the organization of protease genes in four species, a methodology we applied to identify species-specific features that may account for phenotypic or virulence differences among the studied species. Gene divergence, acquisition, loss, and rearrangement within and between syntenic regions have shaped the genomes of the trypanosomatids [5] and can explain the organization and diversity of the degradome (the complete set of protease genes encoded by the genome of a certain organism) of *Leishmania* spp [6]. Initially, we performed a survey of the predicted protease sequences present in the annotated genomes of *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* and *L. (L.) infantum* in the GeneDB genome database [7]. This survey was conducted using the following keywords: protease, peptidase, proteinase, aspartic protease, cysteine protease, serine protease and metalloprotease.

In an initial analysis of the data retrieved by the methodology above, the abundance of protease genes in the genomes of each of the studied species was defined. While protease genes account for 2.18% of the total genes in *L. (V.) braziliensis*, these genes account for smaller percentages in the other species: 1.61% in *L. (L.)*

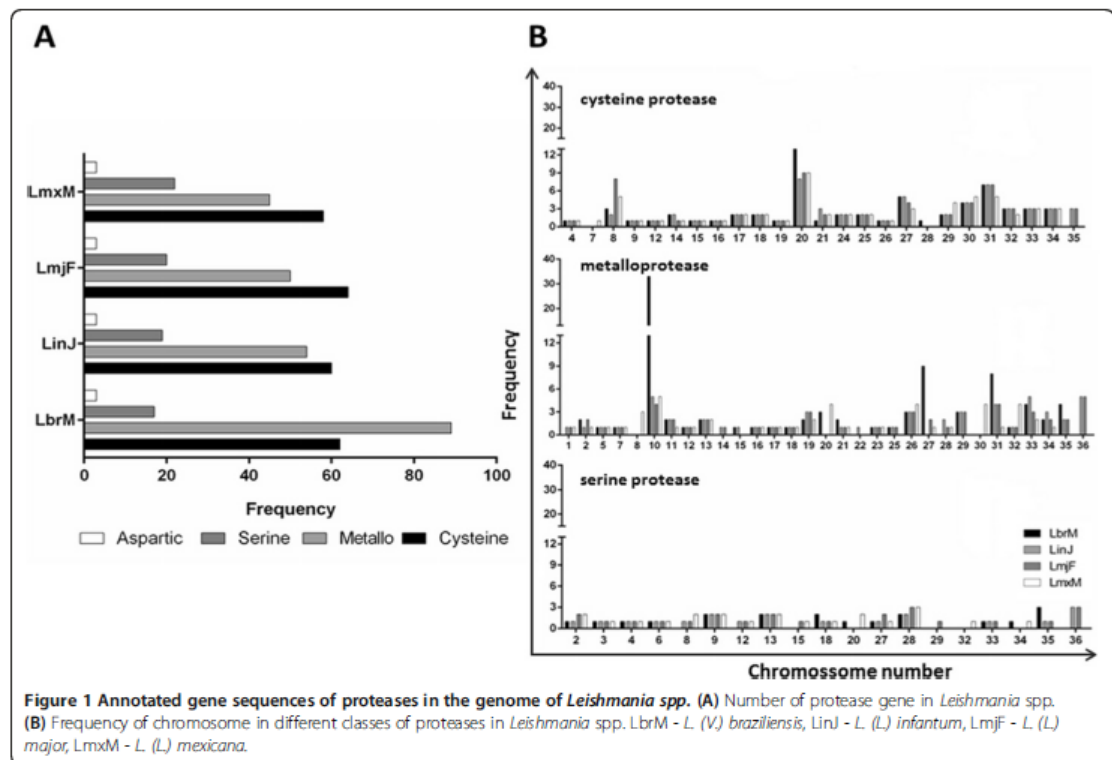
*infantum*, 1.52% in *L. (L.) mexicana* and 1.41% in *L. (L.) major*.

Metalloprotease genes predominate in *L. (V.) braziliensis*, while in the other species the cysteine protease genes prevail. Our analysis showed that 52% of the protease genes in *L. (V.) braziliensis* are metalloproteases and this same class accounts for 40% of protease genes in *L. (L.) infantum* and 35% in *L. (L.) major* and *L. (L.) mexicana*. The percentages of cysteine and serine protease gene are close among the studied species: cysteine protease genes represent 36 to 47% of the total protease genes, whereas serine protease genes represent 10 to 16%. Very few aspartic protease genes were identified, amounting to only three in each of the four species (Figure 1).

A very interesting finding we observed is that protease genes are present in every chromosome of the studied *Leishmania* spp, but occur in different frequencies (Figure 1). This discovery is consistent with the previously reported importance of proteases for these parasitic organisms, as it reveals that genes encoding these enzymes are abundantly scattered among the *Leishmania* spp genomes, and is, complementarily, an indication of the distinct pattern evolution has impinged over the different species.

Other studies regarding gene organization in *Leishmania* spp have been conducted before and related the structural configuration of the genes with important functional features. The organization of genes in tandem repeats allows parasites to quickly generate a high number of transcripts that may be needed in large amounts [8]. Other authors hypothesize that *Leishmania* spp. might have a strategy to increase mRNA levels by duplicating genes on disomic chromosomes or by forming supernumerary chromosomes [9].

Of the chromosomes that we identified as containing metalloprotease genes, 18 are common for all studied species. Notably, the presence of metalloprotease genes on chromosomes 8 and 30 is exclusive to *L. (L.) mexicana*. Similar exclusiveness for the presence of metalloprotease genes was observed for chromosome 22 in *L. (L.) infantum* and chromosome 20 in *L. (V.) braziliensis*. Cysteine protease genes are present in 22 chromosomes common to all four species studied. Cysteine protease genes are also present on chromosome 7 exclusively in *L. (L.) mexicana*, on chromosome 28 in *L. (V.) braziliensis* and on chromosome 35 in *L. (L.) infantum* and *L. (L.) major*. Serine protease genes are present in 9 chromosomes common to all four species studied and the number of these genes does not exceed three per chromosome. The presence of genes for this protease class on chromosome 29 is exclusive to *L. (L.) major* and on chromosome 20 to *L. (V.) braziliensis*. The protease class found to have the fewest coding genes was aspartic proteases: only three genes for this class were observed, but the chromosomes on which they are present



are common to all studied species. These genes are located on chromosomes 1, 15 and 29 (Figure 1).

Regarding genes for different protease classes that occur on the same chromosome, most of the studied chromosomes were found to contain genes for multiple protease classes. The exceptions were chromosomes 3 and 6, which were found to contain only serine protease genes and chromosomes 5, 11 and 22, which were found to contain only metalloprotease genes.

Due to fusion events that occurred in *Leishmania* chromosomes, we observed an interesting pattern of organization of protease genes where the same arrangement of alleles is maintained across different species but is located on different chromosomes. Graphical representations of such fusion events were developed using the Artemis and ACT software [10] (Additional file 1: Figure S1 to S8).

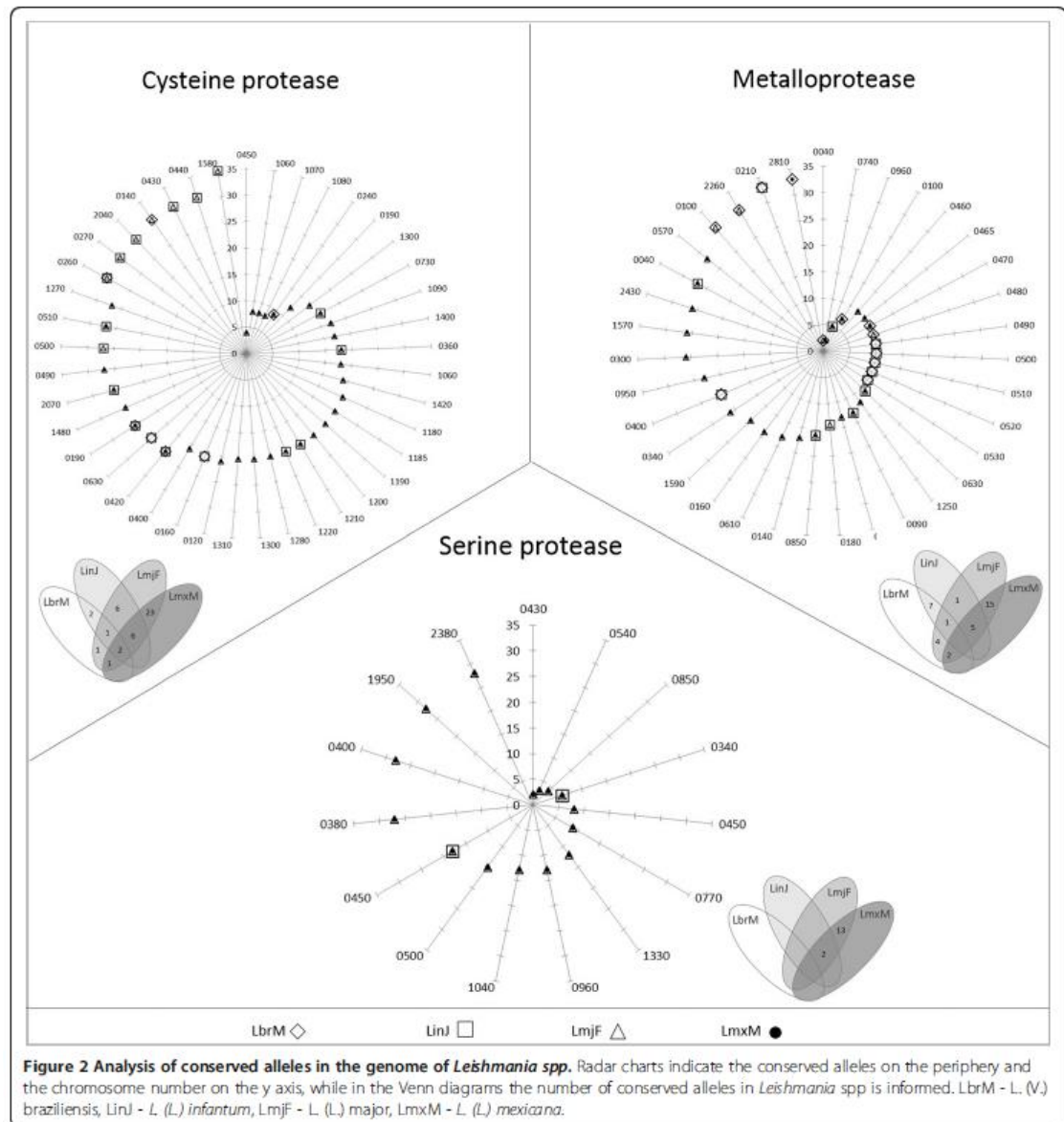
Nevertheless, there is a trend of conservation of some alleles in the same chromosomes across the studied *Leishmania* species. We observed 42 conserved alleles of cysteine proteases, 35 of metalloproteases and 15 of serine proteases (Figure 2). The conserved alleles are predominantly grouped on chromosome 10 for cysteine proteases, chromosome 30 for metalloproteases and chromosome 28 for serine proteases.

Among all the analysed protease genes, only two alleles were found to be conserved on the same chromosome for all four species: alleles of cysteine protease genes coding for ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases (Clan CA, family C12) located on chromosomes 24 and 25 (alleles 0420 and 0190, respectively) of all species.

Notably, *L. (L.) major* and *L. (L.) mexicana* were found to show more synteny than the other species, containing 23, 15 and 13 conserved alleles for cysteine, metallo- and serine proteases, respectively. Conversely, *L. (V.) braziliensis* was not found to show synteny for serine protease genes of any other species. Although this absence of synteny was observed in the only species in our analysis classified into a different subgenus, it has been proposed by Peacock *et al.* [11] that such absence would not necessarily indicate a lineage-specific diversity in *Leishmania* spp.

One of the first comparative genomic studies of *Leishmania* showed that despite phenotypic variations among species, only a few genes are truly species-specific [11]. In agreement with such reports, we also observed few genes that do not show similarity to any others. They show sequence identities lower than 80% to other genes (Additional file 2: Table S1). This is an important finding, as these exclusive genes can help explain why these



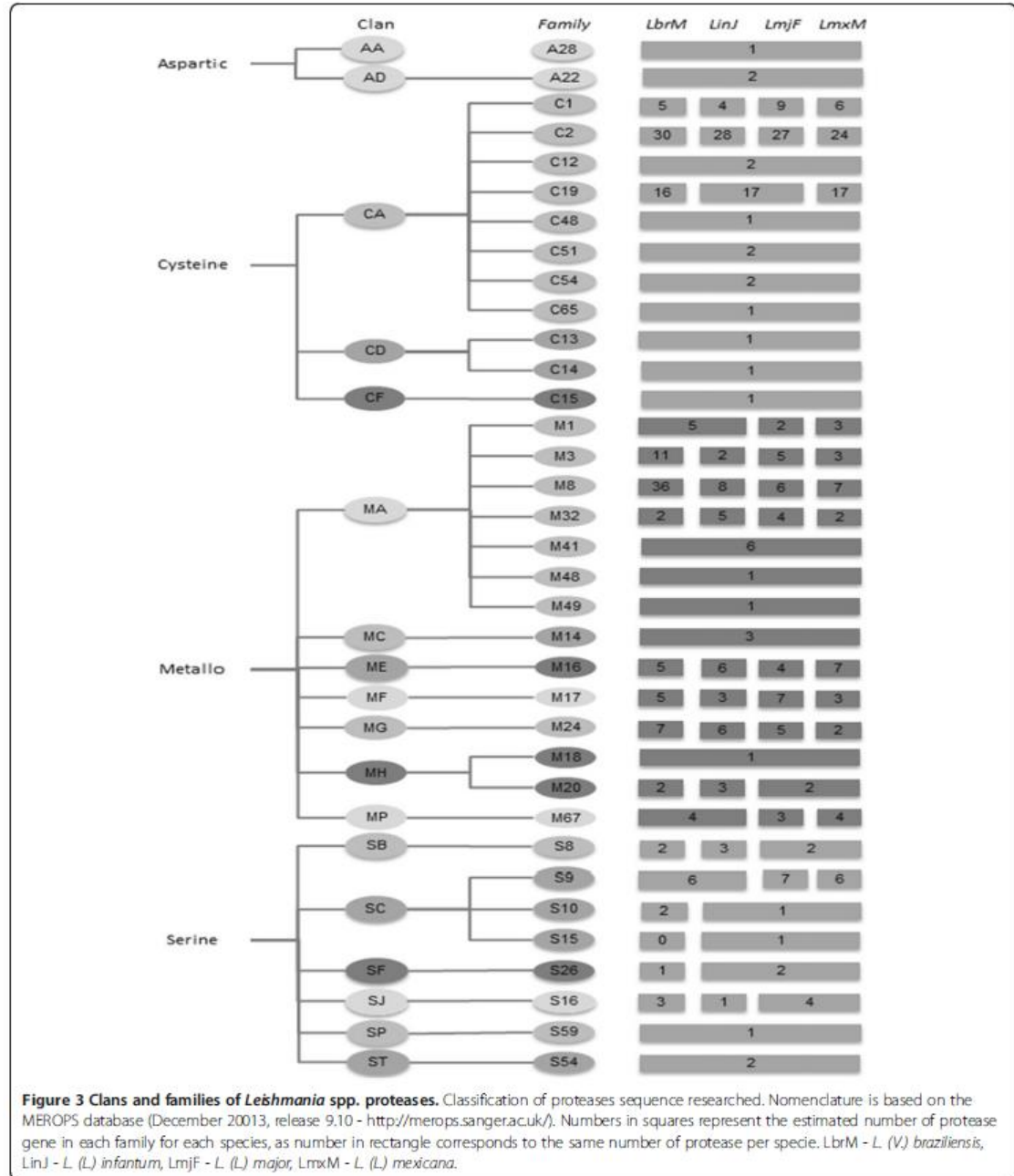


species cause different forms of diseases and are present in specific vectors and hosts. Previously, it was reported that more than 99% of genes are conserved between *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) infantum* and *L. (L.) major*, revealing a high degree of synteny for genomes of different *Leishmania* species [11]. Our data indicates that, when analysing strictly protease genes, this same scenario holds up, as we also observed high synteny between the studied species.

When contemplating the usefulness of parasite proteases as new targets for chemotherapies, it is very important to consider the hypothesis that these enzymes are unique to the *Leishmania* species and quite different from corresponding enzymes in their mammalian hosts, such as humans and dogs. Thus, to verify this hypothesis, we conducted a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analysis to compare the genes that show synteny among the greater

number of the four species (represented in the intersection of the Venn diagram – Figure 2) with mammalian protease genes (taxid:40674). The genes 05.0960 and 11.0630 of *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) major* show the highest degree of relational similarity with mammalian genes, with approximately 69%

sequence identity and a query coverage of up to 39%. However, in general, the query coverage was very low, with a mean value of 2%. In addition, to perform a similar study with other proteases that did not show synteny among all the studied species, we used a different approach.



**Figure 3 Clans and families of *Leishmania* spp. proteases.** Classification of proteases sequence researched. Nomenclature is based on the MEROPS database (December 20013, release 9.10 - <http://merops.sanger.ac.uk/>). Numbers in squares represent the estimated number of protease gene in each family for each species, as number in rectangle corresponds to the same number of protease per specie. LbrM - *L. (V.) braziliensis*, LinJ - *L. (L.) infantum*, LmjF - *L. (L.) major*, LmxM - *L. (L.) mexicana*.

Initially, a multiple alignment analysis was carried out on the sequences of protease genes of the four species (software *CD-HIT* [12]), using a cutoff of 80% sequence identity to cluster them. As result, we were able to establish 28 clusters of metalloprotease genes, 27 of cysteine protease genes, 11 of serine protease genes and 1 of aspartic protease genes.

The consensus sequences (Additional file 2: Table S2) of each cluster were then used in the BLAST analysis to find similarity with mammalian genes. We identified sequences of O-sialoglycoprotein endopeptidase genes of hamster, dog, wolf and mice with 69% sequence identity to a consensus sequence of *Leishmania* metalloprotease genes LbrM.31.0100, LinJ.31.0110, LmjF.31.0100 and LmxM.31.0100. Sequences of 26S subunit ATPase genes of a lagomorph *Ochotona princeps* and of mice showed 65% sequence identity to a consensus sequence of serine protease genes LbrM.03.0450, LinJ.03.0520, LmjF.03.0540 and LmxM.03.0540. Additionally, we could not find any similarity among sequences of cysteine and aspartic protease genes of mammals and *Leishmania* spp.

As proteases can be grouped into different families and clans depending on intrinsic evolutionary relationships, we classified and organized the protease genes surveyed in this study applying criteria from MEROPS [13] (up to December 2013) (Figure 3). This classification is based on structural and functional similarities between these proteolytic enzymes. Clans contain enzymes with related structures and families contain enzymes with related sequences [4]. This classification is highly relevant to understanding the organization of these parasites' degradomes.

Cysteine proteases and metalloproteases are the major representative classes of proteases in this study, corresponding to 43% and 42%, respectively of the protease genes in the studied *Leishmania* spp. In this survey, three clans of cysteine proteases were observed in the studied species: clan CA, CD and CF. These cysteine proteases are distributed among 11 families from which C1, C2 and C19 have more members. The MPs observed in the study belong to the clans MA, MC, ME, MF, MG, MH and MP and are further distributed among 14 families (Figure 3). The diversity of protease genes observed in the analysis reinforces the idea that this class of enzyme is crucial to the parasite lifecycle, although until now the role of most of these proteases can only be predicted based on current knowledge of homologous enzymes, therefore pointing to the necessity of more studies characterising proteases [14].

The high number of metalloprotease genes in *L. (V.) braziliensis* relates to the 36 distinct genes of the zinc metalloprotease gp63. This metalloprotease is a very well-characterised virulence factor for *L. (L.) braziliensis* and has several reported functions in the interactions of this

parasite with its hosts [15]. In *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* and *L. (L.) infantum*, the diversity of gp63 genes is much lower: only 6, 7 and 8 genes, respectively, of this protease could be found (Figure 3). The organization of metalloprotease genes in species of the subgenus *Viannia* is rather different than that of species of the subgenus *Leishmania* [16]. The predominance of metalloprotease genes in *L. (V.) braziliensis*, a peculiarity also observed in *L. (V.) guyanensis* [17], has a biological significance not completely understood [8,18]. Amplification of genes is a common phenomenon in *Leishmania* [19-21] and is a likely source of the differences between the two subgenera. Such interesting variation might have fundamental implications for the way each species interacts with its hosts.

Our study highlights the informative potential of analysing genome databases for understanding the gene organization of parasites. However, one should be aware that not all annotated proteases have described roles in the *Leishmania* life cycle. Thus, the picture observed here is not yet complete.

It is still unclear how the current organization of *Leishmania* spp genomes evolved, but the set of results gathered here emphasises the capacity of *Leishmania* species to use the plasticity of their genomes to modulate their phenotypes and increase their odds of survival within hosts, among other biological processes. The diversity of protease genes described by our present study points to their potential importance as survival and adaptation tools and, consequently, as important targets in vaccination and therapy strategies.

#### Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Representation of fusion events between chromosomes 29 and 8 of *L. (L.) major* (LmjF) and *L. (L.) mexicana* (LmxM), respectively. **Figure S2.** Representation of allelic transpositions between chromosomes 30 and 29 of *L. (L.) major* (LmjF) and *L. (L.) mexicana* (LmxM), respectively. **Figure S3.** Representation of allelic transpositions between chromosomes 31 and 30 of *L. (L.) major* (LmjF) and *L. (L.) mexicana* (LmxM), respectively. **Figure S4.** Representation of allelic transpositions between chromosomes 32 and 31 of *L. (L.) major* (LmjF) and *L. (L.) mexicana* (LmxM), respectively. **Figure S5.** Representation of allelic transpositions between chromosomes 33 and 32 of *L. (L.) major* (LmjF) and *L. (L.) mexicana* (LmxM), respectively. **Figure S6.** Representation of allelic transpositions between chromosomes 34 and 33 of *L. (L.) major* (LmjF) and *L. (L.) mexicana* (LmxM), respectively. **Figure S7.** Representation of allelic transpositions between chromosomes 35 and 34 of *L. (L.) major* (LmjF) and *L. (L.) mexicana* (LmxM), respectively. **Figure S8.** Representation of fusion events between chromosomes 36 and 20 of *L. (L.) major* (LmjF) and *L. (L.) mexicana* (LmxM), respectively.

**Additional file 2: Table S1.** Protease genes exclusive to each *Leishmania* sp. amongst the four studied species. **Table S2.** Cluster of genes.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.



#### Authors' contributions

MSA, FSS and CRA formulated the idea and wrote the manuscript; MSA, FSS, and MFM performed the analysis processes. MSA, FSS, CRA, BASP, provided critical comments to the methods and the discussion. All authors approved the final version of this manuscript.

#### Acknowledgements

We thank FAPERJ (E-26/102413/2010, E-26/110592/2012) and CAPES (23038.007057-98) for partial financial support of this research. Mariana Silva-Almeida and Franklin Souza-Silva are doctoral students of Fiocruz institution; Dr. Bernardo A. S. Pereira and Dr. Michelle Lopes Ribeiro-Guilmarães are postdoctoral researcher's fellow of CAPES/FAPERJ; and Dr. Carlos R. Alves is fellow researcher of CNPq institution.

Received: 7 May 2014 Accepted: 14 August 2014

Published: 20 August 2014

#### References

1. WHO: *Fact sheet n° 375*. 2014. updated January 2014 [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/]
2. Silva-Almeida M, Pereira BA, Ribeiro-Guilmarães ML, Alves CR: **Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals.** *Parasit Vectors* 2012, **7**(5):160.
3. Barrett AJ: **Classification of peptidases.** *Methods Enzymol* 1994, **244**:1–15.
4. Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A: **MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors.** *Nucleic Acids Res* 2014, **42**(Database Issue):D503–509.
5. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renaud H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tan AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Brindaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC, et al: **Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa.** *Science* 2005, **309**:404–409.
6. López-Otin C, Overall CM: **Protease degradomics: a new challenge for proteomics.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**(7):509–519.
7. GeneDB. [www.genedb.org]
8. Victoir K, Dujardin JC: **How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*.** *Trends Parasitol* 2002, **18**(2):81–85.
9. Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, Harris D, Her Y, Herzyk P, Imamura H, Otto TD, Sanders M, Seeger K, Dujardin JC, Berriman M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Mottram JC: **Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*.** *Genome Res* 2011, **21**(12):2129–42.
10. Carver T, Berriman M, Tivey A, Patel C, Bohme U, Barrell BG, Parkhill J, Rajandream MA: **Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database.** *Bioinformatics* 2008, **24**:2672–2676.
11. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhroum A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabinowitz E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Brindaud F, Baldauf SL, et al: **Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease.** *Nat Genet* 2007, **7**:839–847.
12. Li W, Jaroszowski L, Godzik A: **Clustering of highly homologous sequences to reduce the size of large protein databases.** *Bioinformatics* 2001, **17**(3):282–283.
13. MEROPS. [http://meropssanger.ac.uk/]
14. Mottram JC, Coombs GH, Alexander J: **Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*.** *Curr Opin Microbiol* 2004, **7**:375–381.
15. Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT: ***Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63.** *Microbes Infect* 2012, **14**(15):1377–1389.
16. Voth BR, Kelly BL, Joshi PB, Ivens AC, McMaster WR: **Differentially expressed *Leishmania major* gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment.** *Mol Biochem Parasitol* 1998, **93**(1):31–41.
17. Steinkraus HB, Greer JM, Stephenson DC, Langer PJ: **Sequence heterogeneity and polymorphic gene arrangements of the *Leishmania guyanensis* gp63 genes.** *Mol Biochem Parasitol* 1993, **62**:173–185.

18. Victoir K, Arevalo J, De Doncker S, Barker DC, Laurent T, Godfroid E, Bollen A, Le Ray D, Dujardin JC: **Complexity of the major surface protease (msp) gene organization in *Leishmania (Vannia) braziliensis*: evolutionary and functional implications.** *Parasitology* 2005, **131**:207–214.
19. Iovannisi DM, Beverley SM: **Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array.** *Mol Biochem Parasitol* 1989, **34**:177–188.
20. Inga R, De Doncker S, Gomez J, Lopez M, Garcia R, Le Ray D, Arevalo J, Dujardin JC: **Relation between variation in copy number of ribosomal RNA encoding genes and size of harbouring chromosomes in *Leishmania* of subgenus *Vannia*.** *Mol Biochem Parasitol* 1998, **92**:219–228.
21. Kebede A, De Doncker S, Arevalo J, Le Ray D, Dujardin JC: **Size-polymorphism of mini-exon gene-bearing chromosomes among natural populations of *Leishmania*, subgenus *Vannia*.** *Int J Parasitol* 1999, **29**:549–557.

doi:10.1186/1756-3305-7-387

Cite this article as: Silva-Almeida et al.: Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. *Parasites & Vectors* 2014 **7**:387.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



REVIEW

Open Access

# Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals

Mariana Silva-Almeida, Bernardo Acácio Santini Pereira, Michelle Lopes Ribeiro-Guimarães and Carlos Roberto Alves\*

## Abstract

*Leishmania* parasites cause human tegumentary and visceral infections that are commonly referred to as leishmaniasis. Despite the high incidence and prevalence of cases, leishmaniasis has been a neglected disease because it mainly affects developing countries. The data obtained from the analysis of patients' biological samples and from assays with animal models confirm the involvement of an array of the parasite's components in its survival inside the mammalian host. These components are classified as virulence factors. In this review, we focus on studies that have explored the role of proteinases as virulence factors that promote parasite survival and immune modulation in the mammalian host. Additionally, the direct involvement of proteinases from the host in lesion evolution is analyzed. The gathered data shows that both parasite and host proteinases are involved in the clinical manifestation of leishmaniasis. It is interesting to note that although the majority of the classes of proteinases are present in *Leishmania* spp., only cysteine-proteinases, metalloproteinases and, to a lesser scale, serine-proteinases have been adequately studied. Members from these classes have been implicated in tissue invasion, survival in macrophages and immune modulation by parasites. This review reinforces the importance of the parasite proteinases, which are interesting candidates for new chemo or immunotherapies, in the clinical manifestations of leishmaniasis.

**Keywords:** *Leishmania* spp., Leishmaniasis, Protease, Proteinase, Lesion

## Review

### Introduction

Leishmaniasis is a vector-borne infection that is present in the Americas, Africa, eastern Europe, western and central Asia, India and Australia [1,2]. The genus *Leishmania* includes protozoan parasites that cause several types of human infections ranging from the visceral form to the tegumentary forms (cutaneous, diffuse cutaneous, mucocutaneous and post-kalazar dermal). In addition to humans, animals such as dogs, rodents and marsupials are also susceptible to *Leishmania* infections [3].

Currently, it is estimated that 1–1.5 million new cases of tegumentary leishmaniasis and 0.5 million new cases of the visceral form occur each year [4], and the number of leishmaniasis cases occurring outside of the endemic

countries has been increasing due to tourism, military operations and the movement of immigrants from endemic countries [5]. There are two evident morphological phases in the life cycle of these protozoa: (1) elongated promastigotes with visible flagella that inhabit sandfly guts and (2) round-shaped amastigotes without visible flagella that inhabit mammalian cells [6]. During the natural infection, the metacyclic promastigotes are carried by the blood-sucking sandflies that mediate the transmission between mammalian hosts. It has been reported that, in some human cases, the hosts may remain asymptomatic for a long time and thus play an important role in the vector-borne transmission of leishmaniasis in their regions [7].

During the blood meal, the insect vector deposits metacyclic promastigotes in the skin of its host. These promastigotes are the virulent form of *Leishmania* and initiate the infection. The first sign of infection is a small erythema at the site of the sandfly bite that develops after a variable incubation period. The erythema

\* Correspondence: calves@ioc.fiocruz.br  
Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, IOC, Fiocruz, Avenida Brasil, 4365 Manguinhos Pavilhão Leônidas Deane – sala 209, CEP: 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

progresses into a papule and then into a nodule that gradually ulcerates over a period ranging from two weeks to six months, eventually becoming the characteristic lesion of localized cutaneous leishmaniasis, as reviewed by [8]. Once in the skin, the parasites are exposed to new microenvironments, such as the extracellular matrix (ECM) of connective tissue, and must interact with a variety of obstacles, including basement membrane proteins, until establishing infection within macrophage phagolysosomes [9,10].

Currently, it is known that the distinct clinical manifestations of leishmaniasis are dependent upon the parasite species and the status of the host's immune system [10] and result from interactions between host immune factors and parasite components. These manifestations can be divided into three main profiles: (1) an anergic pole, where ulceration is not observed even with a high parasite number in the lesion, characterizes the diffuse cutaneous form; (2) an equilibrated profile characterizes the localized cutaneous form or benign disease, and (3) a hypergenic pole that is observed in mucosal leishmaniasis, in which few parasites are found in the lesions despite the elevated cellular response of the host [11-14].

Some parasite components are characterized as virulence factors that contribute to *Leishmania* pathogenesis and enable the parasite to invade and establish infection in the mammalian host [15]; these virulence factors include glycoinositolphospholipids (GIPs), lipophosphoglycan (LPG), proteophosphoglycan (PPG) and the 11 kDa kinetoplastid membrane protein (KMP-11). Although the exact impact of these *Leishmania* components on the clinical manifestations observed in mammalian hosts is not yet defined, there is evidence that these components modulate the interactions between *Leishmania* and host immune cells.

For example, GIPs were reported to help *Leishmania* (*Leishmania*) *major* survive inside macrophages by inhibiting nitric oxide synthase [16] and protein kinase C [17]. Recently, a correlation was shown between the rate of macrophage infection by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and the GIP-containing detergent-resistant membrane domains of this parasite [18].

Lipophosphoglycan is a macrophage ligand that is directly involved in the initial stages of the infection. Assays carried out with a mutant strain of *L. (L.) major* deficient in the gene *lpg1* (*lpg1*<sup>-</sup>) showed that the mutant parasites are attenuated for virulence during infections of murine macrophages, despite presenting no major phenotypical changes. These parasites lacked LPG but contained normal levels of related glycoconjugates and GPI-anchored proteins. The *lpg1*<sup>-</sup> promastigotes are highly susceptible to the complement system and to the oxidants produced by host cells. In addition, they lose their ability to inhibit phagolysosome fusion. It has also

been reported that *L. (L.) major* LPG2 null mutants (*lpg2*<sup>-</sup>) were unable to survive in sandflies or in mammalian host cells. These parasites were more altered than the *lpg1*<sup>-</sup> mutants and lacked all phosphoglycans, including LPG and proteophosphoglycans [19-23]. *Leishmania* LPG has been shown to impair the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in monocytes, leading to a subsequent decrease in IL-12 production [24], and can also influence the host's early immune responses by modulating dendritic cells by inhibiting antigen presentation and promoting an early IL-4 response [25].

Proteophosphoglycans are highly glycosylated polypeptides with O-glycosylations similar to those found in the LPG and acid phosphatase [26,27]. The function of membrane PPGs is not entirely clear, but it is speculated that its long chain that covers the plasma membrane of the parasite could play some role in binding to macrophage receptors. The secretion of modified PPG by parasites within macrophages appears to contribute to maintenance of the parasitophorous vacuole [28]. Additionally, the PPG is also able to activate complement via mannose-binding protein [29].

KMP-11 is a hydrophobic protein that has been described to be associated to LPG [30]. This protein has presented immunoregulatory properties and is able to induce the expression of IL-10 in cells from patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis [31]; however, the mechanism through which this effect occurs remains unclear.

#### Proteinases of *Leishmania* as virulence factors

Proteinases are also important virulence factor candidates, as they are enzymes that hydrolyze peptide bonds and thus have the potential to degrade proteins and peptides that participate in a broad range of biological functions, including the infection process (Table 1). Proteinases occur ubiquitously in biological systems and have functions that range from the digestion of proteins for nutritive purposes to the exquisite control of protein function by hydrolyzing a highly specific peptide bond in a protein substrate [32].

They can be classified, based on their catalytic domains, as serine-, threonine-, aspartyl-, metallo- and cysteine-proteinases [63]. Among these, only the aspartyl-, metallo- and cysteine-proteinase classes have been extensively studied in *Leishmania* species [64-67].

There are several examples of parasite proteinases being involved in pathogenesis and playing roles in parasite invasion and migration through host tissues, degradation of immune related proteins, immune evasion and activation of inflammation [68]. In protozoan parasites, proteinases play key roles in the life cycle transitions, invasion of hosts, migration through tissue barriers, degradation of hemoglobin and other blood proteins,



**Table 1 Immunological actions of proteinases on the mammalian immune system that drive clinical manifestations of Leishmaniases**

Proteinase classes	<i>Leishmania</i> species	Activities on mammalian host	References	
Cysteine proteinase	<b>CPA</b>	<i>L. (L.) infantum</i>	Related to the ability to infect mammalian hosts cells <i>in vitro</i> ;	[33]
	<b>CPB</b>	<i>L. (L.) mexicana</i>	Associated with a Th2 profile in BALB/c mice: inducing lesions; IL-4 and IL-5 production; inhibition of IL-12 production by cleaving NF- $\kappa$ B; inhibition of NO production by cleaving the STAT-1 and AP-1 transcription factors.	[34-42]
		<i>L. (L.) amazonensis</i>	Associated with a Th1 profile in C3HeB/FeJ and C57BL/6 mice: expression of Th1-associated cytokines;	[43-46]
	<i>L. (L.) major</i>	<i>L. (L.) major</i>	Associated with the cleavage of MHC class II gene products in mice;	[43-46]
		<i>L. (L.) major</i>	Epitopes from CPB COOH-terminal extension modulate infection in BALB/c and CBA mice: induce Th1 or Th2-related cytokines; stimulate CD8+ T lymphocytes;	[43-46]
	<i>L. (L.) major</i>	<i>L. (L.) major</i>	Endogenous CP inhibitors are related with immune modulation	[43-46]
		<i>L. (L.) major</i>	Associated with a Th1 profile and reduction of IFN- $\gamma$ expression in C3HeB/FeJ mice;	[37]
	<i>L. (L.) pifanoi</i>	<i>L. (L.) pifanoi</i>	Reduces the percentage of infected murine macrophages when parasites are treated with an anti-C-terminal extension antibody	[47]
	<i>L. (L.) chagasi</i>	<i>L. (L.) chagasi</i>	Associated with Th1 profile in asymptomatic patients and IFN- $\gamma$ production in cell cultures;	[48]
		<i>L. (L.) chagasi</i>	Related to Th1 and Th2 profiles in cells from symptomatic human patients and dogs: IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 production in cell cultures;	[48]
<b>CPC</b>	<i>L. (L.) mexicana</i>	Contributes to resisting killing by macrophages	[49-51]	
	<i>L. (L.) chagasi</i>	Induces TGF- $\beta$ expression in human cell culture	[52]	
Metallo-proteinases	<b>M8</b>	<i>Leishmania</i> spp.	Related to the hydrolysis and inactivation of immunoglobulin G; Inactivation of C3b factor to complement C3b; Adhesion and internalization in macrophages; downregulation of gp63 expression induces Th1 profile in mice; cleave NF- $\kappa$ B and prevent expression of IL-12 and iNOS in mice	[53-56]
		<i>L. (L.) major</i>	Associated with human NK cells proliferation and cleavage CD4 glycoprotein on human T cells in culture.	[57,58]
		<i>L. (L.) mexicana</i>	In murine bone marrow macrophages, interferes with signaling cascades and affects transcription factors by cleaving c-Jun, the central component of AP-1, alters signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases in murine macrophages	[59]
Serine proteinases	<b>OPB</b>	<i>L. (L.) donovani</i>	Allows parasites to infect the murine macrophage	[60,61]
		<i>L. (L.) major</i>	Related to maintenance of murine macrophage infection	[62]

immune evasion, and activation of inflammation in the mammalian host [67,68].

A comparative genomic analysis carried out with the different species of the genus *Leishmania* that have been sequenced revealed that the number of proteinase genes is kept constant among the various species. However, there is a high diversity of proteinases in *Leishmania*, as a survey of multiple databanks reveals that *L. (V.) braziliensis* alone has at least forty-four cysteine proteinases, twenty-three serine proteinases and ninety-seven metalloproteinase (<http://tritypdb.org>, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Therefore, due to the broad spectrum of action of *Leishmania* proteinases while the parasite is inside the mammalian host, it is reasonable to propose a correlation between proteinase activity and the clinical manifestation of leishmaniasis.

#### Cysteine-proteinases from *Leishmania* as virulence factors

Many studies have identified cysteine proteinases (CPs) as prevalent virulence factors in species that are classified under the *Leishmania (Leishmania) mexicana*

complex, especially in the murine infection model used for most of the CP studies. The efficacy of the use of CP inhibitors for infection control can be interpreted as evidence of the importance of these enzymes during the establishment of the infection in the host [69].

Cysteine proteases are enzymes that are known to play critical roles in the pathogenesis of other parasitic protozoa infections, as reviewed by [70], thus their importance as virulence factors and their potential as drug targets and vaccine candidates has been investigated extensively. The most studied CPs in *Leishmania* are designated CPA, CPB and CPC, all of which are papain-like and belong to the same group of CPs, clan CA, that is divided into families, as follows: family C, including cathepsin B-like (e.g., CPC) and cathepsin L-like (e.g., CPA and CPB) enzymes; family C2, including calpain-like enzymes; and others [34,67,69-72].

Several CP genes have been characterized in *Leishmania*, mainly in species of the *L. (L.) mexicana* complex, such as *L. (L.) mexicana* [73-75], *Leishmania (Leishmania) pifanoi* [47,76] and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

[77]. The genomic organization and characterization of the cathepsin L-like cysteine proteinases gene cluster from the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex has been previously described [79]. It has also been observed that single nucleotide polymorphisms (SNPs) occurring in CPs, which can vary according to the parasite's life stage, could be related to clinical characteristics such as a dermatropic rather than a viscerotropic status [79].

Additionally, a high CP activity was observed in extracts of *L. (L.) amazonensis* amastigotes, but promastigotes from the exponential or stationary phases exhibited very low proteolytic activity [77]. In this species of *Leishmania*, a correlation between the levels of CP expression and virulence has been described [80]. In this context, suppression of the CP genes diminished the virulence of *Leishmania (Leishmania) infantum* in hamsters [81] and of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in human cell cultures [82].

CPs were also shown to play a key role in basic functions and the interactions of *Leishmania (Leishmania) tropica* with the host, as parasites treated with CP inhibitors showed reduced viability, growth and pathogenicity [83]. In contrast, CPA was shown to be important in the host-parasite interaction of *L. (L.) infantum* but not to be essential for parasite replication [33].

#### CPB as a major virulence factor in species of the *L. (L.) mexicana* complex

Proof of the importance of CPBs as a major virulence factor for species of the *L. (L.) mexicana* complex was obtained in assays of experimental infections in BALB/c mice using genetically modified parasites in which the genes for CPA, CPB and CPC were deleted ( $\Delta cpa$ ,  $\Delta cpb$  and  $\Delta cpc$  strains). These assays showed that the absence of CPA or CPC affected the parasites in a more discrete fashion than the absence of CPB; parasites lacking CPB had a greatly reduced ability to infect and induced fewer lesions than the wild-type strain [34,35].

Other studies analyzed the effects of the reinsertion of *cpb* genes in the  $\Delta cpb$  parasite strain; the reinsertion of a single *cpb* gene did not fully restore parasite virulence, but the reinsertion of multiple *cpb* genes (using a cosmid) was able to do so. These data suggest that the multiple copies of *cpb* genes present in the parasites genome produce enzymes with complementary functions [36]. The role of CPB in the progression of infection in distinct murine strains was variable. *L. (L.) mexicana* remained able to continuously induce lesions in BALB/c mice even after the depletion of the *cpb* genes, although it did so at a much lower rate than wild strain parasites, indicating that other virulence factors were still effective. However, in the murine strains C3HeB/FeJ and C57BL/6, the infection with mutant parasites

was eventually controlled and the lesions were able to heal [35-37].

Regarding the direct effect of CPB on the parasite's ability to control host responses, it was observed that  $\Delta cpb$  *L. (L.) mexicana* parasites are unable to promote IL-4 expression during an experimental infection of BALB/c mice. The infected mice were thus able to mount a Th1 response and limit lesion growth. After multiple *cpb* genes were reinserted into the mutant parasites, the capacity to induce IL-4 production was restored along with virulence [36].

It is interesting to note that the subversion of immune responses by a specific parasite species may present in different manners depending on the mouse strain used. For example, it has been reported that the virulence of *L. (L.) mexicana* in the mouse strains C3HeB/FeJ and C57BL/6 is not associated with the capacity to induce IL-4 expression, as in BALB/c mice but is instead due to the inhibition of the expression of Th1-associated cytokines. Studies have shown that animals from these more resistant strains were able to control lesion growth after experimental infection with  $\Delta cpb$  parasites but were susceptible to wild strain parasites. In contrast, animals became susceptible to infection by  $\Delta cpb$  parasites if the IL12p40 or STAT4 genes were suppressed, suggesting that wild-type parasites inhibit the expression of Th1-related genes [37].

Additionally, experiments using cosmids to insert multiple *L. (L.) mexicana cpb* genes into *L. (L.) major* parasites have yielded similar results. After transfection with the *cpb*-containing cosmids, *L. (L.) major* parasites caused infections with higher parasitic loads and reduced IFN- $\gamma$  expression in C3HeB/FeJ mice than was observed for infections with the wild-type *L. (L.) major*, providing more evidence of the influence of CPB on the expression of Th1-related genes [37].

The role of CPB from *L. (L.) mexicana* in the inhibition of host IL-12 production was also analyzed in macrophages and dendritic cells [38,39]. The role of CPB in IL-12 inhibition was shown using assays with  $\Delta cpb$  amastigotes that were less efficient at inhibiting the lipopolysaccharide-related expression of IL-12 than wild-type amastigotes. Supplementary evidence was obtained from the observation that the use of CPB inhibitors in wild-type parasites was similarly able to hinder the ability of amastigotes to inhibit host IL-12 expression [40]. The same study proposed a mechanism through which CPB could inhibit IL-12 expression: the enzyme could be involved in the cleavage of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and its inhibitors (I $\kappa$ B  $\alpha$  and  $\beta$ ), thus preventing the expression of interleukins by the host. This IL-12 inhibition could not be observed in assays using  $\Delta cpb$  amastigotes or promastigotes, because unlike amastigotes, promastigotes only express low levels of CPB [40].



The influence of CPB from *L. (L.) mexicana* on the activity of other transcriptional factors was further analyzed in another study that showed that this proteinase affects other transcription factors, such as STAT-1 and AP-1, as well as NF- $\kappa$ B, by impeding their translocation to the nucleus and thus impairing the production of NO that is induced by IFN- $\gamma$  [41]. Differences in the way that promastigotes and amastigotes modulate NF- $\kappa$ B activity were also observed: while the former cleaves the p65 subunit to a smaller p35 subunit, the latter completely degrades the p65 subunit.

Another effect of CPB on the balance of Th responses occurs through the cleavage of MHC proteins. There is evidence that *L. (L.) amazonensis* CPB is able to cleave MHC class II proteins inside the parasitophorous vacuole of colonized host cells. Consequently, the host immune response could be partially inhibited or, alternatively, be mediated by other immune components such as the MHC class I gene products [43].

The effects of CPB on the murine host immune system has also been tested by subcutaneously injecting an enzymatically active recombinant CPB protein into the hind paw of BALB/c mice. Even without any actual parasites infecting the mice, there was an increase in IL-4 and IL-5 expression (Th2-related cytokines) and in the levels of circulating IgE. These effects may be partially explained by the ability of CPB to cleave CD23 (low affinity IgE receptor) and CD25 (IL-2 receptor), as a similar assay using an inactive recombinant CPB had no such effects on the murine hosts [42].

#### Importance of CPB as a virulence factor in species from other complexes

In spite of the substantial advances in knowledge about CPs from the *L. (L.) mexicana* complex and, to a lesser degree, of the *L. (L.) donovani* complex, less is known about CPs from *L. (V.) braziliensis*, the most important etiological agent of the mucocutaneous form of the disease in the New World. Within this context, our group has been working in an attempt to clarify the biological role of these enzymes. In a recent study, we were able to identify the cellular localization of CPs and their mechanism of anchoring to the parasite plasma membrane [84]. The organization of the *cpb* genes was also determined for this parasite species, along with the subsites of specificity for the recombinant CPB [85].

Most studies about CPB's activity as an immunomodulator were based on the murine model using species from the *L. (L.) mexicana* complex; however, an *in vitro* study using cells cultured from dogs and human patients proved that a recombinant CPB from *L. (L.) chagasi* (rLdcccys1) is able to induce cytokine production even in these distinct models. It was shown that rLdcccys1 can induce IFN- $\gamma$  production in cell cultures from

asymptomatic patients, IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 in oligo-symptomatic patients and IL-4 and IL-10 (at lower levels) in symptomatic patients and dogs [48].

#### Immunological effects of the COOH-terminal extension of CPB

In addition to the aforementioned influence of the proteolytic activity of CPB on the host immune system, the COOH-terminal extension (CTE) of CPB has also been reported to influence the interaction of parasites with the host immune system. The CTE is hydrolyzed when CPB is processed to its mature form [86] and is secreted into the extracellular environment [78]. Because the CTE has also been observed inside host cells [65], this polypeptide may interact with and alter the host immune system.

A synthetic peptide based on the CTE of *L. (L.) amazonensis* (PI) was shown to induce the expression of Th2-related cytokines in cells cultured from BALB/c mice, whereas cells from CBA mice exposed to the same peptide expressed cytokines related to both Th1 and Th2 responses. T cell proliferation was also stimulated by the synthetic peptide, especially that of CD8+ T cells. Additionally, when used for *in vivo* assays with infected mice, PI caused increased growth of lesions for BALB/c mice but not for CBA mice [44]. Our group recently conducted a study using *in silico* simulations of the interactions between MHC and CTE-derived epitopes, and the results suggested that these interactions could be related to the production of specific cytokines [45].

The CTE may also play a role in macrophage infections with *L. (L.) pifanoi* or *L. (L.) amazonensis*, as incubation of parasites with anti-CTE antibodies prior to their interaction with macrophages led to a reduction in the number of infected cells. This effect was more dramatic with amastigotes than with promastigotes, and pre-incubation of the parasites with an antibody specific to the *L. (L.) pifanoi* CPB catalytic domain had no effect in macrophage infection [47].

#### Non-CPB cysteine proteinases

Regarding the importance of other non-CPB CPs, studies indicate that CPC also plays a relevant role as a *Leishmania* virulence factor; although amastigotes from a  $\Delta$ *cpc* *L. (L.) mexicana* strain were still able to infect macrophages *in vitro* at rates comparable to the wild-type strain [49], these mutant parasites were more susceptible to killing by host cells [50,51]. Additionally, there is evidence that CPC may contribute to some of the immunoregulatory activities of *L. (L.) chagasi*, such as the parasite's capacity to induce TGF- $\beta$  expression in human cell cultures [52].

Regarding CPA, assays based on gene suppression showed that a CPA (*cys1*) from *L. (L.) infantum* acts as a

virulence factor, as a  $\Delta Licpa$  strain of this parasite was less infective for mammalian hosts and for cells *in vitro* [33].

The synergy between the activities of the CPs that contribute to *L. (L.) mexicana* virulence was verified in assays using parasites that had a combination of CP genes suppressed ( $\Delta cpa/\Delta cpb$ ). These mutants were even less infective in BALB/c mice than other strains with just one type of CP gene suppressed, indicating the complementary activity of these enzymes [34]. A reduction in the virulence of *L. (L.) mexicana* after CP gene suppression was also observed in infection assays in hamsters and in a human mononuclear phagocytic system [87].

An interesting biological function related to the CPA gene has been described. Double =  $\Delta cpa/cpb$  mutants of *L. (L.) mexicana* have a disrupted autophagy pathway and are also unable to undergo metacyclogenesis and transformation to amastigotes [77]. CPA and CPB are two major lysosomal cysteine peptidases that may function similarly to the aspartic peptidase PEP4 and the serine peptidase PRB1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Autophagy is believed to be necessary to the process of cell differentiation [88].

#### **Endogenous Inhibitors of CPs**

The role of the endogenous CP inhibitors expressed by *Leishmania* (ICPs) in immune modulation has also been studied. The *L. (L.) mexicana* mutants that overexpressed the ICPs led to decreased antibody and IL-4 production but induced the production of increased levels of IFN- $\gamma$  in murine hosts when compared to a wild-type strain [46]. These observations reinforce the important role of CPs as immune modulation tools, especially in species of the *L. (L.) mexicana* complex.

#### **Metalloproteinases of Leishmania as virulence factors**

The major surface protein (MSP or gp63) is a metalloproteinase (MP) that belongs to the metzincin class (peptidase family M8) and is abundantly expressed on the surface of *Leishmania* spp. and other related trypanosomatid protozoans [89-92]. Its biological activity is associated with protecting the parasites against the action of host enzymes in the midgut of insect vectors and the phagolysosomes of macrophages. Additionally, gp63 is required for the resistance of promastigotes to complement-mediated lysis in the mammalian host, as the presence of an enzymatically active form of this proteinase greatly reduced the fixation of the terminal complement components on parasites and increased the conversion of C3b to the inactive form C3bi [53,54]. The cellular localization of metalloproteinases with domains homologous to gp63 was investigated in *L. (V.) braziliensis* and showed that these enzymes are mainly located in the flagellar pocket of the parasite [93].

Studies of the direct effects of metalloproteinases on the immune system of mammalian hosts show that gp63 is important during macrophage infection and modulates the cytokine immune response, as downregulation of gp63 expression in parasites rendered them more susceptible to complement-mediated lysis and led to the development of a Th1-type response at the site of inoculation and its draining lymph node [55].

Natural killer (NK) cells are another type of immune cell that have been shown to be affected by *Leishmania* gp63. The ability of promastigotes to suppress this cell type is dependent on gp63 expression, as a *L. (L.) major* gp63 mutant strain loses its ability to hinder the proliferation of NK cells and to inhibit the expression of surface receptors on these cells [57].

Gp63 has also been shown to interfere with signaling cascades and to affect transcription factors, thus preventing host cells from adequately responding to the parasites during infection. One example of such activity is the gp63-dependent cleavage of c-Jun, the central component of the transcriptional complex AP-1, by *L. (L.) mexicana* parasites. Interestingly, gp63 retrieved from culture supernatants maintains the capacity to cleave c-Jun, suggesting that when secreted by the parasites, this enzyme may use a phagocytosis-independent mechanism to enter host cells [59].

An alternative immune modulation effect of gp63 occurs by the activation of protein tyrosine phosphatases (PTPs) in macrophages, leading to decreased NO production and attenuated innate inflammatory responses, therefore increasing the parasite's odds of survival. It was reported that gp63 activates at least three macrophage PTPs through its proteolytic activity and that this process is partially dependent on a lipid raft-based mechanism [94].

Similar to CPB, gp63 has also been implicated in the cleavage of NF- $\kappa$ B, but this activity has a more subtle and specific purpose than simply preventing the transcriptional factor from reaching the nucleus. Instead, gp63 cleaves the NF- $\kappa$ B subunit p65 into a smaller subunit (p35) that enters the nucleus of the host cell and triggers the expression of chemokines. By subverting the proper function of the transcriptional machinery, the parasites are able to recruit phagocytic cells to serve as hosts while preventing the expression of host factors as IL-12 and iNOS that threaten their survival, [56]. The gp63 from *L. (L.) major* and *L. (L.) donovani* can also cleave CD4 glycoprotein on human T cells in culture, revealing yet another example of the influence that *Leishmania* parasites have on the host immune system. The cleavage was measured by assessing the binding of specific antibodies binding CD4 glycoprotein on the surface of cells, and this effect was detected using both promastigotes and purified gp63 on the cell cultures [58].



#### Serine-proteinases of *Leishmania* as virulence factors

Serine proteinases (SPs) have also been shown to act as virulence factors and influence host immune responses during *Leishmania* infection, but, unlike CPB for cysteine-proteinases and gp63 for metalloproteinases, there is not yet a specific SP that has been shown to be responsible for these effects. Reports indicate that the levels of surface SPs diminishes in attenuated strains of *L. (L.) donovani* and that a 115 kDa SP seems to be related to the parasite's ability to infect the host [95].

A SP of *Leishmania*, oligopeptidase B (OPB; Clan SC, family S9A oligopeptidase B), was identified and characterized by mass spectrometry and gene deletion [60]. It was suggested that during differentiation to the amastigote form, OPB is upregulated and participates in the covering of parasite surface with enolase and plasminogen. The amastigotes are then able to replicate undetected within the macrophage.

The direct effects of OPB on the host immune system was demonstrated by examining the effect of infection with an OPB mutant strain on the expression of host genes. Infection of macrophages in culture with a wild-type *L. (L.) donovani* strain results in changes in the expression of 23 genes, but infection of these same cells with a mutant strain in which the oligopeptidase B gene was deleted leads to changes in 495 genes, an increase of approximately 21x in the number of genes affected by the infection. This suggests a relationship between oligopeptidase B expression and the ability of *Leishmania* to remain undetected in macrophage infections [60]. OPB-deficient *L. (L.) major* mutants were recently shown to be able to grow normally as promastigotes even though they are slightly deficient in their ability to undergo differentiation to metacyclic promastigotes, but they were significantly less able to infect and survive within macrophages *in vitro* despite maintaining their virulence in mice. These data suggest that *L. (L.) major* OPB itself is not a prevalent virulence factor but rather acts in conjunction with other factors, indicating functional differences between trypanosomes and *Leishmania* in their interaction with the mammalian host [96].

Another class of SP, the subtilisin protease (SUB; Clan SB, family S8) of *L. (L.) donovani*, was cloned and shown to possess a unique catalytic triad. When this SP gene was deleted, the ability of the parasite to undergo promastigote to amastigote differentiation *in vitro* was reduced. Furthermore, the activity of this *Leishmania* SP is increased by several fold in amastigotes when compared to promastigotes, suggesting an important role for this enzyme in the vertebrate-inhabiting stages of the parasite [61].

Additional evidence of immune modulation by SPs was obtained by the observation that immunization with a soluble proteases fraction isolated from a mixture of *L.*

*(L.) amazonensis* antigens increased the susceptibility of mice to a subsequent experimental infection. This effect was eliminated by treating the protease fraction with SP inhibitors but not with CP inhibitors [62].

#### Importance of proteinases from mammalian host in the progression of the infection

Although the proteinases from parasites play important roles in immunomodulating the host response and, consequently, the outcome of the infection, proteinases from the host also affect the dynamics of the infection and the development of the lesion. For example, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) interferes with the re-epithelization of chronic wounds in humans. In situations where the inflammation continues for a long period, TNF- $\alpha$  and, subsequently, MMP-9 persist, thereby preventing the migrating keratinocytes from forming new attachments to a newly synthesized basement membrane. This suggests a mechanism whereby the presence of high levels of MMP-9 delays the process of normal wound healing [97].

These data are correlated with findings that associate a high number of cells producing IFN- $\gamma$ , IL-10 and TNF- $\alpha$ , in addition to elevated levels of MMP-9 activity in lesions, with a poor response to therapeutics for cutaneous leishmaniasis (CL) [98]. Indeed, infection with *L. (L.) chagasi* stimulates murine macrophages to produce MMP-9 [99]. Conversely, elevated levels of MMP-2 mRNA were detected in lesions from patients with good responses to treatment [98], an observation consistent with other reports that showed that increased MMP-2 levels were required for cutaneous wound re-epithelization [100]. Interleukin-10 is observed at higher levels in patients with good immune responses [98] and seems to be unique among the cytokines in its ability to suppress the production and activation of MMPs, thus having an important matrix-protective role during inflammation [101].

#### Remarks

The network of interactions that take place during the evolution of the *Leishmania* infection in the mammal host is highly complex and involves a series of responses and counter-responses from both organisms. In this context, proteinases appear as factors of pivotal importance, playing central roles in many of the interactions between parasite and host (Table 1).

Although most of the literature currently available on this subject is focused on cysteine-, metallo- and serine-proteinases from *Leishmania* species, the importance of host proteinases, such as matrix metalloproteinases, and their role in the subversion of host's immune responses by the parasites must not be overlooked, as some reports already point to their direct contribution to determining

the outcome of infections. Furthermore, it is necessary to analyze the participation of aspartyl-proteinases from *Leishmania* species, as their expression changes between morphological forms and may therefore be related to the responses necessary to survive in distinct micro-environments [65]. Therefore, to fully understand how the *Leishmania* infection progresses and to be able to find suitable targets for drug development and options for patient treatment, it is important to consider the influence of proteinases from host and parasite alike, as disregarding one in favor of the other may lead to incorrect conclusions and inadequate, if not harmful, treatment of the disease.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

CRA formulated the idea and CRA, MSA, BASP and MLRG wrote the manuscript. All authors approved the final version of this manuscript.

#### Acknowledgements

This study received financial support from PAPES (CNPq/Fiocruz) and FAPERJ. MSc Mariana Silva-Almeida is doctoral study fellow of the Fiocruz/CAPES institution. Dr. Bernardo Acácio Santini Pereira and Dr. Michelle Lopes Ribeiro-Gulmarães are postdoctoral fellow researchers of CAPES/FAPERJ and CAPES, respectively. Dr. Carlos Roberto Alves is a fellow researcher from CNPq.

Received: 1 March 2012 Accepted: 12 July 2012

Published: 7 August 2012

#### References

1. Allison MJ: *Leishmaniasis*. In *The Cambridge World History of Human Disease*. Edited by Kiple KF. Cambridge Histories Online: Cambridge University Press; 1993. doi:10.1017/CHOL9780521332866.141. Vol 1.
2. Stark D, van Hal S, Lee R, Marriott D, Harkness J: *Leishmaniasis, an emerging imported infection: report of 20 cases from Australia*. *J Travel Med* 2008, **15**(5):351-354.
3. Gramiccia M, Gradoni L: *The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control*. *Int J Parasitol* 2005, **35**:1169-1180.
4. Desjeux P: *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004, **27**(5):305-318.
5. Pavla A, Maltezos HC: *Leishmaniasis, an emerging infection in travelers*. *Inter J Infect Dis* 2010, **14**(12):e1032-e1039.
6. Bates PA, Rogers ME: *New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania*. *Curr Mol Med* 2004, **4**(6):601-609.
7. Marzochi MC, Marzochi KB: *Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil: emerging anthrozoosis and possibilities for their control*. *Cad Saude Publica* 1994, **10**(suppl 2):359-375.
8. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S: *Cutaneous Leishmaniasis*. *Lancet Infect Dis* 2007, **7**(9):581-596.
9. McGwire BS, Chang KP, Engman DM: *Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan Leishmania is enhanced by surface metalloprotease gp63*. *Infect Immun* 2003, **71**(2):1008-1010.
10. Lira R, Rosales-Endina JL, Argüello C: *Leishmania mexicana: binding of promastigotes to type I collagen*. *Exp Parasitol* 1997, **85**(2):149-157.
11. Castes M, Agnelli A, Verde O, Rondón A: *Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis*. *Clin Immunol Immunopathol* 1983, **27**(2):176-186.
12. Pirmez C: *Immunopathology of American cutaneous leishmaniasis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992, **87**(suppl 5):105-109.
13. Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM: *Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects*. *Braz J Otorhinolaryngol* 2007, **73**(6):843-847.
14. Sinha S, Fernández G, Kapila R, Lambert WC, Schwartz RA: *Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome*. *Int J Dermatol* 2008, **47**(12):1263-1270.
15. Matlashewski G: *Leishmania infection and virulence*. *Med Microbiol Immunol* 2001, **190**:37-42.
16. Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY: *Glycoinositolphospholipids of Leishmania major inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages*. *Eur J Immunol* 1995, **25**(3):745-750.
17. Zufferey R, Allen S, Barron T, Sullivan DR, Denny PW, Almeida IC, Smith DF, Turco SJ, Ferguson MA, Beverley SM: *Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by Leishmania major*. *J Biol Chem* 2003, **278**(45):44708-44718.
18. Yoneyama KA, Tanaka AK, Silveira TG, Takahashi HK, Straus AH: *Characterization of Leishmania (Viannia) braziliensis membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity*. *J Lipid Res* 2006, **47**(10):2171-2178.
19. Svárovská A, Ant TH, Seblová V, Jecná L, Beverley SM, Volf P: *Leishmania major glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010, **4**(1):e580.
20. Gaur U, Showalter M, Hickerson S, Dalvi R, Turco SJ, Wilson ME, Beverley SM: *Leishmania donovani lacking the Golgi GDP-Man transporter LPG2 exhibit attenuated virulence in mammalian hosts*. *Exp Parasitol*. 2009, **122**(3):82-91.
21. Handman E, Goding JW: *The Leishmania receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate*. *EMBO J* 1985, **4**(2):329-336.
22. Späth GF, Epstein L, Leader B, Singer SM, Avila HA, Turco SJ, Beverley SM: *Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97**(16):9258-9263.
23. Späth GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM: *The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of Leishmania major infections in mammalian hosts*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**(16):9536-9541.
24. Argueta-Donohué J, Carrillo N, Valdés-Reyes L, Zentella A, Aguirre-García M, Becker I, Gutiérrez-Kobeh L: *Leishmania mexicana: participation of NF-kappaB in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG)*. *Exp Parasitol* 2008, **120**(1):1-9.
25. Liu D, Kebalier C, Pakpour N, Capul AA, Beverley SM, Scott P, Uzonna JE: *Leishmania major phosphoglycans influence the host early immune response by modulating dendritic cell functions*. *Infect Immun* 2009, **77**(8):3272-3283.
26. Ilg T, Montgomery J, Stierhof YD, Handman E: *Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing Leishmania major gene, pp g1, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor*. *J Biol Chem* 1999, **274**(44):31410-31420.
27. Ilg T: *Proteophosphoglycans of Leishmania*. *Parasitol Today* 2000, **16**(11):489-497.
28. Peters C, Stierhof YD, Ilg T: *Proteophosphoglycan secreted by Leishmania mexicana amastigotes causes vacuole formation in macrophages*. *Infect Immun* 1997, **65**(2):783-786.
29. Peters C, Kawakami M, Kaul M, Ilg T, Overath P, Aebischer T: *Secreted proteophosphoglycan of Leishmania mexicana amastigotes activates complement by triggering the mannose binding lectin pathway*. *Eur J Immunol* 1997, **27**(10):2666-2672.
30. Jardim A, Funk V, Caprioli RM, Olafson RW: *Isolation and structural characterization of the Leishmania donovani kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein*. *Biochem J* 1995, **305**:307-313.
31. Carvalho LP, Passos S, Dutra WO, Soto M, Alonso C, Gollob KJ, Carvalho EM, Ribeiro de Jesus A: *Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients*. *Scand J Immunol* 2005, **61**(4):337-342.
32. Barrett AJ: *Classification of peptidases*. *Methods Enzymol* 1994, **244**:1-15.
33. Denise H, Poot J, Jiménez M, Ambit A, Herrmann DC, Vermeulen AN, Coombs GH, Mottram JC: *Studies on the CPA cysteine peptidase in the Leishmania infantum genome strain JPCMS*. *BMC Mol Biol* 2006, **13**(7):42.



34. Mottram JC, Coombs GH, Alexander J: Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol* 2004, **7**(4):375–381.
35. Alexander J, Coombs GH, Mottram JC: *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol* 1998, **161**(12):6794–6801.
36. Denise H, McNeil K, Brooks DR, Alexander J, Coombs GH, Mottram JC: Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence in vivo. *Infect Immun* 2003, **71**(6):3190–3195.
37. Buxbaum LU, Denise H, Coombs GH, Alexander J, Mottram JC, Scott P: Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. *J Immunol* 2003, **171**(7):3711–3717.
38. Weinheber N, Wolfram M, Harbecke D, Aebischer T: Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. *Eur J Immunol* 1998, **28**(8):2467–2477.
39. Bennett CL, Misslitz A, Colledge L, Aebischer T, Blackburn CC: Silent infection of bone marrow-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J Immunol* 2001, **31**(3):876–883.
40. Cameron P, McGachy A, Anderson M, Paul A, Coombs GH, Mottram JC, Alexander J, Plevin R: Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol* 2004, **173**(5):3297–3304.
41. Abu-Dayyeh I, Hassani K, Westra ER, Mottram JC, Olivier M: Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. *Infect Immun* 2010, **78**(6):2438–2445.
42. Pollock KG, McNeil KS, Mottram JC, Lyons RE, Brewer JM, Scott P, Coombs GH, Alexander J: The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2.8, induces potent Th2 responses. *J Immunol* 2003, **170**(4):1746–1753.
43. De Souza Leao S, Lang T, Prina E, Hello R, Antoine JC: Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci* 1995, **108**:3219–3231.
44. Alves CR, Benévolo-De-Andrade TC, Alves JL, Pirmez C: Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2004, **26**(3):127–135.
45. Pereira BA, Silva FS, Rebelo KM, Marin-Villa M, Traub-Cseko YM, Andrade TC, Bertho AL, Caffarena ER, Alves CR: In silico predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during *Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection. *BMC Immunol* 2011, **12**:44.
46. Bryson K, Besteiro S, McGachy HA, Coombs GH, Mottram JC, Alexander J: Overexpression of the natural inhibitor of cysteine peptidases in *Leishmania mexicana* leads to reduced virulence and a Th1 response. *Infect Immun* 2009, **77**(7):2971–2978.
47. Marin-Villa M, Vargas-Inchaustegui DA, Chaves SP, Tempone AJ, Dutra JM, Soares MJ, Ueda-Nakamura T, Mendonça SC, Rossi-Bergmann B, Soong L, Traub-Cseko YM: The C-terminal extension of *Leishmania pifanoi* amastigote-specific cysteine proteinase Lpcys2: a putative function in macrophage infection. *Mol Biochem Parasitol* 2008, **162**(1):52–59.
48. da Costa Pinheiro PH, de Souza Dias S, Eulálio KD, Mendonça IL, Katz S, Barbiéri CL: Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* implicated in human and dog T-cell responses. *Infect Immun* 2005, **73**(6):3787–3789.
49. Frame MJ, Mottram JC, Coombs GH: Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. *Parasitology* 2000, **121**:367–377.
50. Bart G, Frame MJ, Carter R, Coombs GH, Mottram JC: Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 1997, **88**(1–2):53–61.
51. Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH: Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1998, **1**(4):455–460.
52. Somanna A, Mundodi V, Gedamu L: Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 2002, **277**(28):25305–25312.
53. Yao C, Donelson JE, Wilson ME: The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 2003, **132**(1):1–16.
54. Yao C: Major Surface Protease of Trypanosomatids: One Size Fits All? *Infect Immun* 2010, **78**(1):22–31.
55. Thiakaki M, Kolli B, Chang KP, Soteriadou K: Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes Infect* 2006, **8**(6):1455–1463.
56. Gregory DJ, Godbout M, Contreras I, Forget G, Olivier M: A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression. *Eur J Immunol* 2008, **38**(4):1071–1081.
57. Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Khamesipour A, Berg L, Akuffo H: *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol* 2008, **153**(2):221–230.
58. Hey AS, Theander TG, Hviid L, Hazrati SM, Kemp M, Kharazmi A: The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. *J Immunol* 1994, **152**(9):4542–4548.
59. Contreras I, Gómez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW, Olivier M: *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog* 2010, **6**(1):e1001148.
60. Swenerton RK, Zhang S, Sajid M, Medzilhradszky KF, Craik CS, Kelly BL, McKerrow JH: The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem* 2011, **286**(1):429–440.
61. Swenerton RK, Knudsen GM, Sajid M, Kelly BL, McKerrow JH: *Leishmania* subtilisin is a maturase for the trypanothione reductase system and contributes to disease pathology. *J Biol Chem* 2010, **285**(41):31120–31129.
62. Pinheiro RO, Pinto EF, Lopes JR, Guedes HL, Fentanes RF, Rossi-Bergmann B: TGF-beta-associated enhanced susceptibility to leishmaniasis following intramuscular vaccination of mice with *Leishmania amazonensis* antigens. *Microbes Infect* 2005, **7**(13):1317–1323.
63. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:D227–D233.
64. Silva-Lopez RE, Morgado-Díaz JA, Alves CR, Córte-Real S, Giovanni-De-Simone S: Subcellular localization of an extracellular serine protease in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitol Res* 2004, **93**(4):328–331.
65. Alves CR, Corte-Real S, Bourguignon SC, Chaves CS, Saralva EM: *Leishmania amazonensis* early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. *Exp Parasitol* 2005, **109**(1):38–48.
66. Valdivieso E, Dagger F, Rascón A: *Leishmania mexicana*: identification and characterization of an aspartyl proteinase activity. *Exp Parasitol* 2007, **116**(1):77–82.
67. Sajid M, McKerrow JH: Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol* 2002, **120**(1):1–21.
68. McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M: Proteases in parasitic diseases. *Ann Rev Pathol* 2006, **1**:497–536.
69. Selzer PM, Pingel S, Hsieh I, Ugele B, Chan VJ, Engel JC, Bogoy M, Russell DG, Sakanari JA, McKerrow JH: Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96**(20):11015–11022.
70. Vermelho AB, Branquinho MH, D'Ávila-Levy CM, Santos ALS, Dias EPS, Melo ACN: Biological Roles of Peptidases in Trypanosomatids. *Open Parasitol J* 2010, **4**:5–23.
71. Sakanari JA, Nadler SA, Chan VJ, Engel JC, Leptak C, Bouvier J: *Leishmania major*: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. *Exp Parasitol* 1997, **85**(1):63–76.
72. Robertson CD, Coombs GH: "Cathepsin B-like cysteine proteases of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 1993, **62**(2):271–279.
73. Robertson CD, Coombs GH: Multiple high activity cysteine proteases of *Leishmania mexicana* are encoded by the Imcpb gene array. *Microbiology* 1994, **140**(2):417–424.
74. Souza AE, Waugh S, Coombs GH, Mottram JC: Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *FEBS Lett* 1992, **311**(2):124–127.
75. Mottram JC, Frame MJ, Brooks DR, Tetley L, Hutchison JE, Souza AE, Coombs GH: The multiple cpb cysteine proteinase genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. *J Biol Chem* 1997, **272**(22):14285–14293.
76. Traub-Cseko YM, Dubois M, Boukai LK, McMahon-Pratt D: Identification of two distinct cysteine proteinase genes of *Leishmania pifanoi* axenic

- amastigotes using the polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 1993, **57**(1):101–115.
77. Lasakosvitsch F, Gentil LG, dos Santos MR, da Silveira JF, Barbiéri CL: Cloning and characterization of a cysteine proteinase gene expressed in amastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis*. *Int J Parasitol* 2003, **33**(4):445–454.
  78. Mundodi V, Somanna A, Farrell PJ, Gedamu L: Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. *Gene* 2002, **282**(1–2):257–265.
  79. Hide M, Bañuls AL: Polymorphisms of cpb multigene families in the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008, **102**(2):105–106.
  80. de Araújo Soares RM, dos Santos AL, Bonaldo MC, de Andrade AF, Alviano CS, Angluster J, Goldenberg S: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. *Exp Parasitol* 2003, **104**(3–4):104–112.
  81. Poot J, Denise H, Hermann DC, Mottram JC, Coombs GH, Vermeulen AN: Virulence and protective potential of several Cysteine peptidase knockout strains of *Leishmania infantum* in hamsters. In *Experimental challenge models for canine leishmaniasis in hamsters and dogs, optimization and application in vaccine research*. Edited by Poot J. Utrecht, Netherlands: Utrecht University press; 2006:93–107.
  82. Mundodi V, Kudknoor AS, Gedamu L: Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. *BMC Mol Biol* 2005, **6**(1):3.
  83. Mahmoudzadeh-Niknam H, McKerrow JH: *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. *Exp Parasitol* 2004, **106**(3–4):158–163.
  84. Rebello KM, Côrtes LM, Pereira BA, Pascarelli BM, Côrtes-Real S, Finkelstein LC, Pinho RT, d'Ávila-Levy CM, Alves CR: Cysteine proteinases from promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitol Res* 2009, **106**(1):95–104.
  85. Lanfranco MF, Loayza-Muro R, Clark D, Núñez R, Zavaleta AI, Jimenez M, Meldal M, Coombs GH, Mottram JC, Izidoro M, Juliano MA, Juliano L, Arévalo J: Expression and substrate specificity of a recombinant cysteine proteinase B of *Leishmania braziliensis*. *Mol Biochem Parasitol* 2008, **161**(2):91–100.
  86. Duboise SM, Vannier-Santos MA, Costa-Pinto D, Rivas L, Pan AA, Traub-Cseko Y, De Souza W, McMahon-Pratt D: The biosynthesis, processing, and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinases. *Mol Biochem Parasitol* 1994, **68**(1):119–132.
  87. Saravia NG, Escordia B, Osorio Y, Valderrama L, Brooks D, Arteaga L, Coombs G, Mottram J, Travi BL: Pathogenicity and protective immunogenicity of cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana* in non-murine models. *Vaccine* 2006, **24**(19):4247–4259.
  88. Williams RA, Tetley L, Mottram JC, Coombs GH: Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* 2006, **61**(3):655–674.
  89. Bouvier J, Etges RJ, Bordier C: Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. *J Biol Chem* 1985, **260**(29):15504–15509.
  90. Etges RJ, Bouvier J, Hoffman R, Bordier C: Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related. *Mol Biochem Parasitol* 1985, **14**(2):141–149.
  91. Etges R, Bouvier J, Bordier C: The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem* 1986, **261**(20):9098–9101.
  92. Schlagenhaut E, Etges R, Metcalf P: The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure* 1998, **6**(8):1035–1046.
  93. Cuervo P, Santos AL, Alves CR, Menezes GC, Silva BA, Britto C, Fernandes O, Cupollilo E, Batista De Jesus J: Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteinases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Acta Trop* 2008, **106**(3):143–148.
  94. Gomez MA, Contreras I, Hallé M, Tremblay ML, McMaster RW, Olivier M: *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal* 2009, **2**(90):ra58.
  95. Choudhury R, Das P, Bhaumik SK, De T, Chakraborti T: In situ immunolocalization and stage-dependent expression of a secretory serine protease in *Leishmania donovani* and its role as a vaccine candidate. *Clin Vaccine Immunol* 2010, **17**(4):660–667.
  96. Munday JC, McLuskey K, Brown E, Coombs GH, Mottram JC: Oligopeptidase B deficient mutants of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 2011, **175**(1):49–57.
  97. Reiss MJ, Han YP, Garcia E, Goldberg M, Yu H, Garner WL: Matrix metalloproteinase-9 delays wound healing in a murine wound model. *Surgery* 2010, **147**(2):295–302.
  98. Maretti-Mira AC, de Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, de Oliveira MP, Craft N, Pirmez C: Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol* 2011, **163**(2):207–214.
  99. Costa JD, de Melo AC N, Vermelho AB, Meirelles Mde N, Porrozi R: In vitro evidence for metalloproteinase participation in hepatocyte damage induced by *Leishmania chagasi*-infected macrophages. *Acta Trop* 2008, **106**(3):175–183.
  100. Agren MS, Mirastschijski U, Karlsmark T, Saarialho-Kere UK: Topical synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases delays epidermal regeneration of human wounds. *Exp Dermatol* 2001, **10**(5):337–348.
  101. Stearns ME, Wang M, Hu Y, Garcia FU, Rhim J: Interleukin 10 blocks matrix metalloproteinase-2 and membrane type 1-matrix metalloproteinase synthesis in primary human prostate tumor lines. *Clin Cancer Res* 2003, **9**(3):1191–1199.

doi:10.1186/1756-3305-5-160

Cite this article as: Silva-Almeida et al.: Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasites & Vectors* 2012 **5**:160.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit





## Proteinase Inhibitors: A Promising Drug Class for Treating Leishmaniasis

Bernardo Acácio Santini Pereira<sup>#</sup>, Franklin Souza-Silva<sup>#</sup>, Mariana Silva-Almeida, Raquel Santos-de-Souza, Luiz Filipe Gonçalves de Oliveira, Michelle Lopes Ribeiro-Guimarães, and Carlos Roberto Alves<sup>\*</sup>

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

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

### INTRODUCTION

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

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

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

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

### HISTORY AND CURRENT STATUS OF LEISHMANIASIS TREATMENT WITH ANTIMONIALS

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

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

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

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

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

<sup>#</sup>These authors have equally contributed to this review paper.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Regarding the current treatment posology, the WHO recommends a dose of  $Sb^{3+}$  of 10 to 20 mg/kg/day intramuscularly or intravenously with a maximum total daily dose of 810 mg of  $Sb^{3+}$ . The treatments generally continue for 20 days but may be reduced to a minimum of two weeks if the anticipated parasitological cure is observed. In cases in which systemic use of  $Sb^{3+}$  is contraindicated, 0.2 to 1 ml of the antimonial solution may be administered directly into the lesions [11, 31, 32].

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

## SECOND-CHOICE DRUGS FOR LEISHMANIASIS TREATMENT

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

### Amphotericin B

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



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

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

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

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

#### Pentamidine

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

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

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

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

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

#### Miltefosine

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

Its mechanism of action against the *Leishmania* parasites appears to be via the modulation of cell surface receptors that affect many relevant cell processes, including calcium homeostasis, ether-lipid remodeling mechanisms, the synthesis of phosphatidylcholine, signal transduction, inositol metabolism, phospholipase activation and protein kinase C, as well as other mitogenic and apoptotic pathways. Miltefosine also increases macrophage cytotoxicity by increasing oxidative stress and stimulating cellular glucose consumption (by the production of reactive oxygen species such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide O<sub>2</sub>), eventually leading to the death of the parasites inhabiting these cells [52-57].

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

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

#### Paromomycin

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

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

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

#### Azoles

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

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

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

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

#### PROTEINASES AS POTENTIAL TARGETS FOR NOVEL LEISHMANIASIS TREATMENTS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

### Effects of Proteinase Inhibitors on *Leishmania* Parasites in Culture

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Nevertheless, CP inhibitors have been reported to have promising results when applied in a chemotherapeutic context in experimental animal infection models. Two derivatives of oxalic bis[(2-hydroxy-1-naphthyl) methyl-ene]hydrazide (named ZLIII43A and ZLIII15A), both reversible CP inhibitors, and the pseudopeptide substrate analogue morpholine urea-phenylalanine-homophenylalanine-vinylsulfonyl-benzene (K11002, Arris Pharmaceuticals), an irreversible inhibitor of CP, were shown to interfere in *L. (L.) major* infections *in vitro* and *in vivo* [86]. These compounds prevented parasite replication and infection of mouse macrophages (cell line J774) challenged in culture with *L. (L.) major* promastigotes. However, none of these compounds affected the host cells (as assessed by analysis of morphological changes).

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

## REMARKS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### CONFLICT OF INTEREST

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

### ACKNOWLEDGEMENTS

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

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

### REFERENCES

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



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

- [92] Mottram JC, Coombs GH, Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7(4): 375-81.
- [93] Alexander J, Coombs GH, Mottram JC. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol* 1998; 161(12): 6794-801.
- [94] Denise H, McNeil K, Brooks DR, et al. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence *in vivo*. *Infect Immun* 2003; 71(6): 3190-5.
- [95] Cameron P, McGachy A, Anderson M, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J Immunol* 2004; 173(5): 3297-304.
- [96] Abu-Dayyeh I, Hassani K, Westra ER, et al. Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. *Infect Immun* 2010; 78(6): 2438-45.
- [97] De Souza Leao S, Lang T, Prina E, et al. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci* 1995; 108(Pt 10): 3219-31.
- [98] Marin-Villa M, Vargas-Inchaustegui DA, Chaves SP, et al. The C-terminal extension of *Leishmania pifanoi* amastigote-specific cysteine proteinase Lpcys2: a putative function in macrophage infection. *Mol Biochem Parasitol* 2008; 162(1): 52-9.
- [99] Alves CR, Benévolo-De-Andrade TC, Alves JL, et al. Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2004; 26(3): 127-35.
- [100] Pereira BAS, Silva FS, Rebelo KM, et al. *In silico* predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during *Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection. *BMC Immunol* 2011; 12: 44.
- [101] Bart G, Frame MJ, Carter R, et al. Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 88(1-2): 53-61.
- [102] Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol* 1998; 1(4): 455-60.
- [103] Denise H, Poot J, Jiménez M, et al. Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. *BMC Mol Biol* 2006; 13(7): 42.
- [104] Etges R, Bouvier J, Bordier C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. *J Biol Chem* 1986; 261(20): 9098-101.
- [105] Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 132(1): 1-16.
- [106] Yao C. Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? *Infect Immun* 2010; 78(1): 22-31.
- [107] Thiakaki M, Kolli B, Chang KP, et al. Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes Infect* 2006; 8(6): 1455-63.
- [108] Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, et al. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol* 2008; 153(2): 221-30.
- [109] Contreras I, Gómez MA, Nguyen O, et al. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog* 2010; 6(1): e1001148.
- [110] Gregory DJ, Godbout M, Contreras I, et al. A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression. *Eur J Immunol* 2008; 38(4): 1071-81.
- [111] Gomez MA, Contreras I, Hallé M, et al. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal* 2009; 2(90): ra58.
- [112] Choudhury R, Das P, Bhaumik SK, et al. *In situ* immunolocalization and stage-dependent expression of a secretory serine protease in *Leishmania donovani* and its role as a vaccine candidate. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17(4): 660-7.
- [113] Swenerton RK, Zhang S, Sajid M, et al. The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem* 2011; 286(1): 429-40.
- [114] Savoia D, Alice T, Tovo PA. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26(1): 92-4.
- [115] Trudel N, Garg R, Messier N, et al. Intracellular survival of *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis is significantly reduced by HIV-1 protease inhibitors. *J Infect Dis* 2008; 198(9): 1292-9.
- [116] Santos LO, Marinho FA, Altoé EF, et al. HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. *PLoS One* 2009; 4(3): e4918.
- [117] Santos LO, Vitorio BS, Branquinha MH, et al. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(2): 348-53.
- [118] Valdivieso E, Rangel A, Moreno J, et al. Effects of HIV aspartyl-proteinase inhibitors on *Leishmania* sp. *Exp Parasitol* 2010; 126(4): 557-563.
- [119] Pereira IO, Assis DM, Juliano MA, et al. Natural products from *Garcinia brasiliensis* as *Leishmania* protease inhibitors. *J Med Food* 2011; 14(6): 557-62.
- [120] Silva-Lopez RE, Morgado-Diaz JA, Chávez MA, et al. Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. *Parasitol Res* 2007; 101: 1627-35.
- [121] Gangwar S, Baig MS, Shah P, et al. Identification of novel inhibitors of dipeptidylcarboxypeptidase of *Leishmania donovani* via ligand-based virtual screening and biological evaluation. *Chem Biol Drug Des* 2012; 79(2): 149-56.
- [122] Desai PV, Patny A, Sabnis Y, et al. Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors using virtual screening. 1. The ChemBridge database. *J Med Chem* 2004; 47(26): 6609-15.
- [123] Shah PP, Myers MC, Beavers MP, et al. Kinetic characterization and molecular docking of a novel, potent, and selective slow-binding inhibitor of human cathepsin L. *Mol Pharmacol* 2008; 74(1): 34-41.
- [124] d'Avila-Levy CM, Marinho FA, Santos LO, et al. Antileishmanial activity of MDL 28170, a potent calpain inhibitor. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28(2): 138-42.
- [125] Maekawa Y, Himeno K, Ishikawa H, et al. Switch of CD4+ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 1998; 161(5): 2120-27.
- [126] Frame MJ, Mottram JC, Coombs GH. Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. *Parasitology* 2000; 121: 367-77.
- [127] Mahmoudzadeh-Niknam H, McKerrow JH. *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. *Exp Parasitol* 2004; 106(3-4): 158-63.
- [128] Williams RA1, Tetley L, Mottram JC, Coombs GH. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* 2006; 61(3): 655-74.
- [129] Das L, Datta N, Bandyopadhyay S, et al. Successful Therapy of Lethal Murine Visceral Leishmaniasis with Cystatin Involves Up-Regulation of Nitric Oxide and a Favorable T Cell Response. *J Immunol* 2001; 166(6): 4020-8.
- [130] Schurigt U, Schad C, Glowa C, et al. Aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in *Leishmania major* associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(12): 5028-41.
- [131] Ponte-Sucre A, Vicik R, Schultheis M, et al. Aziridine-2,3-Dicarboxylates, Peptidomimetic Cysteine Protease Inhibitors with Antileishmanial Activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(7): 2439-47.
- [132] Somanna A, Mundodi V, Gedamu L. Functional Analysis of Cathepsin B-like Cysteine Proteases from *Leishmania donovani* Complex: Evidence for the Activation of Latent Transforming Growth Factor B. *J Biol Chem* 2002; 277(28): 25305-12.
- [133] Cameron P, McGachy A, Anderson M, et al. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Macrophage IL-12 Production by *Leishmania mexicana* Amastigotes: The Role of Cysteine Peptidases and the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *J Immunol* 2004; 173(5): 3297-304.
- [134] Demarchi IG, Silveira TG, Ferreira IC, et al. Effect of HIV protease inhibitors on New World *Leishmania*. *Parasitol Int* 2012; 61(4): 538-44.
- [135] Paik D, Das P, De T, Chakraborti T. *In vitro* Anti-leishmanial Efficacy of Potato Tuber Extract (PTEx): Leishmanial Serine Pro-



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

---

Received: July 09, 2014

Revised: August 22, 2014

Accepted: October 07, 2014

## Why strategies to control *Leishmania* spp. multiplication based on the use of proteinase inhibitors should consider multiple targets and not only a single enzyme

Carlos Roberto Alves · Bernardo Acácio Santini Pereira ·  
Mariana Silva-Almeida · Franklin Souza da Silva

Received: 3 July 2014 / Accepted: 8 September 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** The use of proteinases as targets to develop novel chemotherapies against *Leishmania* spp. infections is a very promising strategy. Based on a previous study by Goyal et al. [J Mol Model (2014) 20:2099], we discuss herein the idea that only a combined treatment with distinct proteinase inhibitors would be an effective antileishmanial therapy.

**Keywords** Leishmania · Oligopeptidase B · Proteinase inhibitors · Antileishmanial therapy

### Short comments

Leishmaniasis are parasitic tropical diseases that affect humans. Currently, pentavalent antimony compounds (Glucantim and Pentostam) are the drugs of first choice to treat these diseases, while Amphotericin B, Pentamidine, Miltefosine or Aminosidine are used as secondary options [1]. In fact, to date, near 25 compounds or drug formulations have been shown to present antileishmanial effects; however, only a few have been tested properly, and even fewer are in the process to be considered for clinical use [2].

As the current chemotherapy options for these diseases are not entirely efficient and resistant strains are emerging, other components of the parasite have been proposed as potential

targets to control the cutaneous or visceral infections; and, one such target are the proteinases [3].

A pivotal advantage of using proteinases as targets for leishmaniasis treatment derives from the fact that proteolysis is a common mechanism of activation or inactivation of enzymes involved in an array of biological processes, such as digestion, blood clotting, cell differentiation and apoptosis [4]. Thus, an increasing number of research articles have become available in the scientific literature that analyze characteristics of *Leishmania* proteinases and their roles during the course of infection, defining those that are more prominently suitable as drug targets.

In this context, serine proteinases are a topic of great interest for developing new chemotherapies, and an interesting study was published recently about the activity of oligopeptidase B (OPB) inhibitors against *Leishmania* parasites [5]. This paper reported relevant information concerning the interactions of naturally occurring compounds with *Leishmania major* OPB. The authors used a structure-based approach to perform a virtual screening of a large library of compounds and two of those, COP and TOA, were selected for further analysis by molecular dynamics simulations. A good binding affinity to OPB was shown for these compounds, as well as a low toxicity to human cells, indicating a promising new path for developing drugs against *Leishmania* spp.

Using OPB as a target allowed the development of a very relevant study, but it is important to bear in mind that other serine proteinases of *Leishmania* could also be targeted in similar approaches. At the present time, the genomes of *Leishmania (L.) infantum*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) mexicana* and *Leishmania (L.) major*, as

C. R. Alves (✉) · B. A. S. Pereira · M. Silva-Almeida · F. S. da Silva  
Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Molecular e  
Doenças Endêmicas, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365,  
Rio de Janeiro CEP 21040-360, Brazil  
e-mail: calves@ioc.fiocruz.br

annotated in online databases, harbor 18, 17, 20 and 20 genes for serine proteinases, respectively. In comparison, only 2 genes encoding OPB have been identified in these species: in chromosome 9 (OPB) and chromosome 6 (OPB-like) [6]. Thus, these numbers reveal a great diversity of potential new targets for inhibition studies.

In addition to the importance of considering other serine proteinases as potential targets, studies by Munday et al. [7] and Swenerton et al. [8] showed that using OPB as a single target against *Leishmania* parasites may not be the most effective strategy. It was reported that, although knockout of the OPB gene does cause a defect in the differentiation of *L. (L.) major* during experimental infection assays in animals, this effect is only transient, suggesting that OPB is important in virulence processes but may play a less relevant role in pathogenesis of the disease.

As indicated in these studies, the inhibited OPB activity may be compensated by a second OPB-like enzyme. This OPB-like enzyme, although exhibiting only low sequence identity to the OPB, may compensate its activity by having a similar substrate specificity. Such specificity may be associated to a conserved amino acid residue, Glu-621, as well as other important residues composing the S1 binding site [7].

So, these observations are in agreement with the idea that targeting a single proteinase, OPB in this case, is not an appropriate strategy to treat leishmaniasis, even more so when one considers the complex profile of proteinases of *Leishmania* spp. [6]. We advocate that, to develop an efficient chemotherapy strategy, it is necessary to consider the use of multiple protease inhibitors and eventually even combine these inhibitors with drugs currently in use. However, to date, no such combination has been tested clinically and the only reported use of a combination of drugs refers to miltefosine associated with amphotericin B [9].

The concept of a chemotherapy strategy based on a combination of proteinase inhibitors has been applied in the treatment of patients with HIV-1 infection [10]. As for infections with protozoan parasites, a combined chemotherapy based on protease inhibitors is still a proposal at the experimental stage with few empirical data available.

An example of a potential chemotherapy against protozoa based on inhibition of multiple proteinase activities has been reported for *Plasmodium falciparum* [11]. It was shown that a combination of inhibitors targeting cysteine proteinases (falcipain) and aspartic proteinases (plasmepsin I and II) had synergistic effects on blocking this parasite's metabolism. Regarding treatment of leishmaniasis, a study reported the control of infection in laboratory mice by *Leishmania (Leishmania) donovani* through the administration of anticytokine antibody therapy combined with cystatin inhibitor [12]. Such studies shed light on

the potential of combined chemotherapies for treating these diseases, but, at the moment, clinical evidence is still lacking.

Nevertheless, classical and novel proteinase inhibitors have been assayed continuously in parasite cultures or in experimental infection models to assess their potential antileishmanial effect [3]. Some of the assayed proteinase inhibitors that could be potentially used to develop therapies are listed in Table 1.

Among these compounds, some specific inhibitors against serine proteinases, such as antipain and leupeptin, have been assayed on *Leishmania* parasites. Antipain is an oligopeptide isolated from actinomycetes and is an inhibitor of trypsin and papain [28] while leupeptin is naturally occurring inhibitor that can affect cysteine-, serine- and threonine-proteinases [29]. Although these inhibitors are known to interfere with *Leishmania* growth in vitro, they still lack clinical validation.

Our group has been continuously publishing new data about proteinases of *Leishmania* spp. [18, 30–34] and *Trypanosoma cruzi* [35–37] and their importance in host–parasite interactions for over a decade. Collectively, these manuscripts make a relevant contribution to the search for proteinases that could serve as targets for developing future leishmaniasis treatments. As consequence, during our ongoing studies, some peculiarities of proteinases of *Leishmania* spp., in the context of potential targets for drugs, have become apparent to us that could be very useful if considered in other studies in this same research field.

One of such point of interest is the fact that *Leishmania* parasites exhibit variations and fluctuations in the levels of proteinase expression during different stages of their life cycle, and, thus, it would be important to target those proteinases expressed at the parasitic stage that inhabits the vertebrate host when considering targets for novel drugs.

Another point we observed is that even minor structural differences in proteinases in the same class can affect their catalytic site microenvironment, and these variations may account for the difficulties in developing proteinase inhibitors that have wide activity against proteinases of the same class in *Leishmania* spp.

Therefore, due to all these observations, as well as the reports that suggest a great variability and importance of proteinases in these parasites, we reinforce our statement that only treatments that combine distinct proteinase inhibitors have the possibility to deliver an effective antileishmanial therapy. To this end, a deep understanding of the expression modulation of different proteinase classes, even of distinct isoforms of the same proteinase, in *Leishmania* parasites infecting vertebrate hosts is required.

**Table 1** Proteinase inhibitors tested in experimental assays against *Leishmania* spp. and against experimental infection with these parasites

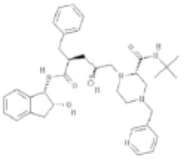
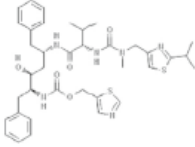
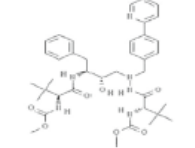
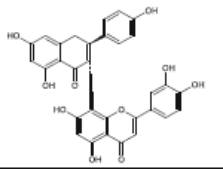
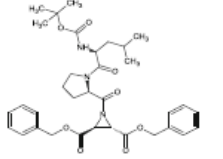
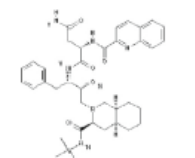
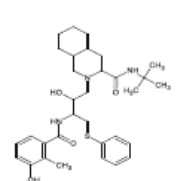
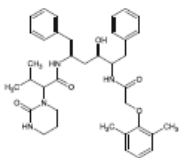
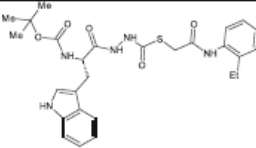
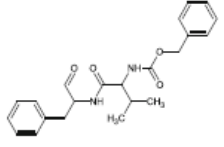
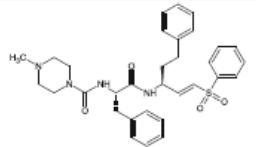
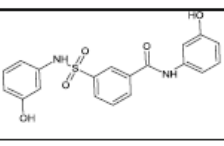
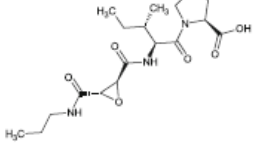
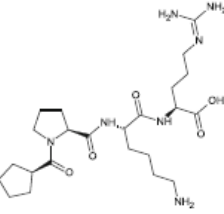
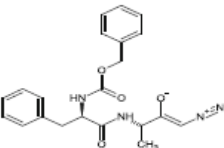
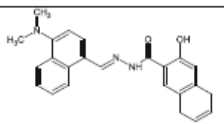
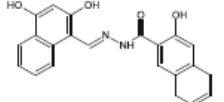
Drug	2D structure	Tested parasite	Efficiency	Target enzyme	Reference
Indinavir (CID 5362440)			IC <sub>50</sub> 100 and 400 μM (promastigote)		
Ritonavir (CID 392622)		<i>L. (L.) amazonensis</i> and <i>L. (V.) braziliensis</i>	IC <sub>50</sub> 40 and 2.3 μM (promastigote)	Aspartic proteinase	[13]
Atazanavir (CID 158550)			IC <sub>50</sub> 266 and 400 μM (promastigote)		
Fukugetin		<i>L. (L.) amazonensis</i>	IC <sub>50</sub> 3.2 μM (amastigote)	Cysteine proteinase and Serine proteinase	[14]
13b		<i>L. (L.) major</i>	IC <sub>50</sub> 40 μM (promastigote) IC <sub>50</sub> 3.0 μM (amastigote)	Cysteine proteinase	[15, 16]
Saquinavir (CID 441243)		<i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L. (L.) amazonenses</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> and <i>L. (L.) major</i>	IC <sub>50</sub> 48.04/55.21, 51.89, 40.67/24.44, 40, 36 and 46.95 μM (promastigote/amastigote)	Aspartic proteinase	[17]
Nelfinavir (CID 64142)		<i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (L.) donovani</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L. (L.) amazonenses</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> and <i>L. (L.) major</i>	IC <sub>50</sub> 18.21/22.86, 14.10, 12.44/13.83, 13.36, 14.60 and 13.37 μM (promastigote/amastigote)	Aspartic proteinase	[17]
Lopinavir (CID 92727)		<i>L. (L.) amazonensis</i>	IC <sub>50</sub> 15 μM (promastigote)	Aspartic proteinase	[19]

Table 1 (continued)

Drug	2D structure	Tested parasite	Efficiency	Target enzyme	Reference
CID 16725315		<i>L. (L.) major</i>	IC <sub>50</sub> 12.5 μM (promastigote)	Cysteine proteinase	[19]
MDL 28170 (CID 11199915)		<i>L. (L.) amazonensis</i>	LD <sub>50</sub> 23.3 μM (promastigote)	Cysteine proteinase	[20]
K11777 (CID 9851116)		<i>L. (L.) mexicana</i> and <i>L. (L.) tropica</i>	antiparasitic properties with a capacity of reduction in lesion size in treated animals and hinder the survival inside peritoneal macrophages of CD1 mice	Cysteine proteinase (amastigote)	[21, 22]
CID 1069242		<i>L. (L.) donovani</i>	IC <sub>50</sub> 0.3 μM (promastigote)	Cysteine proteinase	[23]
CA074 (CID 9821383)		<i>L. (L.) donovani</i> <i>L. (L.) major</i>	reduction the parasite survival within the macrophages and capacity induce cure in infected BALB/c mice	Cysteine proteinase	[24, 25]
Cystatin (CID 128439)		<i>L. (L.) donovani</i>	affects amastigotes growth inside macrophages in vitro and had curative effects for infected animals	Cysteine proteinase	[12]
Z-FA-DMK (CID 5488522)		<i>L. (L.) mexicana</i>	prevent infection of peritoneal cells from BALB/c mice (promastigote and amastigote) and also reduced the number of infecting parasites per host cell	Cysteine proteinase	[26]
ZLIII115A		<i>L. (L.) major</i>	prevent parasite replication as well as infection of mouse macrophages	Cysteine proteinase	[27]
ZLIII43A					



## References

- WHO (1998) Technical Report Series. Rapport sur la Santé dans le Monde 1:59
- Berman J (2005) Recent developments in leishmaniasis: epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr Infect Dis Rep* 7:33–38
- Pereira BAS, Silva FS, Silva-Almeida M, Santos-de-Souza R, Oliveira LFG, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR (2014) Proteinase inhibitors: a promising drug class for treating leishmaniasis. *Curr Drug Target* (in press)
- Beynon RJ, Bond JS (2001) *Proteolytic enzymes: a practical approach*, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford
- Goyal S, Grover S, Dhanjal JK, Goyal M, Tyagi C, Chacko S, Grover A (2014) Mechanistic insights into mode of actions of novel oligopeptidase B inhibitors for combating leishmaniasis. *J Mol Model* 20:2099
- Silva-Almeida M, Souza-Silva F, Pereira BA, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR (2014) Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. *Parasit Vectors* 7(1):387
- Munday JC, McLuskey K, Brown E, Coombs GH, Mottram JC (2011) Oligopeptidase B deficient mutants of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 175(1):49–57
- Swenerton RK, Zhang S, Sajid M, Medzihradsky KF, Craik CS, Kelly BL, McKerrow JH (2011) The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem* 286(1):429–40
- Jha TK (2006) Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. *Indian J Med Res* 123:389–398
- Hughes PJ, Cretton-Scott E, Teague A, Wensel TM (2011) Protease inhibitors for patients With HIV-1 infection: a comparative overview. *P T* 36(6):332–336
- Semenov A, Olson JE, Rosenthal PJ (1998) Antimalarial synergy of cysteine and aspartic protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 42(9):2254–2258
- Das L, Datta N, Bandyopadhyay S, Das PK (2001) Successful therapy of lethal murine visceral leishmaniasis with cystatin involves up-regulation of nitric oxide and a favorable T cell response. *J Immunol* 166(6):4020–4028
- Demarchi IG, Silveira TG, Ferreira IC, Lonardoni MV (2012) Effect of HIV protease inhibitors on New World *Leishmania*. *Parasitol Int* 61(4):538–544
- Pereira IO, Assis DM, Juliano MA, Cunha RL, Barbieri CL, do Sacramento LV, Marques MJ, dos Santos MH (2011) Natural products from *Garcinia brasiliensis* as *Leishmania* protease inhibitors. *J Med Food* 14(6):557–562
- Schurigt U, Schad C, Glowa C, Baum U, Thomale K, Schnitzer JK, Schultheis M, Schaschke N, Schirmeister T, Moll H (2010) Aziridine-2,3-dicarboxylate-based cysteine cathepsin inhibitors induce cell death in *Leishmania major* associated with accumulation of debris in autophagy-related lysosome-like vacuoles. *Antimicrob Agents Chemother* 54(12):5028–5041
- Ponte-Sucre A, Vicik R, Schultheis M, Schirmeister T, Moll H (2006) Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. *Antimicrob Agents Chemother* 50(7):2439–2447
- Valdivieso E, Rangel A, Moreno J, Saugar JM, Cañavate C, Alvar J, Dagger F (2010) Effects of HIV aspartyl-proteinase inhibitors on *Leishmania* sp. *Exp Parasitol* 26(4):557–563
- Santos LO, Marinho FA, Altoé EF, Vitorio BS, Alves CR, Britto C, Motta MC, Branquinho MH, Santos AL, d'Avila-Levy CM (2009) HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE* 4(3):e4918
- Shah PP, Myers MC, Beavers MP, Purvis JE, Jing H, Grieser HJ, Sharlow ER, Napper AD, Huryn DM, Cooperman BS, Smith AB 3rd, Diamond SL (2008) Kinetic characterization and molecular docking of a novel, potent, and selective slow-binding inhibitor of human cathepsin L. *Mol Pharmacol* 74(1):34–41
- d'Avila-Levy CM, Marinho FA, Santos LO, Martins JL, Santos AL, Branquinho MH (2006) Antileishmanial activity of MDL 28170, a potent calpain inhibitor. *Int J Antimicrob Agents* 28(2):138–142
- Williams RA, Tetley L, Mottram JC, Coombs GH (2006) Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* 61(3):655–674
- Mahmoudzadeh-Niknam H, McKerrow JH (2004) *Leishmania tropica*: cysteine proteases are essential for growth and pathogenicity. *Exp Parasitol* 106(3–4):158–163
- Desai PV, Patny A, Sabnis Y, Tekwani B, Gut J, Rosenthal P, Srivastava A, Avery M (2004) Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors using virtual screening The ChemBridge database. *J Med Chem* 47(26):660966–660915
- Somanna A, Mundodi V, Godamu L (2002) Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 277(28):25305–25312
- Maekawa Y, Himeno K, Ishikawa H, Hisaeda H, Sakai T, Dainichi T, Asao T, Good RA, Katunuma N (1998) Switch of CD4+ T cell differentiation from Th2 to Th1 by treatment with cathepsin B inhibitor in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 161(5):2120–2127
- Frame MJ, Mottram JC, Coombs GH (2000) Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. *Parasitology* 121(4):367–377
- Selzer PM, Pingel S, Hsieh I, Ugele B, Chan VJ, Engel JC, Bogoy M, Russell DG, Sakanari JA, McKerrow JH (1999) Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(20):11015–11022
- Umezawa S, Tatsuta K, Fujimoto K, Tsuchiya T, Umezawa H (1972) Structure of antipain, a new Sakaguchi-positive product of streptomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* 25(4):267–270
- Maeda K, Kawamura K, Kondo S, Aoyagi T, Takeuchi T (1971) The structure and activity of leupeptins and related analogs. *J Antibiot (Tokyo)* 24(6):402–404
- Silva-Almeida M, Pereira BA, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR (2012) Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasit Vectors* 5:160
- Pereira BA, Britto C, Alves CR (2012) Expression of infection-related genes in parasites and host during murine experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Microb Pathog* 52(2):101–108
- Rebello KM, Britto C, Pereira BA, Pita-Pereira DD, Moraes MO, Ferreira AB, Cysne-Finkelstein L, Otto TD, Côrtes LM, da-Silva GG, Alves CR (2010) *Leishmania (Viannia) brasiliensis*: influence of successive in vitro cultivation on the expression of promastigote proteinases. *Exp Parasitol* 126(4):570–576
- Rebello KM, Côrtes LM, Pereira BA, Pascarelli BM, Côrtes-Real S, Finkelstein LC, Pinho RT, d'Avila-Levy CM, Alves CR (2009) Cysteine proteinases from promastigotes of *Leishmania (Viannia) brasiliensis*. *Parasitol Res* 106(1):95–104
- Alves CR, Corte-Real S, Bourguignon SC, Chaves CS, Saraiva EM (2005) *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation in vitro. *Exp Parasitol* 109(1):38–48
- Bourguignon SC, Cavalcanti DF, de Souza AM, Castro HC, Rodrigues CR, Albuquerque MG, Santos DO, da Silva GG, da Silva FC, Ferreira VF, de Pinho RT, Alves CR (2011)

- Trypanosoma cruzi*: insights into naphthoquinone effects on growth and proteinase activity. *Exp Parasitol* 127(1):160–166
36. Bouguignon SC, Castro HC, Santos DO, Alves CR, Ferreira VF, Gama IL, Silva FC, Seguin WS, Pinho RT (2009) *Trypanosoma cruzi*: in vitro activity of Epoxy-alpha-Lap, a derivative of alpha-lapachone, on trypomastigote and amastigote forms. *Exp Parasitol* 122(2):91–96
37. Pinho RT, Beltrami LM, Alves CR, De-Simone SG (2009) *Trypanosoma cruzi*: isolation and characterization of aspartyl proteases. *Exp Parasitol* 122(2):128–133