

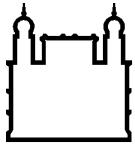
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Cisteína proteinase B de *Leishmania (Viannia) braziliensis*:  
caracterização bioquímica e modulação da expressão durante a  
diferenciação *in vitro*

CINTHIA BERNARDES GOMES

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*Cynthia Bernardes Gomes*

Cisteína proteinase B de *Leishmania (Viannia) braziliensis*:  
caracterização bioquímica e modulação da expressão durante a  
diferenciação *in vitro*

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**

Fevereiro de 2017

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

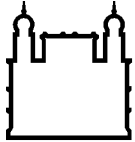
G633 Gomes, Cinthia Bernardes

Cisteína proteinase B de *Leishmania (Viannia) braziliensis*:  
caracterização bioquímica e modulação da expressão durante a  
diferenciação *in vitro* / Cinthia Bernardes Gomes. – Rio de Janeiro, 2017.  
xvi, 100 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biologia Parasitária, 2017.  
Bibliografia: f. 71-86

1. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 2. Cisteína proteinases B  
(CPB). 3. Catepsina L. 4. Z-Phe-Arg-7-amino-4-metilcoumarina. 5. Z-Phe-  
Phe-Fluorometil cetona. 6. Trans-epoxisuccinil-L-leucilamida (4-  
guanidino) butano. I. Título.

CDD 579.84



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**AUTOR: CINTHIA BERNARDES GOMES**

Cisteína proteinase B de *Leishmania (Viannia) braziliensis*:  
caracterização bioquímica e modulação da expressão durante a  
diferenciação *in vitro*

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

**Aprovada em: 13/02/2017**

**EXAMINADORES:**

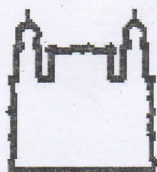
**Prof<sup>ª</sup>. Dra.** Alda Maria da Cruz/Fiocruz / Presidente

**Prof<sup>ª</sup>. Dra.** Suzana Corte Real Faria/Fiocruz

**Prof. Dr.** Saulo Cabral Bourguignon/UFF

**Prof. Dr.** Valmir Laurentino Silva/Fiocruz

Rio de Janeiro, 13 de fevereiro de 2017



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Cinthia Bernardes Gomes**, sob orientação do Dr. Carlos Roberto Alves. Ao décimo terceiro dia do mês de fevereiro de dois mil e dezessete, realizou-se às treze horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **"Cisteína proteinase B de *Leishmania (Viannia) brasiliensis*: caracterização bioquímica e modulação expressão durante a diferenciação in vitro."** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Estudos Bioquímicos e Moleculares de Parasita, Vetores e Hospedeiros.. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Alda Maria da Cruz - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Suzana Corte Real Faria - IOC/FIOCRUZ, Dr. Saulo Cabral Bourguignon - UFF/RJ e como suplentes: Dr. Valmir Laurentino Silva - ENSP/FIOCRUZ e Dr<sup>a</sup>. Luciana Pereira Rangel – UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 13 de fevereiro de 2017.

Dr<sup>a</sup>. Alda Maria da Cruz (Presidente da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Suzana Corte Real Faria (Membro da Banca):

Dr. Saulo Cabral Bourguignon (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

*DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS QUERIDOS PAIS, JURCELENA ALVES BERNARDES GOMES E OZIAS GOMES AVELINO, QUE SEMPRE ME INCENTIVARAM A LUTAR PELOS MEUS OBJETIVOS E QUE SOUBERAM ENTENDER A MINHA AUSÊNCIA EM MUITOS MOMENTOS, DESDE QUE INGRESSEI NO DOUTORADO.*

*AO MARIDO EDUARDO ROMBOM HALFEN, OBRIGADA POR ME AGUENTAR NOS MOMENTOS DE ESTRESSE NOS MESES EM QUE DEDIQUEI A CONCLUSÃO DESTA TESE E POR TER ME AJUDADO NO TRATAMENTO GRÁFICO DAS FIGURAS.*

*AGRADEÇO A DEUS PELO PRESENTE QUE É A MINHA FILHA MARIA VITÓRIA.*

*AOS MEUS AVÓS DIMAS ALVES DE CAMPOS E ANITA MARÇAL BERNARDES QUE SEMPRE SONHARAM QUE SUA NETA FOSSE UMA DOUTORA!*

*AO MEU ORIENTADOR DR. CARLOS ROBERTO ALVES QUE ME AJUDOU A CRESCER PROFISSIONALMENTE E GRAÇAS A VOCÊ, ESSA TESE CHEGOU A UMA CONCLUSÃO!*

## AGRADECIMENTOS

Eu te louvo, meu Deus todo poderoso, por ter me dado forças e coragem para chegar até aqui. Agradeço a ti, Nossa Senhora, que sempre passou na frente das minhas tribulações.

Obrigada, Senhor Jesus, pelos pais maravilhosos que me deram e que sempre me apoiaram nessa conquista e estiveram comigo quando estava doente, abatida e precisando do carinho deles. Muito obrigada minha mamãe, Jurcelena Alves Bernardes Gomes, pelo exemplo de força de mulher e de mãe e que nos momentos em que eu estive triste me orientava e me dava forças para ficar de pé. Obrigada meu papai, Ozias Gomes Avelino que é um exemplo de pai e que sempre me ensinou e ajudou a realizar os meus sonhos. E se alcancei meus objetivos, foi graças a vocês, meus pais, que amo muito!!!

Bendito seja Deus pela vida dos meus avós que muito amo: Dimas Alves de Campos e Anita Marçal Bernardes que sempre na simplicidade deles, rezavam o terço para eu conseguir ser uma doutora.

Também não posso deixar de agradecer aos meus sogros Mary Rombom Halfen e Isaac Halfen que me deram um grande presente que é meu marido Eduardo Rombom Halfen, que amo. Agradeço a Deus e a você Eduardo, que nos deu a nossa filha linda Maria Vitória!

Eu te bendigo, Jesus Cristo, pelos anjos que puseste na minha vida que são meus amigos Neide (madrinha), Rosana, Maria Martins, Elizabete, Moacir, Neuza, Vanderlei Viana, Anna Karla, Paulo Vinicius, Dr. Rodrigo Moura, Dr. Giusepe Porto, Paula Bonatto, Dr. Maulori Cabral, Amarildo, Robson. Obrigada, Padre Damião, meu pastor, irmão e meu orientador espiritual. Também agradeço ao sr. Padre Givanildo Luiz que orou para que essa conquista se realizasse.

Te louvo, Jesus, pelo orientador que me deste aqui nessa terra, que por vezes foi um pai para mim. Às vezes doce, às vezes severo, me fez compreender os mistérios da ciência e de como desenvolver uma pesquisa. O considero não só como orientador, mas como amigo. Essa pessoa é você: Dr. Carlos Roberto Alves, meu querido orientador.

Agradeço o apoio e o carinho dos meus amigos do grupo Biomarcadores e colaboradores: Raquel, Luzia, Bernardo, Franklin, Karen, Carol, Barbara, Laura, Juliana, Luiz, Dr. Francisco, Dra. Mirian. Ao meu amigão Franklin, obrigada pelos momentos de compreensão, pois você me fez crescer como pessoa e foi também meu co-orientador!

Aos amigos e pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas: Camila Rodrigues, Lívia Uehara, Angélica, Dani, Thais, Natália Lins, Myllena, Geovane, Letícia, Ronald, Paula e Dr. Otacílio, enfim obrigada a todos que de certa forma, direta ou indiretamente, contribuíram com essa tese.

À chefe do laboratório Dr<sup>a</sup>. Constança Britto pelo apoio para realização deste trabalho.

Obrigada Dr<sup>a</sup> Léa Cysne Finkelstein do LIP/IOC, pelo incentivo e amizade, pois a senhora foi um presente de Deus na minha vida.

Agradeço a equipe de outros laboratórios, dentre eles: laboratório do Dr. Giovane e sua equipe, Monica, Luciano, Antônia, André, Paloma. Laboratório da Dr. Yara e equipe (Tatiana e Andrea). À Dra Patrícia Cuervo e equipe.

Ao Dr. Hilton Jorge Nascimento de Biomanguinhos e a equipe do seu laboratório, muito obrigada.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária e seus membros, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). Agradeço a secretária do curso Rita Gomes por ter sido tão solícita comigo.

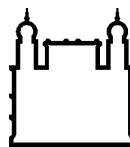
Aos integrantes da banca: revisor, titulares e suplentes pelo aceite em fazer parte deste momento importante na minha vida. Agradeço a Dra Alda Maria Da Cruz por ter dado toda atenção para revisão desta tese.

Às agências de fomento e fontes de financiamento: Fundação Oswaldo Cruz; Instituto Oswaldo Cruz; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior: pela bolsa de doutorado e pelo desenvolvimento deste trabalho.

“Deus dá as batalhas mais difíceis aos seus melhores soldados.”

**Papa Francisco**





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

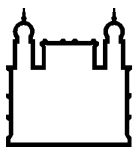
Cisteína proteinase B de *Leishmania (Viannia) braziliensis*: caracterização bioquímica e modulação da expressão durante a diferenciação *in vitro*

### RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

CINTHIA BERNARDES GOMES

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* possui um mecanismo adaptativo auxiliado pelas cisteína proteinases B (CPB), uma enzima similar à catepsina L. O foco deste trabalho é estudar a expressão das isoformas dos genes da *cpb* (LbrM.08.0810, LbrM.08.0820 and LbrM.08.0830) e a atividade enzimática da CPB durante a diferenciação do parasito, induzida pelo choque de pH e temperatura. Tendo como base a sequência a 3'UTR dos genes *cpb*, avaliou-se os níveis de expressão relativa do gene LbrM.08.0810 que revelou uma maior quantidade de transcritos na fase logarítmica dos promastigotas em relação à fase estacionária ( $> 1.5 \times$ ). A expressão dos genes *cpb* diminuíram durante o choque em pH ácido e após o choque de temperatura, o qual foi seguido por um aumento desta expressão nos demais pontos analisados ( $> 1,3 \times$ ). Os genes LbrM.08.0820 LbrM.08.0830 mostraram perfis de expressão semelhante ao gene LbrM.08.0810, mas em menores níveis. Adicionalmente, a variação dos níveis de cisteína proteinases foram analisadas a partir da flutuação da atividade proteolítica (baseado no substrato Z- Phe-Arg-7-amino-4-metilcoumarina) em amostras de proteína das culturas submetidas a transformação *in vitro*. Os resultados obtidos mostraram um aumento gradual da atividade enzimática para cada ponto do processo de diferenciação, em relação aos níveis de proteólise em amostras de promastigotas de fase logarítmica ( $3,1 \pm 0,30 \text{ mmol min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$ ) a um pico de atividade após 72 horas de incubação a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\pm 4,2 \text{ } 0,30 \text{ mmol min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$ ), seguido por uma diminuição aguda após 96 horas de incubação a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $2,8 \pm 0,30 \text{ nmol min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$ ). As atividades foram inibidas por Z-Phe-Phe-Fluorometil Cetona e trans-epoxisuccinil-L-leucilamida (4-guanidino) butano, provando se tratar de cisteína proteinases semelhantes à catepsina - L. Utilizando ensaios de ressonância de plasma de superfície, foi possível demonstrar que a enzima recombinante rCPB LbrM.08.0810 é capaz de se ligar à E-64, a pH 5,0 e pH 7,0 com as melhores constantes de equilíbrio. Coletivamente estes resultados indicam pela primeira vez a modulação da expressão e a potencial atividade biológica de catepsina-L símile durante a diferenciação *in vitro* de *L. (V.) braziliensis* induzida pelo choque de pH ácido e pelo aumento de temperatura. O conjunto de resultados obtidos nesse trabalho indica que as cisteína proteinases atuam nas etapas de diferenciação da *L. (V.) braziliensis*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Cysteine protease B of *Leishmania (V.) braziliensis*: biochemical characterization and modulation of expression during differentiation in vitro

### ABSTRACT

PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

CINTHIA BERNARDES GOMES

*Leishmania (viannia) braziliensis* presents adaptive mechanisms helped of their proteinases, as cysteine proteinases B (CPB), a cathepsin L-like enzyme. The focus of this work is the *cpb* gene isoforms (lbrm.08.0810, lbrm.08.0820 and lbrm.08.0830) expression and the *cpb* enzymatic activity in the parasite during differentiation induced by acid pH and high temperature shocks. We assessed the relative expression levels of the gene lbrm.08.0810 and observed a higher quantity of transcripts in logarithmic phase promastigotes than in stationary phase promastigotes (> 1.5 times). *Cpb* genes trend to decrease during acid pH shock was followed by an increase after temperature shock, in the all assayed points (> 1.3 times). The genes lbrm.08.0820 and lbrm.08.0830 showed expression profiles similar to the gene lbrm.08.0810, but with overall lower levels. Additionally, the cysteine proteinases levels variation were analyzed by proteolytic activity fluctuation (based on substrate z-Phe-Arg 7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride) in protein samples from of the cultures submitted to in vitro transformation. The data obtained herein show a gradual increase of enzymatic activity for each point of the differentiation process, from levels of proteolysis in samples of logarithmic phase promastigotes ( $3.1 \pm 0.30 \text{ mmol min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ ) to a peak of activity after 72 hours of 32°C incubation ( $4.2 \pm 0.30 \text{ mmol min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ ), followed by an acute decrease after 96 hours of 32°C incubation ( $2.8 \pm 0.30 \text{ nmol min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ ). The proteinases activities were inhibited by z-phe-phe-fluoromethyl ketone and and trans-epoxysuccinyl-l-leucylamido(4-guanidino)butane proving their source as cathepsin-like cysteine proteinases. By using surface plasmon resonance assays, was possible to show that the recombinant rcpb lbrm.08.0810 enzyme is able to bind to the trans-epoxysuccinyl-l-leucylamido(4-guanidino)butane at pH 5.0 and pH 7.0 with the best equilibrium constants. Collectively these results indicate for the first time the modulation of cathepsin L - like expression and of its potential biological activity during the *L. (V.) braziliensis* in vitro differentiation induced by acid pH and high temperature. The set of results obtained in this study indicates that the cysteine proteinase acts in the differentiation stages of *L. (V.) braziliensis*.

<b>ÍNDICE</b>	
<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>I-INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 - Considerações gerais sobre as leishmanioses	<b>2</b>
1.2 – A <i>Leishmania (Vianna) braziliensis</i> e o seu ciclo biológico	<b>4</b>
1.3. Expressão gênica em <i>Leishmania</i> spp	<b>9</b>
1.4 - Fatores de virulência das <i>Leishmania</i> spp	<b>12</b>
1.4.1. Glicofosfolipídeos (GIPL)	
1.4.2. Lipofosfoglicanos (LPG)	<b>13</b>
1.4.3. Proteofosfoglicanos (PPG)	<b>17</b>
1.4.4. Proteína de membrana de cinetoplastídeos de 11 kDa (KMP-11)	<b>17</b>
1.4.5. Proteases	<b>19</b>
1.5. Cisteína proteinase de <i>Leishmania (Vianna) braziliensis</i>	<b>21</b>
<b>II. Justificativa</b>	<b>24</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
3.1 Objetivo Geral	<b>27</b>
3.2 Objetivos Específicos	<b>27</b>
<b>IV. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
4.1 Material e reagentes	<b>29</b>
4.2. O Parasito	<b>30</b>
4.3. Diferenciação dos parasitos in vitro	<b>30</b>
4.4. Monitoramento das transformações do parasito	<b>31</b>
4.5. Desenho dos iniciadores oligonucleotídeos específicos	<b>31</b>
4.6. A extração de RNA total e a síntese de cDNA	<b>32</b>
4.7. Eletroforese em gel de agarose desnaturante	<b>32</b>
4.8. Síntese de Cdna	<b>32</b>
4.9. Reação em cadeia da polimerase quantitativa	<b>33</b>
4.10. Ensaio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real	<b>33</b>
4.11. Determinação da expressão relativa de genes	<b>34</b>
4.12. Sequenciamento do produto da PCR dos genes <i>cpb</i>	<b>34</b>
4.13. Análise das Sequências 3'UTR	<b>34</b>
4.14. Obtenção dos extratos de proteínas do parasito	<b>35</b>
4.15. Atividades de cisteína proteinase	<b>35</b>
4.16. Clonagem e expressão da proteína recombinante de <i>L. (V.) braziliensis</i> (rCPB LbrM.08.0810)	<b>36</b>
4.17. Cromatografia de exclusão molecular	<b>37</b>
4.18. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio	<b>37</b>
4.19. Análise por Western Blotting	<b>37</b>
4.20. Ensaio de ressonância de plasma de superfície	<b>38</b>
4.21. Análise dos dados	<b>39</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
5.1. Diferenciação <i>in vitro</i> de promastigotas para amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	<b>41</b>
5.2. A expressão relativa de genes <i>cpb</i> durante a diferenciação in vitro de <i>L. (V.) braziliensis</i>	<b>41</b>

5.3. Análise bidimensional da 3'UTR dos genes cpb de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	42
5.4. Oscilação das atividades de cisteína proteinase em <i>L. (V.) braziliensis</i>	52
5.5. Estabilidade do centro ativo da proteinase rCPB LbrM.08.0810.	54
<b>VI. DISCUSSÃO</b>	<b>59</b>
<b>VII. CONCLUSÕES</b>	<b>69</b>
<b>VIII REFERÊNCIAS</b>	<b>71</b>
<b>IX. ANEXOS</b>	<b>87</b>
<b>Anexo 1:</b> Esquema representando o vetor pet 28a (+) e a inserção do fragmento do gene da cpb LbrM.08.0810.	<b>88</b>
<b>Anexo 2:</b> Confirmação da inserção da rCPB LbrM.08.0810.	<b>89</b>
<b>Anexo 3:</b> Grau de similaridade das sequências obtidas para o gene cpb LbrM.08.0810.	<b>90</b>
<b>Anexo 4:</b> Artigo	<b>91</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Páginas</b>
<b>Figura 1:</b> Taxonomia dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	<b>7</b>
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática das fases do ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp	<b>8</b>
<b>Figure 3:</b> Eletromicrografia de uma preparação de culturas de parasitos usados para diferenciação	<b>44</b>
<b>Figure 4:</b> Eletromicrografias das formas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	<b>45</b>
<b>Figura 5:</b> Análise dos produtos amplificados do gene de cisteína-proteinase B de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> .	<b>46</b>
<b>Figura 6:</b> Alinhamento das sequências 3'UTR de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	<b>47</b>
<b>Figura 7:</b> Curvas de dissociação obtidas a partir da amplificação dos genes de interesse por PCR em tempo real.	<b>48</b>
<b>Figura 8:</b> Níveis de expressão dos genes LbrM.08.0810 e LbrM.08.0820/LbrM.0830 ao longo do percurso de diferenciação de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> .	<b>49</b>
<b>Figura 9:</b> Estrutura bidimensional da região 3'UTR dos genes LbrM.08.0820 e LbrM.08.0830 de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> .	<b>50</b>
<b>Figure 10:</b> Estrutura bidimensional da região 3'UTR do gene LbrM.08.0810 de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> .	<b>51</b>
<b>Figura 11:</b> Atividades de proteinases em solução de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> .	<b>53</b>
<b>Figura 12:</b> Caracterização da proteína recombinante, rCPB Lbrm.08.0810.	<b>56</b>
<b>Figura 13:</b> Imobilização da rCPB Lbrm.08.0810 por ensaios de ressonância plasmônica de superfície.	<b>57</b>

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela I:</b> Ligação do E-64 com a proteína rCPB Lbrm.08.0810.	<b>58</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- APS - *Ammonium persulfate* (Persulfato de amônio)  
BCA - *Bicinchoninic acid* (ácido bicinconínico)  
CP - Cisteína proteinase  
CPB – cisteína proteinase B  
DMSO – Dimetil sulfóxido  
DNA – *Deoxyribonucleic acid*  
DNase I - *Deoxyribonuclease I*  
DNTPs – dextrorribonucleotídeos fosfatados  
DTT– Ditioneitol  
E64 - N-(trans-Epoxisuccinil) -L-leucina 4-guanidinobutilamida  
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)  
Enzima RT- Enzima transcriptase SuperScript III  
FF - Fração de flagelo  
FM - Fração de membrana  
GIPL – glicoinositolphospholipid (glicoinositolfosfolipídico)  
gp63 – glicoproteína 63  
GPI – glicosilfosfatidilinositol  
HisCap - Chip sensor de ouro funcionalizado com complexos de níquel-NTA  
IC3b-Fragmento inativado do componente 3.  
IFN-Interferon  
Ka- constante de associação  
Kd -constante de dissociação  
KD constante de equilíbrio  
KMP- kinetoplastid membrane protein  
LC-leishmaniose cutânea  
LM-leishmaniose mucosa  
LD-leishmaniose disseminada  
LCD - leishmaniose cutânea difusa  
LCL - leishmaniose cutânea localizada  
LMC - leishmaniose mucocutânea  
LPG – lipophosphoglycan (lipofosfoglicano)  
LT - Leishmaniose Tegumentar  
LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana  
LV - Leishmaniose Visceral

MEV – Microscopia eletrônica de varredura  
MOPS: ácido propanosulfônico [MOPS - 3-(N-morpholino)  
MSP-Principal proteína de superfície(Major  
mRNA – Messenger ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensageiro)  
NK-Natural Killer  
NaOAc- acetato de sódio  
Oligo DT- Oligonucleotídeos  
PBS – *Phosphate-buffered saline* (Salina tamponada com fosfato)  
PCR – *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)  
PMSF- *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (fluoreto de fenilmetanossulfonilo)  
PM-Metaloproteinase  
PPG – proteophosphoglycan  
PTK-Proteína tirosina -quinase  
qPCR - *Quantitative PCR* (PCR quantitativo)  
qPCR: PCR quantitativo (quantitative PCR )  
RFU - unidades de fluorescência (relative fluorescence units)  
Ribonuclease- RNase  
RT: transcrição reversa  
RU – Resonance unit (unidade de ressonância)  
RUmax - RU de dissociação máxima  
RUmin -RU de dissociação mínima  
SDS – Sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)  
SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio)  
SFB - Soro Fetal Bovino  
SPR – *Surface plasmon resonance* (ressonância plasmônica de superfície)  
SP-Serina protease  
TEMED - N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina  
TRL-Receptor Toll-like  
Tris base - *Tris(hydroxymethyl)aminomethane* (Tris (hidroximetil) aminometano)  
Z-FF-M - cetona Z-Phe-Phe-fluorometil  
Z-FR-AMC - Z-Phe-Arg 7-amido-4-metilcoumarina cloridrato de  
3'UTR - 3' *untranslated region* (região 3' não traduzida)



## **I- Introdução**

## 1.1 - Considerações gerais sobre as leishmanioses

As doenças tropicais negligenciadas, conforme definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), referem-se às doenças infecciosas que ocorrem em regiões tropicais do planeta e incluem várias enfermidades, dentre elas malária, leishmanioses, esquistossomose, oncocercose, filariose linfática, tripanossomíase e dengue. O conjunto destas doenças contribui às altas taxas de morbidade e mortalidade dos países em desenvolvimento e gerando um claro ônus econômico (Daumerie et al., 2010). Dentre estas enfermidades destacam-se as doenças causadas pelas espécies do gênero *Leishmania* as quais incluem cerca de 21 espécies agrupadas em dois grandes subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. As espécies também podem ser classificadas de acordo com a distribuição geográfica das áreas endêmicas como espécies do Velho Mundo (Europa e Ásia) e do Novo Mundo (Américas). Com relação aos vetores, o gênero *Lutzomyia* está associado à transmissão de espécies de *Leishmania* spp no Novo Mundo, enquanto que o gênero *Phlebotomus*, transmite espécies do Velho Mundo.

As manifestações clínicas da leishmaniose variam de lesões ulceradas na pele até as formas disseminadas. O espectro de apresentações clínicas nos casos humanos inclui: a leishmaniose visceral acarretada por espécies do complexo *Leishmania donovani*, e leishmaniose tegumentar causada pelas espécies que compõem os complexos, como exemplo: *Leishmania trópica*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) naiff* e *Leishmania (Viannia) lainsoni*. Não é possível determinar o número real de casos destas formas clínicas, mas certamente supera os relatados e possivelmente o estimado (Alvar et al., 2012). Da mesma forma, o número de mortes pela doença é também subestimado em vários desses países, sendo que uma das razões é a morte do indivíduo antes da doença ser diagnosticada. Entretanto, baseando-se no relato de alguns países, estima-se que o número de mortes por leishmaniose visceral seja de 20.000 a 40.000 pessoas por ano (Alvar et al., 2012).

No Brasil, no período de 2000 a 2013, a leishmaniose tegumentar (LT) apresentou média anual de 24.694 casos registrados e coeficiente médio de

detecção de 13,5 casos por 100 mil habitantes. Já para a leishmaniose visceral foram relatados 3.253 casos. [<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/vigilancia-de-a-a-z>] Acessado em: 07 de novembro de 2015.

A leishmaniose tegumentar americana permanece endêmica em vastas áreas da América Latina. Os agentes causadores da doença são a *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) panamensis*, e outras espécies relacionadas. As três formas clínicas de LTA humana são: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD). A LD é uma emergente de LTA causada por *L. braziliensis*, que ocorre, principalmente, no Nordeste do Brasil. No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras. No período de 1988 a 2007, a LTA apresentou média anual de 27.736 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 17,3 casos por 100.000 habitantes. Dados recentes mostram que o número de casos de LTA no Brasil foi de 21.147 e a taxa de mortalidade foi de 231 casos em 2010.

A LC apresenta-se com uma ou mais lesões cutâneas ulceradas, que geralmente responde bem à terapia antimonial tradicional e tendem à cicatrização. Na LD, múltiplas lesões de pele, ulceradas são frequentemente encontradas disseminadas pelo corpo do paciente, as quais podem ser precedidas por um período curto e transitório de febre baixa. A LM é a forma mais grave da LTA, afetando, principalmente as mucosas da boca, nariz e a faringe. Isso pode causar lesões faciais desfigurativas e deformações potencialmente letais nos indivíduos afetados (Ministério da Saúde, 2007).

As medidas de controle e prevenção ainda estão restritas ao controle vetorial e dos reservatórios, e ao tratamento dos doentes (Singh et al., 2012). Vacinas antileishmania de segunda geração só devem estar disponíveis em 25 anos. Desta forma, importante se faz investir em estudos dos fatores de virulência destes parasitos para o melhor entendimento da relação entre o parasito e seus hospedeiros, servindo como subsídio no desenvolvimento de novos fármacos e/ou vacinas, e as cisteína-proteinases constituem um destes fatores de virulência.

## 1.2 – A *Leishmania (Vianna) braziliensis* e o seu ciclo biológico

A atual posição taxonômica da *L. (V.) braziliensis* considera o parasito como sendo do Sub-reino Protozoa, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae (Vickerman, 1976). Entre os oitos gêneros que compõe essa Família, encontra-se o gênero *Leishmania* que, por sua vez, reúne as seções *Paraleishmania* e *Euleishmania* (Figura 1). A seção *Euleishmania* compreende o subgênero *Viannia* e outros dois subgêneros, *Leishmania* e *Sauroleishmania*. Somente as espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* são descritas como causadoras de doença no homem, enquanto que os parasitos do subgênero *Sauroleishmania* tem relatos de ocorrência em répteis. Além disso, os parasitos do subgênero *Viannia* são reconhecidos pelo comportamento peripilárico por colonizarem a parte posterior do tubo digestivo e no intestino médio abdominal do hospedeiro. Os parasitos do subgênero *Leishmania* são reconhecidos pelo comportamento suprapilárico, por ocuparem a porção do tubo digestivo anterior ao piloro do hospedeiro invertebrado, principalmente nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio. Já os parasitos do subgênero *Sauroleishmania* tem comportamento hipopilárico, estando seu desenvolvimento restrito ao intestino posterior dos hospedeiros invertebrados (Killick-Kendrick, 1999).

Durante o ciclo de vida da *L. (V.) braziliensis*, assim como as demais espécies deste gênero, o parasito apresenta duas formas evolutivas: promastigotas, presentes em insetos vetores e amastigotas intracelulares, encontradas em hospedeiros vertebrados (Muskus & Marín-villa, 2002). As formas amastigotas são imóveis sem flagelo livre e com morfologia arredondada, que parasitam células do Sistema Fagocitário Mononuclear de mamíferos (Figura 2). O núcleo tem uma localização central, anterior ao cinetoplasto, que é uma parte da mitocôndria onde o DNA mitocondrial está organizado juntamente com uma matriz de fibras finas.

As formas promastigotas apresentam flagelos livres e podem ser vistas em cultura e no intestino médio de insetos fêmeas da subfamília Phlebotominae (Díptera, Psychodidae), que promovem um movimento em um curso espiral (Nieve & Pimenta, 2000; Genaro et al., 2002). A infecção do inseto ocorre no momento do repasto sanguíneo, quando suga o sangue contendo amastigotas ou

macrófagos infectados. No trato digestivo do vetor, ocorre rompimento da membrana dos macrófagos e as amastigotas liberadas diferenciam-se em promastigota que são capazes de se multiplicar (Figura 2).

Durante o ciclo de vida deste parasito, após digestão do sangue, os promastigotas migram para a região anterior do inseto e sofrem um processo de diferenciação, denominado metaciclologênese. Durante a metaciclologênese, os promastigotas apresentam redução de tamanho do corpo celular, tornam-se extremamente móveis e altamente infectivos, passando a ser denominadas de metacíclicas (Mojtahedi et al., 2008). As formas metacíclicas colonizam a glândula salivar do inseto e são transferidas ao hospedeiro vertebrado no momento da picada, durante um novo repasto sanguíneo. Em seguida, no local da picada, estas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear presentes na derme.

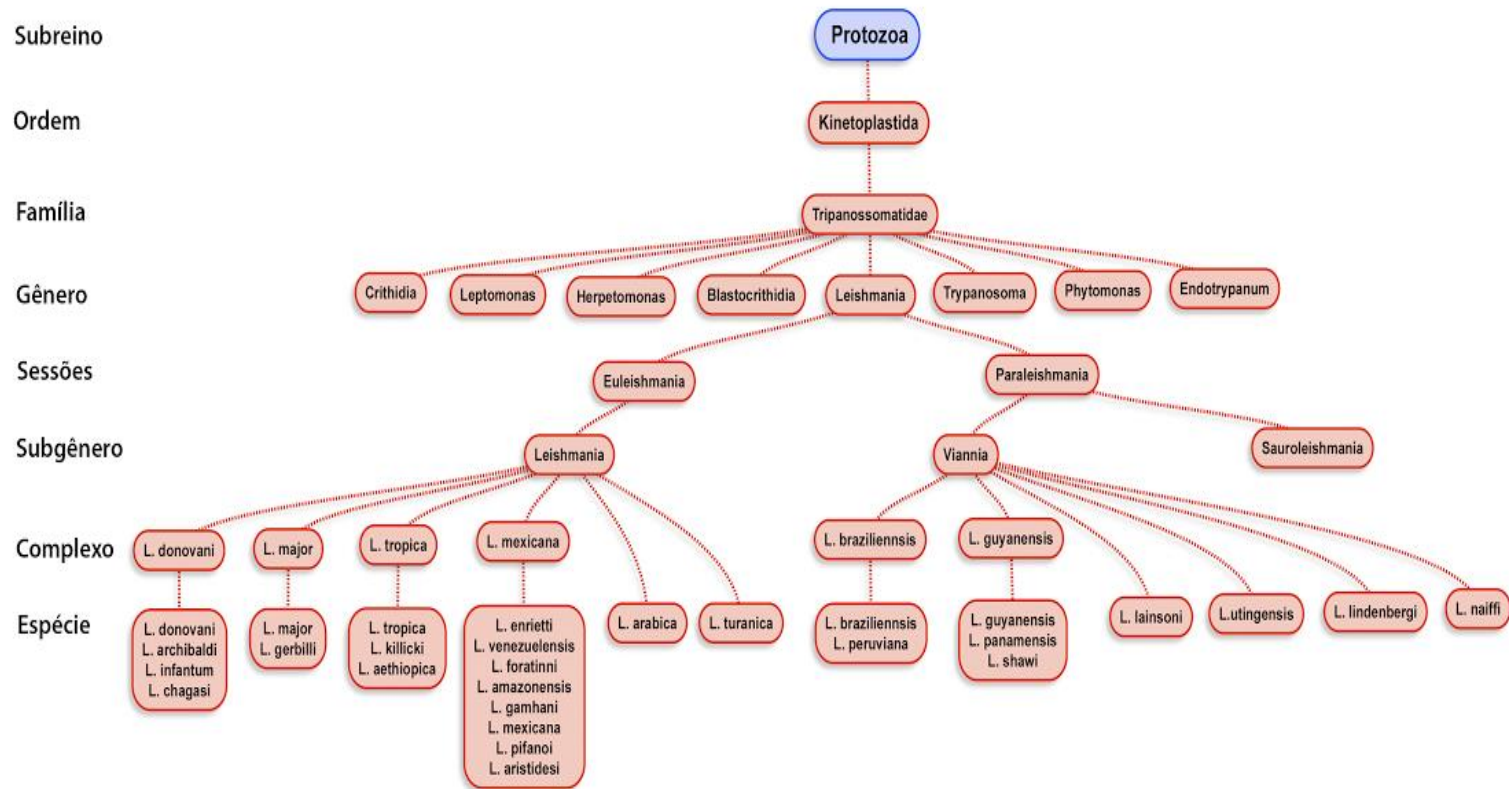
De maneira geral, a fagocitose das *Leishmania* spp é mediada por receptores da célula hospedeira (Receptor de complemento do tipo 1, Receptor 3 do complemento, Receptor mineralocorticoide, Receptor de fibronectina molécula de adesão intercelular não-integrina específica de células dendrítica, o que favorece a sobrevivência intracelular deste parasito, ou seja, contribui na virulência (Ueno & Wilson., 2012). No interior dos fagossomas, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, células arredondadas e com flagelo contido na bolsa flagelar. Este período de diferenciação pode levar de 2 a 5 dias (Courret et al., 2002)

Os fagossomas que contêm o parasito fundem-se com vesículas endocíticas e com lisossomas. Os amastigotas são resistentes às enzimas e ao pH ácido do fagolisossoma, conseguindo se multiplicar no interior de vacúolos parasitóforos por divisão binária. A fagocitose requer uma interação sequencial e circunferencial entre receptores especializados na superfície das células fagocíticas e ligantes complementares na superfície das partículas fagocitadas. Como os promastigotas de *Leishmania* spp se aderem aos fagócitos na região polar, pode-se então presumir que sua internalização é feita pelo alongamento de pseudópodes em torno do parasito de forma radial. A localização no sítio intracelular da *Leishmania* spp é predominantemente no vacúolo parasitóforo (VP), podendo residir

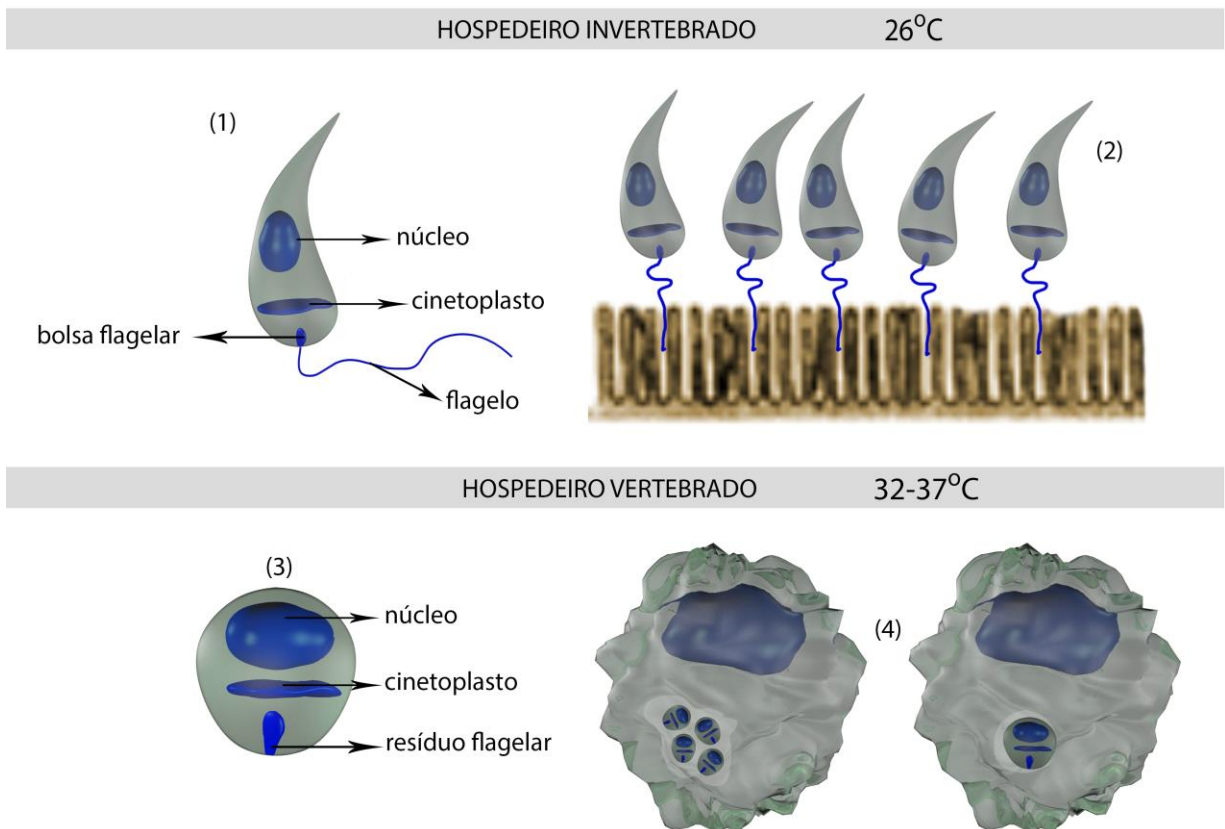
individualmente ou em grandes vacúolos com várias formas amastigotas (Rittig & Bogdan, 2000). Entretanto, em estudos com pacientes com a forma cutânea foram observados um pequeno número de formas amastigotas na região citosólica da célula, e a partir de então foi verificada a possibilidade, de nesses casos, ser induzida a resposta imunitária mediada pelo MHC de classe I.

Uma vez dentro do fagócito mononuclear, os promastigotas sofrem significantes alterações bioquímicas e metabólicas, as quais resultam na forma amastigota. É provável que o lúmen do fagolisossomo contenha uma variedade de fontes de carbono e nutrientes essenciais, mas seja pobre em hexoses (Garami & Ilg, 2001; Naderer et al., 2006). Além disso, as formas amastigotas de *Leishmania* spp desenvolveram mecanismos para subverter e escapar da ação dos macrófagos, podendo reinvasir células dendríticas e fibroblastos, bem como novos macrófagos (Handman & Bullen, 2002).

De maneira geral, o grau de disseminação dos amastigotas no corpo do hospedeiro mamífero vem sendo relacionado à espécie de leishmania e à temperatura dos órgãos afetados. Em humanos, por exemplo, as leishmanias responsáveis pela forma visceral crescem na faixa de temperatura entre 37°C e 38°C, enquanto as espécies que determinam leishmaniose cutânea, como a *L. (V.) braziliensis* a 34°C (Melo, 2004)



**Figura 1: Taxonomia do gênero *Leishmania*.** A posição taxonômica destes parasitos considera a inclusão das seções e subgêneros, e a divisão dos subgêneros em diferentes complexos e espécies. Em destaque alguns representantes do complexo *Leishmania braziliensis*. (Adaptada de Cupolillo, Boité, Porrozz, 2014).



**Figura 2: Representação esquemática das fases do ciclo biológico da *Leishmania* spp.** Os promastigotas (1) são formas alongadas com flagelo livre no meio extracelular que aderem à luz do trato digestivo dos hospedeiros invertebrados (flebotomíneos) (2) onde a temperatura é entorno de 26 °C. Essa adesão inicial faz com que os parasitos sobrevivam aos movimentos peristálticos do intestino durante o processo de digestão. Quando o flebótomo infectado com a *Leishmania* sp realiza o repasto sanguíneo, transmite os promastigotas infectivos que estão principalmente livres ou aderidas na porção anterior do aparelho bucal do inseto. No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas (3) que não apresenta flagelo livre, onde a temperatura pode variar de 32 °C (parasitos que ocorrem em lesões na superfície da pele) a 34 °C (parasitos que ocorrem em lesões em órgãos mais internos) de células como os macrófagos (4), podem ser encontrados vários ou apenas uma amastigota nos vacúolos parasitóforos, onde desenvolvem-se e multiplicam-se no meio ácido (Gomes-Bernardes et al.,2016).



### 1.3. Expressão gênica em *Leishmania spp*

*Leishmania spp*, assim como todos os tripanossomatídeos, exibe um número extraordinário de fenômenos biológicos de grande interesse, especialmente aqueles que envolvem o processamento do RNA, que são dramaticamente diferentes dos paradigmas dos eucariotos. Entre eles estão o *trans-splicing* do pré-mRNA (Agabian, 1990) e as extensivas reações de edição do pré-mRNA por adição/deleção de uridina (Stuart et al., 2005). Entretanto, a característica mais marcante é a organização dos genes nos cromossomos. Os 8.300 genes da *Leishmania* estão organizados em grandes grupos policistrônicos compreendendo até 100 genes (Myler et al., 2001).

A transcrição policistrônica é iniciada por uma RNA polymerase II (pol II) na ausência de fatores e sequências promotoras típicas da pol II. O mRNA se torna maduro por duas reações conjuntas: o *trans-splicing* de um exon *spliced-leader* (SL) para um capeamento do final '5 e a poliadenilação no final 3' (Liang et al., 2003). A adição de um exon SL de 39 nucleotídeos resulta em um mRNAs com uma estrutura "cap" 5'hipermetilada, que é bastante diferente da estrutura cap conhecida em eucariotos (Bangs et al.,1992). Um mecanismo incomum de geração do mRNA maduro, inclui uma regulação individual da expressão gênica no início da transcrição. A transcrição pela pol II parece ser constitutiva dentro de uma mesma unidade policistrônica. Recentes estudos sugerem que a estrutura da cromatina, em parte através de modificações na histona, pode determinar o ponto de início e final de transcrição (Siegel et al., 2009). Desta forma, a regulação da expressão gênica nestes organismos é quase que exclusivamente no nível pós-transcricional e pode envolver um mecanismo alternativo de *trans-splicing* ou poliadenilação, estabilidade do mRNA, eficiência na tradução, e modificações pós traducionais e estabilidade da proteína (Clayton, 2007; Haile & Papadopoulou, 2007).

Durante o seu ciclo digenético de vida, as *Leishmania spp* sofrem profundas modificações bioquímicas e morfológicas, que permite a adaptação aos diferentes ambientes em que se encontra. Estudos sobre o perfil global da expressão dos genes destacam que 3-9% dos genes em algumas espécies de *Leishmania spp* são moduladas em nível de mRNA e até 12-18% são reguladas em nível da

proteína (Saxena et al., 2007; Mcnicoll et al., 2006; Rochette et al., 2005; Rochette et al., 2009; Holzer et al., 2006; Rosenzweig et al., 2008; Leifso et al., 2007).

Um grande número de genes/proteínas e elementos *cis-acting* são associados à fase de vida do parasito e são regulados pós-transcricionalmente (Boucher et al., 2002; Mcnicoll et al., 2005; Foucher et al., 2006; Mcnicoll et al., 2006, Rochetter et al., 2007; Bringaud et al., 2007; Rochette et al., 2008; Haile et al., 2008; Smith et al., 2009). Alguns transcritos amastigota-específicos, incluindo os transcritos amastina, que codificam a maior família de proteínas de superfície em *Leishmania* sp (WU et al., 2002; Rochette et al., 2005), são regulados na tradução por um elemento 3'UTR conservado de 450 nucleotídeos (Rochette et al., 2005; Mcnicoll et al., 2005; Leifso et al., 2007). Foi mostrado também, uma degradação, específica dos transcritos amastina em promastigotas, mediada por um elemento rico em Uridina na região 3'UTR na qual a regulação envolve um mecanismo novo, a desadenilação decapeamento-independente (Haile et al., 2008).

Além do controle pós-transcricional, modificações epigenéticas também parecem desempenhar um papel na modelagem da estrutura da cromatina e, portanto, no controle da expressão gênica. Outro evento biológico que afeta a expressão dos genes e também a capacidade de adaptação de *Leishmania* spp e amplificação gênica. Em células de mamíferos, eventos de amplificação gênica são normalmente associados a instabilidade genômica. Neste fenômeno ocorre o aumento do número de cópias de genes devido a geração de moléculas circulares ou lineares de DNA extracromossomiais (Beverley, 1991)

Em algumas espécies de *Leishmania*, a amplificação gênica parece ser explorada como um recurso para aumentar o número de cópias de genes de transitória, tornando-se determinante na regulação da expressão gênica. É notável que níveis de RNA de genes contidos em segmento de DNA extracromossomiais são geralmente aumentados (Leprohon, Legare et al., 2009) e isto pode ser devido também a diferenças de padrão epigenético entre episomos e cromossomos (Thomas et al., 2007).

Nos casos melhores estudados, os eventos de amplificação gênica estão associados a mecanismos de resistência a drogas. Além das implicações que este fato tem sobre o tratamento das leishmanioses, isso também tem profundo impacto na manipulação genética deste parasito em linhagens cultivadas em laboratório. Apesar da relevância da amplificação gênica para a biologia dos tripanossomatídeos, pouco se sabe sobre as maquinarias envolvidas neste processo e tampouco sobre a sua regulação.

Os estudos de regulação gênica em protozoários do gênero *Leishmania*, e *si*, se justifica devido ao impacto das leishmanioses na saúde pública. Mas, além disto, estes estudos de um modo geral podem oferecer uma compreensão melhor da evolução dos eucariotos e dos processos moleculares relacionados à manutenção da estabilidade genômica. Estes protozoários apresentam a plasticidade genômica e, apesar disso, os mecanismos de sinalização de danos de DNA permanecem amplamente desconhecidos nestes organismos quando comparado ao que sabemos sobre este assunto em eucariotos superiores (Slamon et al.,1987).

A caracterização de algumas proteínas relacionadas ao metabolismo de DNA em tripanossomatídeos sugere que estes protozoários lidam com a manutenção do genoma de forma bastante peculiar. A replicação em *Leishmania* spp também parece ser regida por processos regulatórios não convencionais uma vez que os números de cópias de cromossomos podem variar entre diferentes isolados de uma mesma espécie (Sterkers & Lachaud, 2011). Entretanto, os mecanismos moleculares que regulam a sinalização dos danos no DNA ainda são muito limitados. Algumas observações experimentais, no entanto, sugerem que em *Trypanosoma brucei* e *L. (L.) major* o remodelamento da cromatina é requerido para resposta ao estresse genotóxico (Nardelli & Da Cunha et al.,2009; Glover & Horn 2012; Scher et al.,2012).

#### 1.4 - Fatores de virulência de *Leishmania* spp

O parasitismo das *Leishmania* spp decorre da existência de fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade desses protozoários, o que inclui os mecanismos de adesão, invasão e evasão da resposta imune do hospedeiro. De maneira geral, as *Leishmania* spp podem ser reconhecidas por fagócitos através de suas proteínas no momento que interagem com receptores de reconhecimento de patógenos expressos nos fagócitos. Alguns estudos propõem que esse reconhecimento sirva para a ativação da imunidade inata, bem como um sinal para os processos da imunidade adquirida (Muzio et al., 2000; Janeway & Medzhitov, 2002). Estudo recente demonstrou que, a entrada e sobrevivência de *Leishmania* spp em macrófagos, só são possíveis com a prévia infecção de neutrófilos que são recrutados como uma resposta normal à picada do inseto. Novos achados indicam que *Leishmania* spp são capazes de infectar os neutrófilos, sendo estes fagocitados por macrófagos, e assim desencadear um processo no macrófago conhecido como modelo "cavalo de Tróia" (Jochim & Teixeira, 2009).

Os macrófagos são oriundos da migração dos monócitos ao sítio infeccioso, que ocorre nos estágios iniciais após a picada do inseto, promovida pelos produtos da saliva do inseto vetor. A maturação destas células se dá pelo processamento antigênico, induzindo sua ativação e produção de mediadores, como as quimiocinas, dentre elas podemos citar a proteína inflamatória macrofágica (MIP-1 $\beta$ ) (Van Zandbergen et al., 2004). Nessa situação, os macrófagos são capazes de liberar citocinas que agirão diretamente na ativação e recrutamento de células T. Estas células desempenham papel muito importante, tanto diretamente, por mediar respostas celulares na ativação dos próprios macrófagos residentes, quanto indiretamente, na regulação e produção de anticorpos produzidos por plasmócitos que derivam de linfócitos B (Martinez et al., 2009). Além disso, alguns fatores de virulência destes parasitos têm a capacidade de influenciar a resposta imunitária a *Leishmania* spp, participando diretamente na resistência ou susceptibilidade à doença, dentre eles podemos citar os mediadores inflamatórios e outras moléculas (Serezani et al., 2006).

Entre os principais fatores de virulência e patogenicidade das *Leishmania* spp. destacam-se: glicofosfolipídeos (GIPL - *glicoinositolphospholipid*), os lipofosfoglicanos (LPG - *lipophosphoglycan*), proteofosfoglicanos (PPG - *proteophosphoglycan*), a proteína de membrana de cinetoplastídeos de 11 kDa (KMP-11 - 11 kDa *kinetoplastid membrane protein*) e as proteases.

#### **1.4.1. Glicofosfolipídeos**

Os GIPLs estão presentes na superfície celular e revestindo estruturas intracelulares de *Leishmania* sendo o glicolípido mais abundante (MCCONVILLE & FERGUSON, 1993). Apesar de estruturalmente análogos às âncoras GPI, os GIPLs apresentam diversas modificações bioquímicas durante sua síntese, como adição de cadeias laterais e intensas substituições em sua âncora lipídica além de estarem expressos em grandes quantidades (McConville & Ferguson, 1993), por isso representam produtos metabólicos distintos ao invés de simples precursores de âncoras (Lillico et al., 2003; Zawadzki et al., 1998). Estruturalmente, os GIPLs, apresentam um grande polimorfismo, entretanto possuem uma estrutura básica conservada de Man $\alpha$ 1-4GlcN ligada à porção lipídica, normalmente composta por alquil-acil-glicerol ou lisoglicerolliso-alquil-glicerol (liso-PI), por um resíduo de fosfatidilinositol (PI) (McConville et al., 1990).

Estudos iniciais descreveram a participação dos GIPLs de *L. (L.) major* na resposta humoral, desencadeando a produção de altos títulos de anticorpos anti-galactose em humanos. Resultados semelhantes foram observados por outro grupo em *L. (L.) major*, *L. donavani*, *L. mexicana* e *L. brasiliensis*. A primeira evidência de que os GIPLs de *Leishmania* desempenhariam um papel na imunidade inata foi demonstrada durante a inibição da produção de NO por macrófagos murinos por estas moléculas (Proudfoot et al., 1995).

Após o reconhecimento dos receptores na membrana, os GIPLs são capazes de desencadear diferentes respostas intracelulares. Foi demonstrado que os GIPLs de *L. mexicana* são capazes de ativar vias de sinalização através de proteínas tirosina – quinase (PTKs) (Tachado et al., 1997), que é uma importante via de modulação de vários processos como diferenciação celular, crescimento, metabolismo e apoptose (Geer et al., 1994).

Em parte, a dificuldade de se estudar o papel dos GIPLs se deve ao fato de que estes compartilham vias metabólicas com outras moléculas semelhantes e à ausência de mutantes específicos. Entretanto, a geração de mutantes deficientes parcial ou totalmente de GIPLs sugeriu sua participação na infecção por *L. amazonensis* e *L. mexicana* (Garami et al., 2001).

#### 1.4.2. LIPOFOSFOGLICANOS

O LPG é o glicoconjugado mais abundante na forma promastigota, sendo que na forma invasiva metacíclica apresenta o número de repetições de oligossacarídeos fosforilados duplicado e alguns constituintes alterados. Além disso, ele atua na sobrevivência do parasita durante a transmissão pelo vetor, protegendo-o contra o sistema complemento e agindo como ligante para adesão ao macrófago (Puentes et al., 1990; McConville et al., 1992). Durante o ciclo biológico do parasito, a passagem da forma promastigota para a forma amastigota é acompanhada por uma diminuição da expressão do LPG.

Com isso, de maneira geral, durante a fase inicial da infecção, o LPG promove a sobrevivência intracelular de promastigotas, inibindo, no interior do macrófago, a fusão do fagossomo com os lisossomos (Desjardins & Descoteaux, 1997). A caracterização estrutural do LPG demonstra uma completa conservação da âncora lipídica, do heptassacarídeo e da composição de dissacarídeos fosforilados. Contudo, o LPG apresenta intensa variabilidade na composição e sequência de açúcares ligados às unidades repetitivas, um pequeno oligossacarídeo neutro formando uma estrutura do tipo '**cap**' (Mcconville et al., 1992, 1995; Ilg et al., 1992; Soares et al., 2004).

Após a metaciclogênese, a molécula de LPG dobra de tamanho devido ao aumento do número de unidades repetitivas (Sacks et al., 1995; Barron & Turco, 2006). Mudanças qualitativas nas unidades repetitivas também ocorrem no LPG de *L. (L.) major* no qual os resíduos de galactose são substituídos por arabinose nas formas metacíclicas (Mcconville et al., 1992).

Em relação às espécies de leishmania, os LPGs foram majoritariamente caracterizados em espécies do parasito do Velho Mundo *L. (L.) major* (Mcconville et al., 1990), *L. tropica* (Mcconville et al., 1995, Soares et al., 2004); *L. aethiopica*

(Mcconville et al., 1995) e *L. donovani* (Sudão e Índia) (Sacks et al., 1995; Mahoney et al., 1999).

Nas formas procíclicas de *L. (V) braziliensis*, o LPG não apresenta cadeias laterais em suas unidades repetitivas, equanto podem ser observados de um a dois resíduos de  $\beta$ -glicose na forma metacíclica. O LPG de *L. (L.) infantum*, ainda não completamente caracterizado na forma metacíclica, apresenta cadeias laterais com até três glicoses nas unidades repetitivas das formas procíclicas. Esses polimorfismos nas unidades repetitivas do LPG e seu papel na interação com os hospedeiros vertebrado e invertebrado já foram amplamente estudados nas espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. Entretanto, para as espécies do Novo Mundo, não se sabe o real papel desses polimorfismos, e se essas diferenças, na estrutura e distribuição do LPG, são apenas importantes nos diferentes estágios de desenvolvimento da *Leishmania* ou podem também refletir o perfil imunopatológico da doença.

Diferentemente, nas espécies do Novo Mundo [*L. mexicana* (Ilg et al., 1992), *L. infantum* e *L. (V.) braziliensis* (Soares et al., 2002), *L. infantum* (cepa PP75)], cujos estudos são menos intensos o LPG caracterizado possui resíduos de  $\beta$ -glicose em aproximadamente 1/3 das unidades repetitivas, ocorrendo uma diminuição na expressão dessas glicoses nas formas metacíclicas (Soares et al., 2002). Similarmente, de cadeias laterais com até três glicoses foram também observadas no LPG de outra cepa de *L. infantum* (BH46) (Coelho et al., 2011). Em *L. (V.) braziliensis* (cepa M2903) o LPG não possui cadeias laterais em sua forma procíclica do parasito, enquanto um a dois resíduos de  $\beta$ -glicose podem ser adicionados nas unidades repetitivas das formas metacíclicas (Soares et al., 2005).

Ainda não foi suficientemente definida a relevância destes polimorfismos na estrutura dos LPGs no processo de interação com macrófagos murinos. Do que foi exposto, é possível concluir que o LPG constitui um fator de virulência multifuncional, tendo importância na interação dos parasitos com o hospedeiro vertebrado e invertebrado. Dentre os glicoconjugados, apenas o LPG foi identificado como importante na adesão ao epitélio do intestino médio do vetor.

Schlein et al., (1990) mostraram que o LPG de *Leishmania* inibe a síntese de enzimas proteolíticas pelo epitélio intestinal de *P. papatasi*. Pimenta et al., (1992) e Sacks et al., (1994) demonstraram que o LPG também protege o parasito de um ataque direto das enzimas proteolíticas e favorece a adesão ao epitélio impedindo que sejam excretados após digestão.

A variabilidade da estrutura do LPG também estabelece uma interação espécie específica entre *Leishmania*-flebotomíneo (Pimenta et al., 1994). Estas evidências foram confirmadas por outros autores utilizando mutantes deficientes na síntese de LPG. Dessa forma, estudos demonstraram que mutantes de *L. major* e *L. donavani*, obtidos através de tratamento químico, não foram capazes de manter a infecção nos flebotomíneos. Entretanto, a infectividade foi restaurada após adição do plasmídeo contendo o gene complementar (Butcher et al., 1996). Além disso, é importante ressaltar o papel do LPG na proteção da *Leishmania* frente as condições adversas do tubo digestivo. Trabalhos com *L. major* e *L. donavani* mostram que as modificações na estrutura do LPG são importantes para a diferenciação do parasito de promastigota para a forma metacíclica (Descoteaux & Turco, 2002).

Os parasitos deficientes em LPG mostraram-se sensíveis ao ataque de componentes do soro humano e a explosão oxidativa do macrófago, além de se revelarem incapazes de inibir a fusão do fagolisossoma imediatamente após penetração na célula hospedeira. Estes dados revelam a importância do LPG no estabelecimento da infecção e na sobrevivência do parasito no hospedeiro vertebrado (Spath et al., 2003). Além disso, outros trabalhos mostraram que em *L. donavani*, o LPG e suas unidades repetitivas de carboidratos são capazes de inibir o processo de fusão do fagossoma com o lisossoma do macrófago remodelando o fagolisossoma, promovendo o escape do parasito e a explosão oxidativa da célula hospedeira (Lodge et al., 2006).

Por outro lado, outros trabalhos demonstram que o LPG e outros glicolípidos podem atuar como ativadores de resposta imune do hospedeiro. Mais recentemente, diferentes estudos têm demonstrado a importância de estruturas glicolípicas como ativadores de células da resposta imune inata. As



características estruturais da molécula e sua ancora de GPI permitem a ligação a receptores Toll-like (TRL), responsáveis pela regulação da resposta imune inata de mamíferos (Pasare & Medzhitov, 2004). Portanto, LPG pode ativar receptores do tipo Toll 2 de células NK ativando tais células na produção de IFN- $\gamma$ , citocina que é mediador crucial para a resistência inata contra o parasito (BECKER et al., 2003).

### **1.4.3. Proteofosfoglicanos**

*Leishmania* spp são constituídas por PPGs filamentosos que formam uma rede tridimensional e gelatinosa que obstrui a região anterior do trato digestivo de flebotomíneos infectados (Stierhof et al., 1999). O bloqueio causado pelo PPG altera o comportamento de alimentação do flebotomíneo, pois aumenta o número de tentativas de picada e o tempo de repasto (Killickendrick et al., 1977; Beach et al., 1985; Rogers et al., 2002; Rogers & Bates, 2007).

Devido a sucessivas picadas, esse comportamento dos insetos infectados deve favorecer a inoculação de uma maior quantidade de parasitos na pele do hospedeiro. O PPG regurgitado juntamente com os parasitos atua como mais um potente fator de virulência (Bates & Rogers, 2004; Rogers et al., 2004) adicionalmente à saliva, como já discutido. A exacerbação da infecção causada pelo PPG tem sido atribuída a duas propriedades fundamentais: capacidade de recrutar macrófagos para o sítio da infecção e aumento na expressão e atividade de arginase nessas células, intensificando a síntese de moléculas requeridas para o crescimento do parasito internalizado (Rogers et al., 2009)

### **1.4.4 Proteína de membrana de cinetoplastídeos de 11 kDa**

A KMP-11 é uma glicoproteína de superfície associada à LPG que é encontrada tanto nos amastigotas como nos promastigotas de *Leishmania* spp, e seus níveis de expressão são aumentados durante a metaciclogênese (Matos et al., 2010). A função dessa proteína foi relacionada com a estabilização da membrana, baseando-se no grau de similaridade entre KMP-11 e os domínios anfipáticos das apolipoproteínas. A apolipoproteína é o principal componente do complexo de lipoproteínas que transporta o colesterol de alta densidade, essa

proteína preenche os espaços entre as junções formadas pelos grupos de fosfolípídeos e colesterol na membrana. Em *L. donovani*, KMP-11 parece estar envolvida na estabilização do LPG na membrana do parasito, regulando a pressão da bicamada lipídica através de uma suposta associação com o LPG (Stebeck et al.,1996).

Postula-se que a monometilarginina presente na posição 45 da sequência de KMP-11 em *L. donovani* possa estar envolvida nos mecanismos de defesa do parasito após a degradação parcial da proteína no vacúolo parasitóforo (Jardim et al.,1995). Esse resíduo de arginina modificado é conhecido como um inibidor competitivo do óxido nítrico sintase, uma enzima central envolvida na geração de radicais de óxido nítrico dentro dos macrófagos ativados (Liew et al.,1990). Foi proposto que dentro das fortes condições hidrolíticas do fagolisossomo, a KMP-11 seria liberada pelo parasito e degradada em aminoácidos pelas enzimas proteolíticas (Ramírez et al.,1998).

Estudos de antigenicidade com a proteína recombinante de KMP-11 de *L. panamensis* nos soros de pacientes com LC, LCM e LV sugere que esta proteína atua como um potente estimulador de células B durante o curso natural da infecção (Ramírez et al.,1998). Na leishmaniose visceral canina, essa proteína também age como um potente imunógeno da proliferação de células T, atuando na indução de resposta imune adquirida (Tolson et al., 1994; Jardim et al.,1991; Ramirez et al., 2001; Delgado et al., 2003).

Em humanos, a KMP-11 induz a produção de IL-10, tanto de pacientes como leishmaniose tegumentar americana (Carvalho et al., 2005), controle sadios e indivíduos portadores de infecção assintomática por *L. chagasi* (Carvalho et al.,2003). A produção de IL-10 estimulada pela KMP-11 indica que esta proteína possa desempenhar um papel protetor para o parasito no hospedeiro mamífero e estar, portanto, associada á sua virulência, sendo importante na regulação da reação inflamatória crônica, além de inibir os mecanismos responsáveis pela destruição dos amastigotas intracelulares.

#### 1.4.5. Proteases

As proteases de *Leishmania* spp têm sido implicadas em uma grande variedade de mecanismos de adaptação para a sobrevivência do parasito no hospedeiro. Estas incluem desde a modulação do sistema imune do hospedeiro, invasão e destruição de tecidos, até a disseminação do parasito e aquisição de nutrientes essenciais que assegurem a sobrevivência e proliferação para manutenção da infecção (Alves et al., 2005; Pral et al., 1993; Morgado-díaz et al., 2005; Silva-lopez et al., 2004; Rebello et al., 2009; Choudhury et al., 2011; Mckerrow,2006).

São enzimas capazes de provocar a quebra de ligações peptídicas, tendo uma ampla distribuição filogenética. Estas enzimas catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas e são classificadas com base em três critérios: tipo de reação catalisada, natureza química do sítio catalítico e relação evolutiva de acordo com a estrutura (<https://merops.sanger.ac.uk/>). Elas podem ser subdivididas em dois grupos principais, as exopeptidase e os da endopeptidase (também denominadas proteinases), dependendo do seu sítio de ação. As exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento amino ou carboxi terminal no substrato, enquanto as endopeptidases clivam ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato. Com base no grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases podem ainda ser classificadas dentro de quatro grupos, serina proteinases, aspartil proteinases, cisteína proteinases e metalo proteinases (Barrett, 1985). Dentre as proteinases de *Leishmania* spp as serina proteinases, cisteína proteinases e metalo proteinases são descritas com fatores de virulência na relação destes parasitos com seus hospedeiros. Algumas evidências também apontam para papéis das serina proteinases (SPs) como fatores de virulência: Em cepas atenuadas de *L. (L.) donovani* ocorre redução dos níveis de superfície SPs, além disso, a presença de um a SP 115 kDa está relacionada com a capacidade deste parasito infectar seus hospedeiros (Choudhury et al., 2010). Além disso, a expressão de oligopeptidase B parece ser necessária para a capacidade deste parasito permanecer não detectado nos macrófagos durante as infecções (Munday et al., 2011).

As metaloproteinases (PM) são as principais proteínas de superfície (MSP; *major surface protein*; ou GP63) pois, são abundantemente expressas na superfície de *Leishmania* spp. Assim, na superfície dos amastigotas e

promastigotas são capazes de hidrolisar diversos substratos e apresentam uma ampla faixa de pH ótimo. Nos promastigotas atua resistência à lise pelo complemento através da clivagem do C3b à sua forma inativa (iC3b) a qual se mantém opsonizada, mas perde a capacidade de induzir a formação do complexo C5b-C9 (Chaudhuri & Chang, 1988). Além disso, é provável que a GP63 atue como opsonina, ligando-se a frações inativas do complemento, que possuem um receptor específico na superfície do macrófago, facilitando, assim, a fagocitose de promastigotas (Brittingham et al., 1995; Silva et al., 1989).

No interior dos macrófagos, os promastigotas transformam-se em amastigotas intracelulares obrigatórios e a GP63 desempenha uma importante função de sobrevivência. Uma vez que ela é capaz de evitar a degradação de peptídeos, necessários para o crescimento dos amastigotas, além de proteger os amastigotas do ataque de enzimas líticas produzidas no fagolisossomo (Yao; Donelson; Wilson, 2003). Aparentemente, a GP63 também pode interagir com células do sistema imunológico hospedeiro, através da clivagem de os receptores CD4 e, conseqüente, redução dos mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários resposta mediada por células T (Hey et al., 1994). Além disso, a GP63 cliva peptídeos intracelulares, previne a apresentação de antígenos e inibe a quimiotaxia de macrófagos (Garcia et al., 1997).

As cisteína proteinase (CP) são atualmente a classe de proteínas com mais relatos de atividades como fatores de virulência em espécies de *Leishmania* e são fatores para *L. (L.) mexicana* alterar a sinalização de macrófagos (Abu-Dayyeh et al., 2010). De todas as CPs distintas destes parasitos, três CPs foram bem estudadas, sendo duas do tipo catepsina L (CPA e CPB) e uma do tipo catepsina B (CPC). Sabe-se que a atividade mais elevada de CPs de *L. (L.) amazonensis* ocorre em amastigotas mais do que em promastigotas (De Araújo Soares et al., 2003), e que existe uma correlação entre os níveis de expressão de CPs e infectiosidade dos parasitos, realçando assim a potencial que estas proteinases têm para influenciar o resultado da infecção.

Estudos de supressão de genes CPs em *Leishmania* spp provaram o importante papel de tais proteinases: supressão da expressão de CPs diminuiu a infectividade de *L. (L.) infantum* em hamsters (Poot et al., 2006) e de *L. (L.) chagasi* em culturas de células humanas (Hide et al., 2008). Além disso, a

supressão das múltiplas cópias de genes CPB em *L. (L.) mexicana* reduziu a capacidade dos parasitas infectar e provocar lesões nos hospedeiros (Robertson et al., 1994; Souza et al., 1992).

Dessa forma, a CPB tem sido relatada como a CP mais relevante para parasitos do complexo de *L. (L.) mexicana* apresentando uma ampla gama de efeitos sobre o hospedeiro vertebrado. Assim, esta enzima mostra-se capaz de: promover expressão da interleucina (IL)-4 (Liu et al., 2009), inibir a expressão de IL-12 (Weinheber et al., 1998), afetar factores de transcrição STAT- 1, AP - 1 e NF-kB (Cameron et al., 2004), prejudicar a produção de óxido nítrico (Alves et al., 2004) e clivar proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (De Souza Leao et al., 1995).

Uma porção específica da CPB, o prolongamento do terminal COOH, o qual não é observado em outros PCs, tem sido implicada no processo de infecção no hospedeiro vertebrado, influenciando a produção de citocinas e óxido nítrico pelas células do hospedeiro e a capacidade dos parasitos em sobreviver no interior de macrófagos (Alves et al., 2004; Pereira et al., 2011).

Ambas CPA e CPC têm sido relatadas a desempenhar papéis na interação parasito-hospedeiro, ainda que com menor relevância do que a CPB. A supressão de CPA e CPC leva a efeitos menos significativos: *L. (L.) mexicana* com gene CPC suprimido foram mais suscetíveis a morte por células do hospedeiro (Bart et al., 1997; Mottram et al., 1998) e *L. (L.) infantum* com gene suprimido CPA apresentaram menor capacidade de infectar hospedeiros mamíferos (Somanna et al., 2002).

### **1.5. Cisteína proteinase de *Leishmania (Viannia) braziliensis***

De acordo com a literatura acadêmica os estudos de enzimas proteolíticas de parasitos têm aumentado consideravelmente pelo fato destas enzimas constituírem importantes fatores de virulência diretamente relacionados com a interação parasito-hospedeiro e representarem alvos promissores para a imunoterapia e quimioterapia (Mckerrow, 1989; Selzer et al., 1999; Sajid & Mckerrow, 2002). No entanto, nos últimos 23 anos, são escassos os estudos sobre cisteína proteinase de *L. (V.) braziliensis* o que explica a carência de informações sobre a atuação destas enzimas.

Os genes das proteases correspondem a 2,18% do total de genes em *L. (V.) braziliensis* e das classes de proteases deste parasito, as cisteína proteinases correspondem a 43% dos genes de protease. Nesta espécie, os genes de cisteína proteinases estão presentes exclusivamente presentes no cromossomo 28 (Silva-Almeida et al., 2014), existindo 34 genes distintos que codificam para esta classe de enzima e, entre estes, existem somente três cópias do gene *cpb* (Lbrm 0810, Lbrm0820 e Lbrm0830) que correspondem a três alelos no cromossomo oito ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)). A análise das sequências comparando com o banco de dados de nucleotídeos do *Gene Bank* através do programa *BLAST* revelou identidade máxima de 98% para estas sequências. Devido a este alto grau de similaridade são considerados genes ortólogos e podemos sugerir que sejam isoformas (Silva-Almeida et al., 2014).

A CPB de *L. (V.) braziliensis* foi caracterizada e teve sua localização subcelular determinada em promastigotas. Os resultados deste estudo indicaram a presença de homólogos CPB ricos em manose na superfície dos promastigotas do parasito e ressaltam a necessidade de mais estudos sobre estas em enzimas de *L. (V.) braziliensis*, com ênfase em métodos de enriquecimento para detecção enzimática (Rebello et al., 2009). Os achados deste estudo reforçam os resultados previamente obtidos com método concentração com detergente não iônico, o surfactante octilfenoxipolietoxietanol (Alves et al., 1993).

Recentemente, foi realizada a análise da expressão da CP em promastigotas infectivas de *L. (V.) braziliensis*, examinando a expressão induzida por sucessivas passagens em cultura *in vitro*. Os resultados deste estudo indicaram que a expressão de cisteína proteases é quantitativamente alterada após sucessivas passagens dos promastigotas em meio de cultura Schneider's à 26°C. Também observou-se não existir uma relação quantitativa direta entre atividade enzimática sobre o substrato pGlu-Phe-Leu-pNitroanilida e a quantidade relativa de transcritos dos genes para CPB, o que vem sendo relacionado ao mecanismo de regulação pós-transcricional semelhante ao descrito para a regulação da maioria dos genes em tripanossomatídeos parasitos (Brooks et al., 2001; Haile & Papadopoulou, 2007). Isso sugere que as isoformas de CPB podem ter a

expressão diferenciada e individualmente possuírem papéis distintos na interação parasito-hospedeiro (Rebello *et al.*, 2010).

Apesar da função biológica das proteínas expressas por estes genes ainda não ser conhecida, sabe-se que a expressão destes genes é regulada durante o ciclo de vida do parasito, podendo atuar nos mecanismos adaptativos destes hospedeiros. Em humanos foi demonstrado que as cisteínas proteinases CPA e CPB induzem baixa secreção de IL-10 em culturas de linfócitos periféricos de pacientes com LC causada por *L. (V.) guyanensis*, enquanto que em *L. (L.) major* induziram alta produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 (Pascalis *et al.*, 2003).

Uma CPB recombinante de *L. (V.) braziliensis* (rCPB2.3 $\Delta$ CTE) foi expressa em *Escherichia coli*, isolada e caracterizada pela primeira vez, se observou que sua região madura compartilhava uma elevada identidade (76,4%) com a CPB 2.8 de *L. mexicana* (rCPB2.8) e tem resíduos de aminoácidos idênticos no S(1), tríade catalítica e no subsítio S '(1). Além disso, neste mesmo estudo, um inibidor potente com resíduo de aminoácido prolina na posição P1 mostrou-se se com alta afinidade para rCPB2.3 $\Delta$ CTE e menor afinidade para rCPB2.8 o que preferiu clivar resíduos de aminoácido fenilalanina, leucina e asparagina na mesma posição.

Os resultados apresentados pelos autores são indicativos que a CPB de *L. (V.) braziliensis* constitui um importante alvo quimioterápico para controle da infecção por esta espécie (Lanfranco *et al.*, 2008).

## **II. Justificativa**



O presente estado de conhecimento da bioquímica revela que os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam características peculiares quanto à composição e expressão de suas proteases. Neste contexto, é notória participação das CPBs nos mecanismos de sobrevivência e multiplicação dos promastigotas e amastigotas, e também na degradação intracelular de proteínas. Alguns artigos apontam que *Leishmania* spp utilizam as CPBs para subverter diversas funções do sistema imune dos hospedeiros mamíferos, favorecendo o tipo de resposta que é mais vantajoso para a sobrevivência do parasito e disseminação da infecção: a resposta Th2 (Alexander & Bryson, 2005). Outros estudos apontam para o envolvimento destas enzimas no fenômeno de autofagia, mormente relacionados com transformação do parasito, de promastigota a amastigota (Williams et.al, 2006).

Estes dois exemplos de atuação das CPBs indicam que tais enzimas podem contribuir na adaptação das *Leishmania* spp aos seus hospedeiros, quando experimentam ambientes com características bioquímicas e físicoquímicas distintas. No entanto, estas enzimas vêm sendo estudadas principalmente em espécies do subgênero *Leishmania* e raros são estudos em parasitos do subgênero *Viannia*, como previamente relatado no ítem “1.5” da seção anterior.

Neste contexto foi proposto este trabalho e os resultados obtidos poderão contribuir ao entendimento de mecanismos importantes na relação do parasito com seus hospedeiros, vertebrado e invertebrado. Visamos agregar novos dados sobre a CPB simulando *in vitro* as condições de transformação das formas promastigotas para amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. O norteador deste estudo foi a capacidade de adaptação desse parasito, como um requisito para o sucesso da relação com seu hospedeiro, que se dá por seleção natural, em um determinado ambiente. Nas espécies do gênero *Leishmania*, esse fenômeno se deve a necessidade de diferenciação dos parasitos quando mudam de hospedeiros.

### **III. Objetivos**

### 3.1 Objetivo Geral

Neste trabalho foi proposto, examinar por meio de provas bioquímicas e moleculares as cisteínas proteinases B (catepsinaL-símile) de *L. (V.) braziliensis* durante a diferenciação de formas promastigotas em amastigotas.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Induzir a diferenciação *in vitro* dos promastigotas em amastigotas de *L. (V) braziliensis* induzida por choque de pH e temperatura, sequencialmente;
- Caracterizar as estruturas as 3'UTR referentes aos genes catepsinas L (LbrM.08.0810, LbrM.08.0820 e LbrM.08.0830) de *L. (V) braziliensis*;
- Avaliar a expressão diferencial dos genes Lbrm.08.0810 e LbrM.08.0820/LbrM.08.0830 de *L. (V) braziliensis* nos tempos iniciais da diferenciação *in vitro*;
- Avaliar a atividade enzimática das catepsinas durante a diferenciação do parasito;
- Avaliar a influência da variação do pH na estabilidade do centro ativo da cisteína proteinase recombinante (rCPB LbrM.08.0810).

## **IV. Material e Métodos**

#### 4.1 Material e reagentes

**Applied Biosystems (Califórnia, EUA):** SYBR green master mix.

**Caltag Laboratories, (Califórnia, EUA):** agarose foi obtido da Gibco BRL (Grand Island, NY, EUA) e Anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase obtido em cabra (anti-coelho IgG HRP).

**GE Healthcare Life Sciences (São Paulo, Brasil):** coluna de filtração em gel Superdex 75 (GL 10 x 300)

**Invitrogen, Life Technologies (São Paulo, Brasil):** Soro fetal bovino (SFB), água tratada com DEPC, Platinum Taq DNA polimerase (polimerase de ADN), ADNase I grau de amplificação (ADNase I) e SYBR Verde kit (SYBR Verde ROX Mix).

**BioRad Laboratories (Califórnia, EUA):** Membrana de nitrocelulose e  $\beta$  mercaptoetanol.

**ICx Nomadics, Inc. (Oklahoma, USA):** Chip sensor de ouro funcionalizado com complexos de níquel-NTA (HisCap).

**Millipore corporation (Billerica, USA):** filtro com membrana de nitrocelulose de 0,22 $\mu$ m (Millex GP).

**Pierce Chemical Co. (Dallas, EUA):** Kit de Ensaio de Proteína Micro ácido bicinconínico (BCA kit) e marcador de peso molecular para eletroforese de proteínas (Prestained Protein Ladder - SM0671).

**Promega Biotecnologia Ltda (Sao Paulo, Brasil):** GoTaq Hot Start mestre e misturas de PCR Clean-Up System.

**Promega Co. (Madison, EUA):** Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.

**Qiagen (Hilden, Alemanha):** RNeasy Mini Ki, enzima RNase-out e coluna contendo resina NI-NTA Agarose (NI-NTA).

**Santa Cruz Biotechnology (Califórnia, EUA):** Kit para detecção de quimioluminescência: (Chemiluminescence luminol reagent, kit-ECL).

**Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, EUA):** acetato de sódio (NaOAc), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido propanosulfônico [MOPS - 3-(N-

morpholino), azul de Trypan, comassie blue R-250, ditioneitol (DTT), estreptomicina, glicerol, meio *Drosophila* Schneider, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), N-N' metil bis acrilamida, penicilina, persulfato de amônio (APS), ponceau S, Tris(hidroximetil)aminometano (tris base), sulfato de dodecil de sódio (SDS), dimetilsulfóxido (DMSO), Triton X-100 (TX-100), Tween 20, cetona Z-Phe-Phe-fluorometil (Z-FF-MK), L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano (E-64), fluoreto de fenilmetanossulfonilo (PMSF), Z-Phe-Arg 7-amido-4- cloridrato de metilcoumarina (Z-FR-AMC)], e os reagentes para RT-PCR e PCR [desoxirribonuclease (DNase), Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTP), Enzima transcriptase SuperScript III (enzima RT), MgCl<sub>2</sub>, Oligonucleotídeos (Oligo DT), ribonuclease (RNase), Tampão da enzima RT 5X concentrado, Tampão da enzima Taq 10X, Taq DNA Polimerase , TRIzol ® ARN (Trizol) e macardores de massa molecular para cromatografia de exclusão molecular (Ovalbumina, Anidrase Carbonica, Quimotripsina A, Ribonuclease, Citocormo C e Aprotinina).

#### **4.2. O Parasito**

A cepa de *Leishmania (V.) braziliensis* (MCAN/BR/1998/R619) foi mantida em meio semi-sólido Novy-MacNeal-Nicolle medium (NNN) à 26 °C, e a expansão parasito foi realizada em meio Schneider's (suplementado com 20 % de soro fetal bovino, 200 IU penicilina, 200 µg/mL de estreptomicina e 2 % de urina) a pH 7,2.

#### **4.3. Diferenciação dos parasitos *in vitro***

A diferenciação *in vitro* dos promastigotas a amastigotas foi iniciada com uma suspensão de  $1,0 \times 10^6$  promastigotas/mL, na fase logarítmica, em meio Schneider's pH 7,2 (26 °C, 2 dias). Subsequentemente, os promastigotas foram transferidos na mesma densidade para o meio Schneider's pH 5,5 e incubadas (26 °C, 4 dias), quando as culturas continham 53% de formas metacíclicas. Quando os parasitos atingiram a fase estacionária de crescimento, uma alíquota da suspensão com  $1,0 \times 10^6$  promastigotas/mL foi transferida para meio Schneider's (pH 5,5) e submetida mudança de temperatura (32° C) por 96 horas. A diferenciação de promastigotas para amastigotas axênicos foi acompanhada por microscopia óptica (Zeiss Primo Star halogênio / LED Microscope).

#### 4.4. Monitoramento das transformações do parasito

A diferenciação *in vitro* foi examinada por microscopia de luz (ML) e microscopia eletrônica de Varredura (MEV) para analisar a viabilidade celular e alterações morfológicas, respectivamente.

A viabilidade celular foi avaliada usando o teste de exclusão do Azul de Tripán. Os parasitos foram incubados com o corante vital (1%) e, em seguida contados em Câmara de Neubauer. Para as análises por MEV, cerca de  $1,0 \times 10^7$  parasitos/mL em diferentes estágios de diferenciação foram lavados três vezes por centrifugação ( $8\ 000 \times g$ , 15 minutos,  $25^\circ\text{C}$ ) em 10 mM de fosfato de sódio pH 7,2 contendo 0,15 M de NaCl (PBS) e posteriormente incubados ( $4^\circ\text{C}$ , 24 horas) com 2,5% de glutaraldeído preparado em tampão contendo 0,1 M de cacodilato de sódio pH 7,2. Após nova lavagem em PBS, os parasitos foram fixados a uma lâmina de vidro revestida com Poli-L-Lisina seguido por incubação ( $4^\circ\text{C}$ , 1 hora) em solução 1% de tetróxido de ósmio preparada em tampão 0,1 M de cacodilato de sódio, pH 7,2. Em seguida, as amostras foram desidratadas numa série de gradiente de etanol (30% - 100%), o ponto crítico e secou-se, seguido por revestimento por pulverização catódica com ouro. As amostras foram observadas utilizando um Jeol® JSM-5600.

#### 4.5. Desenho dos iniciadores oligonucleotídeos específicos

Os iniciadores específicos foram obtidos após a análise do alinhamento das sequências feito na plataforma *on line* Clustal omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Inicialmente, os genes da CPB, LbrM.08.0810, LbrM.08.0820 e LbrM.08.0830, mostraram alta identidade quando utilizado a sequência do quadro de leitura aberta (ORF – *open reading framer*). Por conseguinte, foram feitas análises nas sequências 3' UTR referentes às CPBs e os iniciadores desenhados a partir desta região obtida na plataforma TriTrypDB, um banco de sequências que integra dados genômicos e funcionais de patógenos da família *Trypanosomatidae* (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Para o gene LbrM.08.0810 foi utilizada: 5'CGT GCG GCT CTA CGA TCC CCT ACA CG 3' e 5'GGA AAA GGG TGG CTG TGA TAG TCG 3' (190bp). Para os genes LbrM.08.0820 / LbrM.08.0830 foram usados 5 'CAG CGG TAC GCC GAA GTA CAA AGT G 3' e 5 'GTA TTA ACG CGA AGC TGC CAT AGC G 3' (193bp).

#### **4.6.A extração de RNA total e a síntese de cDNA**

Cerca de  $1 \times 10^8$  parasito/mL foram lisados com 0,6 mL de Trizol® (Sigma) e acrescidos de 200  $\mu$ L de clorofórmio. Após homogeneização, os tubos foram centrifugados (10 000  $\times$  g, 15 minutos, 4°C) e o sobrenadante foi recuperado em um novo tubo, onde foi adicionado de 500  $\mu$ L de isopropanol. Após homogeneização o RNA foi centrifugado (12 000  $\times$  g, 25 minutos, 4°C) e o precipitado foi lavado cuidadosamente com 500  $\mu$ L de etanol a 70 % (v/v), em sequência, foi realizada uma nova centrifugação (9 000  $\times$  g, 5 minutos, 4 °C) e ressuspensão e solubilização em 40  $\mu$ L de água livre de RNase (RNase free).

A quantificação de RNA foi determinada a 260 nm em Nanodrop (ND-1000, ThermoFischer, USA), e sua integridade foi avaliada em gel de agarose 1,2 % (p/v) desnaturante.

#### **4.7. Eletroforese em gel de agarose desnaturante**

A integridade do RNA recém-isolado foi observada em gel de agarose desnaturante 1,2 % (p/v) contendo 40 mL de H<sub>2</sub>O RNase free, 3 mL de MOPS 10  $\times$  (0,2M MOPS, 0,05M de acetato de sódio e 0,01M EDTA, pH 7,0) e 7 mL de formaldeído. As amostras contendo 1 $\mu$ g de RNA foram incubadas com solução de corrida [50 $\mu$ L de MOPS 20X, 500  $\mu$ L de formamida e 180  $\mu$ L de formaldeído, 50  $\mu$ L gel red, 2  $\mu$ L de azul de bromofenol (1 $\mu$ g/mL) ] proporção 1:4 volume final de 20  $\mu$ l, aquecidos a 65 °C, 10 minutos e mantidos por 2 minutos em gelo antes de serem aplicados no gel. Os produtos foram visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados em (UVP White Darkroom, Bioimaging Systems, USA).

#### **4.8. Síntese de cDNA**

A partir do RNA previamente extraído foi realizada a síntese de cDNA, através da reação de transcrição reversa (RT). Previamente, 5 $\mu$ g de RNA foi tratado com 1  $\mu$ L DNase I (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade - Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), segundo instruções do fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada incubando-se 5 $\mu$ g de RNA total com 1  $\mu$ L do iniciador complementar à cauda poli A (oligo dT) (70°C, 10 minutos). Logo após, foram adicionados 10 mM de DTT (0,1M/mL), 0,04 mM de dNTPs, 1  $\mu$ L de inibidor de RNase (40U/  $\mu$ L), 1  $\mu$ L enzima transcriptase SuperScript III (200U/ $\mu$ L), 4  $\mu$ L do tampão da enzima



concentrada 10X (200mM Tris-HCl e 500mM KCl, pH 8,4) e H<sub>2</sub>O (q.s.p. para o volume final de 20 µL de reação). As amostras foram incubadas por 1 hora a 42°C e a reação foi interrompida incubando em 90°C por 5 minutos. Após a reação os volumes das preparações foram ajustados para 100 µL e as amostras armazenadas a -20 °C até a sua utilização. A quantificação de cDNA foi determinada em 260 nm com aparelho Qubit 2.0 Fluorometer (ThermoFischer, USA).

Os produtos amplificados foram detectados em gel de agarose 1,7% (p/v) em TBE 0,5X após coloração com Nancy 520 (1µg/mL) e visualização sob luz ultravioleta. Os resultados foram fotodocumentados em UVP (UVP White Darkroom, Bioimaging Systems, USA).

#### **4.9. Reação em cadeia da polimerase quantitativa**

Nos testes da reação em cadeia da polimerase quantitativa convencional (*polymerase chain reaction* - PCR) o cDNA foi amplificado utilizando iniciadores específicos para os alvos descritos acima. A reação foi realizada com 1 µl de reação de cDNA, 12,5 µl GoTaq Hot Start Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 1 µL do iniciador *sense* (10 µM), 1µl do iniciador *antisense* (10 µM) e DEPC-água até 25 ul. A amplificação por PCR foi realizada com um termociclador (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). O protocolo de amplificação de cDNA foi a seguinte: 1 ciclo de 95°C (5 minutos); 30 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 20 segundos a 54 °C, 40 a 72°C, e um ciclo de 5 minutos a 72° C. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE. Coloração feita com GelRed 1: 1000 no cubo horizontal na 80V, 90min.

#### **4.10. Ensaios da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real**

A expressão quantitativa dos genes foi verificada por PCR quantitativo (*quantitative* PCR - qPCR) utilizando o ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). As reações foram realizadas em duplicatas biológicas, utilizando um kit de SYBR Green. A concentração final dos oligonucleótidos (iniciadores) na reação foi de 0,6 µM. As leituras de fluorescência foram realizadas sob as seguintes condições: pré-incubação a 95 C

durante 10 minutos, 40 ciclos de amplificação a 95 °C durante 30 segundos, e 58°C durante 60 segundos. A curva de fusão ou de dissociação foi determinada imediatamente após a amplificação, com a aquisição de leituras contínuas de fluorescência a 55 ° a 95 ° C a uma taxa de transição de temperatura linear de 0,2 °C.

#### **4.11. Determinação da expressão relativa de genes**

O método do Ct comparativo ( $\Delta$ 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* foi a amostra de cDNA de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* no tempo “0” da diferenciação fase estacionária. Como controles endógenos (genes de referência) foram utilizados genes de GAPDH e a proteína S8 do ribossomo 40S. Os valores de quantidade relativa ou níveis de expressão normalizados (RQ) foram calculados com o auxílio do software SDS 7500, e foram obtidos da média geométrica dos genes de referência.

#### **4.12. Sequenciamento do produto da PCR dos genes *cpb***

O produto de reação da PCR convencional descrito acima foi purificado com Wizard® DNA Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), seguindo o protocolo do fabricante e a quantidade determinada medindo a absorbância a 260 nm em um Nanodrop. Uma solução contendo 200 ng do produto de PCR e 1,6 pM do iniciador *sense* (Para o gene LbrM.08.0810 5'CGT GCG GCT CTA CGA TCC CCT ACA CG 3' e para LbrM.08.0820 / LbrM.08.0830 genes 5' CAG CGG TAC GCC GAA GTA CAA AGT G 3') foram enviados para sequenciamento no Applied Biosystems Scanner. Os resultados foram analisados em programa BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EUA).

#### **4.13. Análise das sequências 3'UTR**

As sequências intergênicas referentes a 3'UTR dos genes LbrM.08.0810, LbrM.08.0820, LbrM.08.0830 obtidas e alinhadas nas respectivas plataformas *on line* Tritypdb (<http://tritypdb.org/tritypdb/>) e LocARNA - Alignment & Folding (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/LocARNA/Input.jsp>). A estrutura bidimensional

foi determinada pelo programa RNAfold web Server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>).

#### **4.14. Obtenção dos extratos de proteínas do parasito**

Os extratos proteicos foram obtidos como previamente descrito (Galan et al., 1992). Os parasitos ( $2,0 \times 10^9$ ) foram lavados três vezes por centrifugação (3000xg, 10 minutos, 4°C) em PBS e, em seguida, foram submetidas a 4 ciclos de 30 minutos em vórtice de mistura, na presença de tampão de lise (100 mM de Tris-HCl pH8,0, 150mM de NaCl, 10% de glicerol, 0,6% de Triton X-100). A fração de proteína solúvel foi obtida por centrifugação das amostras (25 000 x g, 30 minutos, 4 °C), e posteriormente armazenada (- 20°C) até à sua utilização. As concentrações de proteínas das amostras de extratos foram determinadas utilizando o BCA kit.

#### **4.15. Atividades de cisteína proteinase**

Os extratos de proteínas (5,0µg) e de catepsina L e B humanas (2µg) foram caracterizados quanto a atividade de cisteína proteinase em tampão de ativação (400 mM de acetato de sódio pH 5,5 contendo 4 mM de EDTA e 8mM de DTT), em um volume final de 60 µL, usando o substrato Z-FR-AMC (0,1 mM) previamente preparada em DMSO.

As amostras foram incubadas (60 minutos, 25 °C) e a variação nas unidades de fluorescência (RFU - *relative fluorescence units*), correspondendo a clivagem enzimática dos substratos, foi monitorizada em espectrofotômetro (Molecular Devices SpectraMax (Gemini XPS). A ação de vários inibidores de proteases foi avaliada sob as mesmas condições. Os ensaios de inibição foram realizados com E-64 (10 µM) e Z-FF-MK (50 µM).

A taxa de clivagem enzimática do substrato foi definida utilizando a fórmula  $V = \Delta s / \Delta t$ , em que:  $V$  = velocidade (ou taxa de reação),  $\Delta s$  = variação de concentração de substrato, e  $\Delta t$  = variação do tempo de reação (Alves et al., 2005). A autodegradação do substrato foi controlada ao longo do ensaio, a fim de evitar leituras incorretas. A atividade enzimática é expressa em milimoles do substrato hidrolizado por miligrama de proteína por minuto ( $\text{mmol min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ).

#### **4.16. Clonagem e expressão da proteína recombinante de *L. (V.) braziliensis* (rCPB LbrM.08.0810)**

A partir do DNA genômico de *L.(V.) braziliensis*, foram realizados ensaios de PCR a fim de amplificar a fase aberta de leitura do gene LbrM.08.0810 contendo uma porção de nucleosídeos codificantes para uma cauda de histidinas. Os fragmentos foram purificados e tratados com as endonucleases de restrição que também foram utilizados nos vetores de clonagem e propagação. Utilizamos o vetor pET 28a(+) de 5369pb que é um plasmídeo com sítio múltiplo de clonagem, possui resistência ao antibiótico kanamicina e o iniciador M13 universal para sequenciamento, além do sítio para o promotor *lacL* RNA para transcrição *in vitro* (Anexo 1). Após realizar a ligação, foi misturada gentilmente metade do seu volume com a cepa de *Escherichia coli*, sempre mantidas no gelo. Após este tempo foi adicionado imediatamente 800 $\mu$ L de meio SOC condicionado a temperatura ambiente. O meio contendo as células transformadas foi removido e mantido sob leve agitação a 37 °C por 1 hora. Finalmente as células transformadas foi plaqueadas em meio LB ágar contendo o antibiótico adequado para posterior seleção dos clones positivos. Os clones selecionados foram sequenciados para garantir a correta inserção no vetor de expressão e testados para a expressão da proteína recombinante incubando-os com IPTG. A inserção do gene de interesse (LbrM.08.0810) no vetor foi confirmada por PCR de colônia (Anexo 2), cujo produto amplificado foi confirmado por sequenciamento e posterior análise por BLAST (Anexo 3).

A análise inicial da expressão foi feita através de centrifugação das culturas induzidas ou não, e posterior ressuspensão do precipitado com tampão de lise, sendo então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12 – 15 % sob condições desnaturantes. As proteínas foram analisadas por SDS-PAGE e Western Blot (com anticorpo monoclonal anti - histidina). Após otimização das condições de indução e expressão das formas recombinantes das proteínas de *L. (V.) brasiliensis*, as enzimas foram purificadas por resina de afinidade Ni-NTA.

#### **4.17. Cromatografia de exclusão molecular.**

A proteína rCPB LbrM.08.0810 previamente eludas da coluna afinidade Ni-NTA foram filtradas em Millex GP e analisadas em cromatografia de exclusão molecular em coluna de filtração em gel Superdex 75 (GL 10 x 300) previamente equilibrada em tampão (Tris-HCl 50mM, pH 8.0 com NaCl 150mM) em fluxo constante (0.8 mL/min), em temperatura ambiente, durante 30 minutos. A injeção da amostra foi realizada por processo automático e as proteínas eluídas foram detectadas a 220nm / 280nm (mAU: miliequivalencias de absorbância).

Para determinar a massa molecular relativa das enzimas estudadas, utilizou se como marcadores: [Ovalbumina (44000 Da), Anidrase Carbonica (29000 Da), Quimotripsina A (24000 Da), Ribonuclease (14700 Da), Citocromo C (13600 Da) e Aprotinina (6600 Da)

#### **4.18. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio**

Os ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) foram realizados em condições redutoras, utilizando o procedimento descrito por (Laemmli, 1970). Para os ensaios de eletroforese desnaturante, as amostras de proteínas foram previamente tratadas com tampão da amostra [80 mM Tris HCl, pH 6,8; 2 % SDS (p/v); 12 % glicerol (v/v); 5 %  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v) e 0,05 % azul de bromofenol (p/v) ] e fervidas por 3 minutos. Após a eletroforese (150V a 15mA), as proteínas foram reveladas pelo método de impregnação pela prata (Shevchenko et al.,1996). O marcador SM0671 foi usado como referência para avaliar a massa molecular da proteína.

#### **4.19. Análise por *Western Blotting***

A proteína recombinante (30 $\mu$ g) foi analisada por SDS-PAGE e electrotransferidas a partir do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose (0,2 $\mu$ m). Após a confirmação da transferência das proteínas com solução de Ponceau S (0,1% de Ponceau S e 0,1% (v/v) de ácido acético), as membranas foram lavadas com água corrente e incubadas (20°C, 16 horas) em solução de PBS acrescido de 0,5 % de Tween 20 (PBST) e 5 % (p/v) de leite desnatado em pó (Molico). Em seguida, as membranas foram incubadas (25°C,

60 minutos) com anticorpo anti-cauda de histidina produzido em camundongo diluído (1:3000) em PBST e posteriormente lavadas (6 vezes, 5 minutos) e incubadas (25 °C, 60 minutos) com anti IgG de camundongos marcada com peroxidase diluída (1: 1000) em PBST. Finalmente, as membranas foram submetidas a mais um ciclo de lavagens (6 vezes, 5 minutos) e o complexo imune formado foi revelado por quimioluminescência, usando kit ECL.

#### **4.20. Ensaios de ressonância de plasma de superfície**

Os ensaios de ressonância de plasma de superfície (*surface plasmon resonance* -SPR) permitiram a análise de interações moleculares em tempo real, com a determinação da concentração ativa de analitos nas preparações biológicas. Os analitos (rCPB LbrM.08.0810 e o E-64) foram avaliados em diferentes fluxos para calcular a concentração efetiva com base na teoria da limitação do transporte de massas. Nas reações utilizamos diferentes quantidades da proteína rCPB purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (10µg, 30µg e 40µg) no chip sensor HisCap. A rCPB LbrM.08.0810 foi imobilizada na superfície do chip sensor (fluxo de 5µL/minuto) a temperatura de 25°C em tampão 10 mM tampão fosfato de sódio pH 7,0. Após captura da proteína na superfície do chip sensor foi possível avaliar a ligação desta enzima ao E-64. Os ensaios de ligação do E-64 foram realizados com variação do potencial hidrogeniônico em tampões 10mM tampão fosfato de sódio (pH4,0; pH5,0; pH6,0; pH7,0) em fluxo constante (10µL/minuto) na temperatura de 25°C. Os dados foram apresentados como unidades de ressonância (RU) e como constantes cinéticas: constante de associação ( $k_a$ ), constante de dissociação ( $k_d$ ) e constante de equilíbrio (KD). A interação enzima-inibidor foi estudada através de uma curva de saturação dos analitos em ambiente químico apropriado durante 5 minutos. A taxa inicial de interação ( $k_0$ ) foi calculada a partir da quantificação dos sítios de combinação remanescentes. Os ensaios de SPR foram conduzidos em um biossensor de transdução óptica SensiQ® Pioneer (Nomadics, Lnc. an ICx company).

#### **4.21. Análise dos dados**

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

## **V. Resultados**



### **5.1. Diferenciação *in vitro* de promastigotas para amastigotas de *L. (V.) braziliensis***

Durante este estudo, as condições *in vitro* foram estabelecidas para simular as condições do microambiente dos hospedeiros: inseto vetor e mamífero, como pH e temperatura, para a transformação de promastigotas a amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Os resultados obtidos indicaram que as condições físico-químicas semelhantes, que ocorrem no hospedeiro vertebrado, os quais foram gradualmente submetidos promastigotas, foram satisfatórias para induzir a transformação destes parasitos. As culturas de parasitos que foram ensaiadas para a diferenciação estavam enriquecidas com mais do que 50 % de formas metacíclicas (Figura 3).

A diferenciação do parasito foi constatada, por microscopia, em 96 horas após o choque de pH e temperatura. Na análise por MEV foi possível constatar três padrões morfológicos predominantes durante a diferenciação: formas alongadas com curto flagelo livre (parasitos em fase logarítmica), formas alongadas com um flagelo livre cerca de duas vezes maior do tamanho do corpo celular (parasitas em fase estacionária) e formas arredondadas sem flagelo (amastigotas). Os resultados indicam uma tendência de mudança morfológica inicialmente caracterizada por promastigotas com flagelo livre, principalmente detectadas em parasitos na temperatura de 26°C na fase logarítmica em pH 7,2 (Figura 4 A) e em fase estacionária em pH 5,5 (Figura 4B), e arredondada com consequente perda do flagelo dos parasitos, após 96 horas de incubação a pH 5,5 e 32°C (Figura 4 C)

### **5.2. A expressão relativa de genes *cpb* durante a diferenciação *in vitro* de *L. (V.) braziliensis***

Foi avaliada a expressão dos genes *cpb* LbrM.08.0810 e 0820/0830 a partir das fases de indução de diferenciação *in vitro*. Como esperado, os iniciadores foram específicos para regiões conservadas das regiões 3'UTR do *L. (V.) braziliensis* do gene *cpb* (LbrM.08.0810), permitindo a amplificação específica do fragmento 190 pb de cDNA em todas as amostras testadas por PCR (Figura 5). A análise BLAST do sequenciamento dos produtos das PCRs dos genes *cpb*

permitiu identificar uma taxa de 100% de identidade entre como os genes semelhantes à L - símile de *L. (V.) braziliensis* (Figura 6).

No entanto, não foi possível diferenciar entre os produtos da amplificação LbrM.08.0820 e LbrM.08.0830, devido à elevada homologia entre eles, incluindo a região 3' UTR, utilizando então o mesmo par de iniciadores para ambos, amplificando um fragmento de 192 pb (Figura 6).

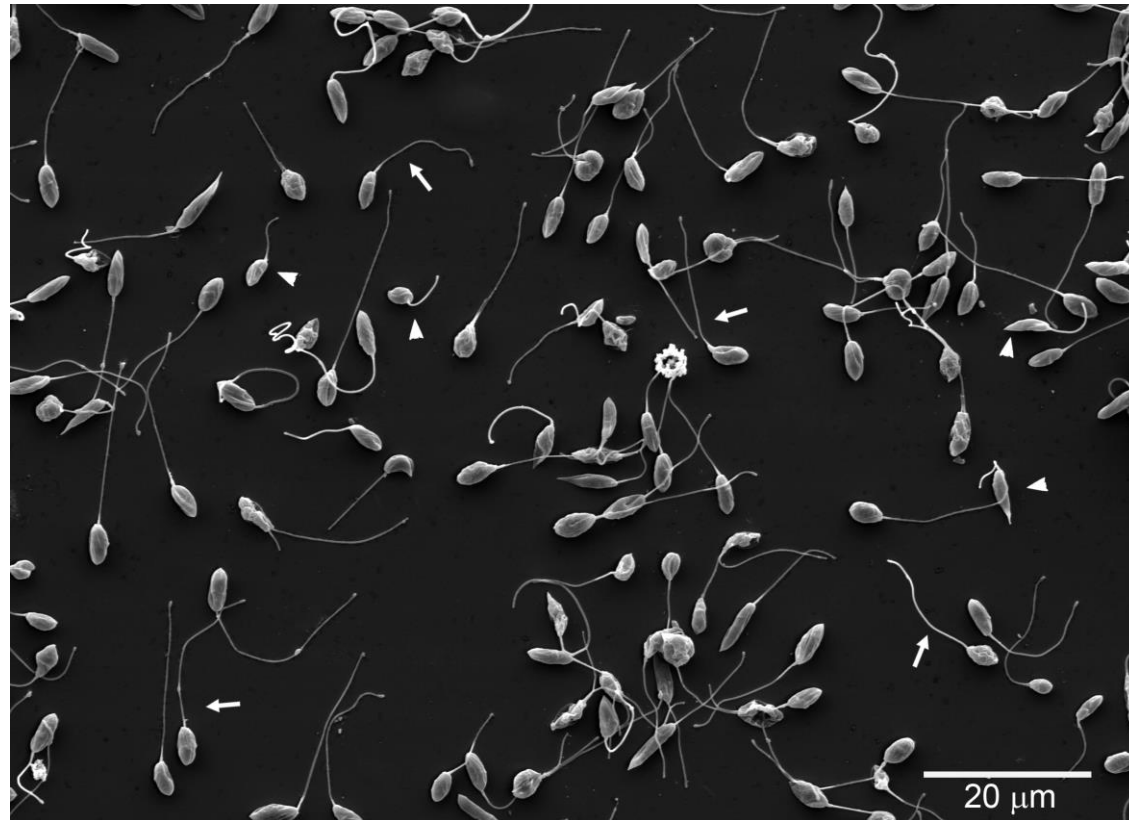
Uma vez identificados os produtos da PCR com os iniciadores para 3'UTR dos genes de *cpb* foram realizados ensaios de RT-PCR para avaliar a expressão relativa das *cpb*. As curvas de dissociação foram realizadas para testar a especificidade de cada um dos produtos amplificados (Figura 7), que mostrou um pico de fusão único da temperatura ( $T_m = 82.5^\circ\text{C}$ , para CPB;  $T_m = 85.5^\circ\text{C}$  para durante  $\alpha$ -tubulina).

As preparações de cDNA obtidas a partir de cada fase *in vitro* de diferenciação indicam maior quantidade de transcritos de *cpb* nas amostras a partir da promastigota na fase logarítmica ( $Ct = 37 \pm 0,40$ ) do que nos promastigota na fase estacionária ( $Ct = 25 \pm 0,38$ ), significando um aumento na expressão de até 1,5 vezes ( $p = 0,003$ ), (figura 7). Esta diminuição da expressão do gene *cpb* no choque de pH ácido foi seguida por um aumento gradativo e irregular após incubação a  $32^\circ\text{C}$  [24 horas ( $Ct = 29 \pm 0,3$ ), 48 horas ( $Ct = 26 \pm 0,17$ ), 72 horas ( $Ct = 32 \pm 0,39$ ) e 96 horas ( $Ct = 26 \pm 0,42$ )], mostrando um aumento da expressão significativa de até 1,3 vezes ( $p = 0,0002$ ). Os genes LbrM.08.0820 e LbrM.08.0830 mostraram os perfis de expressão semelhante ao gene LbrM.08.0810, P-fl ( $Ct = 38 \pm 0,40$ ), P-fe ( $Ct = 24 \pm 0,11$ ) e e irregular após incubação a  $32^\circ\text{C}$  [24 horas ( $Ct = 26 \pm 0,7$ ), 48 horas ( $Ct = 25 \pm 0,5$ ), 72 horas ( $Ct = 30 \pm 0,39$ ) e 96 horas ( $Ct = 25 \pm 0,3$ )], (Figura 8).

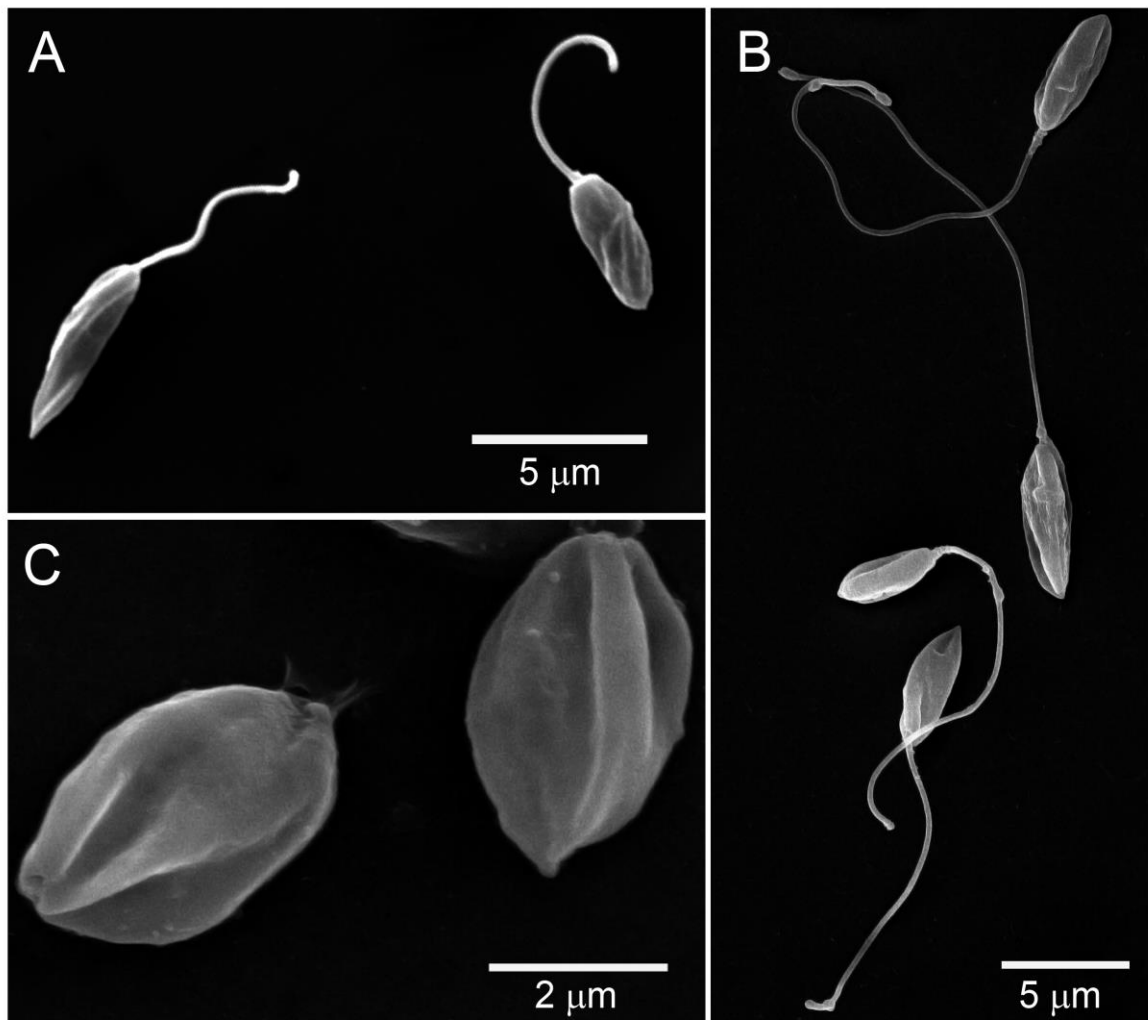
### **5.3. Análise bidimensional da 3'UTR dos genes *cpb* de *Leishmania (V.) braziliensis***

Para averiguar as diferentes expressões entre os genes LbrM.08.0810 e LbrM.08.0820/LbrM.08.0830 foram feitas análises na estrutura bidimensional da região 3'UTR dos referidos genes pela plataforma digital *The mfold Web Server*

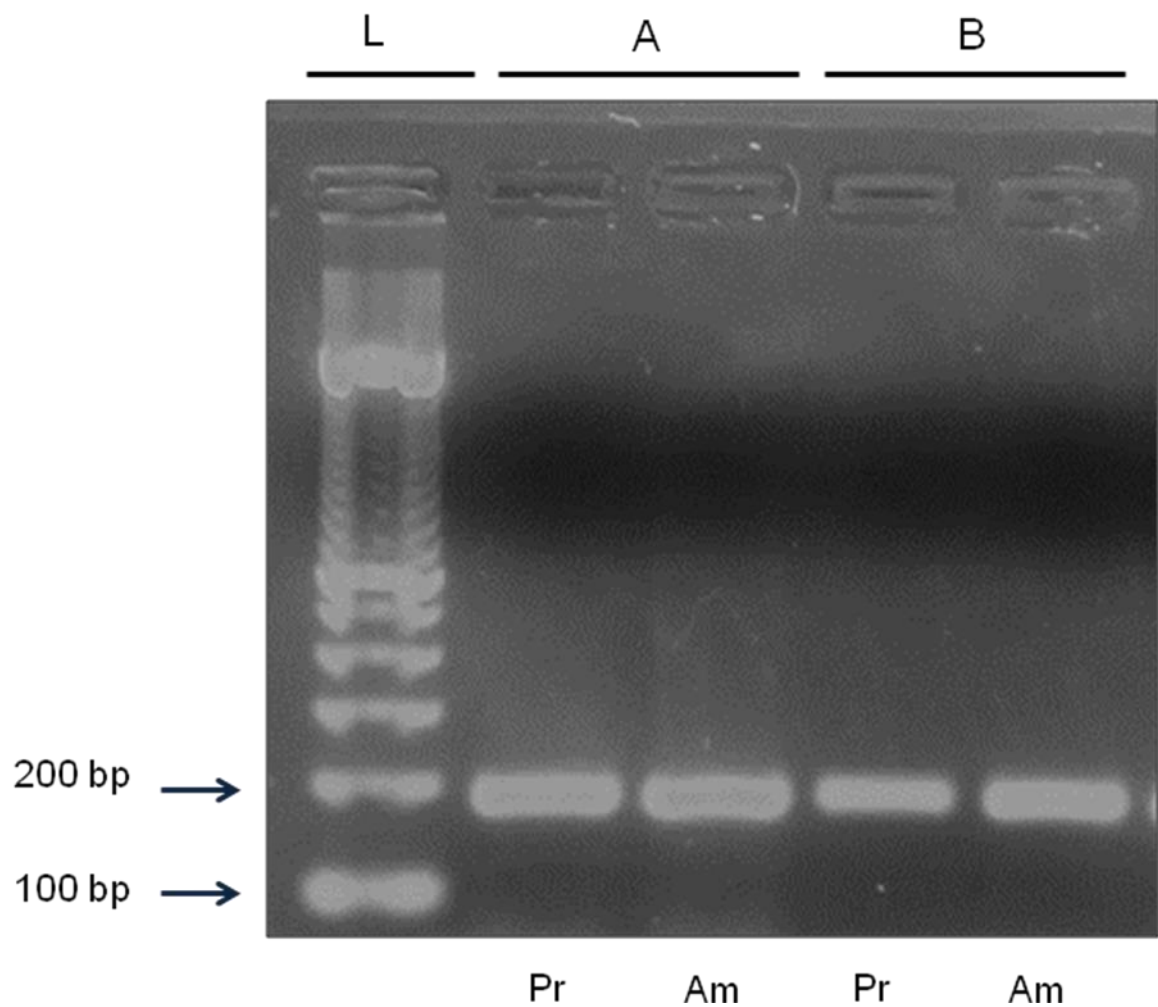
(<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>). Considerando que essa região dos genes LbrM.08.0820/LbrM.08.0830, que são idênticas entre si, possam ter 1100bp, foram observados elementos ricos em uracil-adenina (AU-rich elements - AREs). Na sequência 3'UTR esperada do gene LbrM.08.0810, não foram observados esses elementos ou quaisquer outros descritos relacionados a regulação pós transcricional. (Figuras 9 e 10)



**Figure 3:** Eletromicrografia de uma preparação de culturas de parasitos usados para diferenciação. As preparções de parasitos na fase logaritimica em meio Schenider's (pH 7,2 a 26°C), foram lavadas por centrifugação e tratadas para microscopia eletrônica dede varredura. A imagem indica a presença de formas metacíclicas (seta) e procíclicas (cabeça de seta).



**Figure 4:** Eletromicrografias das formas de *Leishmania (V.) braziliensis*. As imagens mostram as mudanças no perfil morfológico dos parasitos: formas alongadas com curto flagelo livre - parasitos em fase logarítmica (A) e formas alongadas com um flagelo livre cerca de duas vezes maior do corpo celular - parasitos em fase estacionária (B), ambos após de incubação à 26 °C; parasitos arredondados sem flagelo visível, após 96 horas de incubação à 32 °C (C).



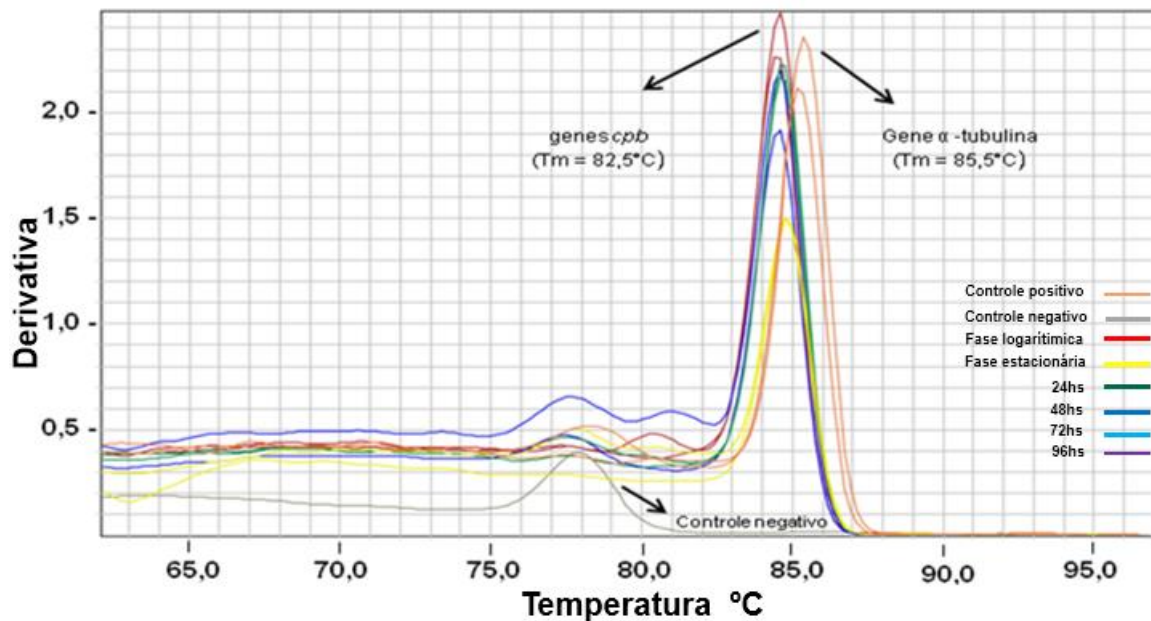
**Figure 5:** Análise dos produtos amplificados do gene de cisteína-proteinase B de *Leishmania (V.) braziliensis*. As amostras de cDNA obtidas de promastigotas na fase logarítima (Pr) e amastigotas axênicas com 96 horas de diferenciação (Am) foram submetidas a reação de PCR como os iniciadores específicos para o gene LbrM.08.0810 (A) e os genes LbrM.08.0820/LbrM.08.0830 (B). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de 2,0% de agarose corado em Nancy 520. bp= marcador de massa molecular DNA Ladder (L), (InvitrogenLifeT echnologies)

```

LbrM.08.0810 TCCGAGCAGCGATTGCAGTGGCACCCAGCGATATGGTGTCCATAGGCGACGCCGTCTCTGT
LbrM.08.0820 TCCGAGCAGCGATTGCAGCGGTACGCCGAAGTACAAAGTGATTTCCTGAGGGTAAGTGTAT
LbrM.08.0830 TCCGAGCAGCGATTGCAGCGGTACGCCAAAGTACAAAGTGATTTCCTGAGGGTAAGTGTAT
*****
LbrM.08.0810 GAAGATGTTTGGTGGCTTAGACATGAGTGC-----CAACATGCC
LbrM.08.0820 GGTGTCCGACGTCCGGCTCGAGCAAGAGCATCTGCACGTTCAAGTAGAGGTGAAGCGTGTG
LbrM.08.0830 GGTGTCCGACGTCCGGCTCGAGCAAGAGCATCTGCACGTTCAAGTAGAGGTGAAGCGTGTG
+ + + + +
LbrM.08.0810 TGT-----CTAACGAGAACAACGTGGCT-----
LbrM.08.0820 TGTGTGTGTGTGTGGTAGTAGCGAGGTGCCGCGAGTGAATGGATGATCGTCCGATGCCGTGC
LbrM.08.0830 TGTGTGTGTGTGTGGTAGTAGCGAGGTGCCGCGAGTGAATGGATGATCGTCCGATGCCGTGC
+ + + + +
LbrM.08.0810 -----CATGGCCGAATAAGAAAAAAGCTGAGCTACACAAGAGAGGGTTTGTGTGG
LbrM.08.0820 TCGCTATGGCAGCTTCGCGTTAATAACAAGATCTGAGCTGGAGGAAGGGGGAGATAACTCC
LbrM.08.0830 TCGCTATGGCAGCTTCGCGTTAATAACAAGATCTGAGCTGGAGGAAGGGGGAGATAACTCC
+ + + + +
LbrM.08.0810 CACCGTGCCTGCTGATGACTACACGGTATACACCTATCCACGTAGCCCCACTCTGGAA
LbrM.08.0820 G-----GCGAAATAGTAGGAGAAATAGGAGGCCGATGTAG-----GGGA
LbrM.08.0830 G-----GCGAAATAGTAGGAGAAATAGGAGGCCGATGTAG-----GGGA
+ + + + +
LbrM.08.0810 TTCCCGTCCCTTCTTCTCTCTTTCTCTTCTGCTGCTACGGTATCGTCCAGGGTGTGTGGAG
LbrM.08.0820 AAAATGAACGATCACGCGCG-CTGTGAATAGGAACTGCGGCACCACCCTACTCCGGGTAT
LbrM.08.0830 AAAATGAACGATCACGCGCG-CTGTGAATAGGAACTGCGGCACCACCCTACTCCGGGTAT
+ + + + +
LbrM.08.0810 CGTGCCTTGTGTTTACCTGTGCTGCGGCTCTACGATCCCCTACACGGCTTCACCCCTCCCTT
LbrM.08.0820 ACTGC---AAATTGCTCTTCTGCCCCGCCCTCGGTCCCCGCCGC-----CTCCTCC
LbrM.08.0830 ACTGC---AAATTGCTCTTCTGCCCCGCCCTCGGTCCCCGCCGC-----CTCCTCC
+ + + + +
LbrM.08.0810 TTTTITTTTGTGTTG---CATCCTGCTGCCCGGACTCTGTGGTAGATGGAGAGTGCCT
LbrM.08.0820 TTTCTACGTCTCTTCCCACGTCCTTCTCTTACGCGCCAATAGAGCAGT-----TGCCT
LbrM.08.0830 TTTCTACGTCTCTTCCCACGTCCTTCTCTTACGCGCCAATAGAGCAGT-----TGCCT
+ + + + +
LbrM.08.0810 AAGTTGGTGGTTAGGAAGCGGAGAGGTGCACGCAAGGCCTCTTTTTTTCTTTGGTCCGC
LbrM.08.0820 ACCACGCCCACACGCAAGCGCGCACAGGAACACAGGCAACCTTTTCGCTCTGCTATCGTC
LbrM.08.0830 ACCACGCCCACACGCAAGCGCGCACAGGAACACAGGCAACCTTTTCGCTCTGCTATCGTC
+ + + + +
LbrM.08.0810 C---AGCGCTTTGCGACTATCACAGCCACCCTTTCCCTTGTACCCCGTTATCCTTATC
LbrM.08.0820 TCTCTCTCTTTTGTGTTTTCTCTTCTCCATCAGCG-----CCITTTGTTTTTG
LbrM.08.0830 TCTCTCTCTTTTGTGTTTTCTCTTCTCCATCAGCG-----CCITTTGTTTTTG
+ + + + +

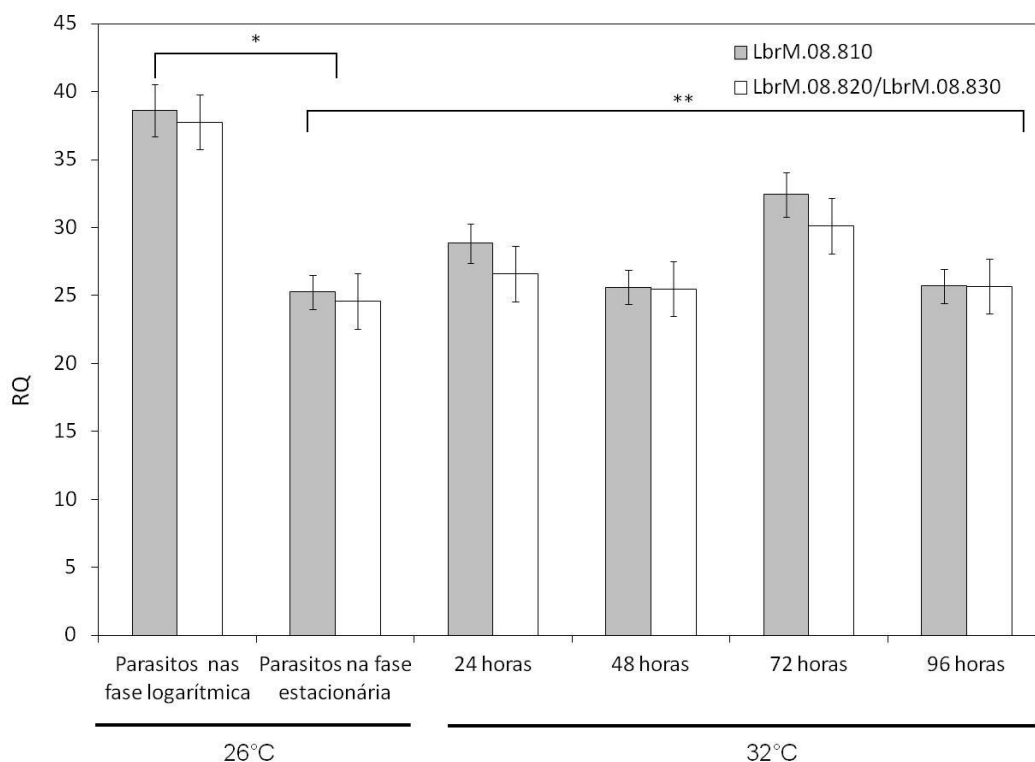
```

**Figure 6:** Alinhamento das seqüências 3'UTR de *Leishmania (V.) braziliensis*. O alinhamento das seqüências dos genes LbrM.08.0810, LbrM.08.0820, LbrM08.0830 foi realizado na plataforma online ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Os iniciadores foram desenhados de acordo com a região 3'UTR dos referidos genes (cinza). A seta indica a ORF e o início da 3'UTR,

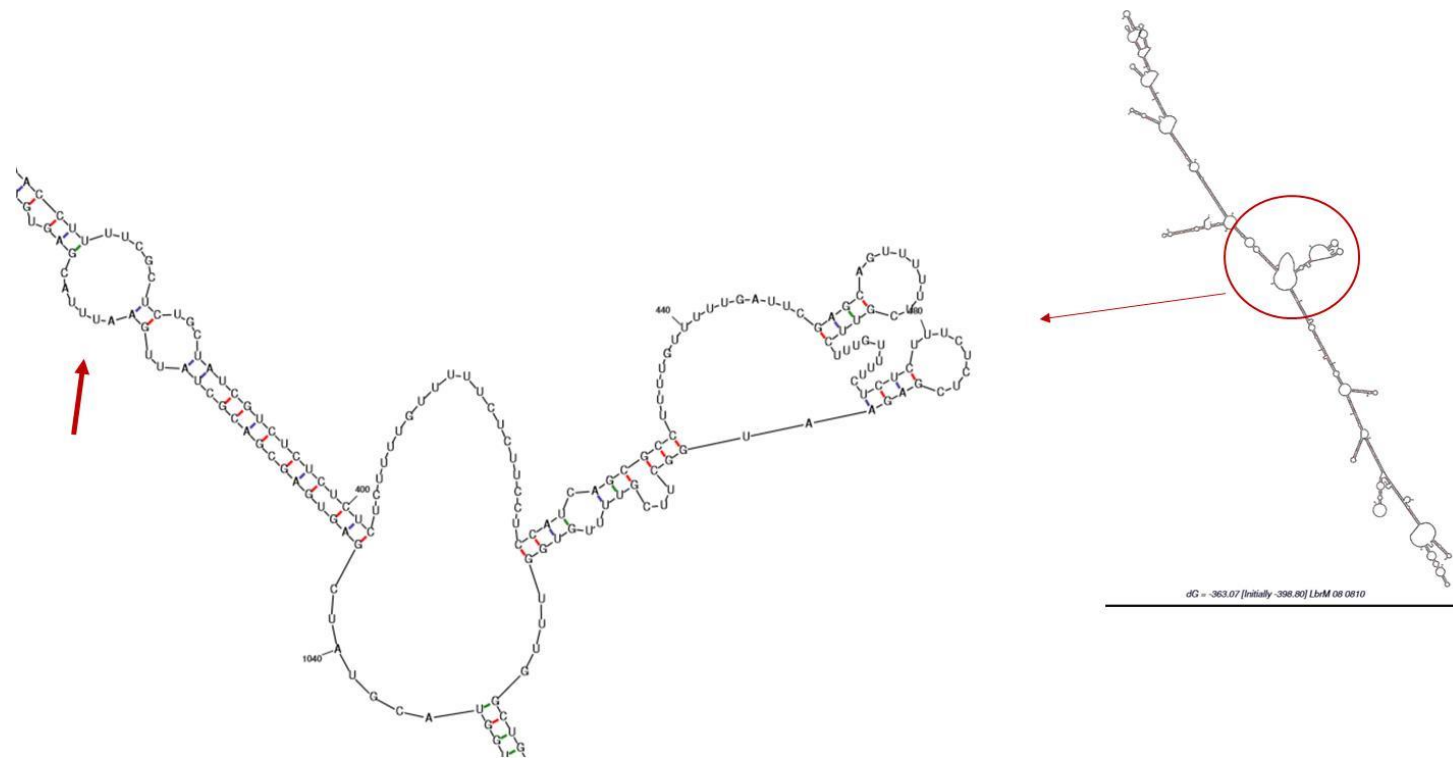


**Figura 7:** Curvas de dissociação obtidas a partir da amplificação dos genes de interesse por PCR em tempo real. Gráfico expressa a derivativa da curva de dissociação dos produtos amplificados obtida a partir dos iniciadores para os genes LbrM.08.0810, LbrM.08.0820 e LbrM08.0830 (82,5 °C) e *da*  $\alpha$ -tubulina (85,5 °C), quando comparado ao controle negativo que não apresenta pico de dissociação. As curvas de dissociação correspondentes as fases de diferenciação dos parasitos [( $\rightarrow$ ) logaritmica, ( $\rightarrow$ ) estacionária, ( $\rightarrow$ ) com 24 horas de incubação à 32°C, ( $\rightarrow$ ) com 48 horas de incubação à 32°C, ( $\rightarrow$ ) com 72 horas de incubação à 32°C e ( $\rightarrow$ ) com 96 horas de incubação à 32°C] e controles [negativo ( $\rightarrow$ ) e positivo ( $\rightarrow$ )], estão indicados na figura. Esses resultados são representativos de cinco experimentos independentes.

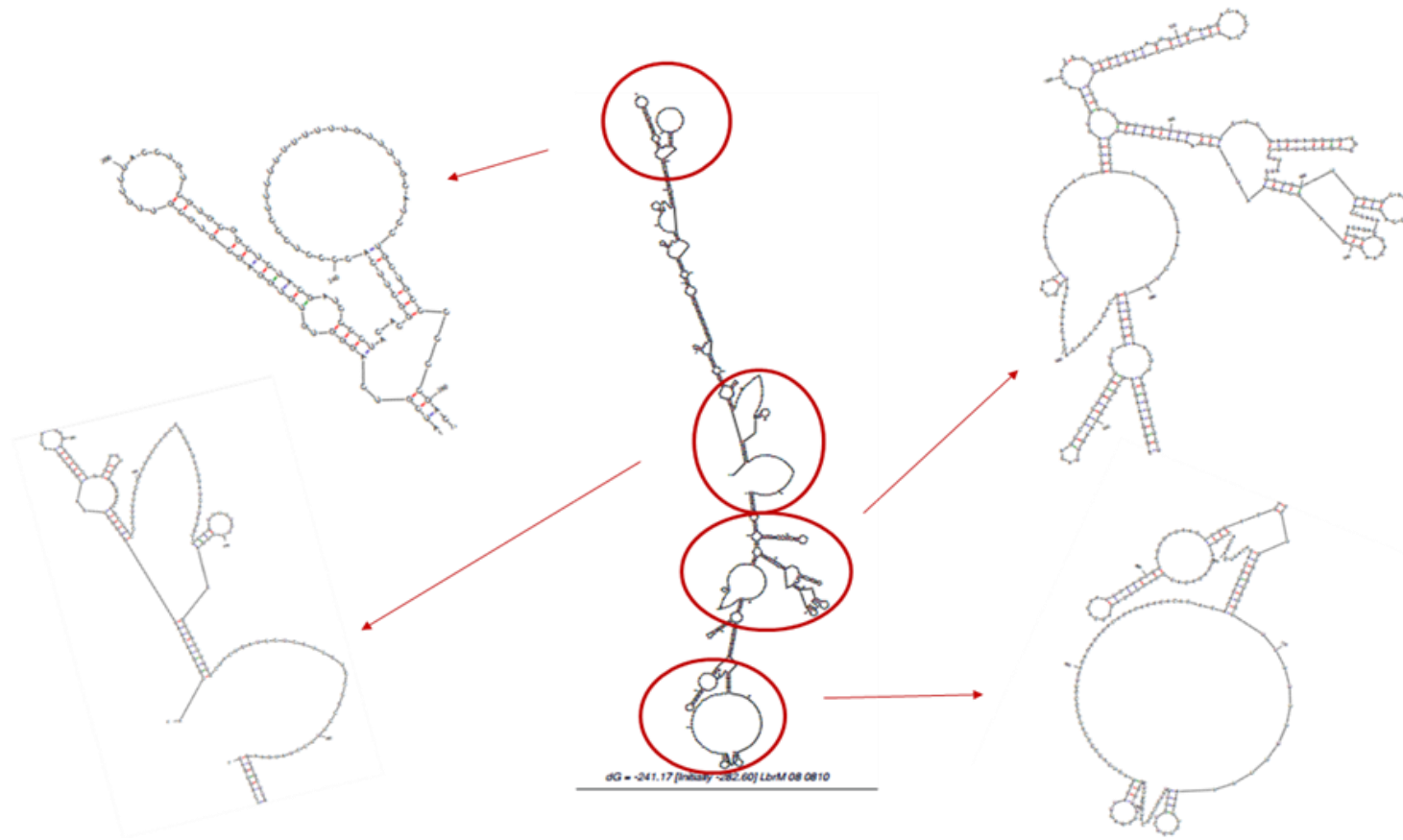




**Figura 8:** Níveis de expressão dos genes LbrM.08.0810 e LbrM.08.0820/LbrM.0830 ao longo do percurso de diferenciação de *Leishmania (V.) braziliensis*. Amostras de RNA total foram extraídas dos parasitos (na fase logarítmica de crescimento e fase estacionária de crescimento à 26°C; e parasitos mantidos à temperatura de 32 °C em diferentes tempos: 24 horas, 48 horas, 72 horas e 96 horas). Após a síntese de cDNA, as expressões gênicas foram analisadas por reação de PCR em tempo real quantitativo. Os resultados são apresentados em quantidades relativas (RQ) a partir de amostras de cDNA de controle endógeno  $\alpha$ -tubulina. Os resultados representam a média  $\pm$  de desvio padrão dos dados de três ensaios. Os asteriscos indicam estatisticamente as diferenças significativas (\* =  $p < 0,003$ ; \*\* =  $p < 0,002$ ) nos valores de RQ quando comparado com dados do ponto de tempo anterior. Os dados são representativos de quatro experimentos independentes.



**Figura 9:** Estrutura bidimensional da região 3'UTR dos genes LbrM.08.0820 e LbrM.08.0830 de *L. (V.) braziliensis*. As setas indicam o elemento ARE (AUUUA) que estão relacionados com degradação do mRNA.



**Figura 10:** Estrutura bidimensional da região 3'UTR do gene LbrM.08.0810 de *L. (V.) braziliensis*. Embora as regiões sejam ricas em fita simples "U", não há nenhum elemento ARE.

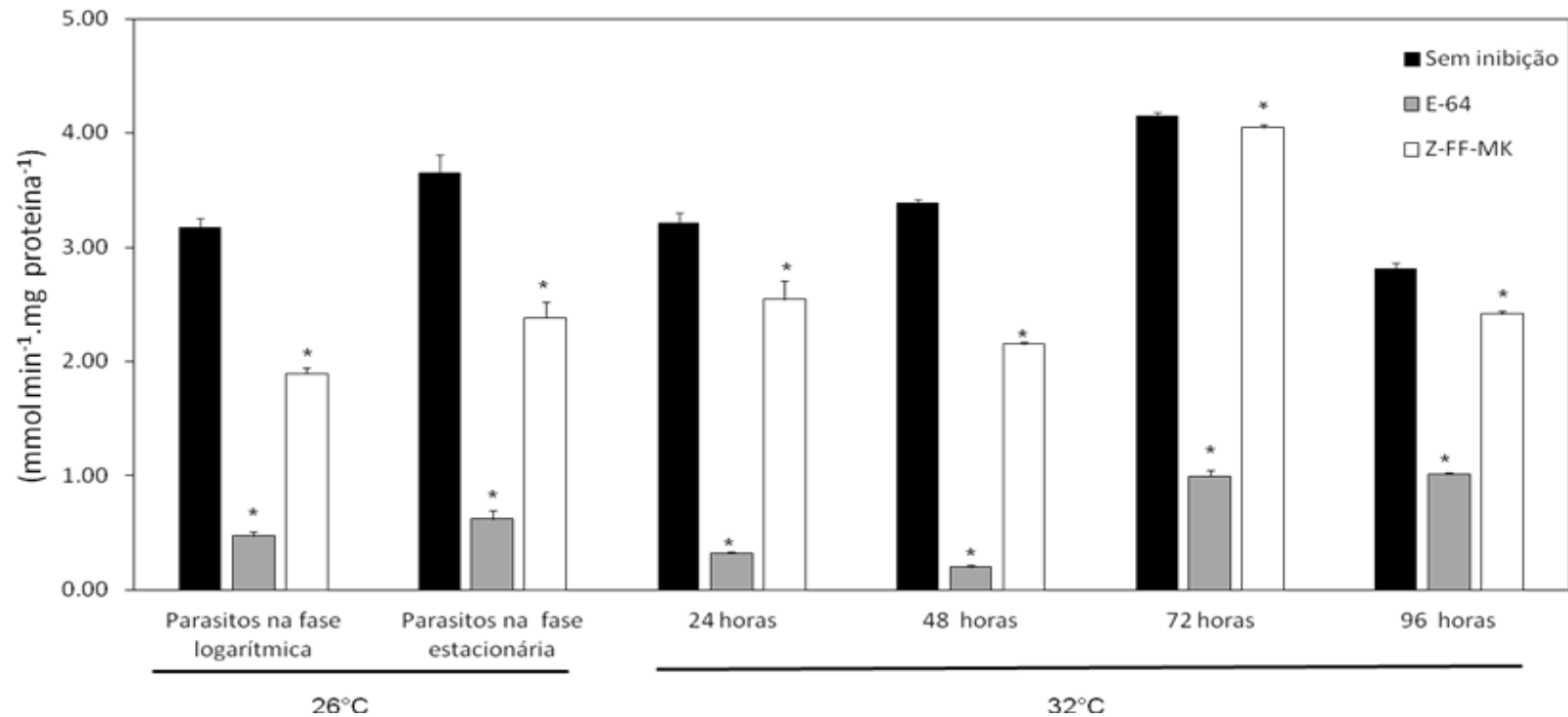
#### 5.4. Oscilação das atividades de cisteína proteinase em *L. (V.) braziliensis*

No decorrer deste estudo, foi possível avaliar a oscilação das atividades cisteína proteinase em extratos brutos de proteínas de *L. (V.) braziliensis*, obtidos das fases de indução de diferenciação *in vitro* deste parasito. Os resultados indicaram que todas as amostras analisadas apresentaram atividade de proteinase pois, foram capazes de hidrolisar o substrato Z-FR-AMC, um substrato peptídico fluorogênico sintético característico para catepsina L e catepsina B, em diferentes taxas de velocidade (Figura 11).

Observamos um aumento gradual da atividade enzimática para cada fase de indução de diferenciação, de  $3,1 \pm 0,030 \text{ mmol min}^{-1}.\text{mg proteina}^{-1}$  nos parasitos em fase logarítmica e atingindo o máximo de  $4,2 \pm 0,030 \text{ mmol minuto}^{-1}.\text{mg proteina}^{-1}$  em 74 horas de incubação a  $32^{\circ}\text{C}$ . Este aumento foi seguido por uma diminuição de até  $2,8 \pm 0,030 \text{ nmol minuto}^{-1}.\text{mg proteina}^{-1}$  nas culturas com 96 horas de incubação à  $32^{\circ}\text{C}$ .

A especificidade da cisteína proteinase foi avaliada medindo a hidrólise dos substratos na presença de inibidores seletivos para CP (Figura 11). Verificou-se que estas atividades de proteinase foram mais fortemente inibidas por E-64 [parasitos na fase logarítmica: 85,1% de inibição ( $p = 0,04$ ); parasitos na fase estacionária: 83,1% ( $p = 0,02$ ); parasitos incubados durante à  $32^{\circ}\text{C}$ : por 24 horas (90,1%;  $p = 0,02$ ), por 48 horas (94,4%;  $p = 0,04$ ), por 72 horas (76,1%;  $p = 0,03$ ) e por 96 horas (64,1%;  $p = 0,04$ )] que Z-FF-MK [parasitos na fase logarítmica: 40,4% de inibição ( $p = 0,03$ ); parasitos na fase estacionária: 34,9% ( $p = 0,003$ ); parasitos incubados durante à  $32^{\circ}\text{C}$ : por 24 horas (74,4%;  $p = 0,04$ ); por 48 horas (36,4%;  $p = 0,04$ ), por 72 horas (2,6%;  $p = 0,03$ ) e por 96 horas (14,2%;  $p = 0,02$ )].

Os ensaios de controle foram realizados com Cath bovina L e Cath B. Como esperado, ambas as enzimas foram capazes de hidrolisar o substrato Z-FR-MAC em velocidade diferente (Cath L =  $2,7 \pm 0,18 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1}$ ; Cath B =  $1,7 \pm 0,18 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg proteina}^{-1}$ ) e foram fortemente inibidas pelo E-64 (Cath L: 100% e Cath B: 100%) e Z-FF-MK (Cath L: 73% e Cath B: 90%), (Figura 11).



**Figura 11:** Atividades de proteinases em solução de *Leishmania (V.) braziliensis*. Amostras de proteínas foram obtidas: parasitos na fase logarítmica e fase estacionária, mantidos a 26°C; e parasitos incubados à 32°C (24horas, 48horas, 72horas e 96horas). As atividades enzimáticas das amostras (5 µg) foram medidas substrato Z-FR-AMC, na ausência (■) ou presença dos inibidores de 10 µM de E-64 (■) e 50 µM de Z-FF-FMK (□). A reação ocorreu durante 60 minutos a 37 °C. As atividades enzimáticas das frações foram expressas como, mmol min<sup>-1</sup>.mg proteína<sup>-1</sup>. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes. (\*) p < 0,05.

### 5.5. Estabilidade do centro ativo da proteinase rCPB Lbrm.08.0810.

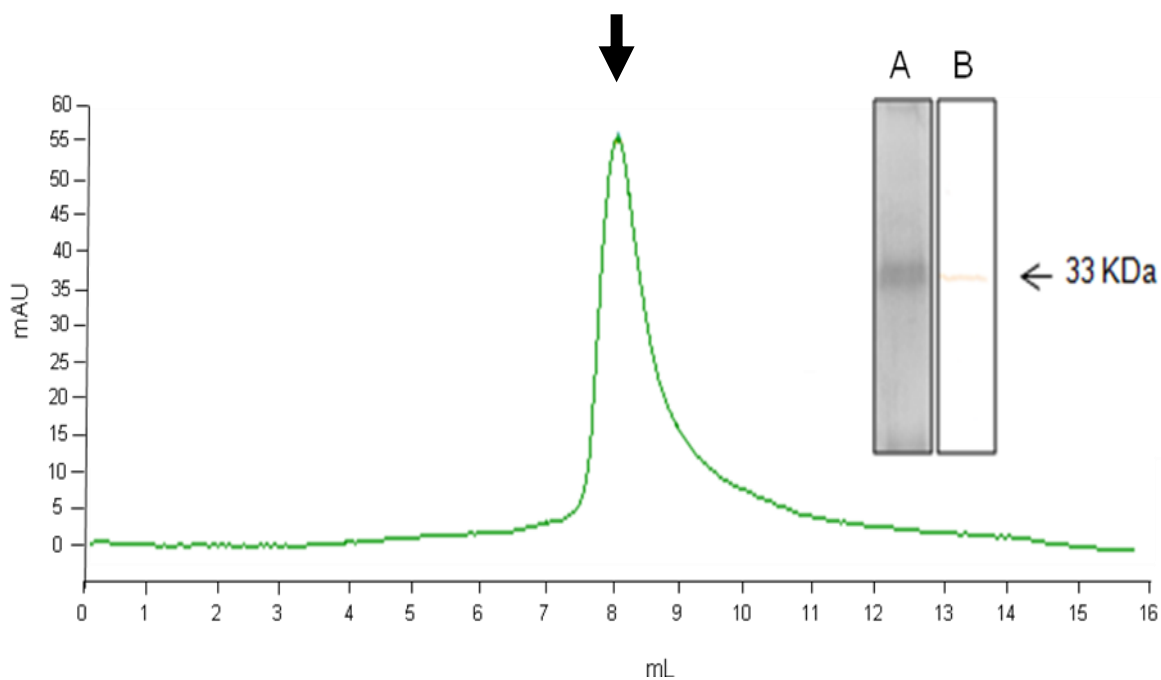
Uma vez que nossos resultados indicaram que o gene Lbrm.08.0810 tem maior expressão nos ensaios de diferenciação *in vitro*, foi oportuno investir em ensaios com a proteína recombinante codificada por este gene, rCPB Lbrm.08.0810. O foco principal desta fase do estudo foi obter evidências da ligação da enzima com o E-64, avaliando a influência da variação de pH na estabilidade do centro ativo da proteinase, uma vez que o gene alvo é expresso tanto no pH neutro quanto ácido.

Após clonagem e expressão da rCPB Lbrm.08.0810 no vetor pET28a (+), a proteína foi submetida a cromatografia de exclusão molecular (Figura 12). Com base no volume de eluição da proteína foi possível determinar a massa molecular relativa, pela relação direta com o logaritmo da massa molecular da proteína. Primeiro foi necessário construir uma curva de calibração (curva padrão) utilizando proteínas de massa conhecida [Ovalbumina ( $K_{av} = 0,198$ ), Anidrase Carb ( $K_{av} = 0,277$ ), Quimo A ( $K_{av} = 0,319$ ), Ribonuclease ( $K_{av} = 0,383$ ), Cit C ( $K_{av} = 0,385$ ) e Aprotinina ( $K_{av} = 0,514$ )]. A curva de calibração (inset) foi obtida plotando-se o  $\text{Log } M_r$  vs  $K_d$  (eluição relativa). O  $K_{av}$  foi calculado seguindo a equação:  $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ , onde,  $V_o$  é o volume necessário para que as proteínas totalmente excluídas da coluna saiam, em geral é um volume muito pequeno,  $V_t$  é o volume total da coluna e  $V_e$  é o volume de eluição da proteína de interesse. Desta forma foi possível determinar a massa molecular da rCPB Lbrm.08.0810 em 33 438,75 Da.

Posteriormente, foram realizados ensaios de biossensoriamento de superfície por *SPR*, (Figura 13). Nestes experimentos foi possível constatar que superfície do *sensor chip* HisCap é capaz de capturar  $\cong 130 \text{ pg/mm}^2$  da rCBP significando um valor de 130 RU (Figura 13) de dissociação durante 10 segundos de fluxo constante.

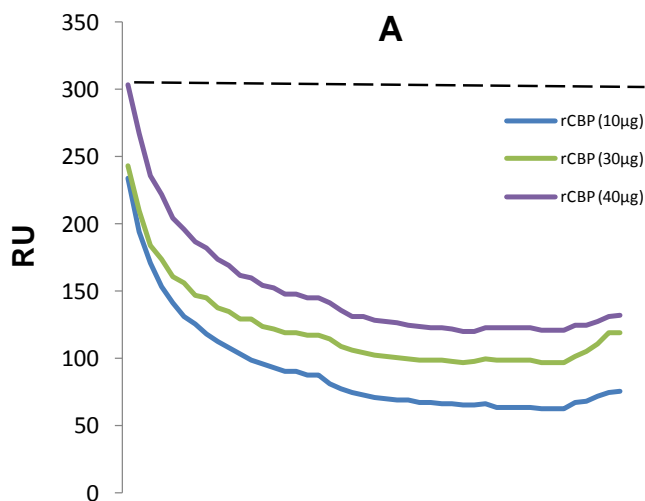
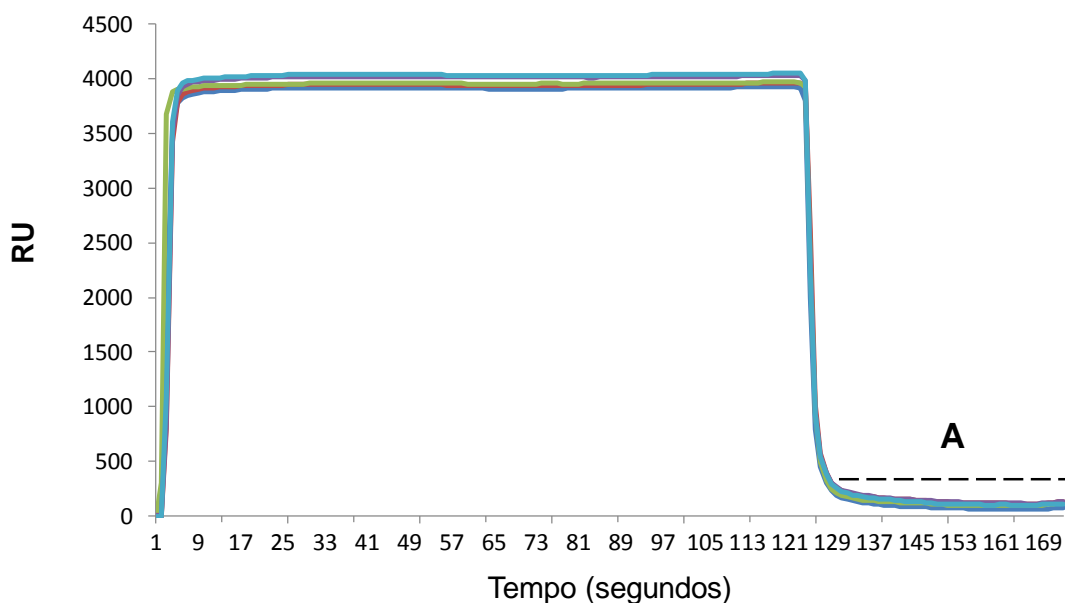
Com a rCPB Lbrm.08.0810 capturada na superfície do *sensor chip* foi possível avaliar a ligação desta enzima ao E-64. Os ensaios de ligação do E-64 (Figura 13) foram realizados com variação do potencial hidrogeniônico tampões 10 mM tampão fosfato de sódio (pH 4, pH 5, pH 6 e pH 7) em fluxo constante (10  $\mu\text{L}$ /minuto) na temperatura de 25°C.

Nestes experimentos os valores de RU de dissociação máxima ( $RU_{max}$ ) e mínima ( $RU_{min}$ ) foram: pH 4.0 (855  $RU_{max}$  e 524  $RU_{min}$ ), pH5.0 (43  $RU_{max}$  e 40  $RU_{min}$ ), pH 6.0 (13  $RU_{max}$  e 5  $RU_{min}$ ) pH7 (1,4  $RU_{max}$  e 0,7  $RU_{min}$ ). Os resultados destes experimentos indicaram que a rCBP LbrM.08.0810 é capaz de ligar ao E-64, e esta ligação é mais estável no pH 5,0 seguido do pH 7.0, com os menores valores de constante de equilíbrio (**KD**), Esta ligação também ocorreu no pH 4,0 e pH 6,0, mas com menor eficiência, (Tabela I).



**Figura 12:** Caracterização da proteína recombinante, rCPB Lbrm.08.0810. A proteína foi clonada e expressa no vetor pET28a (+), e purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Posteriormente, a proteína foi submetida a cromatografia analítica de exclusão molecular em coluna Superdex 75. Durante a cromatografia, as proteínas foram monitoradas a 220nm/280nm (mAU: miliequivalências de absorvância), com base no volume de eluição (mL). Cerca de 30 µg do pico majoritário (→) das preparações de proteínas eluídas da coluna foram submetidas eletroforese em condições desnaturante (SDS-PAGE à 12%), sendo reveladas com nitrato de prata (A) ou eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose e reveladas com anticorpo anti-cauda de histidina produzido em camundongo e anti IgG de camundongos marcada com peroxidase (B). A massa da rCPB Lbrm.08.0810 é indicada a direita em kDa. Estes resultados são representativos de quatro ensaios independentes





**Figura 13:** Imobilização da rCPB Lbrm.08.0810 por ensaios de ressonância plasmônica de superfície. A rCPB Lbrm.08.0810 foi imobilizada na superfície do chip sensor (fluxo de  $5\mu\text{L}/\text{minuto}$ ) a temperatura de  $25^\circ\text{C}$  em tampão  $10\text{ mM}$  tampão fosfato de sódio pH 8.0. Nas reações foram utilizadas diferentes quantidades da proteína rCPB Lbrm.08.0810 ( $10\mu\text{g}$ ,  $30\mu\text{g}$  e  $40\mu\text{g}$ ) e um *sensor chip* de ouro funcionalizado com complexos de níquel-NTA (HisCap - Nomadics, Lnc.anICx company). Os resultados são apresentados como unidades de ressonância (RU) arbitrárias e são representativos de duas experiências independentes. Os valores de RU dissociação são representativos da resposta média entre 1 e 169 segundos (A) em todos os ensaios.

Tabela I: Ligação do E-64 com a proteína rCPB Lbrm.08.0810

Variação de pH	K <sub>D</sub>
pH 4,0	9,6 <sup>-1</sup>
pH 5,0	3,1 <sup>-16</sup>
pH 6,0	3,7
pH 7,0	1,4 <sup>-4</sup>

**E-64:** trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane;

**KD:** constante de equilíbrio da ligação do E-64 com a proteína rCPB Lbrm.08.0810

## **VI. Discussão**

Um dos aspectos de maior destaque no parasito do gênero *Leishmania* é a sua diversidade genética, que possivelmente pode influenciar o desfecho na adaptação aos seus hospedeiros. Evidências apontam para o polimorfismo genético em populações naturais de diferentes *Leishmania spp* (Cupolillo; Grimaldi; Momen, 1998), explicando a adaptação dos parasitos a diferentes ambientes (Cupolillo et al., 2003). No entanto, o mesmo não se pode afirmar para a adaptação do parasito ao hospedeiro vertebrado. Neste contexto, os estudos de expressões gênicas de fatores de virulência, como as proteinases, podem auxiliar na elucidação dos mecanismos de adaptação, e é neste sentido que propusemos este trabalho de tese. Assim, o presente estudo vem acrescentar novas informações sobre o potencial da expressão de fatores de virulência, como as CPBs de *L. (V) braziliensis* que influenciam na sobrevivência, adaptação e manutenção do parasito em meio a condições adversas que se encontram.

Os parasitos do gênero *Leishmania* têm um ciclo de vida digenético com sucessivas diferenciações em fomas promastigotas e amastigotas, um evento sistemático do “estilo de vida” destes protozoários. Estes parasitos são valiosos organismos modelo para estudos de fisiologia, bioquímica e expressão de proteínas guiadas por mudanças ambientais. As alterações do pH e temperatura são condições físico-químicas experimentadas constantemente por estes parasitos, e, possivelmente, alguns desses fatores são indutores para as transformações bioquímicas e morfológicas. Neste trabalho de tese reunimos novos dados sobre a expressão gênica do parasito *L. (V.) braziliensis*, o qual foi exposto a mudanças de pH e temperatura. Propomos que há diferenças na expressão de catepsina L - símile nas formas promastigotas e amastigotas, uma classe de proteinase com um potencial funcional em destaque no genoma do parasito (revisado por Silva-Almeida et al., 2012).

A propriedade física como temperatura é considerada como um indutor da expressão gênica para o processo de diferenciação da *Leishmania sp* (Zilberstein & Shapira, 1994). No entanto, este fato parece ser verdadeiro somente quando os flebotomíneos, ao se alimentarem do sangue, adquirem a forma amastigota. Geralmente, os choques de temperatura e pH, ao mesmo tempo, são aplicados como uma estratégia para induzir as alterações morfológicas em espécies pertencentes ao complexo de *L. mexicana* (Bates, 1994; Cysne-Finkelstein et al.,

1998; Alves et al., 2005) e ao complexo de *L. braziliensis* (Eperon & McMahon-Pratt, 1989).

Com a estratégia de diferenciação *in vitro* de *L. (V.) braziliensis* aqui aplicada foi possível simular os eventos bioquímicos relacionados com a adaptação do parasito em diferentes ambientes: hospedeiros invertebrados e hospedeiros vertebrados, uma simulação da sequência de eventos naturais experimentados por este parasito no ciclo de vida, quando circula entre o flebotomíneo e hospedeiros mamíferos. Portanto, a estratégia de diferenciação assumida neste trabalho levou em consideração que este parasito é primeiramente submetido à alteração do pH ácido, alcançando a fase estacionária com as formas metacíclicas quando migram da glândula salivar para o intestino médio, em seguida, o aumento de temperatura no hospedeiro mamífero, predominando as formas amastigotas, com flagelo que emerge da bolsa flagelar (Schlein, 1993). Estas alterações ambientais atuam como sinais provocando mudanças na expressão gênica necessárias para permitirem a adaptação e diferenciação. Esta hipótese foi testada aqui, uma vez que, temos evidências que as alterações morfológicas ocorreram nas primeiras horas de transformação *in vitro*, apenas depois das flutuações nas expressões dos genes *cbp* e a proteinase codificadas por esses genes.

As formas promastigotas metacíclicas foram expostas a temperatura semelhante ao hospedeiro mamífero acarretando a uma acumulação progressiva de transcritos dos genes LbrM.08.0810, LbrM.08.0820 e LbrM.08.0830, e estão relacionados com uma mudança biológica significativa deste parasito. Neste contexto, é possível que o aumento dos transcritos do gene *cpb* nas primeiras horas de diferenciação possa ser importante para o fenômeno de autofagia para diferenciação de promastigotas metacíclicos em amastigotas. Há relatos de que o aumento do número de autolisossomos durante este processo está relacionado com uma remodelagem da estrutura celular de *L. (L.) mexicana*, na presença de CPB. Também há evidências que a inibição das proteinases lisossomais CPA e CPB, ou remoção de seus genes, não só interfere na via autofágica, mas também impede a metaciclogênese e a transformação para amastigotas, dando suporte à hipótese de que a autofagia está associada a estes genes e é necessária à

diferenciação celular (Williams et al.,2006). Além disso, o parasito *L. (L.) amazonensis* é capaz de manter a produção de fatores de virulências como as cisteína proteinases, os quais são detectados em promastigotas e com o aumento da concentração durante a diferenciação para as amastigotas, assegurando sua virulência (Leon et al., 1994). Assim, a expressão de genes *cpb* ao longo da diferenciação influencia no sucesso da adaptação do parasito ao ambiente intracelular, mostrando-se como um importante fator de virulência envolvido no processo de diferenciação.

Até o presente momento, não se conhece a função biológica dos três genes *cpb* em *L. (V.) braziliensis* e, possivelmente, cada um desses genes pode ter funções distintas ou complementares na interação do parasito com o hospedeiro. Em todos os passos dos ensaios de diferenciação *in vitro* realizados neste trabalho foi evidente que os transcritos do gene LbrM.08.0810 foram melhor detectados do que os transcritos dos genes LbrM.08.0820/LbrM.08.0830. Este fato nos permite sugerir que a maior quantidade de transcritos do gene LbrM.08.0810 está relacionada com um aumento da atividade desta enzima no ciclo de vida do parasita, uma vez que catepsina L, em geral, desempenha um papel importante na atividade de degradação das proteínas celulares e da matriz (Towatari *et al.*,1978; Matsukura *et al.*,1981; Kamboj *et al.*, 1993), como também em *Leishmania sp* atuam na modulação da resposta imune do hospedeiro vertebrado (Pereira *et al.*, 2008).

Assim, é possível sugerir que as três isoformas da CPB exercem individualmente funções diferentes ao longo do ciclo de vida do parasito, uma vez que alguns dos genes *cpb* são sintetizados em maiores quantidades em circunstâncias especiais, somente quando necessário como observado em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* mantidas em cultura *in vitro* (Rebello *et al.* ,2010). Além disso, o controle da regulação da expressão gênica é um fato bem conhecido para outros genes de *Leishmania sp* (Folgueira & Requena, 2007; Omara-opyene & Gedamu, 1997; Somanna *et al.*, 2002).

Em adição, é importante ter em mente que os genes de tripanossomas codificam proteínas que são organizadas em *tandem* separadas por pequenas regiões intergênicas, que são transcritas em longas subunidades policistrônicas (Johnson et al., 1987) e que podem ser reguladas na etapa pós-transcricional (Horn, 2008). Assim, é possível que quantidade dos transcritos de *cpb* detectados nas preparações de RNA total deste parasito, não corresponda a quantidade real de enzima CPB em *L. (V.) braziliensis*. Em contraste, os nossos resultados mostraram que existe também uma regulação pós-traducional, uma vez que há um aumento do produto da expressão traduzido ao longo da diferenciação do parasito. As unidades de RNA policistrônicas são processadas por reações de trans-splicing e de poliadenilação para que se obtenham os RNAs mensageiros monocistrônicos (RNAm maduro). Portanto, os genes *cpb* originado na mesma unidade de transcrição podem mostrar grandes diferenças nos padrões de expressão da CPB e diferenciação de *L. (V.) braziliensis*, tal como sugerido através de estudos com *L. infantum* numa combinação de abordagens proteômica e transcriptômica (McNicoll et al., 2006).

Neste contexto, para observar a expressão de RNA mensageiro dos genes *cpb* (LbrM.08.0810, LbrM.08.0820; LbrM.08.0830) foram desenhados iniciadores 3'UTR, relativamente estimando, devido a extensa homologia na respectiva ORF. No entanto não foi possível distinguir RNA mensageiro dos genes LbrM.08.0820/LbrM.08.0830, que tem 100% de identidade na sua sequência e, por conseguinte, o iniciador utilizado para amplificação do DNA complementar corresponde a ambos os genes. Devido à diferença na expressão entre os genes LbrM.08.0810, e LbrM.08.0820/LbrM.08.0830 e considerando que estão no mesmo *cluster* policistrônico, é possível que esta diferença esteja relacionada com as sequências desses genes 3'UTR.

Além disso, tem sido observado que alguns elementos presentes na região 3'UTR podem atuar na regulação da expressão de proteínas em *Leishmania sp* (Boucher et al., 2002; Mnicoll et al., 2005; Leifso et al., 2007), como também influenciam na regulação da expressão diferencial de RNA da metalo proteinase gp63 em *L. chagasi* (Ramamoorthy et al., 1995). Nas estruturas bidimensionais de sequência 3'UTR que correspondem aos genes LbrM.08.0820/LbrM.08.0830, foi

possível observar elementos ricos em UA (Ares), que se caracterizam como elementos *cis* reguladores envolvidos na aceleração da degradação do RNA (Xu et al., 1997). Curiosamente, na sequência da região *3'UTR* do gene LbrM.08.0810 não foram observados estes elementos, o que explicaria a maior expressão da enzima que codifica em algumas etapas de diferenciação do parasito. Experimentos adicionais são necessários para confirmar o tamanho e a participação de *3'UTR* na regulação destes genes envolvidas na expressão e atividade dessas proteinases.

No decorrer deste trabalho, obtivemos evidências adicionais de presença da atividade de catepsina L - símile em todas as etapas de diferenciação de *L. (V.) braziliensis*. A inibição parcial das proteinases por Z-FF-FMK e E-64, juntamente com a sua capacidade para degradar o substrato Z-FR-AMC é prova de que a atividade das proteinases detectada no extrato total de proteína obtidas do parasito são cisteína proteinases do grupo das catepsinas. A ausência de inibição total da atividade de catepsinas sobre o substrato Z-FR-AMC, por ambos os compostos, permite algumas considerações.

De fato, foi detectado cisteína proteinases semelhantes a catepsina L que são capazes de hidrolisar o Z-FR-AMC, um substrato geralmente aplicado para detectar esta classe de enzima (Kirschke et al., 1982). A hidrólise do substrato que contém resíduos de fenilalanina na posição P2 como Z-FR-AMC, é compatível com a especificidade de proteinases com um grupo tiol no centro ativo, tal como a papaína extraída da *Carica papaya* (Baines & Brocklehurst, 1982), cujo mecanismo de ação é definido pela interação com locais específicos da proteinase, com exceção do grupo AMC, que ocupa o subsítio S'1 (Schechter & Berger, 2012).

Embora o Z-FF-FMK seja um inibidor irreversível para catepsina B e catepsina L (Kamboj et al., 1993), o E-64 se liga irreversivelmente a um grupo tiol ativo em muitas cisteína proteases, tais como a papaína, calpains e catepsinas (B, H, K e L) para formar uma ligação tioéster (Lecaille et al., 2002). Uma vez que ambos os inibidores não reagem com outras proteases, os resultados aqui obtidos provam pela primeira vez, que ocorre uma flutuação da cisteína proteinases com atividade



de catepsina nos momentos iniciais da diferenciação do parasito *L. (V.) braziliensis*. Além disso, embora a atividade específica da catepsina L - símile em preparações homogênicas de proteína esteja limitada, devido a ausência de substrato específico para esta proteinase, os ensaios enzimáticos e de expressão dos genes em conjunto são evidências de que estas enzimas são quantitativamente aumentadas na diferenciação em *L. (V.) braziliensis*.

O sucesso do ciclo de vida da *Leishmania sp.* é dependente dos genes que são diferencialmente expressos durante as fases nos hospedeiros mamíferos e invertebrados e codificam proteínas, tais como proteinases, que estão envolvidas na interação hospedeiro-patógeno como fatores de virulência para sobrevivência do parasito. Propomos, através de detecção de RNA mensageiro e abordagens da atividade enzimática, que a expressão de catepsinas são moduladas durante o processo de diferenciação *in vitro* das promastigotas de *L. (V.) braziliensis* para formas amastigotas e sugerimos que estas enzimas podem estar envolvidas com alterações adaptativas e seletivas durante o ciclo de vida deste parasito.

O aumento da atividade da catepsina observado neste trabalho é uma evidência que durante a transformação de promastigotas para amastigotas, a *L. (V.) braziliensis* adquire de forma gradual o seu *status* de virulência necessário para a infecção de mamíferos. Em geral, estas enzimas inibem a biossíntese das prostaglandinas pró-inflamatórias (Taussig, 1980), reduzem a eficiência de coagulação (Livio et al., 1978) e podem influenciar a resposta imune nos hospedeiros vertebrados (Silva-Almeida et al., 2012). Além disso, a catepsina L, mas não catepsina B, tem o potencial de gerar quininas a partir de quinogênio de baixo e alto peso molecular (Desmazes et al., 2001).

Os resultados aqui reunidos sugerem que o aumento das proteinases como a catepsina L - símile pode estar relacionado com a necessidade de alterações morfológicas experimentadas pelo parasito, como alterações na forma da célula, redução do flagelo extracelular, remodelação do citoesqueleto microtubular, e outros. Uma vez que catepsina L é uma proteinase com uma atividade específica mais elevada do que a catepsina B na degradação de substratos proteicos fisiológicos (Kirschke et al., 1982), experiências adicionais são necessárias para

provar o envolvimento eficaz das enzimas em diferentes fases de autofagia no parasita. Mais investigações precisam ser realizadas para provar a participação efetiva de cada uma das enzimas codificadas por genes da catepsina L - s milde (LbrM.08.0810, LbrM.08.0820 e LbrM.08.0830) no conjunto de atividades biológicas experimentadas por *L. (V.) braziliensis* em seu ciclo de vida.

No curso deste estudo foi oportuno abordagens adicionais sobre a cisteína proteinase recombinante *rCPB* Lbrm.08.0810 de 33 438,75Da, com o propósito de investigar a influência da varia o do pH na estabilidade do centro ativo desta enzima. Nesta fase do estudo comprovamos a hipótese de que os ambientes químicos experimentados pelo *L. (V.) braziliensis* durante o ciclo de vida podem influenciar as propriedades catalíticas da enzima CPB e ser definidor de suas atua es no favorecimento do sucesso de vida do parasito. Esta proposi o foi possível devido ao potencial da ressonância de plasma de superfície, na caracteriza o dos parâmetros físico-químicos de liga o da *rCPB* Lbrm.08.0810 ao E- 64. Com esta abordagem foi possível especular sobre a atua o das CBPs nas fases do ciclo de vida.

Desta forma, a simula o dos ambientes químicos onde correm os eventos de intera o molecular os quais os parasitos estão sujeitos, foi satisfatória para indicar que a enzima *rCPB* Lbrm.08.0810 pode atuar em ambientes químicos com diferentes graus de protona o experimentado pela *L. (V.) braziliensis*. A condi o de pH5,0 e pH7,0 para liga o do E-64   *rCPB* Lbrm.08.0810   um forte indicativo do perfil do ambiente químico necessário para manter as forças envolvidas na estabilidade e no *enovelamento do centro ativo* desta proteinase. De maneira geral, as atividades catalíticas destas enzimas ocorrem em ambientes intracelulares na faixa de pH 5.0, como nos megassomos (Leon et al., 1994; Pupkis et al., 1986) ou ainda na superfície de membrana externa do parasito (Rebello et al., 2009; Rebello et al., 2010). Estes achados são indicativos que a *CPB* de *L. (V.) braziliensis* pode atuar tanto na fase do parasito no inseto vetor quanto no hospedeiro mamífero.

Durante as duas últimas décadas houve um avanço significativo no desenvolvimento de sensores e biossensores ópticos para determina es das intera es moleculares em um ambiente tridimensional e em tempo real,

permitindo medir parâmetros relevantes para as interações moleculares em fenômenos biológicos diversos (Carvalho et al., 2003), como também na interação entre proteínas H-2 e epítomos imunogênicos da CPB de *L. amazonensis* (Brandt et al., 2016; Souza-Silva et al., 2014). Ressalta-se ainda, que uma das vantagens desta metodologia é a possibilidade de análise do fenômeno de ligação em tempo real, ou seja, leva-se em conta, também, a quarta dimensão no estabelecimento da interação molecular (Van Regenmortel, 1996). Desta forma os resultados de SPR que apresentamos são dinâmicos e simulam a realidade do fenômeno de interação que está sendo pesquisado.

Além disso, é importante destacar que os resultados dos estudos físico-químicos apresentados neste trabalho correspondem a uma primeira abordagem de biossensoriamento de superfície aplicados à análise de interação molecular entre proteinase de *L. (V.) braziliensis* e um composto inibidor. As grandezas termodinâmicas relacionadas às interações moleculares obtidas neste trabalho deram indícios de que o grau de protonação ao qual a proteína está exposta pode modificar o domínio estrutural do centro ativo da enzima CPB interferindo na interação com o composto E-64. De maneira geral, as taxas de conformação e o potencial eletrostático de centro ativo de enzimas estão intimamente relacionados e são funcionalmente essenciais (Hanoian et al., 2015).

De certa forma, podemos afirmar que as enzimas CPB estão sujeitas a vários graus de protonação durante o ciclo de vida do parasito e, provavelmente, de acordo com isoforma podem ter atuações mais precisas e eficientes na degradação de proteínas pelo parasito. Este ciclo de protonação afeta a taxa de hidrólise destas enzimas e podem mudar entre a aquisição de substratos por autofagia, degradação de substratos e a reciclagem de proteínas degradadas para novas proteínas (Lockwood, 2013); o que pode explicar o potencial funcional destas enzimas no parasito.

Estamos certos de que, a partir da compreensão do mecanismo de catálise da CPB de *L. (V.) braziliensis* será possível propor uma estratégia de interferência na multiplicação deste parasito. Isto será de grande contribuição para a química medicinal voltada para os reagentes leishmanicidas com propriedades inibitórias sobre o ataque nucleofílico de substratos proteicos, sendo um reflexo dos estudos

das razões moleculares da ação de fármacos. A tática de inibição enzimática, reversível ou não, está entre as diversas estratégias modernas de desenho molecular de novos protótipos de substâncias com potencial terapêutico conhecido, em função do mecanismo de ação pretendido para o tratamento de várias doenças (Wermuth, 1996; Klinghofer et al., 2001; Combs et al., 2005).

Como o conjunto de informação obtidas neste trabalho, no âmbito da bioquímica, “dissecamos molecularmente” as cisteínas proteinase B que têm o potencial de atuação na resistência da *L. (V.) braziliensis* aos seus hospedeiros, seja nas formas promastigota quanto a amastigota. Esmiuçamos alguns aspectos do ciclo de vida deste parasito, através de uma nova estratégia de diferenciação *in vitro*, simulando condições adversas de choque de temperatura e pH e identificamos regiões no genoma da cisteína proteinase B que atua na adaptação do parasito. Regiões essas que interferem na maior síntese desta proteinase, sugerindo que tais proteinases são fatores de virulência que modulam tanto as vias imunológicas do hospedeiro vertebrado, quanto a manutenção da homeostase do parasito.

## **VII. Conclusões**

- A estratégia de diferenciação sequencial por choque de pH e temperatura de *L. (V) braziliensis in vitro* foi favorável à mudança do padrão morfológico de promastigotas a amastigotas, em uma cinética temporal.
- Somente depois da oscilação dos níveis de expressão dos genes de *cpb* (Lbrm.08.0810 e Lbrm.08.0820/Lbrm.08.0830) e da atividade enzimática de cisteína proteinases, os promastigotas de *L. (V) braziliensis* mudam sua morfologia para amastigota *in vitro*.
- Os transcritos do gene LbrM.08.0810 foram melhor detectados do que os transcritos dos genes LbrM.08.0820/LbrM.08.0830, indicando que são mais expressos no parasito nos tempos iniciais da diferenciação *in vitro*.
- A extensa homologia entre as sequências *ORF* dos genes LbrM.08.0810, LbrM.08.0820 e LbrM.08.0830 foi um dos fatores limitantes na distinção da expressão do RNA mensageiro destes genes, sendo apenas possível propor dois iniciadores: um para o gene LbrM.08.0810 e outro para os genes LbrM.08.0820 e LbrM.08.0830.
- A propriedade de hidrolisar o substrato Z-FR-AMC e a inibição dessa atividade por Z-FF-FMK e E-64, comprovam que as enzimas catepsinas (L ou B) atuam durante a diferenciação da *L. (V.) braziliensis*.
- A cisteína proteinase rCPB LbrM.08.0810 preserva a propriedade de ligar o E-64 nas condições de pH 5,0 e pH 7,0 uma vez que revelaram os melhores valores de constante de equilíbrio. Este achado é um indicativo de que os ambientes químicos ácido e neutro são favoráveis em manter as forças envolvidas na estabilidade e no enovelamento do centro ativo da proteinase.
- O conjunto de resultados obtidos apontam que a cisteína proteinase codificada pelo gene LbrM.08.0810 pode ter uma contribuição de destaque no ciclo de vida da *L. (V.) braziliensis*, pois tem maior expressão dos seus RNA mensageiros, sugerindo maior síntese de catepsina L - símile em ambientes distintos, típico do ciclo deste parasito.

## **VIII. Referências**

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE. 2012; 7(5):32-36.
- Araujo Soares RM, dos Santos AL, Bonaldo MC, de Andrade AF, Alviano CS, Angluster J, Goldenberg S. *Leishmania (Leishmania)amazonensis*: differential expression of proteinases and cell surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes. Exp Parasitol. 2003; 104:104-112.
- Bangs JD, Brouch EM, Ransom DM, Roggy JL. A soluble secretory reporter system in *Trypanosoma brucei*. Studies on endoplasmic reticulum targeting. J. Biol. Chem. 1996; 271: 18387–18393.
- Bangs JD, Crain PF, Hashizume T, McCloskey JA, Boothroyd JC. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. J Biol Chem. 1992; 267: 9805-9815.
- Barrett AJ. Classification of peptidases. Methods Enzymol 1994; 244: 1-15
- Barron TL, Turco SJ. Quantitation of *Leishmania* lipophosphoglycan repeat units by capillary electrophoresis. Biochem Biophys Res Commun. 2006; 4:710-714.
- 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.
- Bates PA. The developmental biology of *Leishmania* promastigotes. Exp Parasitol. 1994; 79: 215-218.
- Beverley S.M. Gene amplification in *Leishmania*. Annu. Rev. Microbiol. 1991;45:417–444.
- Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M, Papadopoulou BA. Common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. J. Biol. Chem. 2002; 19511-1920.
- Brandt AM, Batista PR, Souza-Silva F, Alves CR, Caffarena ER. Exploring the unbinding of *Leishmania (L.) amazonensis* CPB derived-epitopes from H2 MHC class I proteins. Proteins. 2016; Jan 21.



- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Atlas de *leishmaniose tegumentar americana*: diagnósticos clínico e diferencial. 1st ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006.
- Brooks DR, Denise H, Westrop GD, Coombs GH, Mottram JC. The Stagerregulated expression of *Leishmania mexicana* CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element. J. Biol. Chem. 2001; 276: 47061– 47069.
- 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.
- Carvalho FAA, Charest H, Tavares CAP, Matlashewski G, Valente EP, RABELLO A, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Diagnosis of american visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. Diagn Microbiol Infect Dis.2002; 43(4):289-295.
- 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: 337-342.
- Carvalho RM, Rath S, Kubota LT. SPR - Uma nova ferramenta para biossensores. Quim. Nova. 2003; 26: 97-104.
- 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.
- Clayton C, S.M. Post-transcriptional regulation of gene expression in *trypanosomes* and *leishmanias*. Mol Biochem Parasitol. 2007;156: 93-101.
- Clustal omega Disponível em: < <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>. Acessado em: 06 de abril de 2015.

- Coelho PS, Klein A, Talvani A, Coutinho SF, Takeuchi O, Akira S, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN-gamma-primed-macrophages. *J Leukoc Biol.* 2002 May;71(5):837-44.
- 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 Parasitology Parasites Wildlife.* 2011 Mar;41(3-4):333-42.
- Combs AP, Yue EW, Bower M, Ala PJ, Wayland B, Douty B, Takvorian A, Polam P, Wasserman Z, Zhu W, Crawley ML, Pruitt J, Sparks R, Glass B, Modi D, McLaughlin E, Bostrom L, Li M, Galya L, Blom K, Hillman M, Gonneville L, Reid BG, Wei M, Becker-Pasha M, Klabe R, Huber R, Li Y, Hollis G, Burn TC, Wynn R, Liu P, Metcalf B. Structure-based design and discovery of protein tyrosine phosphatase inhibitors incorporating novel isothiazolidinone heterocyclic phosphotyrosine mimetics. *Eur. J. Med. Chem.* 2005;48: 544–6548.
- Courret N, Frehel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, Antoine JC. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci.* 2002; 115(11): 2303-2316.
- Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G Jr. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93(5):663-668.
- Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon L.L. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes *Exp Parasitol.* 1998, 89, 58-62.
- Daumerie D, Lorenzo S, DWT. Crompton. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization. 2010.
- 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.
- De Souza Leao S, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci.*1995; 108:3219–3231.
- Descoteaux A, Avila HA, Zhang K, Turco SJ, Beverley SM. *Leishmania* LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *EMBO J.* 2002; 21: 4458–4469.
- Descoteaux A, Matlashewski G, Turco SJ. Inhibition of macrophage protein kinase C-mediated protein phosphorylation by *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. *J Immunol.* 1992; Nov 1;149(9):3008-15.
- Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et biophysica acta.* 1999, Oct 8;1455(2-3):341-52.
- Eperon S, McMahon-Pratt D. Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *Leishmania braziliensis*. *J Eukaryot Microbiol.*1989; 36: 502-510.
- Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev.* 2007; 31: 359-77.
- Foucher AL, Papadopoulou B, Ouellette M. Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of *Leishmania infantum*. *Journal of Proteome Research.* 2006.
- Freiburg RNA Tools Disponível em: < <http://rna.informatik.uni-freiburg.de/LocARNA/Input.jsp> >. Acessado em:30 de nov.2015.
- Garami A, Ilg T. The role of phosphomannose isomerase in *Leishmania mexicana* glycoconjugate synthesis and virulence. *JBiolChem.* (2001a); 276: 6566–6575.
- Garami A, Mehlert A, Ilg T. Glycosylation defects and virulence phenotypes of *Leishmania mexicana* phosphomannomutase and dolicholphosphate-mannose synthase gene deletion mutants. *Mol. Cell. Biol.* 2001 Dec;21(23):8168-83.
- GeneDB. Disponível em: < [www.genedb.org](http://www.genedb.org) >. Acessado em:28 de jan.2016.

- Glover L, Horn D. Trypanosomal histone gH2A and the DNA damage response. *Mol Biochem Parasit.*2012;183: 78–83.
- Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffinembedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol.* 1991; 95: 117-124.
- Haile S, Dupé A, Papadopoulou B. Deadenylation-independent stagespecific mRNA degradation in *Leishmania*. *Nucleic acids research.*2008; 36(5): 1634-44.
- Haile S, Papadopoulou B. Developmental regulation of gene expression in *trypanosomatid* parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007; 10: 569–577.
- Handman E., Bullen D.V.R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 2002; 18:332–334.
- Hanoian P, Liu CT, Hammes-Schiffer S, Benkovic S. Perspectives on electrostatics and conformational motions in enzyme catalysis. *Acc Chem Res.* 2015;48(2):482-489.
- Hide M, Bañuls AL. Polymorphisms of cpb multicopy genes in the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102(2):105–106.
- Holzer TR, McMaster WR, Forney JD. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; 146: 198-218.
- Horn D. Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids. *BMC Genomics.* 2008; 9:2
- Ilg T, Etges R, Overath P, McConville MJ, Thomas-Oates J, Thomas J, et al. Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. *J. Biol. Chem.*1992; 267(10):6834-6840.
- Ilg T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *The EMBO journal.* 2000;19(9):1953-62.

- IlgT, Demar M, Harbecke D. Phosphoglycan repeat-deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice. *J. Biol. Chem.* 2001;276(7):4988-97.
- Jochim RC, Teixeira C. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. *Trends Parasitol.*2009; 25: 145-157.
- Johnson PJ, Kooter JM, Borst P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell.* 1987; 51: 273-281.
- Kamboj RC, Pal S, Raghav N, Singh H. A selective colorimetric assay for cathepsin L using Z-Phe-Arg-4-methoxy-beta-naphthylamide. *Biochimie.*1993; 75: 873-878.
- Killick-Kendrick, R., and M. Killick-Kendrick: Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In: Killick-Kendrick, R. (ed.): *Canine leishmaniasis: an update.* Proc. Int. Can. Leishm. Forum, Barcelona, Spain, Intervet Int. 1999;26-31.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-685.
- Légaré D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, Papadopoulou B, Ouellette M. The *Leishmania* ABC protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem.* 2001.
- Leprohon P, Légaré D, Raymond F, Madore E, Hardiman G, Corbeil J, Ouellette M. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res.* 2009.
- Lodge R, Diallo TO, Descoteaux A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol.* 2006;8: 1922–1931.
- Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of Macrophages: An immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.*2009;27: 451-48.
- Matos DCS, Faccioli LAP, Cysne-Finkelstein L, Luca PMD, Corte-Real S, Armôa GRG, Lemes EMB, Decote-Ricardo D, Mendonça SCF. Kinetoplastid membrane protein-11 is

- present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010;105: 341-347.
- Matsukura U, Okitani A, Nishimura T, Kato H. Modes of degradation of myofibrillar proteins by endogenous protease cathepsin L. Biochemical and Biophysical Acta.1981; 662: 41-47.
- Mcconville MJ, Collidge TA, Ferguson MA, Schneider P. The glycoinositol phospholipids of *Leishmania mexicana* promastigotes. Evidence for the presence of three distinct pathways of glycolipid biosynthesis. J. Biol. Chem.1990; 268: 15595–15604.
- Mcconville MJ, Ferguson MA. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. Biochem. J.1993; 294: 305–324.
- Mcconville MJ, Menon AK. Recent developments in the cell biology and biochemistry of glycosylphosphatidylinositol lipids (review). Mol Membr Biol. 2000;17(1):1-16.
- McNicoll F, Drummelsmith J, Müller M, Madore E, Boilard N, Ouellette M, Papadopoulou B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. Proteomics.2006; 6: 3567-3581.
- McNicoll F, Müller M, Cloutier S, Boilard N, Rochette A, Dubé M, Papadopoulou B. Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. J. Biol. Chem.2005; 280: 35238-35246.
- Medzhitov R, Janeway CA. JR. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. Curr Opin Microbiol. 1997;9(1):4-9.
- MELO MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: desafio e perspectivas. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto. 2004; 41-45.

Ministério da saúde Disponível em:<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/vigilancia-de-a-a-z>>. Acessado em: 07 de novembro de 2015.

Mojtahedi Z, Clos J, Sarvestani-Kamali E. *Leishmania major*: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Experimental Parasitology*. 2008;119: 422-429.

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;100(4):377-83.

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.

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.

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

Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol*. 2000;164(11): 5998-6004.

Myler PJ, Beverley SM, Cruz AK, Dobson DE, Ivens AC, McDonagh PD, Madhubala R, Martinez-Calvillo S, Ruiz JC, Saxena A, Sisk E, Sunkin SM, Worthey E, Yan S, Stuart KD. The *Leishmania* genome project: new insights into gene organization and function. *Med Microbiol Immunol*. 2001;190(1-2):9-12.

- Nieves E, Pimenta PFP. Developmente of *leishmanina (Viannia) brasiliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei*. J. Med. Entomol. 2000; 37(1):134-140.
- Omara-Opyene AL, Gedamu L. Molecular cloning, characterization and overexpression of two distinct cysteine protease cDNAs from *Leishmania donovani chagasi*. Mol Biochem Parasitol. 1997; 90: 247-267.
- Papadopoulou B, Boucher N, McNicoll F, Wu Y, Dubé M, El-Fakhry Y, Huang X.F. Translational control of stage-specific gene expression in the intracellular form of *Leishmania*. J Parasitol. 2003; 89: S174-S181.
- Pascalis H, Lavergne A, Bourreau E, Prévot-Linguet G, Kariminia A, Pradinaud R, Rafati S, Launois P. Th1 Cell Development Induced by Cysteine Proteinases A and B in Localized Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania guyanensis*. Infection and Immunity. 2003; 71(5):2924–2926.
- Passare C, Medzhitov R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation 1. Immunity. 2004; 21:733-741.
- Passos VMA, Gontijo CMF, Dias ES, Katz N, Falcão AL. Cutaneous leishmaniasis in periurban foci of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. Proceedings of Workshop “Research and Control of Leishmaniasis in Brazil” 1998; 81: 83-88.
- Pereira BA, Silva FS, Rebello KM, Marín-Villa M, Traub-Cseko YM, Andrade TC, Bertho ÁL, Caffarena ER, Alves CR. In silico predicted epitopes from the COOH-terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during *Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection. BMC Immunol 2011, 12:44.
- Pereira, B.A. and Alves, C.R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Veterinary Parasitology. 2008; 158: 239-255.
- Pimenta PFP, Saraiva EMB, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, et al. The vectorial competence of phlebotominae sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91: 9155-9159.



- Poot J, Denise H, Herrmann 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.
- Pral EM, Bijovsky AT, Balanco JM, Alfieri SC. *Leishmania mexicana*: proteinase activities and megasomes in axenically cultivated amastigote-like forms. Exp Parasitol. 1993; 77(1):62-73.
- Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei WQ, Ferguson MA, Brimacombe JS, et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996 Oct 1;93(20):10984-9.
- Ramamoorthy R, Swihart KG, McCoy JJ, Wilson ME, Donelson JE. Intergenic regions between tandem gp63 genes influence the differential expression of gp63 RNAs in *Leishmania chagasi* promastigotes. J. Biol. Chem. 1995; 270: 12133-12139.
- 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;126(4):570-576.
- 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;106(1):95-104.
- Ritting MG, Bogdan C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. Parasitol Today. 2000; 16: 292-297.
- RNAfold web Server Disponível em: <<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>>. Acessado em 25 de out.2015.

- 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.
- Rochette A, McNicoll F, Girard J, Breton M, Leblanc E, Bergeron MG, Papadopoulou B. Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania spp.* *Mol Biochem Parasitol*. 2005; 140: 205-220.
- Rochette A, Raymond F, Corbeil J, Ouellette M, Papadopoulou B. Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2009; 165: 32-47.
- Rogers M, Kropf P, Choi BS, Dillon R, Podinovskaia M, Bates P, Müller I. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog.* (2009).
- Rogers ME, Bates PA. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *PLoS Pathog.* 2007; 3, e91.10.1371.
- 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*. 124: 495–507.
- Rogers ME, Hajmová M, Joshi MB, Sadlova J, Dwyer DM, Volf P, Bates PA. *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. *Cell. Microbiol.* 2008; 10: 1363–1372.
- Rosenzweig D, Smith D, Myler PJ, Olafson RW, Silberstein D. Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics*. 2008; 8: 1843-1850.
- Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55:453-483.
- Sacks DL, Pimenta PF, McConville MJ, Schneider P, Turco SJ. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by

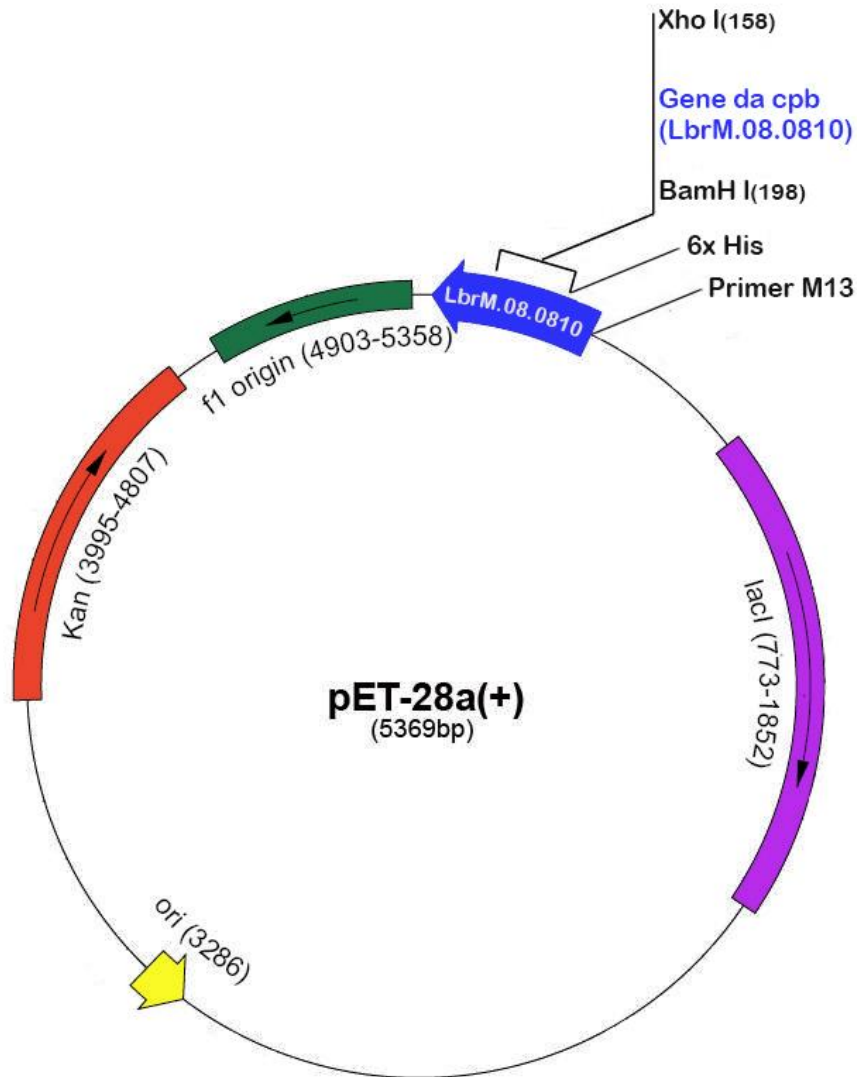
- conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 1995;181(2):685-9.
- Saxena A, Lahav T, Holland N, Aggarwal G, Anupama A, Huang Y, Volpin H, Myler PJ, Zilberstein D. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. *Mol Biochem Parasitol.* 2007; 152: 53-65.
- Scher R, Garcia JB, Pascoalino B, Schenkman S, Cruz AK. Characterization of anti-silencing factor 1 in *Leishmania major*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2012; 107:377–386.
- Schlein Y. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today.* 1993; 9: 255-258.
- Serezani CH, Perrela JH, Russo M, Peters-Golden M, Jancar S. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J Immunol.* 2006; 177 (5) :3201-3208.
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996; 68(5):850-858.
- Siegel TN, Hekstra DR, Kemp LE, Figueiredo LM, Lowell JE, Fenyo D, Wang X, Dewell S, Cross GA. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev.* 2009; 23:1063-1076.
- Silva-Almeida M, Pereira BA, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Proteinases as virulence factors in *Leishmania spp.* infection in mammals. *Parasit Vectors.* 2012; 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.
- Smith M, Blanchette M, Papadopoulou B. Improving the prediction of mRNA extremities in the parasitic protozoan *Leishmania*. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9: 158.
- Soares RP, Barron T, McCoy-Simandle K, Svobodova M, Warburg A, Turco SJ. *Leishmania tropica*: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate

- with transmission by different *Phlebotomus* species. *Exp Parasitol.* 2004; 107:105-14.
- Soares RP, Cardoso TL, Barron T, Araujo MS, Pimenta PF, Turco SJ. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *International journal for parasitology.* 2005;35(3):245-53.
- 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, Margonari C, Secundino NC, Macedo ME, da Costa SM, Rangel EF, et al. Differential midgut attachment of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the sand flies *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*. *J Biomed Biotechnol.* 2010.
- 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):25305–2531.
- Souza AE, Waugh S, Coombs GH, Mottram JC: Characterization of a multicopy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *FEBS Lett.* 1992; 311(2):124–127.
- Spath 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.* (2003); 100:9536-9541.
- Stebeck CE, Beecroft R, Singh B, Jardim A, Olafson R, Tuckey C, Prenevost K, Pearson T. 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 protozoan parasites. *Mol Biochem Parasitol.*1995;71: 1-13
- Sterkers Y, Lachaud L, Crobu L, Bastien P, Pages M. FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. *Cell. Microbiol.* 2011;13: 274–283.

- Stierhof YD, Bates PA, Jacobson RL, Rogers ME, Schlein Y, Handman E, Ilg T. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur. J. Cell Biol.* 1999;78: 675–68910.
- Stuart KD, Schnauffer A, Ernst NL, Panigrahi AK. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(2):97-105.
- Tachado SD, Gerold P, Schwarz R, Novakovic S, McConville M, Schofield L. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;15;94(8):4022-7.
- Taussig SJ. The mechanism of the physiological action of bromelain. *Medical Hypotheses.*1980; 6: 99-104.
- The mfold Web Server Disponível em: < <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>>. Acessado em: 15 de fev. de 2015
- Thomas JR, McConville MJ, Thomas-Oates JE, Homans SW, Ferguson MA, Gorin PA, Greis KD, Turco SJ. Refined structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.*1992; 267: 6829–6833.
- Tolson DL, Jardim A, Schnur LF, Stebeck C, Tuckey C, Beecroft RP, Teh HS, Olafson RW, Pearson TW. The kinetoplastid membrane protein 11 of *Leishmania donovani* and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. *Infect Immun.* 1994;62(11):4893-4899.
- Towatari T, Tanabe K, Yoshikawa D, Katunuma N. Purification and properties of a new cathepsin from rat liver. *J. Biochem.* 1978; 84: 659-671.
- TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae Disponível em :<<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>>. Acessado em: 17 de fev. 2016.
- Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol.* 2012;28(8):335-44.

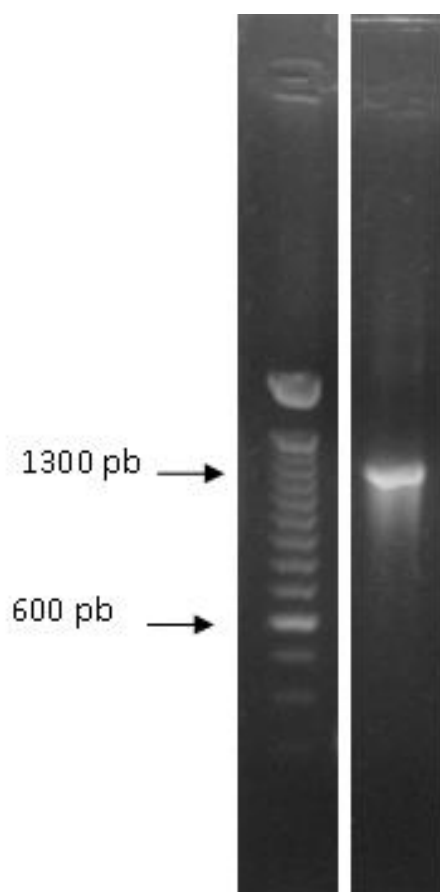
- Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.*2004; 173: 6521–6525.
- Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. *Biology of the kinetoplastida*. London: Academic Press. 1976: 1–34.
- 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.
- Wermuth CG. *The practice of medicinal chemistry*. 3rd ed. London: Academic Press. 2008: 982.
- Williams RA, Tetley L, Mottram JC, Coombs GH. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Molecular Microbiology.*2006; 61: 655-74.
- Wu Y, El Fakhry Y, Sereno D, Tamar S, Papadopoulou B. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol.*2000; 110: 345– 357.
- Zawadzki J, Scholz C, Currie G, Coombs GH, McConville MJ. The glycoinositolphospholipids from *Leishmania panamensis* contain unusual glycan and lipid moieties. *J Mol Biol.* 1998; 282:287–299.
- Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1994; 48: 449-470.

## **IX. Anexos**



**Anexo1: Esquema representando o vetor pet 28a(+) e a inserção do fragmento do gene da cpb LbrM.08.0810.** Podemos observar nessa figura algumas características do vetor de expressão pET-28a tais como: a região de clonagem (BamHI – XhoI), conforme a seta em vermelho indicando onde foi inserido o gene LbrM.08.0810 e também o vetor apresenta uma sequência codificadora da cauda de histidina (His-tag) o que permite a expressão da proteína recombinante fusionada à 6 resíduos de histidina e facilitando a purificação por técnicas de cromatografia de afinidade.





**Anexo 2: Confirmação da inserção da rCPB LbrM.08.0810.** Amostra de DNA da colônia de bactéria transformado e clonada, foi amplificada em PCR para confirmação do gene de interesse (LbrM.08.0810) no vetor (pet28a). Os iniciadores utilizados foram M13. O peso molecular utilizado foi de 100pb e o inserto tem um tamanho aproximado de 1300 pb.

**Anexo3: Grau de similaridade das sequências obtidas para o gene *cpb* LbrM.08.0810.** Após o alinhamento das sequências realizamos uma busca no banco de dados do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e obtivemos sequências com alto grau de identidade em relação ao gene *cpb* LbrM.08.0810 de *Leishmania braziliensis*.

Número de acesso	Descrição	Escore Máximo	Query cover	Identidade
FR798982.1	Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 complete genome, chromosome 8	829	100%	99%
XM_001562089.1	Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA	829	100%	
AY850168.1	Cloning vector pQ-CPB recombinant cysteine protease mRNA, partial cds	820	100%	99%
XM_001562091.1	Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA	814	100%	99%
XM_001562090.1	Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904 cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA	810	100%	99%
XM_010705915.1	Leishmania panamensis cathepsin L-like protease (CPB), partial mRNA	738	100%	95%
CP009377.1	Leishmania panamensis strain MHOM/PA/94/PSC-1 chromosome 8 sequence	738	100%	95%
GQ180933.1	Leishmania guyanensis cysteine protease (CPB) gene, complete cds	733	100%	95%
EU289030.1	Leishmania panamensis cysteine protease gene, complete cds	733	100%	95%
AJ512653.1	Leishmania guyanensis partial cpb gene for cysteine proteinase b	666	90%	95%

**Anexo4:**Increasing in cysteine proteinase B expression and enzymatic activity during in vitro differentiation of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: First evidence of modulation during morphological transition artigo publicado na revista "Biochimie"2016;133:28-36.



## Research paper

## Increasing in cysteine proteinase B expression and enzymatic activity during *in vitro* differentiation of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: First evidence of modulation during morphological transition



Cinthia Bernardes Gomes<sup>a,1</sup>, Franklin Souza -Silva<sup>a,1</sup>, Karen dos Santos Charret<sup>a,1</sup>, Bernardo Acácio Santini Pereira<sup>a</sup>, Léa Cysne Finkelstein<sup>b</sup>, Raquel Santos-de-Souza<sup>a</sup>, Luzia Monteiro de Castro Côrtes<sup>a</sup>, Mirian Claudia Souza Pereira<sup>c</sup>, Francisco Odêncio Rodrigues de Oliveira Jr.<sup>c</sup>, [Carlos Roberto Alves<sup>a,\\*</sup>](mailto:calves@ioc.fiocruz.br)

<sup>a</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, CEP: 21040-360, Brazil

<sup>b</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunoparasitologia, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, CEP: 21040-360, Brazil

<sup>c</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Ultraestrutura Celular, Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, CEP: 21040-360, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 21 June 2016

Accepted 30 November 2016

Available online 3 December 2016

## Keywords:

*Leishmania (Viannia) braziliensis*

Cysteine proteinases B

Cathepsin L

Z-Phe-Arg 7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride

Z-Phe-Phe-fluoromethyl ketone and

Trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane

## ABSTRACT

*Leishmania (Viannia) braziliensis* presents adaptive protease-dependent mechanisms, as cysteine proteinases B (CPB). This study investigates the expression of three *cpb* gene isoforms and CPB enzymatic activity during the parasite differentiation. Relative expression levels of LbrM.08.0810 gene were assessed, exhibiting a higher quantity of transcripts in the logarithmic promastigotes phase than in the stationary promastigotes phase (>1.5 times). The *cpb* gene tends to decrease during acid pH shock and increases when the temperature rises (>1.3 times). LbrM.08.0820 and LbrM.08.0830 genes exhibited similar expression profiles to LbrM.08.0810 gene, with lower levels being observed overall. The proteolytic activity exhibits a gradual increase during the parasite's differentiation with low levels in samples of logarithmic promastigotes phase ( $3.2 \pm 0.08 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ ) to a peak of activity after 72 h of incubation at 32 °C ( $4.2 \pm 0.026 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ ) followed by a subsequent decrease of 68 % of peak activity levels after 96 h of incubation at 32 °C ( $2.8 \pm 0.37 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ ). These activities were also measured in the presence of selective inhibitors for cysteine proteinases, such as Z-Phe-Phe-fluoromethyl ketone and trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane, demonstrating their source as cathepsin-like proteinases. To the best of our knowledge, this report presents the first description of a modulation of cathepsin L-like expression during the *L. (V.) braziliensis in vitro* differentiation induced by acid pH and high temperature.

© 2016 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

## 1. Introduction

Protozoa of the genus *Leishmania* are parasites adapted to shift between two morphological stages, living as extracellular promastigotes in the gut of sandfly vectors and as intracellular amastigotes in mammalian host cells [1]. The parasites are transmitted to the mammalian host through the bite of the female sand fly,

showing a heterogeneous life cycle [2]. *Leishmania spp* are widely distributed in tropical and subtropical regions, causing cutaneous and visceral injuries. Leishmaniasis is endemic in 98 countries and in three territories. Approximately 200 thousand new cases of cutaneous leishmaniasis (CL) occur per year. In Brazil, the American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is geographically expanding, reaching an annual incidence of 11.3 cases per 100 thousand inhabitants in the last four years [3].

The main species causing ACL in Brazil are *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Indeed, *L. (V.) braziliensis* is also the main agent of mucocutaneous in Americas, a metastatic sequela of a cutaneous

\* Corresponding author.

E-mail address: [calves@ioc.fiocruz.br](mailto:calves@ioc.fiocruz.br) (C.R. Alves).

<sup>1</sup> These authors have equally contributed to this paper.

infection that results from dissemination of parasites from the skin to the naso-oropharyngeal mucosa [4]. Pentavalent antimonials are the drugs mainly used in the current therapy; however, this treatment is toxic and expensive [5]. In this context, new strategies for leishmaniasis treatment are recommended, and studies for potential new targets are underway, mainly focusing on the virulence factors of these parasites, such as the proteases [6,7].

Proteases have been addressed as putative therapeutic targets due to their relevance in the biological processes of different life stages of *Leishmania* sp, either in vertebrate or invertebrate hosts, influencing transmission and infection [8]. These enzymes are hydrolases, grouped according to structure and functionality, that are able to cleave peptide bonds of proteins. Hydrolysis of peptide bonds may occur at the amino-terminal or carboxy terminal groups (exopeptidase activity) or inside (endopeptidase activity) the protein. In the latter case, enzymes are also known as proteinases [9].

In fact, different proteinases activities are known in *Leishmania* sp, and some of these enzymes are essential to the parasite lifecycle [8,10,11]. Cysteine proteinases (CPs), followed by metalloproteinase and serine proteinases, are the best described virulence factors of *Leishmania* sp influencing successful infection in vertebrate hosts [8].

CPs are currently the class with more reports of virulence factors in *Leishmania* sp. In *L. (L.) mexicana* CPs are known to influence macrophage signaling [12] and the activities are higher in amastigotes than in promastigotes [13], which is correlated with the infectivity of this parasite [8]. Three CPs (CPA, CPB and CPC) are well studied in *Leishmania* sp, but CPB has been highlighted by its role in host-parasite interactions. CPC null mutants of the *L. (L.) mexicana* grew normally as promastigotes and axenic amastigotes, but showed reduced infectivity to macrophages [14,15]. Additionally, *Leishmania donovani* with the suppressed CPA gene was less able to infect mammalian hosts [16].

The CPB has been reported as the most relevant to CP in parasites of *L. (L.) mexicana* complex, producing a wide range of effects on vertebrate host. This enzyme is able to promote expression of interleukin (IL)-4 [17], inhibit IL-12 [18] expression, affect transcription factors as STAT-1, AP-1 and NF- $\kappa$ B [19], impair the production of nitric oxide [20], and cleave proteins of the major histocompatibility complex [21]. Furthermore, the suppression of multiple copies of *cbp* genes in *L. (L.) mexicana* reduced the ability of parasites to infect and cause lesions in hosts [22,23]. Additional studies of CP genes suppression in *Leishmania* sp have proven the important role of such proteinases for the virulence of the parasite. CPs suppression decreased *L. Infantum infantum* infectivity in hamsters [24] and *L. I. chagasi* in human cell cultures [25].

Although several studies have identified CP as relevant virulence factors in many *Leishmania* sp, in *L. (V.) braziliensis*, such virulence factors have not been adequately characterized to date. Analysis of the genome organization of this parasite showed two main types of CP sequences: cathepsin B-like (locus CPA and locus CPC - present as single copy genes) and cathepsin L-like (locus CPB - present as three copies genes) [15,26]. Due to this high degree of similarity to *cbp*, gene copies LbrM.08.0810, LbrM.08.0820 and LbrM.08.0830 are considered orthologous [11], and identification of differences in expression among these genes based on their mRNA sequence is rather difficult.

A recent report demonstrated that *L. (V.) braziliensis* expresses CPB enzymes on the membrane surface of promastigotes, and this enzyme may be important in the catalysis of protein substrates in the gut environment of sand flies [27]. In addition, the expression of these genes is regulated during the successive *in vitro* culture of promastigotes, suggesting a parallel between the CPB genes expression and the loss of infectivity [28].

In the present study, we analyzed CPB expression on *in vitro*

differentiation of promastigotes to amastigotes of *L. (V.) braziliensis*, induced by pH and temperature shock. These manuscripts present new evidence of cathepsin L-like genes expression along with parasite differentiation, suggesting a differential expression between the *cbp* isoforms by analysis based on the 3'UTR region. We hypothesize that a temperature of 32 °C and a change of pH to acidic levels can modulate cathepsin L-like gene expression in this parasite, which may be associated with environmental adaptation within the hosts.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and culture reagents

Detergents [sodium dodecyl sulfate (SDS) and *t*-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)], dimethyl sulfoxide (DMSO), dithiothreitol (DTT), glycerol, penicillin, streptomycin, Schneider's drosophila medium, fluorogenic peptide substrates [Z-Phe-Arg 7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride (Z-FR-AMC)], proteinases inhibitors [trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and Z-Phe-Phe-fluoromethyl ketone (Z-FF-MK)] and sodium acetate, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). The micro-bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit was purchased from Pierce Chemical Co. (Appleton, WI). Fetal calf serum (FCS) was purchased from Gibco, Invitrogen (Brazil). TRIzol<sup>®</sup> RNA Isolation Reagent (Trizol), RNase H enzyme, DEPC-treated water, Platinum Taq DNA Polymerase (DNA Polymerase), DNase I amplification grade (DNase I) were purchased from Invitrogen, Life Technologies (USA). RNeasy Mini Ki and RNase OUT enzyme were purchased from Qiagen (Hilden, Germany). GoTaq Hot Start Master Mixes, Wizard<sup>®</sup> DNA Clean-Up System and PCR Clean-Up System were purchased from (Promega Corporation, USA). SYBR Green kit (SYBR Green ROX Mix) was purchased from LGC Biotechnology (Teddington, Middlesex, UK). TBE buffer Gelred Staining solution (Bio-tium, Hayward, CA). All reagents were of analytical grade or better.

### 2.2. Parasite

*Leishmania (Viannia) braziliensis* (strain MCAN/BR/1998/R619) was maintained in semi-solid NNN medium at 26 °C and its expansion was performed in Schneider's insect medium pH 7.2 (supplemented with 10% FCS, 200 IU penicillin, 200 µg/mL streptomycin and 2% urine).

### 2.3. In vitro differentiation of parasites

*In vitro* differentiation of promastigotes to amastigotes was initiated with a 10<sup>6</sup> promastigotes/mL suspension of log-phase promastigotes (26 °C, 2 days) in Schneider's insect medium pH 7.2 - parasite in logarithmic phase. Subsequently, promastigotes were suspended at the same prior density in Schneider's insect medium pH 5.5 (supplemented with 10% FCS, 200 IU penicillin, 200 µg/mL streptomycin and 2% urine) and incubated (26 °C, minimum 4 days) when cultures presented at least 53% of metacyclic forms (data not shown). When parasites reached the stationary growth phase, a suspension of 10<sup>6</sup> promastigotes/mL was transferred to Schneider's insect medium pH 5.5 (supplemented with 20% FCS, 200 IU penicillin, 200 µg/mL streptomycin and 2% of urine) and incubated at 32 °C for 4 days - parasites under high temperature [29].

### 2.4. Monitoring the parasites differentiation

The *in vitro* differentiation process was followed by light

microscopy (LM) and scanning electron microscopy (SEM) to assess cell viability and morphological changes, respectively. Trypan Blue, a living-cell exclusion dye, was used to determine parasite viability. Parasites were incubated with vital dye (1% - v/v) and then, counted in a Neubauer chamber by light microscopy (Zeiss Primo Star Halogen/LED Microscope). For SEM, parasites ( $10^7$ ) at each stage of differentiation were fixed (4 °C, 24 h) with 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2). After washing with PBS, the parasites were attached to a poly-L-lysine coated coverslip followed by post-fixation (4 °C, 1 h) with 1% OsO<sub>4</sub> in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.2). Then, the samples were dehydrated in a serial gradient of ethanol (30–100%), critical point dried and submitted to sputter coating with gold. The samples were observed using a Jeol® JSM-5600.

### 2.5. Total RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from  $10^8$  parasites during differentiation assays using Trizol reagent, following the manufacturer's protocol. Quantitative analysis of total RNA was determined by measuring absorbance at 260 nm in a Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Retrieved RNA was treated with 1 µL DNase I (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade - Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), following the manufacturer's instructions. A reverse transcription reaction was initiated with 5 µg of RNA and 1 µL of oligo dT (70 °C, 10 min). Then, 10 mM of DTT (0.1 M/mL), 0.04 mM of dNTPs, 1 µL RNase inhibitor (40U/µL), 1 µL transcriptase SuperScript III enzyme (200U/µL), 4 µL reaction buffer 10X (200 mM Tris-HCl and 500 mM KCl, pH 8.4), and H<sub>2</sub>O up to 20 µL were added. The reaction was kept for 1 h at 42 °C and inactivated at 90 °C for 5 min. Produced cDNA was quantified in Qubit 2.0 Fluorometer (ThermoFischer, USA).

### 2.6. Design of specific primers

Previous alignment in CLUSTAL Omega online platform (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) showed a high identity rate between CPB genes when their open read frame (ORF) sequence was used. Then, primers were designed by aiming the 3'UTR region sequence of LbrM.08.0810, LbrM.08.0820 and LbrM.08.0830 genes, which were obtained from the [Tritypdb.org](http://Tritypdb.org) platform [LbrM.08.0810: 5'CGT GCG GCT CTA CGA TCC CCT ACA CG 3' and 5'GGA AAA GGG TGG CTG TGA TAG TCG 3' (expected product size: 190 bp); LbrM.08.0820/Lbrm.08.0830: 5' CAG CGG TAC GCC GAA GTA CAA AGT G 3' and 5' GTA TTA ACG CGA AGC TGC CAT AGC G 3' (expected product size: 193 bp)]. The primers used for  $\alpha$ -tubulin (LbrM.13.0200) gene expression were employed as endogenous control (constitutive expression) for comparative analysis of CPB genes expression: 5' TAT CTG CAT TCA CAT CGG 3' and 5' CGT CAT CCT CAA CAC CA 3'(expected product size: 130 bp) [28].

### 2.7. Conventional (qualitative) PCR

cDNA was amplified using specific primers, as described above. The reaction was carried out with 1 µL cDNA reaction, 12.5 µL GoTaq Hot Start Master Mixes and DEPC-treated water up to 25 µL. PCR amplification was performed with a programmable thermal cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). cDNA amplification protocol was carried out as follows: 1 cycle 95 °C; 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 54 °C, 40 s at 72 °C, and 1 cycle of 5 min at 72 °C. PCR products were subjected to electrophoresis in a 2% agarose gel in TBE buffer Gelred Staining solution 1:1000 on horizontal cube at 80 V for 90 min.

### 2.8. Real-time RT-PCR

Gene expression by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using a ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Reactions were performed as biological triplicates and technical duplicates using a SYBR Green kit. The final concentration of oligonucleotides in the reaction was 0.6 µM. Fluorescence readings were performed under the following conditions: preincubation at 95 °C for 10 min, 40 cycles of amplification at 95 °C for 30 s, and 60 °C for 60 s. The melting or dissociation curve was determined immediately after amplification with continuous readings of fluorescence at 55 °C–95 °C at a linear temperature transition rate of 0.2 °C. Gene expression analyses were performed using QuantStudio™ Software V1.2 (Applied Biosystems) based on  $\Delta$ Ct methods.

### 2.9. Sequencing of cpb gene PCR product

The product of conventional PCR reaction described above was purified with Wizard® DNA Clean-Up System, following the manufacturer's protocol and quantified in a Nanodrop 2000c. Next, 200 ng of the PCR product and forward primer for the studied genes (described above) were used for sequencing using a Sequence Scanner (Applied Biosystems). The results were analyzed in the BioEdit program (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA).

### 2.10. Parasite protein extracts

Protein extracts were obtained as described previously [30]. The parasites ( $2.0 \times 10^9$ ) were washed three times by centrifugation ( $3000 \times g$ , 10 min, 4 °C) in PBS (pH 7.2) and then subjected to 4 cycles of vortex-mixing for 30 min in lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.6% Triton X-100). The soluble protein fraction was obtained by centrifugation ( $25,000 \times g$ , 30 min, 4 °C) and stored (- 20 °C) until further use. Protein concentration of extract samples was determined using a micro-BCA protein assay kit.

### 2.11. Cysteine proteinase activity

Cysteine proteinase activities in protein extracts (5.0 g) of human cathepsin L (2.0 µg), which was used as positive activity control, were characterized in activation buffer (400 mM Sodium acetate pH 5.5, containing 4 mM EDTA and 8 mM DTT) at a final volume of 60 µL, using a Z-FR-AMC substrate (0.1 mM) previously prepared in DMSO. Samples were incubated (60 min, 37 °C) and variance in the relative fluorescence units (RFU), corresponding to enzymatic cleavage of the substrates, was monitored with a Molecular Devices SpectraMax spectrophotometer (Gemini XPS) [31]. The inhibition effects of E-64 (10 µM) and Z-FF-MK (50 µM) were assessed under the same conditions.

Substrate enzymatic cleavage rate was defined using the formula  $v = \Delta s/\Delta t$ , where  $v$  represents velocity (reaction rate),  $\Delta s$  represents substrate concentration variation, and  $\Delta t$  represents the total reaction time [32]. Self-degradation of fluorescent peptide substrate was controlled throughout the assay to avoid incorrect readings. The enzymatic activity was expressed as millimoles of hydrolyzed substrate per minutes per milligram of protein ( $\text{mmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ).

### 2.12. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 4.0 (San Diego, USA) software. Data were analyzed for statistical significance using unpaired Student's t-test and considered to be

significant at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. *In vitro* differentiation of *Leishmania (V.) braziliensis* promastigotes into amastigotes

*In vitro* conditions were established to simulate mammalian host microenvironment conditions and to induce differentiation of promastigotes into amastigotes, such as pH and temperature. The obtained data indicated that the physicochemical conditions to which promastigotes were subjected satisfactorily induced their gradual differentiation into amastigote-like shapes. The parasites cultures assayed to differentiation were enriched with more than 50% of viable metacyclic forms.

Differentiation of the parasite was observed during 96 h after pH and temperature shock by light microscopy (data not shown) and SEM. Analysis by SEM indicates a trend of morphological changes characterized by promastigotes with free flagellum mostly detected in parasites at temperature of 26 °C in logarithmic phase (pH 7.2) and in stationary phase (pH 5.5) (Fig. 1A and B, respectively), and with a subsequent rounding followed by loss of the flagellum at 96 h of incubation at pH 5.5 and at 32 °C (Fig. 1C).

#### 3.2. Relative expression of *cpb* genes during *in vitro* differentiation of *Leishmania (V.) braziliensis*

Expression of *L. (V.) braziliensis cpb* genes family (LbrM.08.0810/0820/0830) during *in vitro* differentiation was evaluated. Primers based on the conserved 3'UTR regions of *L. (V.) braziliensis* CPB gene LbrM.08.0810 allowed the amplification of 190 bp specific fragment in all tested cDNA samples by PCR (data not shown). BLAST analysis

following sequencing of those *cpb* genes products showed a 100% identity rate with *L. (V.) braziliensis* cathepsin L-like protein (Fig. 2).

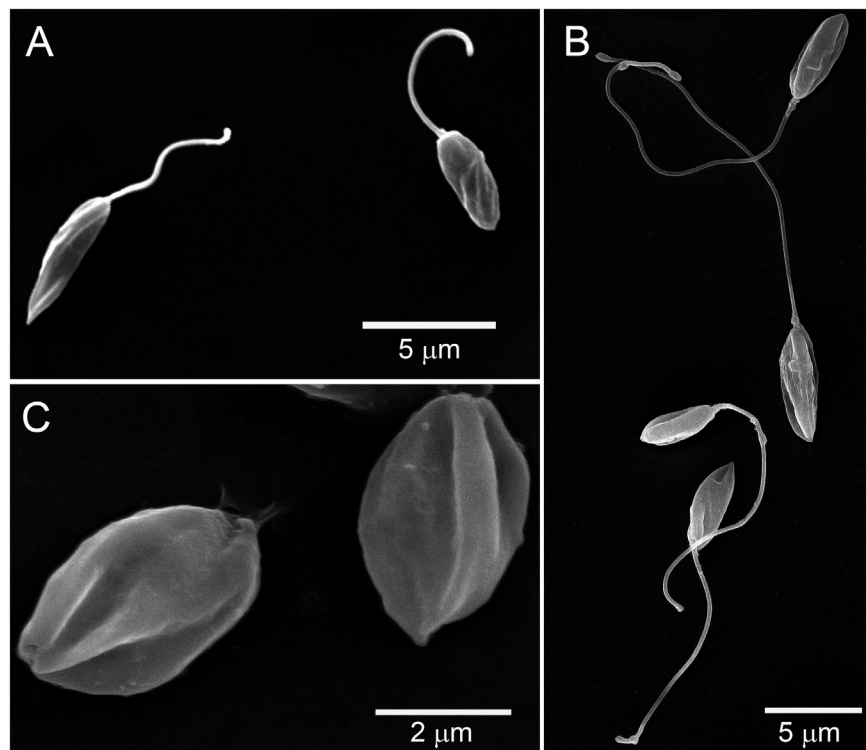
However, it was not possible to differentiate the amplification between LbrM.08.0820 and LbrM.08.0830, due to the high homology between their 3'UTR regions. Thus, a single pair of primers was used to amplify a 192 bp fragment correspondent to both genes (Fig. 2).

Real-time PCR assays for assessing the relative expression of *cpb* in the cDNA samples obtained from each *in vitro* differentiation stage indicated a higher quantity of *cpb* transcripts in samples of parasites in logarithmic phase ( $Ct = 37 \pm 0.40$ ) compared to parasites in stationary phase ( $Ct = 25 \pm 0.38$ ), up to 1.5 times higher ( $p = 0.003$ ), (Fig. 3). A decrease in the *cpb* gene expression was initially observed during acid pH shock, but it was followed by an increase after incubation at 32 °C [24 h ( $Ct = 29 \pm 0.30$ ), at 48 h ( $Ct = 26 \pm 0.17$ ), 72 h ( $Ct = 32 \pm 0.39$ ) and 96 h ( $Ct = 26 \pm 0.42$ )], showing a significant expression of up to 1.3 times ( $p = 0.0002$ ). Genes LbrM.08.0820/LbrM.08.0830 showed a similar expression profile to LbrM.08.0810 gene for parasites in logarithmic phase ( $Ct = 38 \pm 0.40$ ) and stationary phase ( $Ct = 24 \pm 0.11$ ) and after incubation at 32 °C [24 h ( $Ct = 26 \pm 0.7$ ), at 48 h ( $Ct = 25 \pm 0.5$ ), 72 h ( $Ct = 30 \pm 0.39$ ) and 96 h ( $Ct = 25 \pm 0.3$ )] (Fig. 3).

Dissociation curves were carried out to test for specificity of each amplified product and showed a single melting-temperature peak ( $T_m = 82.5$  °C for *cpb* and  $T_m = 85.5$  °C for  $\alpha$ -tubulin).

#### 3.3. Cysteine proteinase activities in *Leishmania (V.) braziliensis* during differentiation

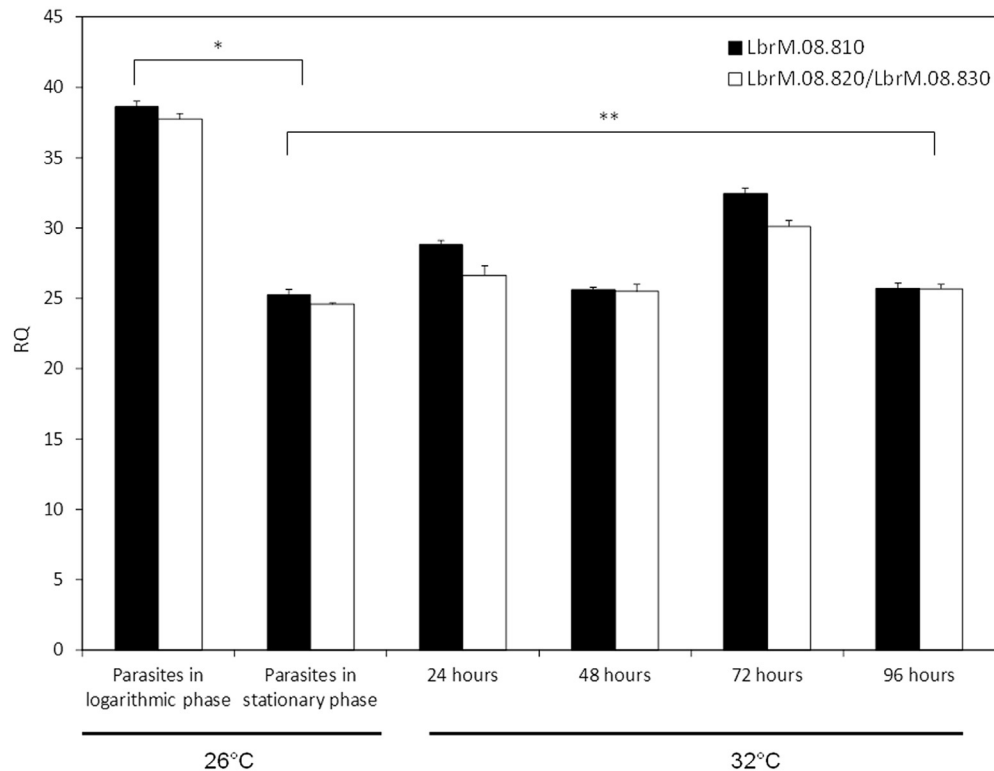
In the course of this study, we were able to assess fluctuations of CP activities during parasite differentiation using crude protein extracts from *L. (V.) braziliensis*. The results showed that all



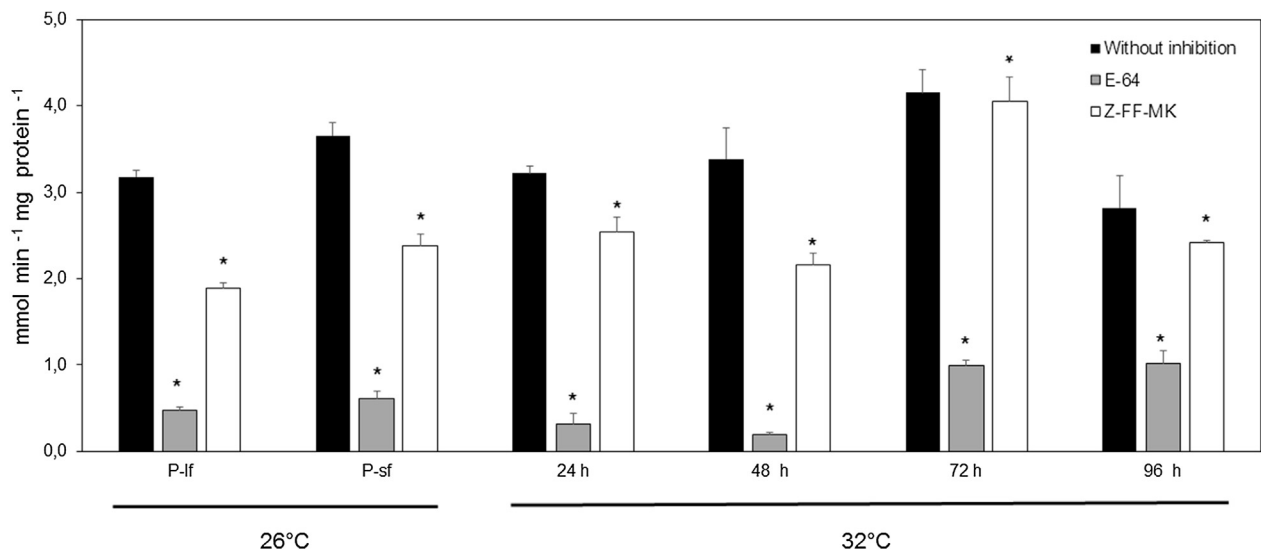
**Fig. 1.** Scanning electron microscopy showing the progression of *Leishmania (V.) braziliensis* *in vitro* differentiation. Electron micrographs show the changes in the morphological profile of parasites: elongated forms with a little free flagellum - parasites in logarithmic phase in pH 7.2 (A) and elongated forms with a free flagellum double the cellular body - parasites in stationary phase in pH 5.5 (B), after incubation at 26 °C; and rounded form without visible flagellum, after 96 h of incubation at 32 °C in pH 5.5 (C). Data are representative of two independent experiments.







**Fig. 3.** Expression levels of LbrM.08.810 and LbrM.08.820/LbrM.08.830 cDNA samples along the progress of *Leishmania (V.) braziliensis* differentiation. Total RNA samples were extracted of parasites [in logarithmic phase and stationary-phase at 26 °C; and parasites incubated at 32 °C for different times: at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h]. After cDNA synthesis, gene expressions were assessed by real-time quantitative PCR. The results are shown in relative quantities (RQ) based on endogenous control  $\alpha$ -tubulin cDNA samples. The results represent the mean  $\pm$  standard deviation of data from three assays. Asterisks indicate statistically significant differences ( $^* = p < 0.05$ ) in RQ values when compared to data from the previous time point. The data are representative of four independent experiments.



**Fig. 4.** Proteinase activities in *Leishmania (V.) braziliensis* protein samples in solution. Soluble proteins samples were obtained from parasites in logarithmic phase (P-lf) and parasites in stationary phase (P-sf) at 26 °C; parasites incubated at 32 °C for different times: at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h. Enzymatic activities of samples (5  $\mu$ g) were measured with 0.1 mM of substrates Z-FR-AMC, in the absence (■) or presence of inhibitors such as 10  $\mu$ M E-64 (■) and 50  $\mu$ M Z-FF-FMK (□). Reaction mixtures were incubated for 60 min at 37 °C in activation buffer. Fractions of enzymatic activity were expressed as  $\text{mmol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ . Results are expressed as the means standard deviations from three independent experiments. ( $^* p < 0.05$ ).

Control assays were performed with bovine cathepsin L and B. As expected, both enzymes hydrolyzed the fluorogenic substrate Z-FR-AMC at different velocities (cathepsin L =  $2.7 \pm 0.18 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$  and cathepsin

B =  $1.7 \pm 0.18 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ ) and were strongly inhibited by both E-64 (cathepsin L: 99.96% of inhibition and cathepsin B: 100%) and Z-FF-MK (cathepsin L: 73.0% and cathepsin B: 90%).

#### 4. Discussion

Parasites of the *Leishmania* genus have a digenetic life cycle with a successive differentiation in promastigote and amastigote forms, a systematic event of their “lifestyle”. These parasites are valuable model organisms for studying the physiology and biochemistry of protozoan proteins, as well as their expression guided by environmental changes. Changes in pH and temperature are physicochemical conditions constantly experienced by these parasites, and, possibly, some of these factors are inducers of biochemical and morphological differentiations. Here, we add new data on the gene expression variation in *L. (V.) braziliensis* induced by environmental changes, proving there is a differential expression of cathepsin L-like enzymes between promastigotes and amastigotes, which is a proteinase class with reported functional relevance in this parasite genome [8].

The physical property of temperature is considered to be an inducer of gene expression to the differentiation process of *Leishmania* sp [33]. However, this phenomenon is observed only when amastigotes reaches the sand flies by blood feeding. Generally, temperature and pH shocks used in combination have been applied as a strategy to induce morphological changes in species belonging to the *L. mexicana* complex [29,32,34] and to *L. braziliensis* complex [35]. The *in vitro* strategy for the differentiation of *L. (V.) braziliensis* applied here enabled simulation of biochemical events related to the adaptation of parasite in different environments: invertebrate and vertebrate hosts - a simulation of natural event sequences experimented by this parasite during its lifecycle within the sand fly to mammalian hosts. Therefore, assuming that these parasites are first submitted to acid pH change, reaching the stationary phase with metacyclic forms when migrating from the midgut to the salivary glands, and then to temperature increase in the mammalian host, when amastigote forms with flagellum in the limit of flagellar pocket predominates [36]. These environmental alterations act as signals, triggering changes in gene expression necessary to allow differentiation and adaptation. This hypothesis was assessed here, since evidence that morphological changes occurred at early hours of *in vitro* differentiation only after fluctuations in the expression of *cbp* gene and the proteinase activity encoded by these genes.

Exposure of promastigotes metacyclic to temperatures similar to those of a mammalian host environment led to a gradual accumulation of genes transcripts LbrM.08.0810, LbrM.08.0820 and LbrM.08.0830, occurring in parallel with significant biological changes in the parasite. Based on previous reports for *L. (L.) mexicana* [37], the increase of *cbp* transcripts in the early hours of differentiation appears to be important for metacyclic promastigotes differentiate into amastigote. There is evidence in *L. (L.) mexicana* that inhibition of lysosomal proteases CPA and CPB, or removal of their genes, not only interferes with the pathway of autophagy, but also avoids metacyclogenesis and differentiation into amastigotes, supporting the hypothesis that autophagy is necessary for cell differentiation [37].

Currently, the biological function of the three *cbp* genes in *L. (V.) braziliensis* is not yet clear. Each of these genes may possibly play distinct or complementary roles in host-parasite interactions. At all assayed *in vitro* differentiation stages, it was clear that transcripts of LbrM.08.0810 genes are more abundant than transcripts of genes LbrM.08.0820/LbrM.08.0830. This fact allows us to suggest that a greatest amount of transcripts of the LbrM.08.0810 gene detected is related to an increased activity of this enzyme in the parasite life cycle, since cathepsin L enzymes play a major role as the highest degradative activity on cellular and matrix proteins [38–40]. It also acts in modulating the immune response of the vertebrate host, as in experimental murine infection with *Leishmania (L.) amazonensis*

[8]. It is possible to suggest that the three CPB isoforms individually exert different roles throughout the life cycle of this parasite, since some *cbp* genes are synthesized in larger amounts under special circumstances, such as the LbrM.08.0810 gene detected here. These findings suggest regulation of *cbp* gene expression, which is a well-known phenomenon for other *Leishmania* sp genes [16,41,42].

Additionally, it is important to keep in mind that protein-encoding genes are organized in tandem and separated by small intergenic regions in trypanosomatids, which are transcribed into long polycistronic subunits [43] and regulated at the post-transcriptional level [44]. Thus, it is possible that the amount of *cbp* transcripts detected in total RNA preparations of *L. (L.) braziliensis* does not reflect the actual amount of CPB enzyme. In contrast, our results in mRNA expression and *in silico* demonstrated that two-dimensional structures of the 3'UTR sequences of these genes (supplementary 1 and 2) showed the possibility of post-translational regulation. Polycistronic RNA units are processed by trans-splicing and polyadenylation reactions to yield the mature RNAs monocistronic messengers (mature mRNA). Therefore, *cbp* genes originated in the same transcriptional unit may show large differences in the expression pattern of CPB in *L. (V.) braziliensis* differentiation, as suggested for *L. infantum* in a combined proteomic and transcriptomic approach [45].

In addition, it was observed that some elements present in the 3'UTR region may act on the regulation of proteins expression in *Leishmania* sp [46–48], as observed in regulation of gp63 protease expression [49]. The two-dimensional structures of 3'UTR region sequences (supplementary 1) showed LbrM.08.0820/LbrM.08.0830 genes, estimating approximately 1100 bp, with AU-rich elements (AREs) exposed on a single strand, which is characterized as cis regulatory elements that accelerate RNA degradation [50]. Interestingly, in the sequence of the expected 3'UTR LbrM.08.0810 gene, the elements that would explain the higher expression of this gene in relation to others were not observed (supplementary 2). Additional experiments are necessary to confirm the size and participation of 3'UTR in the regulation of these genes, which aid in the understanding of the dynamics involved in expression and activity of these proteinases.

In the course of this work, we observe the presence of cathepsin L-like enzymes in all differentiation stages of *L. (V.) braziliensis*. The partial inhibition of proteinase activity in the parasite protein extracts by Z-FF-FMK and E-64 coupled to their capacity to degrade the Z-FR-AMC substrate proves that these active enzymes are cysteine proteinases. However, enzymes from distinct classes may also be present, as the hydrolytic activity of the extracts over the Z-FR-AMC substrate was not completely depleted by inhibitory compounds.

While Z-FF-FMK is an irreversible inhibitor specific for cathepsin B and cathepsin L [8], E-64 irreversibly binds to an active thiol group present in many cysteine proteases, such as papain, actinidase, calpain and cathepsins B, H, K and L [51]. Since these inhibitors do not react with other proteases, data obtained here prove an activity of cysteine proteinase in early stages of *L. (V.) braziliensis* differentiation. In addition, although the specific cathepsin L-like activity in protein extracts is limited due to the absence of specific substrates for this proteinase, the enzymatic and gene expression assays together are evidence that these enzymes are quantitatively increased during *L. (V.) braziliensis* differentiation.

Additionally, the increase of cathepsin-like activity observed in this study is evidenced during the differentiation of promastigotes into amastigotes. *L. (V.) braziliensis*, which gradually acquires its status of virulence necessary for mammalian infection. Generally, the presence of cathepsin-like in *Leishmania* sp inhibits biosynthesis of proinflammatory prostaglandins [52], thereby reducing clotting efficiency [53] and the possibility of influencing immune

response in vertebrate hosts [8]. Furthermore, cathepsin L, but not cathepsin B, has the potential to generate kinins from high and low molecular weight kininogens - vasoactive peptides [54].

## 5. Conclusions

The findings of this study suggest that an increase of proteinases as cathepsin L-like can be related to the morphological changes experienced by the parasite, as changes in cell shape, reduction of the extracellular flagellum, remodeling of the microtubular cytoskeleton, among others. Since cathepsin L is of a higher specific activity than cathepsin B in the degradation of physiological protein substrates [55], further experiments are needed to demonstrate the effective involvement of the enzymes in different stages of autophagy within the parasite. Further research is also warranted to demonstrate the effective participation of each enzyme encoded by cathepsin L-like in LbrM.08.0810, LbrM.08.0820 and LbrM.08.0830 genes in the set of biological activities experienced by *L. (V.) braziliensis* throughout their life cycle.

## Conflict of interest disclosure

All authors declare no competing financial interest and approved the final version of the manuscript.

## Financial support

This research was supported by grants from Brazilian research agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ): E-26/010.002145/2015) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 401356/2014-0).

## Acknowledgments

The authors would like to thank the Rudolf Barth Electron Microscopy Platform (Instituto Oswaldo Cruz - IOC), Genomic-DNA Sequencing (RPT01A) and Real-Time PCR (RPT09A) technological platforms of Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) for support in the assays. Additionally, Cinthia B. Gomes is a doctoral fellow of Fiocruz. Raquel S. Silva is a doctoral fellow of Fiocruz/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) institution. Franklin S. Silva and Francisco O. Jr. are postdoctoral researcher fellows of CAPES institution. Karen S. Charret a postdoctoral researcher fellow of CNPq institution. Mirian C. S. Pereira and Carlos R. Alves are fellow researchers of CNPq institution.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2016.11.015>.

## References

- [1] P.A. Bates, M.E. Rogers, New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*, *Curr. Mol. Med.* 4 (2004) 601–609, <http://dx.doi.org/10.2174/1566524043360285>.
- [2] D.E. Teixeira, M. Benchimol, J.C. Rodrigues, P.H. Crepaldi, P.F. Pimenta, W. de Souza, The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations, *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003594, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003594>.
- [3] *Leishmaniasis Statistics Reports for Brazil*, SUS, Brazil, 2015. <http://tabnet.datasus.gov.br> (accessed 11 February 2016).
- [4] *Leishmaniasis Statistics Reports for Americas*, CDC, USA, 2013. <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/> (accessed 17 May 2016).
- [5] P.D. Deps, M.C. Viana, A. Falqueto, R. Dietze, Comparative assessment of the efficacy and toxicity of N-methyl-glucamine and BP88 sodium stibogluconate in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33 (2000) 535–543, <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-8682200000600004>.
- [6] G. Matlashewski, *Leishmania* infection and virulence, *Med. Microbiol. Immunol.* 190 (2001) 37–42, <http://dx.doi.org/10.1007/s004300100076>.
- [7] B.A. Pereira, F. Souza-Silva, M. Silva-Almeida, R. Santos-de-Souza, L.F. Gonçalves de Oliveira, M.L. Ribeiro-Guimarães, C.R. Alves, Proteinase inhibitors: a promising drug class for treating leishmaniasis, *Curr. Drugs Targets* 15 (2014) 1121–1131, <http://dx.doi.org/10.2174/1389450115666141016150007>.
- [8] M. Silva-Almeida, B.A. Pereira, M.L. Ribeiro-Guimarães, C.R. Alves, Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals, *Parasites Vectors* 5 (2012) 160, <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-5-160>.
- [9] A.J. Barrett, J.K. McDonald, Nomenclature: a possible solution to the 'peptidase anomaly', *Biochem. J.* 231 (1985) 807, <http://dx.doi.org/10.1042/bj2310807>.
- [10] B.A. Pereira, C.R. Alves, Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Veterinary Parasitol.* 158 (2008) 239–255, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.015>.
- [11] M. Silva-Almeida, F. Souza-Silva, B.A. Pereira, M.L. Ribeiro-Guimarães, C.R. Alves, Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp, *Parasites Vectors* 7 (2014) 387, <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-7-387>.
- [12] I. Abu-Dayyeh, K. Hassani, E.R. Westra, J.C. Mottram, M. Olivier, Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions, *Infect. Immun.* 78 (2010) 2438–2445, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00812-09>.
- [13] R.M. de Araújo Soares, A.L. dos Santos, M.C. Bonaldo, A.F. de Andrade, C.S. Alviano, J. Angluster, S. Goldenberg, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes, *Exp. Parasitol.* 104 (2003) 104–112, [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4894\(03\)00135-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-4894(03)00135-8).
- [14] G. Bart, M.J. Frame, R. Carter, G.H. Coombs, J.C. Mottram, Cathepsin B-like cysteine proteinase-deficient mutants of *Leishmania mexicana*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 88 (1997) 53–61, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00072-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00072-8).
- [15] J.C. Mottram, D.R. Brooks, G.H. Coombs, Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions, *Curr. Opin. Microbiol.* 1 (1998) 455–460, [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80065-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80065-9).
- [16] A. Somanna, V. Mundodi, L. Gedamu, 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 (2002) 25305–25312, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M203034200>.
- [17] D. Liu, C. Kebaier, N. Pakpour, A.A. Capul, S.M. Beverley, P. Scott, J.E. Uzonna, *Leishmania major* phosphoglycans influence the host early immune response by modulating dendritic cell functions, *Infect. Immun.* 77 (2009) 3272–3283, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01447-08>.
- [18] N. Weinheber, M. Wolfram, D. Harbecke, T. Aebischer, Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 2467–2477, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199808\)28:08.x](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199808)28:08.x).
- [19] P. Cameron, A. McGachy, M. Anderson, A. Paul, G.H. Coombs, J.C. Mottram, J. Alexander, R. Plevin, 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.* 173 (2004) 3297–3304, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3297>.
- [20] C.R. Alves, T.C. Benévolo-De-Andrade, J.L. Alves, C. Pirmez, Th1 and Th2 immunological profile induced by cysteine proteinase in murine leishmaniasis, *Parasite Immunol.* 26 (2004) 127–135, <http://dx.doi.org/10.1111/ji.0141-9838.2004.00691.x>.
- [21] S. De Souza Leao, T. Lang, E. Prina, R. Hellio, J.C. Antoine, Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells, *J. Cell Sci.* 108 (1995) 3219–3231.
- [22] C.D. Robertson, G.H. Coombs, Multiple high activity cysteine proteases of *Leishmania mexicana* are encoded by the *Imcpb* gene array, *Microbiology* 140 (1994) 417–424, <http://dx.doi.org/10.1099/13500872-140-2-417>.
- [23] A.E. Souza, S. Waugh, G.H. Coombs, J.C. Mottram, Characterization of a multicopy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*, *FEBS Lett.* 311 (1992) 124–127, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)81382-V](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(92)81382-V).
- [24] J. Poot, H. Denise, D.C. Herrmann, J.C. Mottram, G.H. Coombs, A.N. Vermeulen, Virulence and protective potential of several Cysteine peptidase knockout strains of *Leishmania infantum* in hamsters, in: Poot J. Utrecht (Ed.), *Experimental Challenge Models for Canine Leishmaniasis in Hamsters and Dogs*, Optimization and Application in Vaccine Research, vol. 2006, Utrecht University press, Netherlands, 2006, pp. 93–107.
- [25] M. Hide, A.L. Bañuls, Polymorphisms of *cpb* multicopy genes in the *Leishmania (Leishmania) donovani* complex, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102 (2008) 105–106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.013>.
- [26] Jeremy C. Mottram, Graham H. Coombs, James Alexander, Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*, *Curr. Opin. Microbiol.* 7.4 (2004) 375–381.
- [27] K.M. Rebello, L.M. Cortes, B.A. Pereira, B.M. Pascarelli, S. Corte-Real, L.C. Finkelstein, R.T. Pinho, C.M. d'Ávila-Levy, C.R. Alves, Cysteine proteinases from promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Parasitol. Res.* 106 (2009) 95–104, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-009-1632-5>.
- [28] K.M. Rebello, C. Britto, B.A. Pereira, D. Pita-Pereira, M.O. Moraes, A.B. Ferreira, L. Cysne-Finkelstein, T.D. Otto, L.M. Cortes, G.G. da-Silva, C.R. Alves, *Leishmania (Viannia) braziliensis*: influence of successive in vitro cultivation on the expression of promastigote proteinases, *Exp. Parasitol.* 126 (2010) 570–576,

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.009>.
- [29] L. Cysne-Finkelstein, R.M. Temporal, F.A. Alves, L.L. Leon, *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes, *Exp. Parasitol.* 89 (1998) 58–62, <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1998.4276>.
- [30] J.E. Galán, J. Pace, M.J. Hayman, Involvement of the epidermal growth factor receptor in the mammalian cells by *Salmonella typhimurium*, *Nature* 357 (1992) 588–589, <http://dx.doi.org/10.1038/357588a0>.
- [31] A.C. Saldanha, G.A. Romero, E. Merchan-Hamann, A.V. Magalhães, O. Macedo Vde, Comparative study between sodium stibogluconate BP 88R and meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis treatment: I. Efficacy and safety, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32 (1999) 383–387, <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821999000400008>.
- [32] C.R. Alves, S. Corte-Real, S.C. Bourguignon, C.S. Chaves, E.M. Saraiva, *Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote amastigote differentiation in vitro, *Exp. Parasitol.* 109 (2005) 38–48, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2004.10.005>.
- [33] D. Zilberstein, M. Shapira, The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites, *Annu. Rev. Microbiol.* 48 (1994) 449–470, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.48.100194.002313>.
- [34] P.A. Bates, The developmental biology of *Leishmania* promastigotes, *Exp. Parasitol.* 79 (1994) 215–218, <http://dx.doi.org/10.1006/expr.1994.1084>.
- [35] S. Eperon, D. McMahon-Pratt, Extracellular cultivation and morphological characterization of amastigote-like forms of *Leishmania panamensis* and *Leishmania braziliensis*, *J. Eukaryot. Microbiol.* 36 (1989) 502–510, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1989.tb01086.x>.
- [36] Y. Schlein, *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission, *Parasitol. Today* 9 (1993) 255–258, [http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90070-V](http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758(93)90070-V).
- [37] R.A. Williams, L. Tetley, J.C. Mottram, G.H. Coombs, Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*, *Mol. Microbiol.* 61 (2006) 655–674, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05274.x>.
- [38] T. Towatari, K. Tanabe, D. Yoshikawa, N. Katunuma, Purification and properties of a new cathepsin from rat liver, *J. Biochem.* 84 (1978) 659–671.
- [39] U. Matsukura, A. Okitani, T. Nishimura, H. Kato, Modes of degradation of myofibrillar proteins by endogenous protease cathepsin L, *Biochem. Biophysical Acta* 662 (1981) 41–47.
- [40] R.C. Kamboj, S. Pal, N. Raghav, H. Singh, A selective colorimetric assay for cathepsin L using Z-Phe-Arg-4-methoxy-beta-naphthylamide, *Biochimie* 75 (1993) 873–878, [http://dx.doi.org/10.1016/0300-9084\(93\)90042-Q](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9084(93)90042-Q).
- [41] C. Folgueira, J.M. Requena, A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids, *FEMS Microbiol. Rev.* 31 (2007) 359–377, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00069.x>.
- [42] A.L. Omara-Opyene, L. Gedamu, Molecular cloning, characterization and overexpression of two distinct cysteine protease cDNAs from *Leishmania donovani chagasi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 90 (1997) 247–267, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00158-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00158-8).
- [43] P.J. Johnson, J.M. Kooter, P. Borst, Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene, *Cell* 51 (1987) 273–281, [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90154-1](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(87)90154-1).
- [44] D. Horn, Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids, *BMC Genomics* 9 (2008) 2, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-2>.
- [45] F. McNicoll, J. Drummelsmith, M. Müller, E. Madore, N. Boilard, M. Ouellette, B. Papadopoulou, A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*, *Proteomics* 6 (2006) 3567–3581, <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200500853>.
- [46] N. Boucher, Y. Wu, C. Dumas, M. Dube, D. Sereno, M. Breton, B. Papadopoulou, A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19511–19520, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M200500200>.
- [47] F. McNicoll, M. Müller, S. Cloutier, N. Boilard, A. Rochette, M. Dubé, B. Papadopoulou, Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 35238–35246, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M507511200>.
- [48] K. Leifso, G. Cohen-Freue, N. Dogra, A. Murray, W.R. McMaster, Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed, *Mol. Biochem. Parasitol.* 152 (2007) 35–46, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.11.009>.
- [49] R. Ramamoorthy, K.G. Swihart, J.J. McCoy, M.E. Wilson, J.E. Donelson, Intergenic regions between tandem gp63 genes influence the differential expression of gp63 RNAs in *Leishmania chagasi* promastigotes, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 12133–12139, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.20.12133>.
- [50] Nianhua Xu, C.Y. Chen, Ann-Bin Shyu, Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay, *Mol. Cell. Biol.* 17.8 (1997) 4611–4621.
- [51] F. Lecaille, J. Kaleta, D. Brömmle, Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design, *Chem. Rev.* 102 (2002) 4459–4488, <http://dx.doi.org/10.1021/cr0101656>.
- [52] S.J. Taussig, The mechanism of the physiological action of bromelain, *Med. Hypotheses* 6 (1980) 99–104, [http://dx.doi.org/10.1016/0306-9877\(80\)90038-9](http://dx.doi.org/10.1016/0306-9877(80)90038-9).
- [53] M. Livio, M.P. Bertoni, G. De Gaetano, M.B. Donati, Effect of bromelain on fibrinogen level, prothrombin complex factors and platelet aggregation in Prostaglandin and in the rat, *Drugs under Exp. Clin. Res.* 49 (1978) 53.
- [54] C. Desmazes, F. Gauthier, G. Lalmanach, Cathepsin L, but not cathepsin B, is a potential kininogenase, *Biol. Chem.* 382 (2001) 811–816, <http://dx.doi.org/10.1515/bchm.2001.382.5.811>.
- [55] H. Kirschke, A.A. Kembhavi, P. Bohley, A.J. Barrett, Action of rat liver cathepsin L on collagen and other substrates, *Biochem. J.* 201 (1982) 367–372, <http://dx.doi.org/10.1042/bj2010367>.