

CAMILA GUARANY RAMALHO ELIAS

EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS SIMILARES À CRUZIPAÍNA EM  
*Phytomonas serpens*



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Microbiologia).

**Orientadores:** *André Luis Souza dos Santos*  
*Marta Helena Branquinha*



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES  
RIO DE JANEIRO

FEVEREIRO DE 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

ELIAS, Camila Guarany Ramalho

Expressão de moléculas similares à cruzipaína em *Phytomonas serpens*/

Camila Guarany Ramalho Elias – Rio de Janeiro, 2009

xiii, 101

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof.

Paulo de Góes, 2009.

Orientadores: André Luis Souza dos Santos & Marta Helena Branquinha

Referências bibliográficas:f 176

1. *Phytomonas serpens*
2. Tripanossomatídeos
3. Enzimas proteolíticas
4. Cisteína peptidases
5. Cruzipaína
6. *Trypanosma cruzi*

I. Santos, André. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas. III. Expressão de moléculas homólogas à cruzipaína em *Phytomonas serpens*

CAMILA GUARANY RAMALHO ELIAS

EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS SIMILARES À CRUZIPAÍNA EM  
*Phytomonas serpens*

Rio de Janeiro, 10 de fevereiro de 2009

---

(André Luis Souza dos Santos, Doutor, IMPPG - UFRJ)

---

(Marta Helena Branquinha, Doutora, IMPPG - UFRJ)

---

(Alane Beatriz Vermelho, Doutora, IMPPG - UFRJ)

---

(Rosangela Maria de Araújo Soares, Doutora, IMPPG - UFRJ)

---

(Lucimar Ferreira Kneipp, Pesquisadora Assistente, FIOCRUZ)

---

(Marcio Lourenço Rodrigues, Doutor, IMPPG - UFRJ)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação dos Professores André Luis Souza dos Santos e Marta Helena Branquinha.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a minha família, que possibilitou o meu ingresso no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, arcando com todas as conseqüências e dificuldades da distância. Agradeço pelo incentivo para continuar e ingressar na Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), um grande investimento para meu futuro.

Ao meu orientador, André Santos, um verdadeiro pai científico. Uma pessoa de caráter, coragem e determinação admiráveis, figura forte e indispensável para meu desenvolvimento acadêmico e pessoal.

A professora Marta Branquinha, pessoa que muito admiro, mulher forte, um verdadeiro exemplo de futuro. Obrigada por toda orientação no desenvolvimento desta dissertação. Aos componentes de seu grupo de trabalho, em especial, Leandro, Michel e Fernanda.

Aos membros da banca: Professoras Alane Vermelho, Rosangela Soares e Lucimar Kneipp.

Ao Professor Marcio Lourenço pela convivência no laboratório, por todo conhecimento compartilhado (para dúvidas de qualquer assunto, é com certeza a pessoa mais indicada) e pela paciência. Agradeço por revisar a dissertação.

A Cláudia d'Avila-Levy, por disponibilidade para qualquer experimento em qualquer momento!

A Professora Thais Souto-Padrón, responsável pelos experimentos de microscopia eletrônica.

A Professora Angela Hampshire por sempre disponibilizar seu laboratório, reagentes e os insetos utilizados durante esta dissertação. Aos componentes de seu laboratório, em especial Thiago Luís (Cirilo) e Marta Teixeira.

A Fernanda, companheira desde o 1º período da faculdade, presente em muitos momentos importantes da minha vida. Ingressamos juntas na Pós-Graduação e continuamos a compartilhar alegrias, dificuldades, tristezas e muito estudo em todos estes anos; agradeço pelo amor e confiança que me dedica.

A Bib's, pela convivência maravilhosa no laboratório. Aprendemos a lidar com as diferenças e transformá-las em aprendizado e muito amor. Admiro muito seu esforço para realizar tudo da melhor maneira que pode, e sei que posso contar com seu companheirismo sempre.

A todos os componentes de nosso grupo de pesquisa: Ana Luíza, Ana Carolina, Bianca, Carina, Fernanda, Karine, Lys, Vanila e as novas integrantes: Érika, Polliana e Viviane.

A todos que compõe o sensacional abrigo anti-bombas, pois tornam o trabalho cotidiano muito prazeroso. Não posso esquecer-me da Geralda, que sempre facilitou minha vida!

A Felipe Dias, por ser meu padrasto científico sempre, independente das circunstâncias.

As meninas(os) maravilhosas(os) da minha turma de Graduação: Camila Nunes, Carolina, Fabiene, Juliana, Ayla, Simone, Mateus, Lucas, Fred e todos os outros que eu amo.

A Luisa e Aline, amigas queridas que estiveram ao meu lado em todos os momentos que mais precisei!

Agradeço também a todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e me ajudaram na monografia, ainda que em momentos de descontração: Paulo Caju Verçosa (consultor!), Mônica, Leo Quintella, Badá, dentre muitos outros!

Ao CNPq e FAPERJ (bolsa nota 10), agências de fomento responsáveis pelas bolsas de mestrado importantíssimas para que esse trabalho pudesse ser realizado sem grandes preocupações.

## RESUMO

Camila Guarany Ramalho Elias

EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS SIMILARES À CRUZIPAÍNA EM *Phytomonas serpens*

Orientadores: André Luis Souza dos Santos & Marta Helena Branquinha

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

*Phytomonas serpens* é um tripanossomatídeo parasito de plantas, capaz de causar infecções em diferentes cultivares de importância econômica. No presente estudo, avaliamos a expressão de polipeptídeos e enzimas proteolíticas neste flagelado. Duas peptidases majoritárias de 38 e 40 kDa foram observadas. A atividade proteolítica foi bloqueada por inibidores clássicos de cisteína peptidase, apresentou maior intensidade em pH ácido (5,0) e foi completamente dependente de agentes redutores. As cisteína peptidases foram capazes de hidrolisar vários substratos protéicos, incluindo proteínas presentes nas glândulas salivares do inseto fitófago *Oncolpetus fasciatus*. As cisteína peptidases produzidas por *P. serpens* compartilham antígenos comuns com a cruzipaína, a principal cisteína peptidase do *Trypanosoma cruzi*. Os dados também sugerem que a cisteína peptidase de 40 kDa pode ser localizada na superfície do parasito, ligada aos domínios de membrana via âncora de glicosilfosfatidilinositol. A enzima de 40 kDa foi também detectada livre no sobrenadante de cultivo, em uma forma cataliticamente ativa, o que sugere secreção ou “shedding” para o meio extracelular. Análises comparativas mostraram que epimastigotas de *T. cruzi* apresentaram eficácia dez vezes maior em hidrolisar um substrato específico para cisteína peptidases (Z-Phe-Arg-AMC) quando comparada a promastigotas de *P. Serpens*, resultado que foi confirmado por zimografia e ELISA. As cisteína peptidases foram detectadas majoritariamente em frações citoplasmáticas de *P. Serpens*, conforme demonstrado por ensaios bioquímicos e imunocitoquímicos. Anticorpos de um paciente chagásico reconheceram antígenos celulares e extracelulares de *P. serpens*, incluindo a molécula similar a cruzipaína., O cultivo de *P. serpens* em meio complexo suplementado com extrato natural de tomate (*Solanum lycopersicum*) resultou no aumento da expressão de cisteína peptidases, incluindo as moléculas similares a cruzipaína. Além disso, uma proteína de 110 kDa com capacidade de se ligar a promastigotos

vivos de *P. serpens* foi detectada no extrato do tomate. Finalmente, parasitos recolhidos após a infecção de tomates maduros por sete dias também induziram ao aumento de moléculas homólogas à cruzipaína. Coletivamente, nossos resultados mostraram a importância de cisteínas peptidases similares à cruzipaína em eventos biológicos essenciais ao ciclo de vida do fitoflagelado *P. serpens*.

Palavras-chave: 1. *Phytomonas serpens* 2. Tripanossomatídeos 3. Enzimas 4. Cisteína-peptidase 5. Cruzipaína 6. *Trypanosma cruzi*

Rio de Janeiro

Fevereiro de 2009

## ABSTRACT

Camila Guarany Ramalho Elias

EXPRESSION OF CRUZIPAIN-LIKE MOLECULES IN *Phytomonas serpens*

Orientadores: André Luis Souza dos Santos & Marta Helena Branquinha

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

*Phytomonas serpens* is a protozoan parasite that infects different plants of economic importance. In the present work, we evaluated the expression of *P. serpens* peptidases. Two major peptidases with 38 and 40 kDa were observed. Proteolytic activities were blocked by classical cysteine peptidase inhibitors, increased at acidic pH and showed dependence on the presence of reducing agents. The cysteine peptidases hydrolyzed several proteinaceous substrates, including the salivary gland proteins from the phytophage insect *Oncopeltus fasciatus*. Both cysteine peptidases produced by *P. serpens* share common epitopes with cruzipain, the major cysteine peptidase of *Trypanosoma cruzi*. Moreover, our data suggest that the 40 kDa cysteine peptidase was located at the *P. serpens* cell surface, attached to membrane domains via a glycosylphosphatidylinositol anchor. The 40 kDa peptidase was also detected in the cell-free culture supernatant in its active form, which suggests secretion or shedding to the extracellular environment. Comparative analysis revealed that epimastigotes of *T. cruzi* presented a 10-fold higher efficiency in hydrolyzing the cysteine peptidase substrate Z-Phe-Arg-AMC than the promastigotes of *P. serpens*, as confirmed by zymography and ELISA. The cytoplasm was the major site of distribution for the *P. serpens* cysteine peptidases, as determined by biochemical assays and immunocytochemistry. Antibodies from a Chagas' Disease patient recognized both cellular and extracellular antigens of *P. serpens*, including the cruzipain-like molecule. Growth of *P. serpens* in a complex medium supplemented with natural tomato (*Solanum lycopersicum*) extract resulted in increased expression of cysteine peptidases, including the cruzipain-like molecules. Moreover, a 110 kDa *P. serpens*-binding protein was detected in the tomato extract. Collectively, our results showed that cysteine

peptidases similar to cruzipain participate in important biological events during the life cycle of *P. serpens*.

Palavras-chave: 1. *Phytomonas serpens* 2. Tripanossomatídeos 3. Enzimas 4. Cisteína-peptidase 5. Cruzipaina 6. *Trypanosma cruzi*

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2009

## SUMÁRIO

<b>1) Introdução</b>	<b>1-21</b>
1.1) Família Trypanosomatidae	2
1.2) Tripanossomatídeos de plantas	6
1.3) <i>Phytomonas serpens</i>	9
1.4) Peptidases	12
1.5) Peptidases em tripanossomatídeos	15
1.6) Peptidases em <i>P. serpens</i>	20
<b>2) Objetivos</b>	<b>22-24</b>
<b>3) Material e Métodos</b>	<b>25-38</b>
3.1) Microrganismos	26
3.2) Manutenção e inoculo dos parasitos	26
3.3) Cultivo dos parasitos	26
3.4) Contagem do número de células e avaliação da viabilidade celular	26
3.5) Manutenção de <i>Oncopeltus fasciatus</i>	27
3.6) Obtenção dos extratos celulares totais	27
3.7) Partição de proteínas de membrana com Triton X-114	27
3.8) Quantificação química de proteínas	28
3.9) Análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE	28
3.10) Análise do perfil de peptidases celulares	28
3.11) Efeito do pH e de moduladores na atividade catalítica	29
3.12) Capacidade hidrolítica das peptidases de <i>P. serpens</i>	29
3.13) Degradação de proteínas de superfície da glândula salivar de <i>O. fasciatus</i> por <i>P. serpens</i>	30
3.14) Dosagem enzimática: degradação de substrato específico para cisteína peptidases	30
3.15) Teste de aglutinação	31
3.16) Western blotting	31
3.17) Citometria de fluxo e microscopia de fluorescência	32
3.18) Imunocitoquímica	32

3.19) ELISA	33
3.20) Detecção de âncora de GPI: tratamento com PLC e tripsina	33
3.21) Modulação da expressão de moléculas similares à cruzipaína por diferentes substratos protéicos	34
3.22) Obtenção do sobrenadante de cultivo	35
3.23) Dosagem química da atividade proteolítica secretória	35
3.24) Secreção de polipeptídeos por <i>P. serpens</i> em meio mínimo	36
3.25) Degradação de diferentes substratos protéicos	36
3.26) Obtenção do extrato filtrado de tomate	37
3.27) Análise do perfil de proteínas e peptidases celulares	37
3.28) Infecção <i>in vitro</i> de tomates ( <i>S. lycopersicum</i> )	37
3.29) Detecção de moléculas similares à cruzipaína	38
3.30) Identificação de receptor para <i>P. serpens</i> em <i>S. lycopersicum</i>	38
<b>4) Resultados</b>	<b>39-69</b>
<b>5) Discussão</b>	<b>70-80</b>
<b>6) Conclusões</b>	<b>81-83</b>
<b>7) Referências bibliográficas</b>	<b>84-99</b>
<b>8) Anexos</b>	<b>100-101</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

BHI	- infusão de cérebro e coração
BSA	- soro albumina bovina
DNA	- ácido desoxirribonucléico
DTT	- ditioneitol
E.C.	- “enzyme commission” - comissão de enzimas
E-64	- L- <i>trans</i> -epoxisuccinil leucilamido-(4-guanidino) butano
EDTA	- ácido etileno-diamino tetracético
EGTA	- etileno glycol-bis ( $\beta$ -aminoetil éter)
EL	- extrato de levedura
ELISA	- ensaio imunoenzimático adsorvente
FITC	- isotiocianato de fluoresceína
GPI	- glicosilfosfatidilinositol
Hg	- hemoglobina
HSA	- soro albumina humana
IgG	- imunoglobulina G
kDa	- kilodalton
LIT	- infusão de fígado e tripticase
mA	- mili ampere
nm	- nanômetro
OPD	- orto-fenilenodiamina
PBS	- tampão fosfato salina
pH	- potencial hidrogeniônico
PLC	- fosfolipase C
PMSF	- fluoreto de fenilmetanosulfonil
SDS	- dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SFB	- soro fetal bovino
sp.	- espécie
TBS	- tampão Tris-salina
TLCK	- N $\alpha$ -Tosil-Lis-clorometilcetona
V	- volt

# Introdução

# 1) INTRODUÇÃO

## 1.1) Família Trypanosomatidae

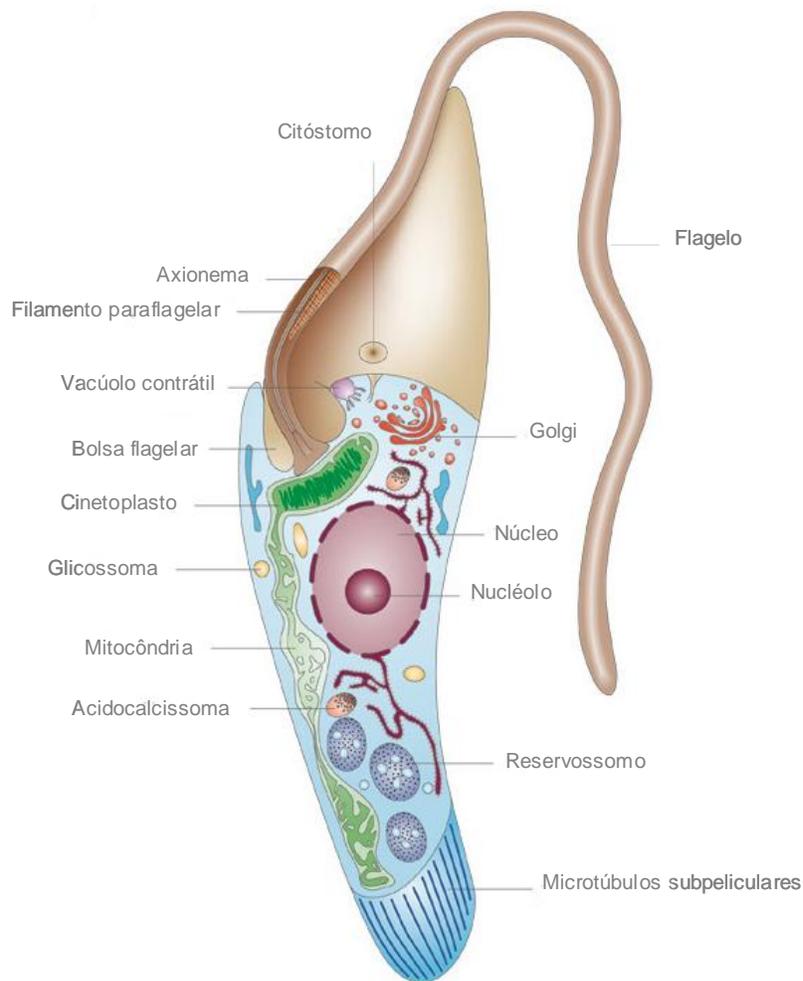
A família Trypanosomatidae, classificada na ordem Kinetoplastida, compreende um grande número de parasitos monoflagelados eucariotos. Os diferentes gêneros de tripanossomatídeos compartilham características singulares, como a presença de mitocôndria única e ramificada que percorre todo o corpo celular. Esta organela apresenta uma porção especializada, localizada dentro da matriz mitocondrial, perpendicular ao eixo do flagelo, rica em ácido desoxirribonucléico (20-30% do DNA total), identificada como cinetoplasto. O DNA desta estrutura é denominado k-DNA e se organiza em redes de cadeias circulares, concatenadas e compactadas. Em muitos tripanossomatídeos, a posição relativa do cinetoplasto em relação ao núcleo varia de acordo com o ciclo celular (MASLOV & SIMPSON, 1995, DE SOUZA, 2008).

A presença do glicosomo, organela relacionada com os peroxissomos de eucariotos superiores, também representa característica peculiar desse grupo; esta organela confina a via glicolítica, o que torna a transformação de glucose em piruvato mais eficiente em tripanossomatídeos que em outros organismos eucariotos (revisto por VICKERMAN, 1994). O glicosomo coopera com a mitocôndria no metabolismo energético, mas possui também outras funções relacionadas à fixação de dióxido de carbono, biossíntese de pirimidinas, recuperação de purinas, síntese de éter-lipídios e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (revisto por MICHELS, HANNAERT & BRINGAUD, 2000). O glicosomo não possui um genoma próprio; logo, todas as proteínas encontradas nesta organela são codificadas por genes nucleares, traduzidas em ribossomos no citoplasma e importadas para o interior da organela (SHIH *et al.*, 1998, DE SOUZA, 2008). Outra organela característica é o acidocalcissomo, estrutura ácida responsável pelo armazenamento de íons cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ). Esta organela, que se caracteriza por sua elétrion-densidade ao microscópio eletrônico de transmissão, também é capaz de armazenar fósforo (P), magnésio ( $\text{Mg}^{+2}$ ), sódio ( $\text{Na}^{+}$ ), potássio ( $\text{K}^{+}$ ) e zinco ( $\text{Zn}^{+2}$ ). Em alguns tripanossomatídeos, como algumas espécies de *Phytomonas*, também foi possível a identificação de ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) (MIRANDA *et al.*, 2004). Além disso, possui várias proteínas trocadoras em sua membrana, o que ressalta sua importância na homeostase do pH intracelular e osmorregulação, função que executa em associação com o vacúolo contrátil. Os acidocalcissomos também são responsáveis pelo armazenamento intracelular de energia e diversos íons, principalmente pirofosfato inorgânico e polifosfato,

componentes envolvidos em diversos processos bioquímicos essenciais (revisto por DOCAMPO *et al.*, 2005).

Como típicas células eucarióticas, os tripanossomatídeos apresentam também citoesqueleto, estrutura formada por uma camada de microtúbulos subpeliculares, associados entre si e à membrana plasmática, garantindo a sustentação da célula (revisto por GULL, 1999). O citoesqueleto representa uma barreira importante ao transporte celular; logo, as funções endocíticas e exocíticas, responsáveis por tal transporte, limitam-se a outras regiões onde os microtúbulos não estão presentes. A região da bolsa flagelar é desprovida destes microtúbulos, representando portanto o único sítio para endocitose/exocitose de macromoléculas na maioria destes parasitos (VICKERMAN & PRESTON, 1976; DE SOUZA, 1984; VICKERMAN, 1994). No entanto, existe uma estrutura presente em alguns membros do gênero *Trypanosoma*, denominada citóstomo, responsável por processos de endocitose/exocitose. O citóstomo se apresenta como uma invaginação digitiforme da membrana plasmática, que pode atingir até a região do núcleo celular. Em epimastigotas de *T. cruzi*, cerca de 85% da atividade endocítica ocorre através desta estrutura (DE SOUZA, 2008).

O flagelo dos tripanossomatídeos é uma estrutura especializada, responsável pela motilidade celular e está envolvido com outros processos biológicos importantes, como reconhecimento celular e adesão (ROCHA *et al.*, 2006). Além de componentes característicos da estrutura de um flagelo, os tripanossomatídeos apresentam também o corpo paraxial, um corpo fibroso formado por filamentos proteicos discretos diretamente ligados ao axonema, porção estreitamente relacionada com a motilidade celular. O corpo paraxial se encontra extremamente reduzido em espécies de tripanossomatídeos que apresentam endossimbiontes (GADELHA *et al.*, 2005). O flagelo emerge da bolsa flagelar e se encontra ancorado à célula pelos corpos basais, os quais estão associados à mitocôndria. A bolsa flagelar é uma invaginação profunda da membrana plasmática localizada na base do flagelo. Esta representa entre 0,4 e 3% da área da superfície celular e especializa-se em endocitose, secreção de proteínas e adição de proteínas integrais à membrana plasmática da célula (revisto por LANDFEAR & IGNATUSHCHENKO, 2001). A arquitetura celular de um tripanossomatídeo pode ser observada no esquema representativo da Figura 1.

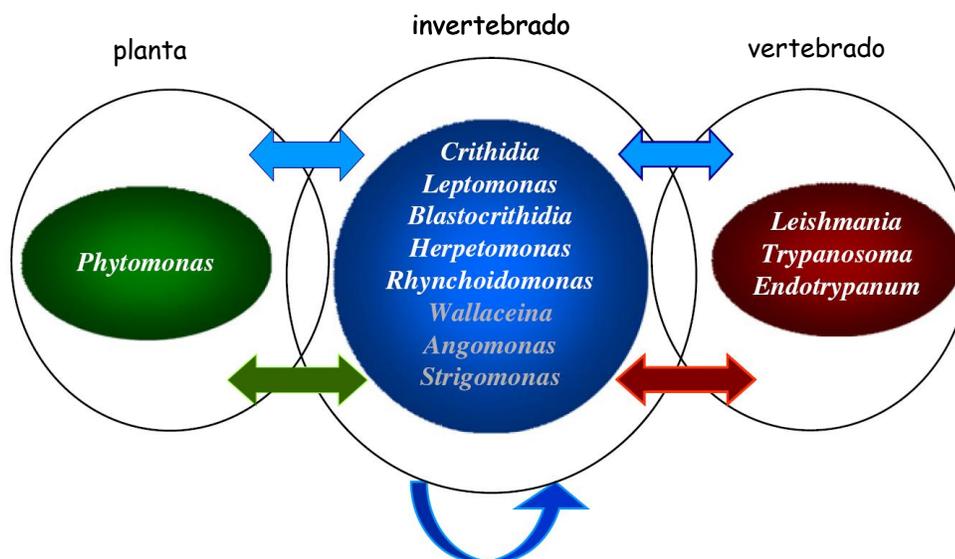


**Figura 1:** Representação esquemática da morfologia dos tripanossomatídeos (adaptado de DOCAMPO *et al.*, 2005).

Os tripanossomatídeos são capazes de infectar um grande número de organismos eucarióticos, tais como aracnídeos, insetos, peixes, répteis, anfíbios, mamíferos, plantas e outros protistas (WALLACE, 1966; MCGHEE & COSGROVE, 1980, VICKERMAN, 1994). Alguns destes flagelados são agentes causais de doenças importantes, como leishmanioses, tripanossomíases humanas e de gado; outros são patogênicos para vegetais, revelando grande importância médica e econômica (VICKERMAN, 1994). Além disso, estes microrganismos têm sido amplamente utilizados como modelos biológicos em diversas áreas da ciência; como por exemplo, em estudos de variação antigênica e processamento de RNA. Alguns trabalhos têm descrito casos de parasitoses oportunistas causadas por tripanossomatídeos classicamente não-patogênicos em indivíduos imunocomprometidos (DEDET *et al.*, 1995; MCBRIDE *et al.*, 1995; MILLER, 2000; REVISTO POR CHICHARRO & ALVAR, 2003). As similaridades entre os gêneros patogênicos e não-patogênicos que compõem esta família também têm sido descritas, enfatizando os parasitos

usualmente não-patogênicos como importantes modelos para estudos bioquímicos, imunológicos e moleculares dentro da família Trypanosomatidae (TEIXEIRA *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2000; DUTRA *et al.*, 2001; BREGANÓ *et al.*, 2003; NOGUEIRA DE MELO *et al.*, 2006; D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006a; revisto por SANTOS *et al.*, 2006).

Atualmente os tripanossomatídeos estão divididos em nove gêneros (*Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Rhynchoidomonas* e *Phytomonas*), com base em características morfológicas e especificidade de hospedeiro (Fig. 2). No entanto, estudos recentes sugerem a formação de três novos gêneros (*Wallaceina*, *Strigomonas* e *Angomonas*) (SOUSA & CÔRTE-REAL, 1991; PODLIPAEV & ROKITSKAYA, 1999; BRANDÃO *et al.*, 2000; D'AVILA-LEVY *et al.*, 2004), o que enfatiza e reforça a necessidade de uma revisão taxonômica deste grupo de microrganismos (Fig. 2).

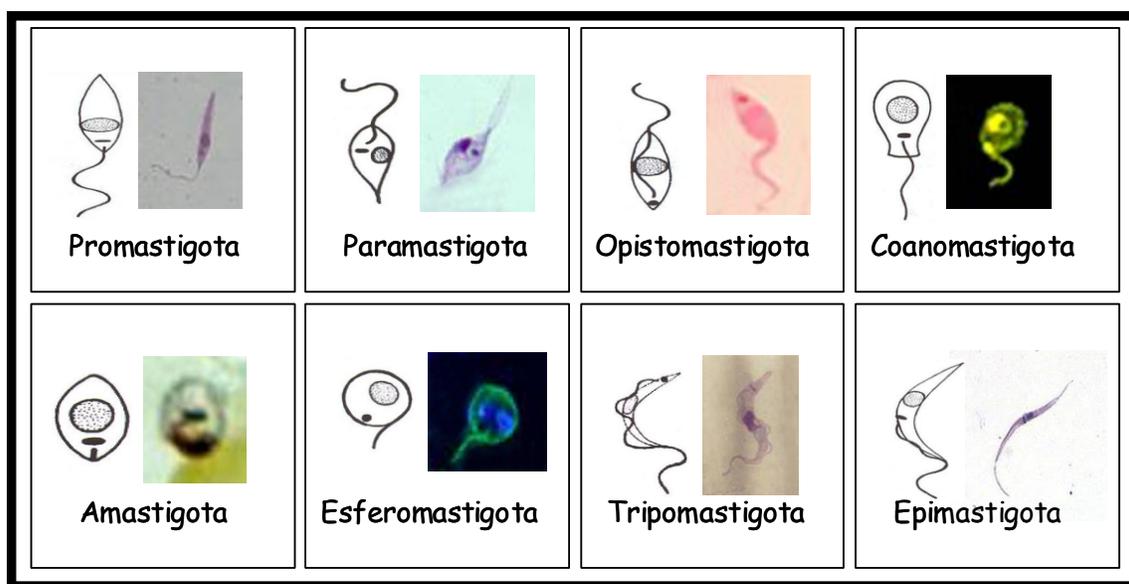


**Figura 2:** Relação espécie-hospedeiro dos tripanossomatídeos. Tripanossomatídeos heteroxênicos alternam entre hospedeiros invertebrados e vertebrados (seta vermelha) ou plantas (seta verde). O ciclo de vida dos parasitos monoxênicos ocorre exclusivamente em um hospedeiro invertebrado (seta azul escura), embora tripanossomatídeos de insetos já tenham sido isolados de plantas e vertebrados (setas azuis claras). Os parasitos com nome em destaque (cinza) representam os novos gêneros (adaptado de SANTOS *et al.*, 2007).

Tripanossomatídeos que parasitam somente insetos durante seu ciclo de vida são muito comuns e distribuídos mundialmente; estes são classificados como monoxênicos (Fig. 2). Já os tripanossomatídeos que possuem hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados podem ser classificados como heteroxênicos; estes são representados por três gêneros distintos. Ainda no

grupo dos parasitos heteroxênicos se classificam os flagelados capazes de infectar um hospedeiro invertebrado e uma planta (VICKERMAN, 1994) (Fig. 2).

Nos tripanossomatídeos, a reprodução é assexuada e ocorre por divisão binária (MCGHEE & COSGROVE, 1980), embora existam relatos sugerindo troca de material genético em algumas espécies (VICKERMAN, 1990; SOUSA *et al.*, 1997; SANTOS *et al.*, 2000a). Durante o ciclo de vida, devido a mudanças ambientais, os tripanossomatídeos podem sofrer alterações morfo-fisiológicas, apresentando-se em diferentes formas evolutivas (Fig. 3). Estas são caracterizadas pela morfologia do corpo celular, presença ou ausência de flagelo extracelular, local de emersão do flagelo e posição do complexo flagelo-bolsa flagelar-cinetoplasto em relação ao núcleo (HOARE & WALLACE, 1966; WALLACE, 1977; VICKERMAN, 1990, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1997). Estas mudanças morfo-fisiológicas, que caracterizam as distintas formas evolutivas dos tripanossomatídeos, são comumente acompanhadas por uma expressão diferenciada de moléculas. Deste modo, esta transformação é muito importante para tais parasitos, uma vez que alguns possuem em seus ciclos de vida mudanças entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado ou uma planta, fazendo-se necessária a adaptação do flagelado em todos os ambientes.



**Figura 3:** Formas evolutivas dos tripanossomatídeos (adaptado de SOUSA, 2000).

## 1.2) Tripanossomatídeos de plantas

A descoberta de protozoários da família Trypanosomatidae parasitando vegetais ocorreu em 1909, quando o pesquisador Alexandre Lafont direcionou seus estudos para o látex de plantas laticíferas, amplamente empregadas na medicina popular, como as euforbiáceas, particularmente

a *Euphorbia pilulifera*. Ao estudar o látex de várias euforbiáceas, Lafont e seu técnico, Sr. David, encontraram um protozoário alongado, com único flagelo, núcleo e cinetoplasto típico; este parasito foi identificado como *Leptomonas davidi* (LAFONT, 1909). Ainda em 1909, Donovan confirmou a presença de flagelados em *E. pilulifera* e sugeriu o nome *Phytomonas* para designar os tripanossomatídeos isolados de plantas (DONOVAN, 1909). Durante os 18 anos seguintes a denominação *Phytomonas* foi ignorada por inúmeros cientistas, que por sua vez alocavam erroneamente os parasitos de plantas nos gêneros *Herpetomonas* e *Leptomonas*. Somente em 1927 (ARAGÃO, 1927) este nome foi oficialmente atribuído a um parasito flagelado associado à planta - *Phytomonas françai*. Curiosamente, esta nomenclatura foi atribuída ao parasito em homenagem a Carlos França, um pesquisador fervorosamente contrário à criação do gênero *Phytomonas* (revisto por CAMARGO, 1999).

GEROLD STAHEL (1931), um médico holandês, descreveu a presença de um parasito flagelado em vasos condutores de seiva do café; este foi o primeiro registro de um tripanossomatídeo infectando plantas não-laticíferas, embora o autor não o tenha considerado um agente patogênico (STAHEL, 1931). No entanto, alguns estudos demonstraram que a presença dos parasitos era capaz de provocar a necrose do floema do café (Fig. 4), uma vez que ocorriam deposições de calos (calose) nos vasos condutores de seiva elaborada e redução das reservas de amido. A parasitose é fatal e, quando se apresenta na fase aguda, pode levar a planta à morte em três meses (revisto por DOLLET, 1984).



**Figura 4:** Exemplo ilustrativo de necrose do café. (Fonte: <http://www2.hawaii.edu/~coffee/>).

GIBBS (1957) descreveu na África um tripanossomatídeo capaz de parasitar exclusivamente o tomate, identificado inicialmente como *Leptomonas serpens*. Apenas a partir de 1976, os tripanossomatídeos associados a plantas começaram a ser descritos como agentes etiológicos de doenças vegetais. PARTHASARATHY e colaboradores descreveram no Suriname organismos

flagelados capazes de causar doença fatal em coqueiros (*Cocos nucifera*) (PARTHASARATHY, 1976). Nos anos seguintes, tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas* também foram encontrados associados a síndromes em coqueiros no Equador (DOLLET *et al.*, 1979), Colômbia (MARTINEZ LOPEZ *et al.*, 1980), Brasil (BEZERRA & DE FIGUEREDO, 1982) e Costa Rica (MCCOY *et al.*, 1984). Estes parasitos também estão estreitamente relacionados a uma doença do dendê (*Elaeis guineensis*), denominada “marchitez” ou “morte supressiva”, descoberta inicialmente em 1963 (LOPEZ *et al.*, 1975) (Fig. 5). Essa patogenia existe em todo o norte da América Latina, onde causa grandes prejuízos; as perdas nas plantações comerciais podem comprometer até 20% das suas produções anuais (DOLLET, 1984). A doença do coqueiro (hartrot) e a marchitez sopressiva são fatais e tiveram seu agente etiológico descrito por MCGHEE em 1979 – *Phytomonas staheli*.



**Figura 5:** Espécies de plantas não laticíferas (A–C) e laticíferas (D) afetadas por parasitos do gênero *Phytomonas*: coqueiro (A), café (B), dendê (C) e mandioca (D).  
(Fonte: <http://images.google.com.br/imghp?hl=pt-BR&tab=wi>)

Quando ARAGÃO (1927) descreveu a presença de *P. françai* em mandioca (Fig. 5), nenhuma sintomatologia foi associada à doença dessa euforbiácea. Porém, em 1979, foram detectadas plantações de mandioca no Brasil que apresentavam clorose das partes aéreas e atrofia das raízes; a doença ficou então conhecida como “chochamento” das raízes (SILVEIRA & PEREIRA, 1983). Mais

tarde, a sintomatologia desta doença foi associada à presença de flagelados no látex das plantas (KITAJIMA, 1986). Todavia, a correlação dos parasitos com a doença descrita em mandiocas ainda não foi comprovada, apenas sugerida.

Os tripanossomatídeos também são capazes de infectar frutos e sementes; duas espécies já foram descritas e identificadas: *P. serpens*, isolada de tomate, (JANKEVICIUS *et al.*, 1989) e *Phytomonas mcgheei*, isolada de milho (JANKEVICIUS *et al.*, 1993). Na verdade, flagelados podem ser detectados em mais de 33 espécies de frutos, encontrados na África, Europa e Brasil; porém, tais parasitos ainda precisam de caracterização e identificação bioquímica e molecular mais apuradas. Além disso, existem outros gêneros de tripanossomatídeos que também podem ser encontrados em frutos (revisto por CAMARGO, 1999).

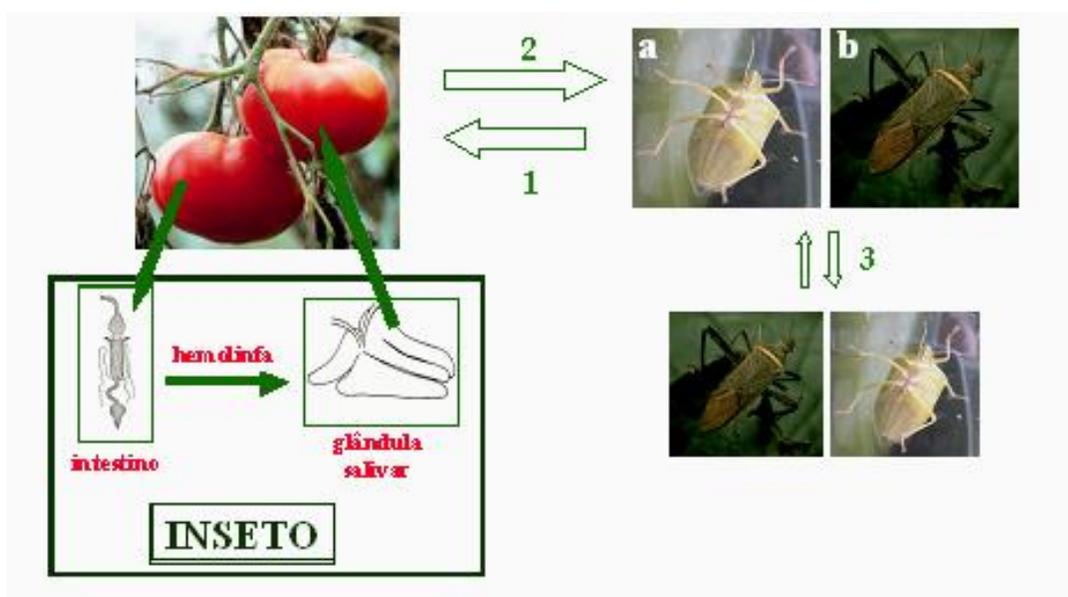
Os tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas* também são capazes de parasitar plantas sem causar patogenicidade aparente (CUNHA *et al.*, 2000). Além disso, constituem excelentes modelos biológicos, uma vez que os parasitos enfrentam condições completamente adversas durante as etapas dos seus ciclos de vida, tendo em vista que encontram hospedeiros tão distintos: plantas (frutos, látex, vasos condutores de seiva) e insetos (intestino, hemolinfa e glândulas salivares) (revisto por CAMARGO, 1999). A maioria dos estudos envolvendo tais tripanossomatídeos enfoca suas características morfológicas, bioquímicas e moleculares, embora diversos aspectos desses estudos ainda permaneçam pouco explorados.

### 1.3) *Phytomonas serpens*

GIBBS (1957) descreveu no sul da África um tripanossomatídeo parasita exclusivo de tomate (*Lycopersicum sculentum*), denominando-o *Leptomonas serpens*. Este foi posteriormente reclassificado como *P. serpens* por PODLIPAEV (1986). JANKEVICIUS (1989) observou que duas espécies de hemípteros fitófagos (*Phthia picta* e *Nezara viridula*), que se alimentam em plantas, também se alimentavam em tomates, nos quais havia sido detectada a presença de tripanossomatídeos da espécie *P. serpens*. Os parasitos flagelados foram isolados tanto do tomate maduro quanto do trato digestivo e das glândulas salivares das duas espécies de insetos citadas anteriormente, permitindo identificá-los como vetores naturais para *P. serpens*.

Nos insetos, os parasitos do gênero *Phytomonas* ingeridos colonizam inicialmente sítios intestinais, local onde ocorre a multiplicação. Em seguida, esta cessa e os parasitos aumentam em diâmetro e comprimento. Cerca de doze dias depois da ingestão, os flagelados já podem ser encontrados na face externa das glândulas salivares, sítio alcançado através da hemolinfa. A

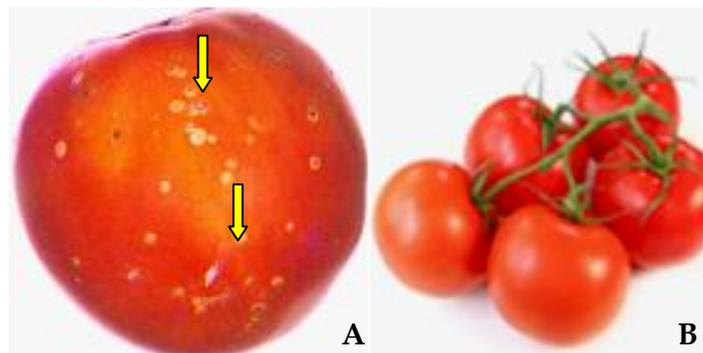
proliferação volta a acontecer somente nas glândulas salivares, onde são produzidos parasitos menores capazes de provocar infecção (MCGHEE & HANSON, 1964). A transmissão ocorre quando os insetos com as glândulas salivares infectadas se alimentam do vegetal: antes ou durante a sucção de fluidos da planta, o inseto injeta a saliva contendo os flagelados (JANKEVICIUS *et al.*, 1989, 1992; CAMARGO & WALLACE, 1994). Outros insetos se infectam durante a alimentação em plantas que contêm parasitos (Figura 6). Os parasitos do gênero *Phytomonas* adotaram uma estratégia de parasitismo através da qual ocupam compartimentos da planta que oferecem condições favoráveis para a sobrevivência, como os frutos, vasos condutores de seiva elaborada e vasos laticíferos (JANKEVICIUS *et al.*, 1988).



**Figura 6:** Ciclo biológico de *P. serpens*. Nos insetos, os tripanossomatídeos colonizam sítios intestinais, onde ocorre passagem para a hemolinfa, veículo de acesso até a face externa das glândulas salivares (setas verdes escuras). Quando os insetos *Nezara viridula* (a) e *Phthia picta* (b) se alimentam de frutos, ocorre transmissão do flagelado (1). Da mesma maneira, tais insetos podem ser infectados pelos flagelados ao se alimentarem de frutos infectados (2). A transmissão também pode ocorrer de inseto para inseto (3). (Fonte: <http://images.google.com.br/imghp?hl=pt-BR&tab=wi>).

Embora *P. serpens* não seja considerado um parasito classicamente patogênico, um tomate maduro infectado por este tripanossomatídeo exibe manchas circulares e amareladas na superfície (Figura 7a), além de apresentar queda na qualidade do seu conteúdo, possivelmente por ação do metabolismo energético dos parasitos. Esses danos, característicos de processos patogênicos para o vegetal, tornam o fruto menos atrativo para o consumidor. Tomates ainda

verdes, folhas, flores e caule não são infectados, restringindo os danos aos frutos maduros (FIORINI *et al.*, 1993).

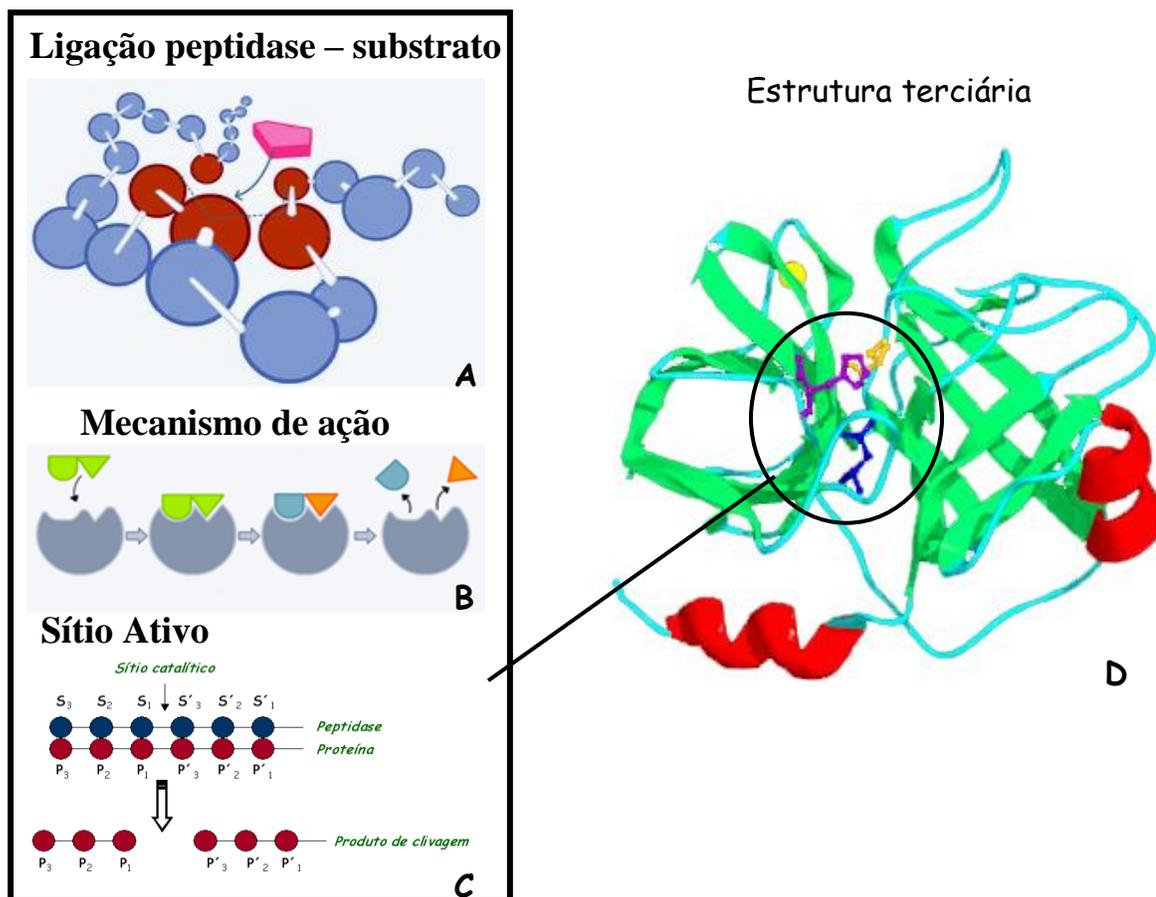


**Figura 7:** Tomate infectado (a) e não infectado (b) por *P. serpens*. As setas indicam os danos provocados no fruto por consequência do metabolismo celular dos flagelados. (Fonte: <http://images.inimagine.com/img/foodcollection>)

Além dos fatores já discutidos acima, *P. serpens* representa uma ferramenta importante para estudos bioquímicos e moleculares (CARVALHO *et al.*, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 1995; VERMELHO *et al.*, 2003; PAPPAS *et al.*, 2005) e se apresenta como excelente modelo biológico de estudo por expressar moléculas similares às descritas em tripanossomatídeos patogênicos para humanos. BREGANÓ e colaboradores (2003) demonstraram que *P. serpens* apresenta antígenos semelhantes aos do *Trypanosoma cruzi*, que foram fortemente reconhecidos pelo soro de pacientes com doença de Chagas. Paralelamente, foi demonstrado que esses parasitos de plantas são capazes de induzir imunidade protetora em camundongos BALB/c. *P. serpens* também expressa polipeptídeos semelhantes à gp63 (leishmanolisina) (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006b; SANTOS *et al.*, 2006), principal metalopeptidase de superfície de *Leishmania* spp. (revisito por Yao *et al.*, 2002). Embora nenhuma atividade de metalopeptidase associada à célula tenha sido detectada em *P. serpens*, estes parasitos apresentam polipeptídeos de 63–52 kDa reconhecidos por anticorpo contra a leishmanolisina de *L. amazonensis* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006b). Assim como nos flagelados do gênero *Leishmania*, a localização dessa molécula está majoritariamente direcionada à membrana plasmática (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006b; SANTOS *et al.*, 2006). Os tripanossomatídeos do gênero *Phytomonas* também podem ser de grande valor no estudo dos eventos envolvidos em processos de interação de parasitos flagelados com insetos vetores.

## 1.4) Peptidases

As proteases, peptidases ou peptido-hidrolases (E.C. 3.4) são enzimas hidrolíticas capazes de clivar ligações peptídicas em proteínas ou fragmentos protéicos (BARRETT, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001) (Fig. 8). Estas podem ser encontradas em vários organismos, desde vírus até humanos, catalisando um amplo espectro de reações biológicas importantes (MCKERROW, 1989).



**Figura 8:** (A) Esquema geral da ligação do substrato (rosa) ao sítio ativo de uma peptidase (vermelho). (B) Mecanismo de ação de uma peptidase (cinza) após ligação do substrato (verde) e conseqüente formação do produto (azul, laranja). (C) Ligação dos aminoácidos do sítio ativo da peptidase ( $S'_1$ - $S_3$ ) aos aminoácidos específicos do substrato ( $P'_1$ - $P_3$ ). (D) Exemplo ilustrativo da estrutura terciária de uma enzima, com sítio ativo evidenciado. Fontes: Adaptado de BOND & BUTLER (1987) e MEROPS database (<http://www.merops.sanger.ac.uk>).

Atualmente três critérios são utilizados para a classificação dessas enzimas (BARRETT, 1994, 1995; RAO *et al.*, 1998; BARRETT *et al.*, 2001, 2003, RAWLINGS *et al.*, 2004a), conforme sumarizado a seguir:



As serina peptidases são caracterizadas pela presença de um grupamento serina no seu sítio ativo, do qual a hidroxila se responsabiliza pela ligação e catálise do substrato. Estas enzimas podem ser do tipo endo ou exopeptidases e são encontradas em diversos sistemas biológicos, como vírus, bactérias e eucariotos, sugerindo importância vital para estes organismos (BARRETT, 1994). As enzimas pertencentes à subclasse das aspártico peptidases são comumente conhecidas como peptidases ácidas; estas são endopeptidases que dependem de resíduos de ácido aspártico para estabelecer atividade catalítica (SIELECKI *et al.*, 1991). As cisteína peptidases ocorrem em procariotos e eucariotos e sua atividade depende de uma díade catalítica representada por uma cisteína e uma histidina. O grupamento tiol do aminoácido cisteína está presente no sítio ativo da enzima, sendo responsável por ligação e catálise do substrato específico (BARRETT, 1994). As metalopeptidases representam o grupo mais diverso entre as peptidases catalíticas (BARRETT, 1995); exigem presença de um metal divalente, comumente o zinco, para que estabeleçam atividade catalítica. Estas incluem enzimas de uma grande variedade de organismos, desde organismos superiores (colagenase de mamíferos) a bactérias (toxinas hemorrágicas) (HIBBS *et al.*, 1985).

### **c) As relações evolutivas relacionadas com aspectos estruturais**

A seqüência de aminoácidos das peptidases permite analisar as relações evolutivas existente entre estas; a identificação de similaridades estruturais reflete importantes correlações entre mecanismos catalíticos e outras propriedades (BARRETT, 1994). Através dessas análises comparativas, é possível determinar similaridades funcionais e estruturais entre peptidases desconhecidas e outras bem caracterizadas, como tripsina, pepsina, dentre outras.

Atualmente, o sistema MEROPS (<http://www.merops.sanger.ac.uk>) é sugerido para classificação das peptidases. Este sistema indica a classificação de determinada enzima proteolítica com base na sua estrutura e perfil de inibição. De acordo com este novo modelo, as peptidases são agrupadas em famílias com base na homologia da seqüência de aminoácidos. Famílias que apresentam origens evolucionárias similares são organizadas em clãs, classificação realizada de acordo com a estrutura terciária das enzimas que compõem tais famílias (RAWLINGS & BARRETT 2000; BARRETT *et al.*, 2001, RAWLINGS *et al.*, 2002, 2004a, 2004b). Para que determinada peptidase seja alocada em uma família, esta deve apresentar similaridade com a seqüência de aminoácidos da unidade de peptidase (parte da enzima responsável pela atividade de hidrolase)

da enzima representativa daquela família. As famílias são representadas por uma letra, que indica o tipo de mecanismo catalítico, e um número, adicionado seqüencialmente. O agrupamento das famílias em clãs reflete similaridades na estrutura secundária, terciária e na seqüência de aminoácidos catalíticos. O clã é representado por duas letras: a primeira indica o tipo de mecanismo catalítico e a segunda é adicionada seqüencialmente. As letras usadas são A' (aspártico), 'C' (cisteína), 'M' (metalo), 'S' (serina), 'T' (treonina) ou 'U' (tipo desconhecido) (BARRETT, RAWLINGS & O'BRIEN, 2001).

## 1.5) Peptidases em tripanossomatídeos

Os estudos de peptidases produzidas por tripanosomas e leishmanias, assim como em outros protozoários da família Trypanosomatidae, têm recebido atenção especial nos últimos anos, uma vez que estas enzimas são relevantes em diversos aspectos da relação parasito-hospedeiro e têm papel essencial na nutrição destes parasitos (revisto por MCKERROW *et al.*, 1993; CAZZULO *et al.*, 1997; SAJID & MCKERROW, 2002). Em relação aos tripanossomatídeos, as peptidases mais comumente encontradas e que receberam maior atenção estão relacionadas às classes das metalo- e cisteína peptidases, assunto que será explorado nos subitens seguintes (MCKERROW *et al.*, 1993; BRANQUINHA *et al.*, 1996; CAZZULO *et al.*, 1997; YAO *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2005; revisado por SANTOS *et al.*, 2006).

As peptidases dos parasitos são de considerável interesse para pesquisa porque podem proporcionar informações sobre a bioquímica e biologia destes, assim como esclarecer alguns aspectos da interação parasito-hospedeiro e da patogenicidade de inúmeros organismos. Desta forma, essas enzimas podem ser alvos potenciais para desenvolvimento de agentes quimioterápicos, podem ser utilizadas na produção de vacinas, bem como na produção de reagentes diagnósticos e em processos industriais (revisto por MCKERROW, 1999).

### 1.5.1) Metalopeptidases

As metalopeptidases são enzimas amplamente detectadas em diferentes espécies de tripanossomatídeos (BRANQUINHA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.* 2006, 2007). A peptidase pertencente a essa classe melhor caracterizada na família Trypanosomatidae é uma glicoproteína de 60-65 kDa expressa pelas formas promastigotas das espécies de *Leishmania*, denominada gp63, leishmanolisina, PSP (proteína de superfície de promastigosta) ou MSP (principal peptidase de superfície) (ETGES, BOUVIER & BORDIER, 1987). Essa glicoproteína também pode ser encontrada

nas formas amastigotas, porém em níveis reduzidos de expressão (MEDINA-ACOSTA *et al.*, 1993). A gp63 é ancorada à membrana plasmática via glicosilfosfatidilinositol (GPI) e pode mediar a ligação das formas promastigotas de *Leishmania* à superfície do macrófago presente no hospedeiro mamífero (CHANG & CHANG, 1986; RUSSEL, 1987), sendo então essencial para o ciclo de vida do parasito, assim como para a sua patogenicidade. Receptores celulares como MAC-1 e receptor para fibronectina são reconhecidos pela molécula de gp63 e são importantes para a ligação parasito-macrófago (revisto por MAUEL, 1996). Outras funções são atribuídas à gp63, tais como: inativação de moléculas do sistema complemento do hospedeiro (JOSHI *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2000), aumento da internalização da *Leishmania* por macrófagos (BRITTINGHAM *et al.*, 1999), proteção contra degradação intracelular no fagolisossoma (revisto por MAUEL, 1996) e clivagem do fibrinogênio (MCGWIRE *et al.*, 2003). A capacidade de hidrolisar proteínas de matriz extracelular é importante, pois indica que a atividade proteolítica atribuída à gp63 está diretamente ligada à invasão e disseminação do parasito no hospedeiro vertebrado (MCGWIRE *et al.*, 2003). Embora a gp63 seja uma molécula bem caracterizada, seu papel no ciclo de vida do parasito durante a colonização do inseto hospedeiro permanece indeterminado. JOSHI e colaboradores (2002) descreveram que a ausência da gp63 (cepa nocaute para os genes da *gp63*) em *L. major* não era capaz de impedir a colonização do intestino do hospedeiro invertebrado (*Phlebotomus dubosqui*) por formas promastigotas do parasito. Por outro lado, HAJMOVÁ e colaboradores (2004) descreveram a importância da molécula gp63 para os estágios iniciais da colonização do inseto vetor (*Lutzomyia longipalpis*) por *L. amazonensis*. Desta maneira, a molécula de gp63 pode apresentar diferentes funções para as duas espécies de *Leishmania* em questão, nas suas relações com os respectivos hospedeiros invertebrados.

O primeiro estudo referente à identificação de moléculas similares à gp63 em tripanossomatídeos inferiores foi realizado por ETGES em 1992, utilizando-se *Crithidia fasciculata* e *Herpetomonas samuelpessoai*. A presença destas metalopeptidases conservadas indica possível função também para a sobrevivência destes parasitos no trato digestivo dos seus insetos vetores. Entre a molécula de gp63 encontrada em *H. samuelpessoai* e a gp63 de *Leishmania* existem diversas similaridades descritas, tais como presença da âncora de GPI, sensibilidade ao inibidor proteolítico 1,10-fenantrolina, localização tanto na superfície celular quanto no conteúdo citoplasmático, dentre outras (SCHNEIDER & GLASER, 1993). Além das similaridades bioquímicas já citadas, as moléculas de gp63 existentes em *Leishmania* e *H. samuelpessoai* também apresentam semelhanças imunológicas, uma vez que o anticorpo policlonal contra a gp63 de *L. amazonensis* é capaz de reconhecer epítomos na molécula gp63-like de *H. samuelpessoai* através de Western

blotting (ELIAS *et al.*, 2006). Ensaios de imunofluorescência e citometria de fluxo corroboram estes dados (ELIAS *et al.*, 2006). Em estudos posteriores, homólogos de leishmanolisina foram descritos em outros tripanossomatídeos inferiores: *Blastocrithidia culicis* (SANTOS *et al.*, 2001, D'AVILA-LEVY *et al.*, 2005), *Crithidia deanei* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2003, 2006a, 2006b), *Crithidia guilhermei* (BRANQUINHA *et al.*, 1996; NOGUEIRA DE MELO *et al.*, 2001; D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006a), *Crithidia lucilae* (BRANQUINHA *et al.*, 1996; JAFFE & DWYER, 2003), *Herpetomonas megaseliae* (NOGUEIRA DE MELO *et al.*, 2006), *Leptomonas seymouri* (JAFFE & DWYER, 2003; SANTOS *et al.*, 2005), *Leptomonas collosoma*, *Leptomonas wallacei*, *Leptomonas samueli* (PEREIRA *et al.*, 2009) *Phytomonas françai* (ALMEIDA *et al.*, 2003; D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006a) e *P. serpens* (VERMELHO *et al.*, 2003; D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006b; SANTOS *et al.*, 2006).

Homólogos da gp63 já foram descritos também em *T. cruzi* (CUEVAS *et al.*, 2003) e *T. brucei* (LACOUNT *et al.*, 2003). No *T. cruzi*, os homólogos da gp63 possivelmente desempenham um papel na interação com a célula hospedeira (CUEVAS *et al.*, 2003). Já no *T. brucei*, o homólogo da gp63 (TbMSP-B) atua em conjunto com uma fosfolipase C específica para GPI (GPI-PLC) de origem endógena para a liberação da glicoproteína variável de superfície (VSG) das formas sanguíneas deste protozoário, o que contribui para sua evasão do sistema imune do hospedeiro (LACOUNT *et al.*, 2003). Os estudos sobre as peptidases sintetizadas por tripanossomatídeos monoxênicos e tripanossomatídeos de plantas são de grande importância, pois revelam similaridades com peptidases de tripanossomatídeos superiores (heteroxênicos), o que pode refletir relações filogenéticas entre os mesmos.

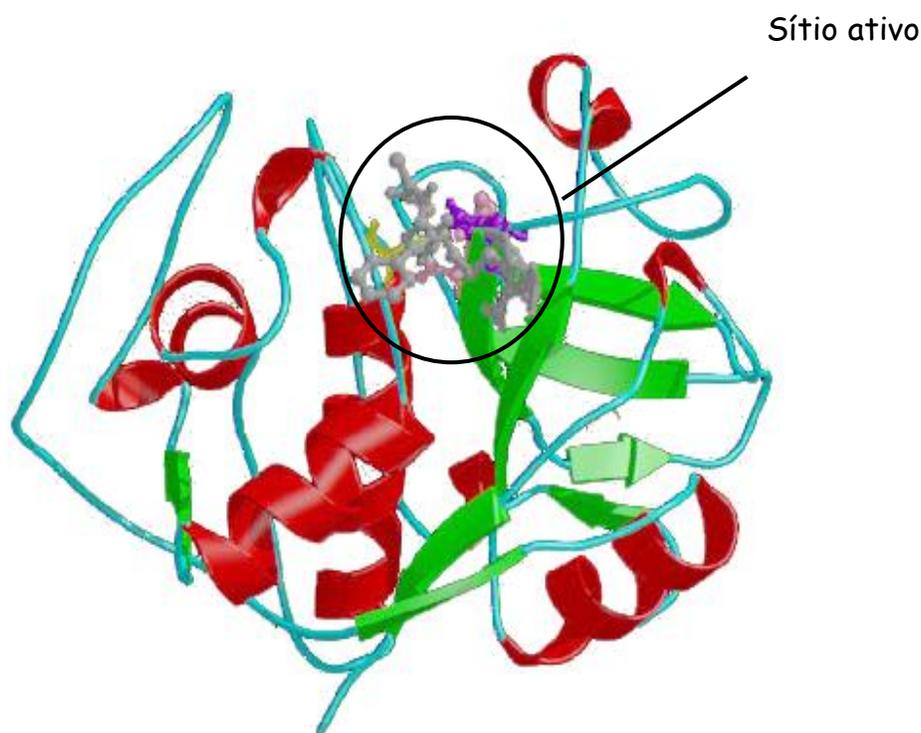
### 1.5.2) Cisteína peptidases

As cisteína peptidases já foram detectadas em muitas espécies da família Trypanosomatidae e representam moléculas importantes para o ciclo de vida dos parasitos desta família, uma vez que estão envolvidas em processos como nutrição (ROSENTHAL, 1999), degradação de proteínas do hospedeiro (revisto por MOTTRAM, COOMBS & ALEXANDER, 2004) e neutralização da resposta imune (ALEXANDER *et al.*, 1998). Em *Leishmania*, as cisteína peptidases são essenciais em etapas do ciclo celular como a diferenciação (promastigota→amastigota) e metaciclogênese (promastigota procíclico→promastigota metacíclico) (BATES, ROBERTSON & COOMBS, 1994; ALFIERI, BALANCO & PRAL, 1995); além disso, representam importante fator de virulência, pois a deleção dos genes que as codificam leva a uma significativa redução na infectividade de camundongos BALB/c (MOTTRAM *et al.*, 1996). Em *T. cruzi*, a principal cisteína

peptidase é denominada cruzipaína (CAZZULO *et al.*, 1990). A principal enzima lisossomal do *T. brucei* também é uma cisteína peptidase (RUSSO *et al.*, 1994), denominada tripanopaína, e está envolvida em diversos processos importantes para o ciclo de vida e patogênese deste parasito, tais como: proteólise catabólica, degradação de anticorpos responsáveis pelo processo de opsonização e degradação de proteínas do hospedeiro (MBAWA *et al.*, 1991, AUTHIÉ *et al.*, 1993, RUSSO *et al.*, 1994). As cisteína peptidases de *Leishmania*, *T. cruzi* e *T. brucei* apresentam similaridades já descritas, sugerindo ancestralidade comum (revisto por CAZZULO *et al.*, 1997).

### 1.5.3) Cruzipaína

A principal cisteína peptidase do *T. cruzi* é uma glicoproteína monomérica de aproximadamente 36,3 kDa pertencente à família das papaínas e denominada *cruzipaína*. Esta enzima também pode ser identificada como gp57/51, uma vez que apresenta em sua composição uma porção glicídica rica em manose (10%). A atividade proteolítica ocorre através da ação de uma tríade catalítica formada por um resíduo de cisteína (147), um de histidina (284) e um de asparagina (304) (Fig. 10) (CAZZULO *et al.*, 1990, CAMPETELLA *et al.*, 1992).



**Figura 10:** Estrutura terciária da cruzipaína. Os resíduos catalíticos estão representados por cisteína em amarelo, histidina em roxo e asparagina em rosa. (Fonte: <http://merops.sanger.ac.uk>)

A cruzipaína é expressa de forma diferencial em todos os estágios do ciclo de vida do parasito: em epimastigotas sua atividade proteolítica pode ser detectada em maior quantidade, até cem vezes mais, quando comparada às outras formas evolutivas (MURTA *et al.*, 1990, CAZZULO *et al.*, 2001). Embora seja encontrada majoritariamente nos reservossomos (estrutura citoplasmática da via endocítica) do *T. cruzi*, esta peptidase pode ser detectada em outros compartimentos intracelulares, como na bolsa flagelar, bem como na membrana plasmática dos parasitos (SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990). Ensaio imunocitoquímico revelam que os estágios celulares também apresentam expressão diferencial da cruzipaína de superfície: esta é detectada em maior quantidade nas formas amastigotas (NASCIMENTO & SOUZA, 1996). FRESNO e colaboradores (1994) descreveram a possível ligação de cisteína peptidases à superfície de *T. cruzi* via âncora de GPI; entre tais cisteína peptidases, a cruzipaína estaria incluída. Poucos anos depois, esta hipótese foi corroborada em ensaios de localização de alta resolução: os sítios antigênicos da cruzipaína não estão associados a partículas intramembranares. Além disso, o tratamento de parasitos com PLC reduz a ligação do anticorpo anti-cruzipaína a moléculas na superfície do *T. cruzi* (NASCIMENTO & SOUZA, 1996). Em adição a sua ampla localização na célula do parasito, moléculas de cruzipaína são também secretadas em uma forma cataliticamente ativa para o meio extracelular (YOKOAMA-YASUNAKA *et al.*, 1994).

Análise do DNA genômico dos tripanossomos revela que a cruzipaína é codificada por genes que podem se localizar em até quatro cromossomos, o que explica a microdiversidade existente entre as isoformas desta enzima (STOKA *et al.*, 1995). Além disso, estas análises também permitiram concluir que sua síntese ocorre na forma inicial de pré-pro-enzima, o que significa que esta sofre processamento pós-traducional até se apresentar como enzima madura (CAMPETELLA *et al.*, 1992), corroborando a diversidade interna desta peptidase.

A cruzipaína é altamente imunogênica, sendo reconhecida por anticorpos presentes em soro de pacientes com doença de Chagas (SCHARFSTEIN *et al.*, 1986). A porção C-terminal desta enzima representa a região mais antigênica, sendo diretamente reconhecida por anticorpos presentes no soro de pacientes ou de camundongos imunizados. Conseqüentemente, uma vez que o sítio catalítico da cruzipaína fica livre da ligação com o anticorpo, os imuno-complexos continuam enzimaticamente ativos (MARTINEZ *et al.*, 1993), o que pode representar uma adaptação evolutiva do *T. cruzi* para proteger sua maquinaria essencial de sobrevivência.

Esta cisteína peptidase desempenha várias funções importantes para o ciclo de vida e patogenicidade do *T. cruzi*, tais como: nutrição do parasito – uma vez que é a principal enzima lisossomal, penetração das formas tripomastigotas nas células hospedeiras, diferenciação celular e

escape do sistema imune. A cruzipaína é capaz de degradar a imunoglobulina G e inativar componentes responsáveis por disparar a cascata do sistema complemento (revisto por CAZZULO *et al.*, 1997). Desta maneira, a cruzipaína apresenta grande relevância biológica para o *T. cruzi*. Além disto, esta enzima parece ser conservada evolutivamente: de maneira semelhante à leishmanolisina, homólogos da cruzipaína também já foram descritos em alguns tripanossomatídeos inferiores, tais como *B. culicis* e *P. serpens* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2006, 2007).

### 1.6) Peptidases em *P. serpens*

Várias enzimas solúveis são secretadas por tripanossomatídeos para o meio extracelular; algumas destas estão diretamente relacionadas à degradação de substratos e conseqüente nutrição dos parasitos (CLAYTON *et al.*, 1995). Em *P. serpens*, a secreção diferencial de moléculas representa uma característica extremamente importante, pois este microrganismo heteroxênico encontra distintos ambientes durante seu ciclo de vida e deve se adaptar a estas condições adversas. VERMELHO e colaboradores (2003) caracterizaram metalopeptidases secretadas por *P. serpens*, com massas moleculares de aproximadamente 70, 90 e 94 kDa, proteoliticamente ativas em pH ácido. Estas são liberadas para o meio extracelular preferencialmente durante a fase estacionária de crescimento e são capazes de clivar ativamente a gelatina, enquanto não hidrolisam soro albumina bovina e hemoglobina (VERMELHO *et al.*, 2003). A função fisiológica desempenhada por tais enzimas ainda não foi amplamente estudada. A propagação dos flagelados de plantas nos insetos hospedeiros exige a utilização de aminoácidos como fonte de energia, uma vez que o ciclo de Krebs está inativo e açúcares não são abundantes em tais insetos (SANCHEZ-MORENO *et al.*, 1992). Deste modo, as metalopeptidases ativamente liberadas pelo parasito podem estar possivelmente relacionadas à degradação de proteínas para obtenção de aminoácidos com fins nutricionais (VERMELHO *et al.*, 2003).

Embora *P. serpens* seja capaz de liberar metalopeptidases para o meio extracelular, nenhuma atividade proteolítica desta classe foi detectada quando extratos celulares foram analisados através de SDS-PAGE contendo gelatina como substrato (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006). Curiosamente, ainda que nenhuma atividade proteolítica associada à célula tenha sido detectada, dois polipeptídeos celulares com massas moleculares de 52 e 63 kDa foram reconhecidos por anticorpos anti-gp63 de *Leishmania*. O anticorpo anti-gp63 também foi capaz de reconhecer um polipeptídeo de 60 kDa associado à membrana de *P. serpens*. Este polipeptídeo

está ligado à superfície do parasito via uma âncora de GPI e pode ser liberado para o meio extracelular (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006). A localização de moléculas gp63-like na superfície de *P. serpens* foi confirmada através de ensaios de aglutinação, citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006, SANTOS *et al.*, 2006, 2007). A importância destas moléculas em processos de interação *P. serpens*-hospedeiro invertebrado tem sido fortemente sugerida. Em ensaios experimentais com *Oncopeltus fasciatus*, um inseto fitófago usado como modelo experimental, observou-se que o bloqueio de tais polipeptídeos reduziu significativamente a capacidade dos parasitos em aderir às glândulas salivares deste inseto (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006).

SANTOS e colaboradores (2006) descreveram a presença de duas cisteína peptidases em promastigotas de *P. serpens*. Estas enzimas apresentam massas moleculares aparentes de 38 e 40 kDa, são ativas em pH ácido e estão localizadas majoritariamente em compartimentos citoplasmáticos. Através de ensaios de citometria de fluxo e imunocitoquímica, a peptidase de 40 kDa também foi identificada na superfície do parasito. A importância biológica destas enzimas foi investigada: inibidores específicos de cisteína peptidases foram capazes de bloquear a proliferação celular de *P. serpens* e induziram alterações morfológicas nas células do parasito, como redução de volume citoplasmático e principalmente “shedding” de fragmentos de membrana celular. Além disso, estes inibidores e anticorpos contra a cruzipaina de *T. cruzi* foram capazes de bloquear, de forma significativa, a adesão de *P. serpens* às glândulas salivares de *O. fasciatus*, sugerindo participação importante desta classe de enzima na interação parasito-hospedeiro invertebrado (SANTOS *et al.*, 2006).

# Objetivos

## 2) OBJETIVOS

### 2.1) Objetivo Geral

Analisar a produção de cisteína peptidases em *P. serpens*, com ênfase na similaridade destas com a cruzipáina expressa por *T. cruzi*.

## 2.2) Objetivos específicos

### **PARTE I: Identificação e caracterização de atividade proteolítica associada às células de *Phytomonas serpens***

- Verificar a influência de diferentes meios de cultura na produção de polipeptídeos e peptidases por células de *P. serpens*;
- Estudar algumas propriedades bioquímicas das cisteína peptidases produzidas por estes parasitos em resposta a condições controladas, tais como: variações de pH, dependência de agentes redutores, sensibilidade a diferentes inibidores proteolíticos e capacidade de hidrolisar diferentes substratos protéicos;
- Avaliar a possível associação das cisteína peptidases de *P. serpens* com a membrana plasmática.

### **PARTE II: Reatividade cruzada entre a cisteína peptidase de *P. serpens* e a cruzipaína de *T. cruzi***

- Estudar os níveis de expressão de homólogos de cruzipaína através de técnicas sorológicas após incubação de *P. serpens* com diferentes substratos protéicos.

### ***PARTE III: Liberação de peptidases por *P. serpens****

- Estudar a possível secreção de cisteína peptidases por *P. serpens*;
- Avaliar a modulação da atividade secretória por diferentes substratos protéicos;
- Investigar a degradação de substratos protéicos pelo sobrenadante de *P. serpens*.
- Investigar a reatividade cruzada das moléculas secretadas com a cruzipaína.

### **PARTE IV: Interação *in vitro* entre *P. serpens* e tomates da espécie *Solanum lycopersicum***

- Avaliar a expressão de proteínas e peptidases sintetizadas por este parasito quando cultivado em extrato natural de tomate, com ênfase na expressão de homólogos de cruzipaína;
- Estudar a expressão de homólogos de cruzipaína após infecção de tomates *in vitro*.

# Material e Métodos

### 3) MATERIAL E MÉTODOS

- *PARTE I: Identificação e caracterização de atividade proteolítica associada às células de P. serpens*

#### 3.1) Microrganismos

No presente trabalho foram utilizados parasitos da espécie *Phytomonas serpens* (isolado 9T, CT-IOC-189), cedidos pela Dr. Maria Auxiliadora de Sousa (Coleção de Tripanossomatídeos, Fundação Oswaldo Cruz - RJ), e parasitos da espécie *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), cedidos pela Profa. Thaís Souto-Padrón (Departamento de Microbiologia Geral - IMPPG - UFRJ).

#### 3.2) Manutenção e inóculo dos parasitos

Parasitos da espécie *P. serpens* foram mantidos através de repiques semanais em meio infusão de cérebro e coração (BHI a 3,5 g/L, caseína a 10 g/L, peptona a 12 g/L, extrato de levedura a 2 g/L, dextrose a 2 g/L e cloreto de sódio a 2 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram crescidas a 26°C por 48 h em tubos contendo 5 mL de meio e estocadas a 4°C. Parasitos da espécie *T. cruzi* foram mantidos em tubos contendo 5 mL de meio LIT (KCl a 0,4 g/L, NaCl a 4 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 8 g/L, glucose a 2 g/L, triptona a 5 g/L, infusão de fígado a 5 g/L e extrato de levedura a 15 g/L) suplementado com 10% SFB e utilizados como controle nos experimentos de similaridade dos peptídeos de *P. serpens* com a cruzipaina.

#### 3.3) Cultivo dos parasitos

Inicialmente, os parasitos da espécie *P. serpens* foram cultivados em quatro diferentes meios: LIT, BHI, extrato de levedura (EL - extrato de levedura a 5 g/L e cloreto de sódio a 5 g/L) e Warren modificado (infusão de cérebro e coração a 37 g/L, ácido fólico a 10 µg/L e hemina a 1 mg/L) por 24 a 96 h a 26°C. Em todos os ensaios seguintes, o meio de cultivo utilizado foi o BHI, como citado no item 3.2.

#### 3.4) Contagem do número de células e avaliação da viabilidade celular

O número de células obtido após cultivo nos diferentes meios foi estimado através de contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer (Neubauer Improved Chamber), para

construção da curva de crescimento. A viabilidade celular dos parasitos foi monitorada, quando necessário, através da visualização de mobilidade (microscopia óptica) e observação da ausência de malato desidrogenase, uma enzima exclusivamente intracelular, no sobrenadante de cultivo (THOMPSON *et al.*, 1998).

### **3.5) Manutenção de *Oncopeltus fasciatus***

Insetos adultos (*Oncopeltus fasciatus*, Hemiptera: Lygaeidae) foram gentilmente cedidos pela Dr. Patrícia Azambuja Penna (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil). Os insetos foram mantidos à temperatura ambiente em potes plásticos e alimentados com sementes de girassol e água destilada (Romeiro *et al.*, 2003). As glândulas salivares foram cuidadosamente dissecadas, lavadas três vezes em tampão salina-fosfato gelado (PBS; NaCl 150 mM, tampão fosfato 20 mM, pH 7.2) e imediatamente utilizadas para os experimentos.

### **3.6) Obtenção dos extratos celulares totais**

As células de *P. serpens* crescidas nos diferentes meios de cultura foram coletadas nas fases logarítmica e estacionária de crescimento, através de centrifugação a 500g a 4°C por 5 min. Os sedimentos, correspondentes às células, foram lavados três vezes em PBS gelado. Para análise eletroforética, as células foram ressuspensas em água, adicionadas de 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e submetidas a três ciclos de 1 min no gelo e 30 seg no vórtex. Após, os lisados celulares foram centrifugados a 1.500g a 4°C por 15 min, obtendo-se assim os extratos protéicos totais.

### **3.7) Partição de proteínas de membrana com Triton X-114**

Parasitos ( $1 \times 10^8$  células) foram coletados por centrifugação após crescimento durante 48 h em meio BHI e, em seguida, foram submetidos à extração das proteínas associadas à membrana utilizando-se 2% Triton X-114 em TBS (Tris 10 mM; NaCl 190 mM, pH 7,5) como previamente descrito por BORDIER (1981). Após adição do detergente, foram realizados cinco ciclos de vórtex (1 min) e gelo (15 min); em seguida a solução foi deixada em repouso por 1 h em gelo. A mistura foi centrifugada a 7.000g por 15 min. O sobrenadante obtido foi incubado por 30 min a 37°C e, em seguida, centrifugado por 3.000g por 20 min, obtendo-se dessa maneira duas fases: a fase superior (hidrofílica), lavada três vezes com Triton X-114 a 5% e a fase inferior (hidrofóbica), lavada três vezes com tampão Tris-HCl, pH 7,4.

### **3.8) Quantificação química de proteínas**

A concentração de proteínas foi analisada pelo método descrito por LOWRY e colaboradores (1951), utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como padrão.

### **3.9) Análise do perfil de proteínas por SDS-PAGE**

Para análise das proteínas, alíquotas dos extratos celulares, equivalentes a 50 µg, foram adicionadas de tampão de amostra (Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0,01% e β-mercaptoetanol 1 mM), aquecidas a 100°C por 5 min e aplicadas em SDS-PAGE a 12%, contendo gel de empacotamento a 3%, de acordo com o sistema descrito por LAEMMLI (1970). A eletroforese foi processada a 120 V/60 mA, a 4°C. As proteínas foram reveladas através da coloração com 0,2% de Coomassie brilliant blue R-250 em metanol:ácido acético:água (50:10:40). As massas moleculares dos polipeptídeos foram estimadas através da comparação da migração destes com a de proteínas padrão (GIBCO BRL SDS-PAGE standards).

### **3.10) Análise do perfil de peptidases celulares**

Para análise qualitativa das peptidases celulares de *P. serpens*, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com 0,1% de gelatina co-polimerizada. Alíquotas dos extratos celulares, equivalentes a 50 µg, foram adicionadas de tampão de amostra (Tris 125 mM, pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,002%) em condições semi-desnaturantes. A eletroforese foi processada a 120 V/60 mA, a 4°C. Ao fim da corrida eletroforética, os géis foram lavados por 1 h com Triton X-100 1% para que o excesso de SDS fosse removido. Em seguida, foi realizada a incubação do gel por 48 h a 37°C em tampão de proteólise: fosfato de sódio 50 mM, pH 5,0, suplementado com ditioneitol (DTT) 2 mM. Finalmente os géis foram corados com Coomassie brilliant blue R-250 e descorados em uma solução contendo metanol-ácido acético-água (50:10:40). As massas moleculares das peptidases foram estimadas através da comparação da migração destes com a de proteínas padrão (GIBCO BRL SDS-PAGE standards) (SANTOS *et al.*, 1999) Os géis foram fotografados para análise densitométrica através do software Kodak Digital Science EDAS 120 (ELIAS *et al.*, 2006).

### **3.11) Efeito do pH, inibidores proteolíticos e agentes redutores na atividade catalítica**

Nestes experimentos a atividade proteolítica associada às células de *P. serpens* foi avaliada através do ensaio descrito no item 3.10. O efeito do pH foi determinado incubando-se o gel a 37°C por 48 h nos seguintes sistemas tampões: citrato de sódio 10 mM (pH 2,0–4,0), fosfato 50 mM (pH 5,0–8,0) e glicina-NaOH 20 mM (pH 9,0–10,0). Todos os sistemas tampões foram suplementados com 2 mM DTT. Para determinação da classe enzimática das peptidases estudadas, os géis foram incubados em tampão fosfato, pH 5,0, suplementado com DTT 2 mM, na presença e ausência dos seguintes inibidores proteolíticos: E-64 (1 µM), leupeptina (1 µM), cistatina (1 µM), PMSF (1 mM), 1,10-fenantrolina (1 mM) e pepstatina A (1 µM). Além disso, a influência de diferentes agentes redutores na atividade proteolítica também foi avaliada através de SDS-PAGE-gelatina; os géis foram incubados em tampão fosfato, pH 5,0, na presença e ausência dos seguintes agentes redutores a 2 mM: DTT, L-cisteína e β-mercaptoetanol.

### **3.12) Capacidade hidrolítica das peptidases de *P. serpens***

A capacidade de degradação das peptidases de *P. serpens* foi avaliada através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% contendo 0,1% de diferentes substratos copolimerizados: BSA, soro albumina humana (HSA), caseína, gelatina, hemoglobina, imunoglobulina G (IgG), mucina e extrato das glândulas salivares (0,07 µg/µL de proteína no gel) de *O. fasciatus* (3.12.1). Aliquotas dos extratos celulares dos parasitos, equivalentes a 50 µg, foram adicionadas de tampão de amostra em condições não desnaturantes. A eletroforese foi processada a 120 V/60 mA, a 4°C. Ao fim da corrida eletroforética, os géis foram lavados por 1 h com Triton X-100 a 1% para que o excesso de SDS fosse removido. Em seguida foi realizada incubação do gel por 48 h a 37°C em tampão de proteólise fosfato de sódio 50 mM, pH 5,0, suplementado com DTT 2 mM. Finalmente os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorados em uma solução contendo metanol-ácido acético-água (50:10:40).

#### **3.12.1) Extração de proteínas totais das glândulas salivares de *O. fasciatus***

As glândulas salivares intactas foram inicialmente congeladas em nitrogênio líquido. Após o descongelamento, estas foram maceradas e pérolas de vidro foram adicionadas à mistura. O sistema foi agitado três vezes em vórtex, intercalando-se com banho de gelo por 2 min. O homogenato foi centrifugado a 5.000g por 10 min, a 4°C, e o sobrenadante, contendo o extrato protéico das glândulas salivares, foi recolhido, incubado a 100°C, para inibir as peptidases endógenas, e estocado a 4°C.

### **3.13) Degradação de proteínas de superfície da glândula salivar de *O. fasciatus* por *P. serpens***

Inicialmente as glândulas salivares de *O. fasciatus* foram dissecadas, lavadas duas vezes em PBS e biotinizadas por 30 min a 4°C através da incubação com 0,1 mg/mL Sulfo-NHS-LC-biotin (Pierce) (SANTOS *et al.*, 2001; DIAS *et al.*, 2007). Em seguida, as glândulas foram lavadas cinco vezes com PBS para remover a biotina não ligada. Paralelamente, promastigotas de *P. serpens* ( $1 \times 10^8$ ) foram incubados por 30 min a 26°C na presença e ausência de 10  $\mu$ M E-64. Finalmente, os parasitos tratados e não tratados com o inibidor proteolítico foram incubados por 4 h a 26°C com as glândulas salivares biotinizadas (três glândulas por sistema). Após incubação, os parasitos foram removidos através de três lavagens com PBS; em seguida, as glândulas foram lisadas como descrito acima. Os extratos protéicos obtidos foram aplicados em SDS-PAGE 12% e transferidos para membrana de nitrocelulose, como descrito no item 3.16. A membrana foi bloqueada em solução de TBS-Tween 0,05% contendo 2% de BSA. Em seguida, estas foram lavadas três vezes com TBS-Tween e incubadas com avidina-peroxidase (1:10000). Os polipeptídeos reativos foram detectados por quimioluminescência através de sistema ECL.

### **3.14) Dosagem enzimática: degradação de substrato específico para cisteína peptidases**

O composto fluorogênico *N*- $\alpha$ -benziloxicarbonil-L-fenilalanil-L-arginina-(7-amino-4-metilcumarina) (Z-Phe-Arg-AMC) (Sigma) foi utilizado como substrato em procedimento adaptado do método descrito por BARRET e colaboradores (1980). A reação foi iniciada através da adição de 20  $\mu$ M do substrato a 10  $\mu$ g de extrato protéico de *P. serpens* (extrato total, sobrenadante PBS-glucose condicionado, fração hidrofílica e fração hidrofóbica) e *T. cruzi* (extrato total), diluídos em tampão fosfato 0,1 M, pH 5,0, contendo 2 mM de L-cisteína. A mistura de reação foi incubada a 37°C por 15 min e a intensidade de fluorescência foi determinada por espectrofotofluorimetria (SpectraMax Gemini XPS, Molecular Devices, CA, USA), utilizando comprimentos de onda de emissão e excitação a 460 e 380 nm, respectivamente.

➤ **PARTE II: Homologia entre antígenos de *P. serpens* e a cruzipaína de *T. cruzi***

### **3.15) Teste de aglutinação**

Os parasitos foram cultivados por 48 h em meio BHI, coletados por centrifugação e lavados em PBS. O sedimento foi ressuspensão em PBS e a quantidade de células determinada através de contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, os parasitos ( $2 \times 10^6$  células) foram incubados com diferentes concentrações (1:125, 1:250, 1:500, 1:1000 e 1:2500) do anticorpo policlonal anti-cruzipaína (gentilmente cedido pelo Dr. Juan Jose Cazzulo, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, Buenos Aires, Argentina), por 1 h a 26°C. O ensaio foi realizado em placa de 96 poços. Após o período de incubação, as células foram transferidas para sistemas de lâmina-lamínula e visualizadas em microscópio óptico.

### **3.16) Western blotting**

As proteínas presentes nos extratos celulares (lisado total, fração de membrana e fração citoplasmática) e no sobrenadante (item 3.22) de cultivo de parasitos crescidos em BHI por 48 h foram separados em SDS-PAGE 12%, como descrito no item 3.9, e transferidos (100 V/300 mA, 2 h, 4°C) para membrana de nitrocelulose em tampão Tris-base 25 mM, contendo glicina 200 mM e 20% de metanol. Após a transferência, as membranas foram incubadas por 24 h a 4°C em tampão de bloqueio (PBS pH 7,2; Tween 20 a 0,1%, leite em pó desnatado a 5%). Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 10 min com TBS-0,1% Tween. Estas foram então incubadas por 2 h, sob agitação, com anticorpo primário anti-cruzipaína a 1:400; posteriormente foram novamente lavadas três vezes por 10 min em TBS-0,1% Tween e incubadas com o anticorpo secundário (IgG-coelho) conjugado à peroxidase (1:2500). Alternativamente, membranas de nitrocelulose contendo extrato total de *T. cruzi* e extrato total e sobrenadante condicionado (item 3.24) de *P. serpens* foram incubadas com soro de paciente chagásico (gentilmente cedido pelo Dr. José Mauro Peralta, Departamento de Imunologia, IMPPG, UFRJ) na diluição de 1:100. Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes por 10 min em TBS-0,1% Tween e incubadas com o anticorpo secundário (IgG-humano) conjugado à peroxidase (1:2500). Finalmente, as membranas foram novamente lavadas e reveladas através de quimioluminescência (sistema ECL).

### 3.17) Citometria de fluxo e microscopia de fluorescência

Parasitas ( $5 \times 10^6$  células) crescidos em meio BHI por 48 h foram lavados e fixados durante 30 min a 4°C em paraformaldeído diluído 2% em PBS. Após fixação, as células foram lavadas três vezes em PBS gelado. Alternativamente, células fixadas foram permeabilizadas com 0,01% de Triton X-100 durante 15 min à temperatura ambiente; em seguida, as células foram também lavadas com PBS gelado (4°C). Parasitos, fixados e/ou permeabilizados, foram analisados por microscopia óptica para observação da integridade morfológica. Os parasitos então foram incubados por 1 h com o anticorpo primário policlonal anti-cruzipaína diluído 1:250, lavados extensivamente em PBS e incubados com anticorpo secundário (IgG) conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) na diluição de 1:250. Finalmente, as células foram lavadas, examinadas por citometria de fluxo e montadas em sistema de lâmina-lamínula para observação através de microscopia de fluorescência. Células não tratadas e tratadas somente com anticorpo secundário foram utilizadas como controles negativos.

Alternativamente, *P. serpens* e *T. cruzi* foram fixados em paraformaldeído 2%, lavados extensivamente em PBS e incubados por 1 h com anti-cruzipaína 1:250 e soro de paciente chagásico 1:100. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho e anti-humano, ambos diluídos 1:100, durante 1 h. Finalmente, as células foram lavadas e examinadas por citometria de fluxo.

### 3.18) Imunocitoquímica

Promastigotas de *P. serpens* foram cultivadas em BHI por 48 h, coletadas por centrifugação, lavadas duas vezes em PBS e fixadas em tampão cacodilato 0,1 M contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 0,2% de ácido pícrico e  $\text{CaCl}_2$  5 mM. Após 1 h de fixação, as células foram desidratadas em etanol e embebidas em resina (Unicryl) a -20°C. Seções ultrafinas da resina foram colocadas em grades de níquel e incubadas em TBS 0,1M e cloreto de amônio 50 mM. Após três lavagens em TBS, as grades foram finalmente incubadas com anticorpo anti-cruzipaína (diluído 1:50 em TBS, 1% BSA e 1% Tween 20) e subseqüentemente com anticorpo secundário IgG (diluído 1:10) conjugado a partículas de ouro (15 nM). Após coloração com acetato de uranila e citrato de chumbo, as seções ultrafinas foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss 10C) (SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990).

### 3.19) ELISA

O teste de ELISA foi realizado como descrito por VOLLER e colaboradores (1976). Inicialmente foi realizado um ensaio com a finalidade de padronizar as concentrações de antígenos para utilização nos experimentos de imunoreatividade. As placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL/poço de diferentes concentrações do antígeno (extrato total de *T. cruzi*, extrato total e sobrenadante de *P. serpens*) variando de 5 a 20 µg/mL por 1 h a 37°C e posteriormente por 20 h a 4°C, em câmara úmida. Em seguida, foram adicionados a cada poço 100 µL do anticorpo anti-cruzipaína e do soro de paciente chagásico, diluídos em tampão de bloqueio, em diluições variando de 1:100 a 1:12800, os quais foram incubados por 1 h a 37°C. Após lavagem das placas (5 vezes) com PBS-T 0,1% (150 µL/poço) foram adicionados (100 µL/poço) os anticorpos secundários anti-IgG de coelho e anti-IgG humana conjugados à peroxidase diluídos a 1:2500 em tampão de bloqueio, seguindo a incubação como na etapa anterior. As placas foram então lavadas como previamente descrito e adicionadas de 100 µL do substrato enzimático (4 mg de orto-fenilenodiamina [OPD] em 10 mL de tampão citrato, pH 5,5, adicionado de 4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A reação foi processada no escuro à temperatura ambiente. Após 20 min esta foi interrompida com adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N em cada poço. A absorbância foi lida a 492 nm em leitor Thermo Plate.

### 3.20) Detecção de âncora de GPI: tratamento com PLC e tripsina

Os parasitos foram cultivados por 48 h em meio BHI, coletados por centrifugação, lavados três vezes em TBS, fixados em paraformaldeído 2% e contados em câmara de Neubauer. As células (3×10<sup>7</sup>) fixadas foram então ressuspensas em 750 µL de TBS para posterior tratamento enzimático. Dois sistemas foram montados em eppendorfs e os parasitos foram tratados com fosfolipase C (PLC) e tripsina. No sistema com PLC, 250 µL de células foram adicionados a 242 µL de glicerol e 8 µL da enzima (0,2 U/µL). Já no sistema com tripsina, 250 µL de células foram adicionados a 210 µL de glicerol e 40 µL da enzima a 25 µg/mL. O sistema controle foi montado somente com 250 µL de células e 250 µL de glicerol. Os parasitos de todos os sistemas foram incubados durante 24 h a 37°C. Posteriormente, as células foram centrifugadas e lavadas extensivamente em TBS. Estas foram então incubadas por 1 h com o anticorpo primário policlonal anti-cruzipaína diluído 1:250, lavadas extensivamente em TBS e incubadas com anticorpo secundário (IgG) conjugado à FITC (1:400). Finalmente, as células foram lavadas e analisadas por

citometria de fluxo. Células não tratadas e tratadas somente com anticorpo secundário foram utilizadas como controles negativos.

### **3.21) Modulação da expressão de moléculas semelhantes à cruzipaína por diferentes substratos protéicos**

Os parasitos cultivados em BHI por 48 h foram coletados por centrifugação, lavados em PBS e contados em câmara de Neubauer. Em seguida, as células ( $8 \times 10^8$ ) foram incubadas em PBS-glucose 2% (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2003) suplementado com diferentes substratos protéicos solúveis a 1%: soro albumina bovina (BSA), soro albumina humana (HSA), mucina, soro fetal bovino (SFB), imunoglobulina G (IgG), hemoglobina (Hg) e extrato natural de tomate. Após 3 h de incubação à temperatura ambiente, as células foram separadas do sobrenadante por centrifugação. Em seguida, os parasitos foram fixados em paraformaldeído 2% e preparados para análise em FACS, utilizando-se o anticorpo anti-cruzipaína, como descrito no item 3.17.

#### ***3.21.1 - Modulação da expressão de moléculas do tipo cruzipaína pelas glândulas salivares do inseto fitófago *O. fasciatus****

Inicialmente, as glândulas salivares de *O. fasciatus* foram cuidadosamente dissecadas, lavadas três vezes em PBS gelado e ressuspensas em PBS-glucose 2%. Paralelamente, parasitos cultivados em BHI por 48 h foram coletados por centrifugação, lavados em PBS e contados em câmara de Neubauer. Em seguida, as células ( $8 \times 10^8$ ) foram incubadas com as glândulas (previamente dissecadas) durante 3 h. Após a incubação, os parasitos foram coletados por centrifugação e tratadas com anticorpo anti-cruzipaína e analisadas através de citometria de fluxo, como descrito no item 3.17. Sistemas controle foram utilizados com parasitos incubados somente com PBS-glucose 2%.

#### ***3.21.2 - Modulação da expressão de moléculas semelhantes à cruzipaína pela hemolinfa do inseto fitófago *O. fasciatus****

Parasitos foram crescidos por 48 h em BHI, lavados três vezes em PBS e contados em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS ( $4 \times 10^5$ ) e injetadas, com auxílio de pipeta Hamilton, na lateral da junção entre o segundo e o terceiro segmento torácico do *O. fasciatus*. Após 72 h de infecção, os insetos infectados tiveram seus dois primeiros pares de patas removidos para coleta da hemolinfa. Esta foi

então centrifugada a 5000g por 10 min para separação dos parasitos. Estes foram lavados em PBS e fixados em paraformaldeído 2% para análise através de citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti-cruzipaína, como descrito no item 3.17.

### ➤ **Parte III: Secreção de peptidases por *P. serpens***

#### **3.22) Obtenção do sobrenadante de cultivo**

O sobrenadante de cultivo de *P. serpens* foi obtido após centrifugação de parasitos crescidos em BHI por 48 h. Um volume de 400 mL foi submetido à concentração em sistema de ultrafiltração AMICON (AMICON, Beverly, USA), com membrana de exclusão de 10 kDa, em banho de gelo (SANTOS *et al.*, 1999). O sobrenadante concentrado (400×) foi separado em gel de poliacrilamida 12% e transferido para membrana de nitrocelulose para testar reatividade cruzada com anticorpo anti-cruzipaína, como descrito no item 3.16, e dosagem química de atividade proteolítica secretória (item 3.24).

#### **3.23) Dosagem química da atividade proteolítica secretória**

A atividade proteolítica extracelular foi quantificada em espectrofotômetro utilizando-se a gelatina como substrato protéico solúvel, como descrito por BUROKER-KILGORE E WANG (1993). O sobrenadante concentrado de *P. serpens* foi incubado por 30 min na ausência e presença dos inibidores proteolíticos listados na tabela abaixo:

<b>INIBIDORES</b>	<b>CONCENTRAÇÃO</b>
1,10-Fenantrolina	1 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1 mM
Pepstatina A	1 µM
PMSF	1 mM
TLCK	1 mM
Cistatina	1 µM
Leupeptina	1 µM
E-64	1 µM
Antipaína	1 µM

Para determinar a atividade proteolítica remanescente, gelatina (0,5 mg/ml), DTT 2 mM, tampão fosfato 50 mM (pH 5,0) e 12 µL de cada sobrenadante foram adicionados a tubos eppendorfs (volume final de 100 µL) e incubados por 2 h a 37°C. Em seguida, três alíquotas (20 µL) da mistura de reação foram transferidas para poços em uma microplaca contendo 10 µL de

água e 20 µL de uma solução de Coomassie (Coomassie brilliant blue G-250, 11,75% etanol e 21,25% ácido fosfórico). Após 10 min, a placa foi submetida à leitura em leitor de ELISA (Thermomax Molecular Device microplate reader) com absorvância de 595 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 na unidade de absorvância. Os resultados foram expressos como porcentagem relativa de atividade proteolítica na presença de inibidores subtraída da atividade na ausência dos mesmos.

### **3.24) Secreção de polipeptídeos por *P. serpens* em meio mínimo**

Parasitas cultivados em BHI por 48 h foram coletados por centrifugação, lavados cinco vezes em PBS e contados em câmara de Neubauer. Parasitos ( $1 \times 10^{10}$  células) foram então ressuspensos em 1 mL de PBS-glucose a 2% (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2003) e incubados sob agitação (100 rpm) durante 3 h à temperatura ambiente. A integridade celular foi monitorada através da dosagem de malato desidrogenase no sobrenadante de cultura coletado (THOMPSON *et al.*, 1998). Após a incubação, as células foram então separadas do sobrenadante (PBS-glucose condicionado) por centrifugação. Este sobrenadante foi utilizado para ensaios de degradação de substratos protéicos (item 3.26) e dosagens químicas específicas para cisteína peptidases (item 3.13).

### **3.25) Degradação de diferentes substratos protéicos**

O sobrenadante PBS-glucose condicionado foi incubado com diferentes substratos protéicos solúveis a 1%: BSA, HSA, SFB, IgG, hemoglobina e mucina na presença e ausência de inibidores proteolíticos: E-64 10 µM e 1,10-fenantrolina 10 mM. Para visualização dos resultados, alíquotas destes sistemas foram submetidas à dosagem química, como descrito no item 3.24.

➤ **Parte IV: Interação *in vitro* entre *P. serpens* e tomates da espécie *Solanum lycopersicum***

**3.26) Obtenção do extrato filtrado de tomate**

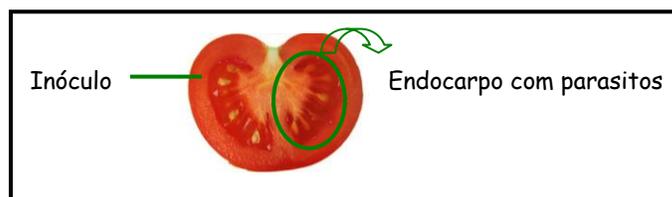
Tomates frescos da espécie *Solanum lycopersicum* foram lavados em solução de água destilada com hipoclorito de sódio a 0,01%. Em seguida, estes foram macerados, pesados e diluídos em PBS até a concentração final de 3 g/mL. Após a diluição, o extrato de tomate foi centrifugado a 8000g por 30 min. O sobrenadante (chamado de extrato natural de tomate) foi retirado e submetido à esterilização através de filtração em membrana millipore 0,22 µm.

**3.27) Análise do perfil de proteínas e peptidases celulares**

Os parasitos cultivados em extrato natural de tomate (25% e 50% em BHI) e BHI foram coletados por centrifugação e lisados para obtenção de extrato protéico total, como descrito no item 3.6. Para análise qualitativa dos polipeptídeos celulares de *P. serpens*, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (item 3.9). Para análise quantitativa da atividade proteolítica foi realizada uma dosagem química como descrito no item 3.24.

**3.28) Infecção *in vitro* de tomates (*S. lycopersicum*)**

Parasitos cultivados em BHI foram coletados por centrifugação, lavados em PBS e contados em câmara de Neubauer. Paralelamente, tomates frescos foram inicialmente tratados por 15 min em solução de cloro e água (20 ppm) e deixados por 30 min sob ação da luz ultravioleta. Em seguida, os parasitos ( $5 \times 10^4$  ressuspensos em 5 µL de salina) foram inoculados em 3 pontos previamente escolhidos e marcados nos tomates. Estes foram então incubados por sete dias a 26°C. Finalmente, o tomate foi cortado, as sementes separadas e os parasitos removidos através de filtração do endocarpo (componente denso que envolve as sementes), como ilustrado no esquema abaixo:



### **3.29) Detecção de moléculas semelhantes à cruzipáina**

Parasitas cultivados comparativamente em tomates (item 3.29) e em BHI por sete dias foram coletados por centrifugação, lavados em PBS, fixados em paraformaldeído 2% e preparados para FACS com anticorpo anti-cruzipáina, como descrito no item 3.17. Alternativamente, parasitos cultivados em BHI suplementado com 25 e 50% de extrato natural de tomate (item 3.27) durante 48 h foram coletados por centrifugação, lavados em PBS e preparados também para análise através de citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti-cruzipáina.

### **3.30) Identificação de receptor para *P. serpens* em *S. lycopersicum***

Extratos de tomate (30 µg) foram separados em SDS-PAGE 12% e transferidos para membrana de nitrocelulose. As proteínas então transferidas foram bloqueadas com solução de leite desnatado 5% em TBS-Tween por 24 h a 4°C. Paralelamente, parasitos vivos foram coletados por centrifugação e lavados três vezes em PBS gelado para remoção das proteínas do meio de cultivo. Em seguida,  $1 \times 10^9$  parasitos foram ressuspensos em PBS (1 mL) e colocados em contato com 0,1 mg/mL Sulfo-NHS-LC-biotin por 30 min a 4°C. Os parasitos foram então lavados seis vezes com PBS gelado para remoção da biotina não ligada (SANTOS *et al.*, 2001). Após bloqueio, a membrana foi incubada por 2 h sob agitação constante com os parasitos vivos biotinilados ( $1 \times 10^8$ ). Posteriormente, a membrana foi lavada com TBS-Tween e incubada em solução de avidina peroxidase diluída 1:2500 por 1 h. O imunoblot foi revelado através de quimioluminescência (ECL).

# Resultados

## 4) RESULTADOS

### ➤ PARTE I: Identificação e caracterização de atividade proteolítica associada às células de *P. serpens*

#### 4.1) Curva de crescimento de *P. serpens*

Os parasitos da espécie *P. serpens* (isolado 9T, CT-IOC-189) foram cultivados em quatro meios distintos (BHI, LIT, EL e Warren) a 26°C durante 96 h. Os flagelados iniciaram a fase logarítmica de crescimento após 36 h de cultivo (Fig. 11A, seta branca) mantendo-se nesta até aproximadamente 60 h, momento no qual foi atingida a fase estacionária (Fig. 11A, seta preta). É interessante ressaltar que, após 48 h de cultivo, os flagelados crescidos em todos os meios se encontravam no meio da fase logarítmica, tempo este escolhido para os demais experimentos desenvolvidos neste estudo (Fig. 11A, seta hachurada). A composição do meio de cultura não parece influenciar as fases de crescimento do parasito, uma vez que os flagelados cultivados em todos os meios passaram, ao mesmo tempo, pelas fases lag, logarítmica e estacionária de crescimento (Fig. 11A). Embora as diferentes fases de crescimento tenham se mostrado similares, o padrão de proliferação apresentado pelos parasitos cultivados nos quatro meios demonstrou diferenças notáveis. Os flagelados apresentaram proliferação abundante quando crescidos em meio Warren e crescimento bastante reduzido quando cultivados em meio EL (Fig. 11A). Os parasitos cultivados nos meios BHI e LIT apresentaram multiplicação celular mediana entre os extremos dos meios Warren e EL (Fig. 11A).

#### 4.2) Análise do perfil de proteínas e peptidases celulares de *P. serpens*

O perfil de proteínas sintetizado por *P. serpens* tem sido pouco explorado e pouco caracterizado. No entanto, é fato que a composição química dos meios de cultura é capaz de modular a expressão de polipeptídeos em microrganismos, inclusive em tripanossomatídeos (SANTOS *et al.*, 2001; NOGUEIRA DE MELO *et al.*, 2002). Desta maneira, através da técnica de SDS-PAGE, foram evidenciadas as proteínas expressas por *P. serpens* quando cultivado nos quatro diferentes meios.

Após separação eletroforética e coloração com Coomassie brilliant blue, foi observado um perfil de polipeptídeos muito similar para os parasitos cultivados em todos os diferentes meios,

embora a expressão destes seja notavelmente distinta (Fig. 11B). Foram detectadas proteínas com massas moleculares que variavam entre 15 e 250 kDa, com expressão majoritária de alguns polipeptídeos entre 25 e 85 kDa (Fig. 11B, setas). Entre os sistemas foram observadas pequenas diferenças quantitativas, tal como a expressão de um polipeptídeo de 250 kDa, detectado somente em parasitos cultivados em meio EL (Fig 11B, seta clara). Além da análise do perfil de proteínas expresso pelos parasitos quando cultivado em diferentes meios, também foi observado o perfil dos polipeptídeos expressos quando *P. serpens* se encontrava em duas distintas fases do seu ciclo celular: fase logarítmica (48 h) e estacionária (60 h). A expressão detectada foi indiferente e por este motivo só foram mostrados os resultados da fase logarítmica (Fig. 11B).

Além do perfil de proteínas, a expressão de enzimas proteolíticas em *P. serpens* também foi avaliada para os parasitos cultivados nos quatro diferentes meios. Através da técnica de SDS-PAGE contendo gelatina como substrato incorporado ao gel, o perfil observado para os quatro meios revelou a expressão de duas bandas majoritárias com massas moleculares de aproximadamente 38 e 40 kDa. Estas apresentaram modulações sutis nos seus níveis de expressão quando o meio de cultura utilizado para crescimento do parasito foi alterado, como pode ser observado na figura 11C. A expressão de peptidases em duas diferentes fases de crescimento também foi investigada, assim como feito para o perfil de polipeptídeos. O resultado observado permitiu afirmar que a expressão de enzimas proteolíticas não se alterou com as mudanças de fases atravessadas pelo parasito durante a sua proliferação *in vitro*. Desta maneira, apenas o perfil observado na fase logarítmica de crescimento foi ilustrado (Fig. 11C).

#### **4.3) Efeito do pH, agentes redutores e inibidores proteolíticos sobre as peptidases associadas às células de *P. serpens***

Com o objetivo de determinar algumas características bioquímicas das peptidases detectadas, os extratos protéicos de *P. serpens* foram submetidos à SDS-PAGE-gelatina e os géis sofreram diferentes processos de incubação. Através desta técnica, foi possível determinar a faixa ótima de pH para atividade catalítica (Fig. 12A), a classe das enzimas evidenciadas (Fig. 12B) e a modulação das suas atividades proteolíticas frente a agentes redutores conhecidos (Fig. 12C).

Os resultados indicaram que as peptidases sintetizadas pelo flagelado atuam em uma ampla faixa de pH (3,0-9,0), com atividade majoritária em pH ácido (5,0) (Fig. 12A). Além disso, a análise dos géis também permitiu identificar as duas bandas de 38 e 40 kDa como cisteína peptidases, uma vez que estas foram sensíveis a inibidores proteolíticos clássicos desta classe (E-

64, leupeptina e cistatina), não sofrendo modulação significativa de suas atividades quando na presença de inibidores de aspártico peptidases (pepstatina A), serina peptidases (PMSF) e metalo peptidases (1,10-fenantrolina) (Fig. 12B).

Em geral, cisteína peptidases dependem de agentes redutores para que desempenhem suas atividades catalíticas. Desta maneira, os géis contendo os extratos protéicos de *P. serpens* foram incubados na presença e ausência de alguns agentes redutores. Os resultados confirmaram a dependência das cisteína peptidases celulares de *P. serpens* frente a agentes redutores, tais como ditioneitol e L-cisteína, uma vez que na ausência destes não houve detecção de atividade proteolítica (Fig. 12C). O agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol não foi capaz de restituir a atividade catalítica das enzimas em estudo (Fig. 12C).

#### **4.4) Localização das cisteína peptidases: extração com Triton X-114**

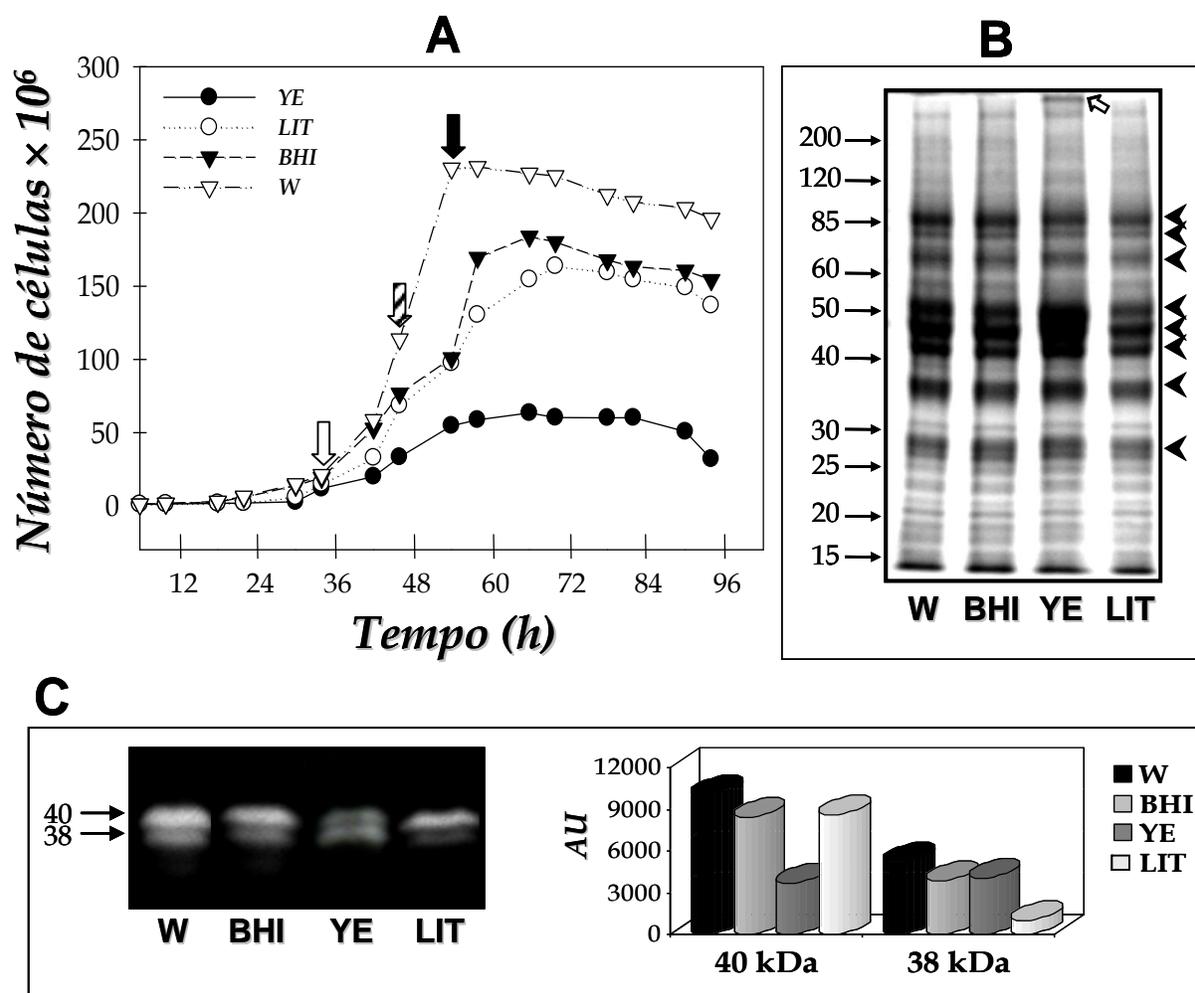
O perfil proteolítico associado às células de *P. serpens* é expresso por duas bandas majoritárias de 38 e 40 kDa (Fig. 13A, coluna 1), classificadas como cisteína peptidases. Com o objetivo de determinar a localização destas enzimas, foi realizada uma extração diferencial usando-se o detergente Triton X-114. Desta maneira, o conteúdo citoplasmático é separado da fração correspondente às membranas celulares. Com esta técnica foi possível observar a presença das duas bandas na fase aquosa, ou seja, na porção citoplasmática do parasito (Fig. 13A, coluna 2). Já na fase hidrofóbica – fração de membrana – apenas uma discreta banda de 40 kDa foi detectada (Fig. 13A, coluna 3). Os mesmos sistemas foram analisados na presença de E-64, inibidor específico de cisteína peptidases, confirmando a identidade das enzimas como as mesmas detectadas nos ensaios anteriores (Fig. 13B).

#### **4.5) Clivagem de diferentes substratos protéicos pelas cisteína peptidases de *P. serpens***

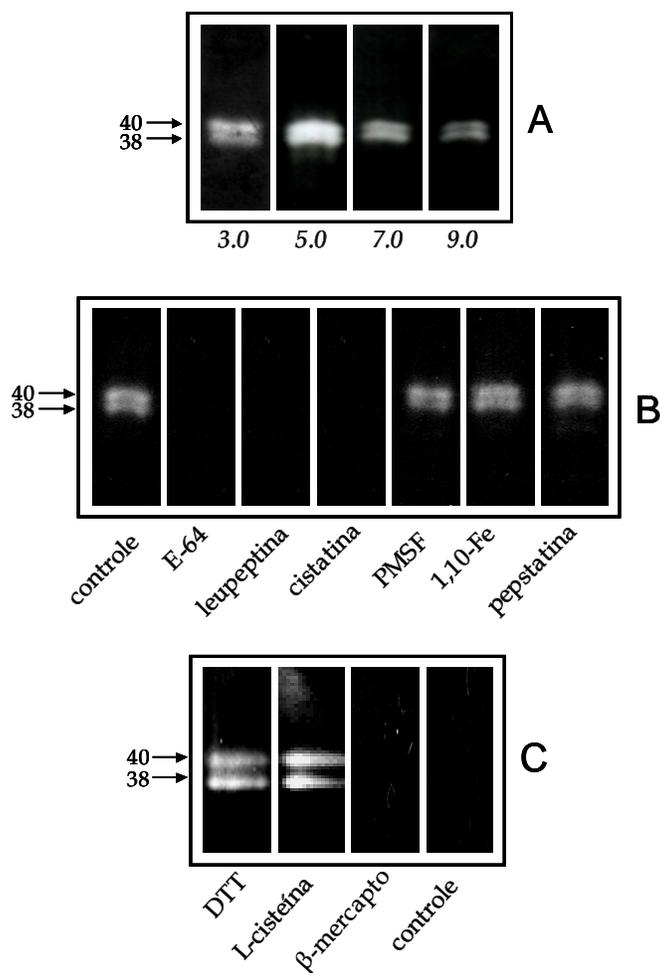
*P. serpens* é um parasito heteroxênico; logo, este confronta distintos ambientes durante o seu ciclo de vida, tais como o intestino/hemolinfa de insetos e o endocarpo de tomates. Desta maneira, a capacidade hidrolítica das peptidases expressas por este flagelado foi investigada. Através de SDS-PAGE co-polimerizado a diferentes substratos observou-se um amplo espectro catalítico destas cisteína peptidases. As enzimas proteolíticas do parasito foram capazes de hidrolisar proteínas como gelatina, caseína, hemoglobina, imunoglobulina G e albumina (Fig. 14A). Além disso, tais peptidases também foram capazes de clivar a mucina, uma glicoproteína

sialilada (Fig. 14A). O extrato protéico das glândulas salivares do inseto fitófago *O. fasciatus* também foi utilizado como substrato incorporado ao gel. Curiosamente, as enzimas foram capazes de degradar esse substrato, o que sugere a importância de tais peptidases em processos de interação parasito-hospedeiro invertebrado (Fig. 14A).

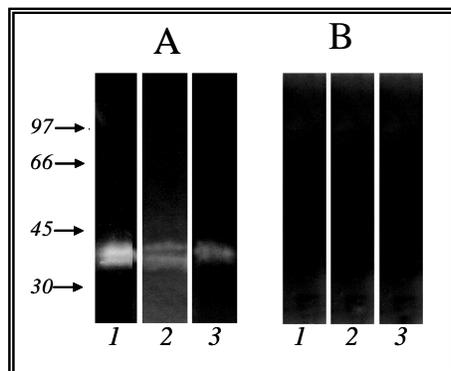
A degradação do extrato total das glândulas salivares de *O. fasciatus* despertou grande interesse. Desta forma, com o objetivo de investigar quais proteínas presentes nas glândulas seriam degradadas pelas cisteína peptidases de *P. serpens*, os tripanossomatídeos vivos foram incubados com as glândulas salivares previamente biotiniladas. Os resultados demonstraram que um componente de superfície de 115 kDa foi clivado após incubação com os parasitos vivos, gerando peptídeos de menores massas moleculares (Fig 14B, setas). A adição de E-64 foi capaz de inibir a hidrólise deste componente de 115 kDa, sugerindo associação direta entre a atividade de cisteína peptidase de *P. serpens* e a degradação de pelo menos uma proteína de superfície presente nas glândulas salivares do inseto fitófago *O. fasciatus* (Fig. 14B).



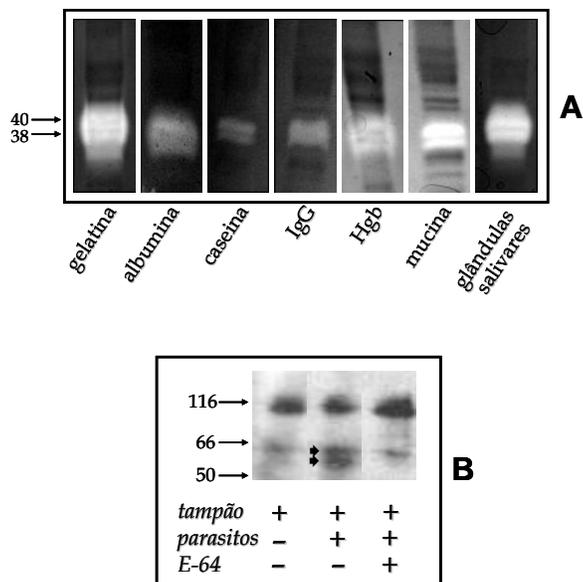
**Figura 11: Curva de crescimento e perfis de proteína e peptidase de *P. serpens*.** (A) Curva de crescimento de *P. serpens* quando cultivada a 26°C durante 96 h em quatro meios diferentes: extrato de levedura (YE), infusão de fígado e tripticase (LIT), infusão de cérebro e coração (BHI) e Warren (W). Os valores representam a média de três experimentos independentes. As setas indicam diferentes fases de crescimento do parasito: final da fase lag (seta branca), meio da fase exponencial (seta hachurada) e início da fase estacionária (seta preta). (B) SDS-PAGE demonstrando os perfis de polipeptídios (50µg de extrato total) e (C) SDS-PAGE-gelatina (50µg de extrato total) demonstrando os perfis de peptidases expressas após crescimento do parasito nos quatro meios por 48 h. Na figura B, a seta aberta indica a expressão diferencial de polipeptídio e as cabeças de seta indicam os polipeptídios majoritariamente expressos por *P. serpens* nas condições de crescimento descritas. Os géis de protease em (C) foram incubados em tampão fosfato, pH 5,0, suplementado com 2 mM de DTT a 37°C por 48 h. Análises densitométricas dos halos proteolíticos, expressas em unidades arbitrárias (AU), são sumarizadas no gráfico da figura C. Os números à esquerda (em B e C) indicam as massas moleculares aparentes, expressas em kilodaltons.



**Figura 12: Efeito do pH, agentes redutores e inibidores proteolíticos sobre as atividades peptidásicas associadas às células de *P. serpens*.** (A) Efeito do pH nas atividades proteolíticas associadas às células de *P. serpens*, após crescimento em BHI por 48h. Os géis foram incubados a 37°C por 48 h nos seguintes sistemas tampões: citrato de sódio 10 mM (pH 3,0), fosfato de sódio 50 mM (pH 5,0 e 7,0) e glicina-NaOH 20 mM (pH 9,0). Todos os tampões foram suplementados com DTT a 2 mM. (B) Efeito de inibidores proteolíticos na atividade das peptidases de *P. serpens*. Os géis foram incubados a 37°C por 48 h em tampão fosfato de sódio 50 mM suplementado com 2 mM DTT na ausência e na presença dos seguintes inibidores proteolíticos: E-64 a 1 µM, leupeptina a 1 µM, cistatina a 1 µM, PMSF a 1 mM, 1,10-fenantrolina a 1 mM e pepstatina a 1 µM. (C) Efeito de agentes redutores na atividade proteolítica. Os géis foram incubados a 37°C por 48 h em tampão fosfato de sódio 50 mM na ausência e na presença de diferentes agentes redutores a 2 mM: DTT, L-cisteína e β-mercaptoetanol (β-mercapto). Os números à esquerda indicam as massas moleculares aparentes, expressas em kilodaltons.



**Figura 13: Localização das cisteína-peptidases - extração com Triton X-114.** Após extração das células de *P. serpens* com Triton X-114, as frações obtidas foram analisadas através de SDS-PAGE contendo gelatina como substrato co-polimerizado. Frações: **(1)** extrato celular total, **(2)** hidrofílica e **(3)** hidrofóbica. Os géis foram incubados em tampão fosfato, pH 5,0, suplementado com 2 mM de DTT, por 48 h a 37°C na ausência **(A)** e presença **(B)** de 1  $\mu$ M de E-64. Os números à esquerda indicam as massas moleculares aparentes, expressas em kilodaltons



**Figura 14: Clivagem de diferentes substratos protéicos pelas cisteína peptidases de *P. serpens*.** (A) Hidrólise de diferentes compostos protéicos pelas peptidases associadas às células de *P. serpens*. Gelatina, soro albumina bovina (albumina), caseína, imunoglobulina (IgG), hemoglobina (Hgb), mucina e extrato das glândulas salivares de *O. fasciatus* foram incorporados individualmente ao SDS-PAGE para evidenciar a atividade proteolítica. Os géis foram incubados em tampão fosfato, pH 5,0, suplementado com 2 mM de DTT a 37°C por 48 h. As massas moleculares das peptidases, expressas em kilodaltons, estão representadas à esquerda. (B) Degradação das proteínas de superfície das glândulas salivares de *O. fasciatus* por células vivas de *P. serpens*. Neste ensaio, as glândulas salivares foram dissecadas, lavadas e biotiniladas. Em paralelo, *P. serpens* foi incubada por 30 min a 26°C na presença ou ausência de E-64 a 1 µM. Em seguida, parasitos controle e tratados com inibidor foram incubados com as glândulas; após incubação, foi realizado um Western blotting para visualização do resultado. As setas indicam os peptídeos resultantes da degradação do componente de 115 kDa. Os números à esquerda indicam as massas moleculares aparentes, expressas em kilodaltons.

➤ **PARTE II: Homologia entre antígenos de *P. serpens* e a cruzipaína de *T. cruzi***

#### **4.6) Detecção de moléculas semelhantes à cruzipaína em *P. serpens***

Em trabalho publicado recentemente (BREGANÓ *et al.*, 2003), foi descrita a reatividade cruzada existente entre antígenos de *P. serpens* e *T. cruzi*. Com o objetivo de detalhar essa similaridade, foi investigada no presente estudo a possível reatividade entre as moléculas de *P. serpens* e a cruzipaína de *T. cruzi*. Para tanto, foram utilizados anticorpos específicos contra a enzima de *T. cruzi*. Através de Western blotting, foi observado que o anticorpo policlonal anti-cruzipaína reconheceu fortemente uma banda de 50 kDa no extrato celular de *T. cruzi*, além de ser capaz de reconhecer dois polipeptídeos - 38 e 40 kDa - no extrato protéico total e na fração citoplasmática de *P. serpens*. O polipeptídeo de 40 kDa expresso na membrana do parasito também foi reconhecido pelo anticorpo (Fig. 15A). Para confirmar os dados obtidos, foi realizada uma citometria de fluxo com os parasitos fixados e/ou permeabilizados com Triton X-100. Os resultados ratificaram os dados do Western blotting: há presença minoritária de moléculas semelhantes à cruzipaína na superfície (Fig. 15A, seta 2) de promastigotas fixados e majoritária nos compartimentos intracelulares de parasitos permeabilizados (Fig. 15A, seta 3). Além da citometria de fluxo, testes de aglutinação direta (Fig. 15B) e imunofluorescência (Fig. 15B), utilizando o anticorpo anti-cruzipaína, também confirmaram a presença de moléculas semelhantes à cruzipaína tanto na superfície quanto no citoplasma do parasito.

#### **4.7) Distribuição de moléculas semelhantes à cruzipaína em *P. serpens***

Para que fosse possível visualizar a distribuição das cisteína peptidases nos diferentes compartimentos celulares de promastigotas de *P. serpens*, foi realizado um ensaio imunocitoquímico utilizando o anticorpo policlonal anti-cruzipaína. Os resultados indicaram a presença de moléculas semelhantes à cruzipaína ao longo de toda a extensão da membrana celular do parasito, assim como no flagelo, na bolsa flagelar e em compartimentos intracelulares de *P. serpens*. Curiosamente, a marcação das moléculas homólogas a cruzipaína também pôde ser observada livre no interior da bolsa flagelar (Fig. 16), sugerindo a secreção desta molécula para o meio extracelular.

#### **4.8) Detecção de uma possível âncora de GPI nas moléculas semelhantes à cruzipaína associadas à superfície de *P. serpens***

Com o objetivo de investigar a possível presença de uma âncora de GPI nas moléculas semelhantes à cruzipaína associadas às membranas celulares de *P. serpens*, os parasitos fixados com paraformaldeído foram inicialmente submetidos à digestão enzimática com fosfolipase C (PLC) e tripsina. A PLC é uma enzima capaz de clivar a ligação fosfodiéster da âncora de GPI. Como consequência da retirada da âncora lipídica, a proteína é liberada e perde seu caráter original anfifílico, tornado-se solúvel em água (CARDOSO DE ALMEIDA & TURNER 1983; CARDOSO DE ALMEIDA & HEISE 1993; SANTOS *et al.*, 2002). Já a tripsina é capaz de clivar polipeptídeos em resíduos carboxi-terminais de arginina ou lisina (RAO *et al.*, 1998); como tais resíduos são comumente encontrados em proteínas, estas são majoritariamente removidas de membranas celulares tratadas com tripsina. As células de *P. serpens* tratadas com estas enzimas hidrolíticas foram posteriormente incubadas com anticorpo policlonal anti-cruzipaína e analisadas através de citometria de fluxo. Os resultados indicaram que as cisteína peptidases homólogas à cruzipaína em *P. serpens* estão possivelmente associadas à superfície dos parasitos via âncora de GPI, uma vez que o tratamento prévio com as enzimas (PLC e tripsina) reduziu o reconhecimento pelo anticorpo em relação aos parasitos controles, ou seja, que não foram tratados enzimaticamente (Fig. 17).

#### **4.9) Expressão de cruzipaína: ensaio comparativo entre *T. cruzi* e *P. serpens***

Como demonstrado no item 4.6, *P. serpens* é capaz de expressar cisteína peptidases que apresentam reatividade cruzada com a cruzipaína do *T. cruzi*. Desta maneira, com o objetivo de comparar a expressão destas moléculas nos dois tripanossomatídeos estudados foi investigada a capacidade de degradação de um substrato sintético específico para cisteína peptidases. Os resultados demonstraram que o extrato celular de epimastigotas de *T. cruzi* apresenta eficácia dez vezes maior na degradação do substrato em relação ao extrato celular de *P. serpens* (Fig 18A). Este resultado foi corroborado através de SDS-PAGE-gelatina: o extrato de *T. cruzi* gerou um forte halo de degradação de 50 kDa, enquanto o extrato de *P. serpens* gerou dois halos fracos de digestão, correspondentes a massas moleculares de 38 e 40 kDa. Todas as atividades catalíticas citadas anteriormente foram inibidas por E-64, um inibidor específico de cisteína peptidases (Fig 18A, inset).

Para confirmar que a diferença na produção de cisteína peptidases entre *T. cruzi* e *P. serpens* reflete a diferença na expressão de cruzipaína, um ensaio de ELISA foi realizado utilizando extratos celulares dos dois flagelados e anticorpo anti-cruzipaína. Os resultados confirmaram as dosagens com substrato específico: o anticorpo reconhece os antígenos de *T. cruzi* em títulos mais altos quando comparados aos detectados em *P. serpens* (Fig 18B).

#### **4.10) Expressão de moléculas semelhantes à cruzipaína em extrato celular e sobrenadante condicionado de *P. serpens***

Em 2003, BREGANÓ e colaboradores demonstraram que soros de pacientes com doença de Chagas apresentavam forte reatividade com antígenos de *P. serpens*. Este flagelado apresenta alta imunogenicidade, induzindo imunidade protetora contra infecção por *T. cruzi* em BALB/c. Com o objetivo de explorar tal similaridade e observar se a cruzipaína se encontra entre os antígenos compartilhados, foram realizados testes de ELISA utilizando-se antígenos celulares e extracelulares de *P. serpens* contra um soro de paciente com Doença de Chagas e o anticorpo anti-cruzipaína. Os resultados demonstraram que tanto os antígenos celulares (extrato total do parasito) quanto o extrato extracelular (PBS-condicionado) foram reconhecidos pelo soro do paciente chagásico (Fig 19B). O ensaio de imunoreatividade também confirmou a presença da molécula semelhante à cruzipaína entre os antígenos compartilhados por *P. serpens* e *T. cruzi* (Fig 19A).

#### **4.11) Soro de paciente chagásico e anti-cruzipaína: reconhecimento de antígenos em *P. serpens* e *T. cruzi***

Como descrito no item 4.9, o soro de paciente chagásico e o anticorpo anti-cruzipaína são capazes de reconhecer antígenos associados às células de *P. serpens* e liberados para o meio extracelular. Desta maneira, para explorar ainda mais estes resultados, os dois anticorpos foram testados contra antígenos de superfície de *P. serpens*, em comparação ao *T. cruzi*. Os resultados da citometria de fluxo demonstraram que ambos os anticorpos reconhecem moléculas homólogas na superfície dos tripanossomatídeos, embora o reconhecimento antígeno-anticorpo seja aproximadamente duas vezes maior em *T. cruzi* (Fig 20A).

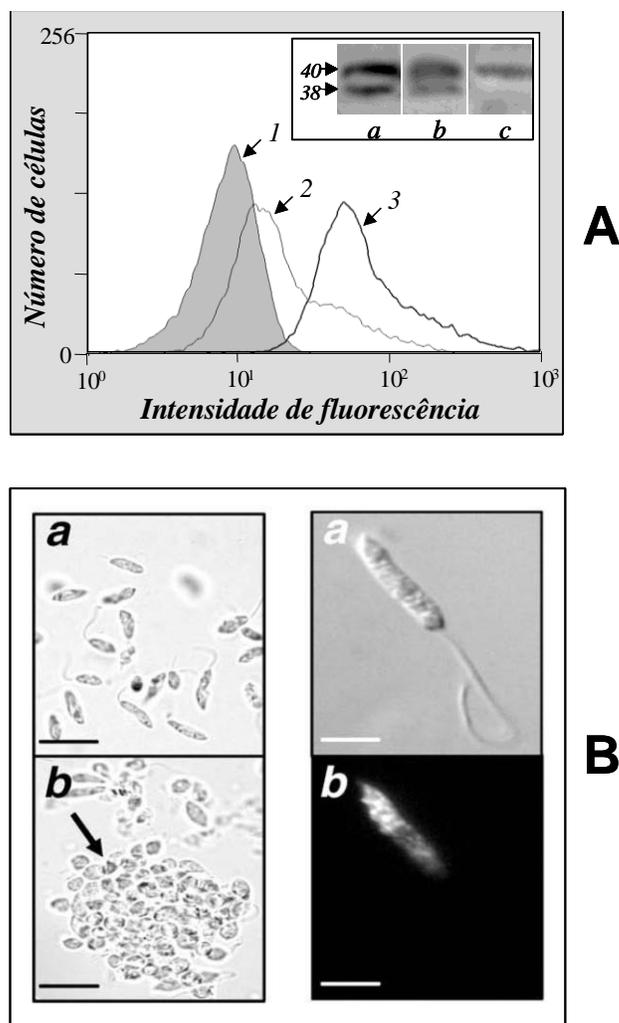
Para confirmar os dados obtidos até então através do uso de soro chagásico e anticorpo anti-cruzipaína, foi realizado um Western blotting com extratos celulares de *P. serpens* e *T. cruzi*, além do sobrenadante de *P. serpens*. O soro do paciente é capaz de reconhecer diversos

polipeptídeos de massas moleculares entre 50 e 15 kDa no extrato total de *P. serpens*, além de um polipeptídeo similar a molécula semelhante à cruzipaína, com aproximadamente 40 kDa, no conteúdo extracelular (Fig 20B).

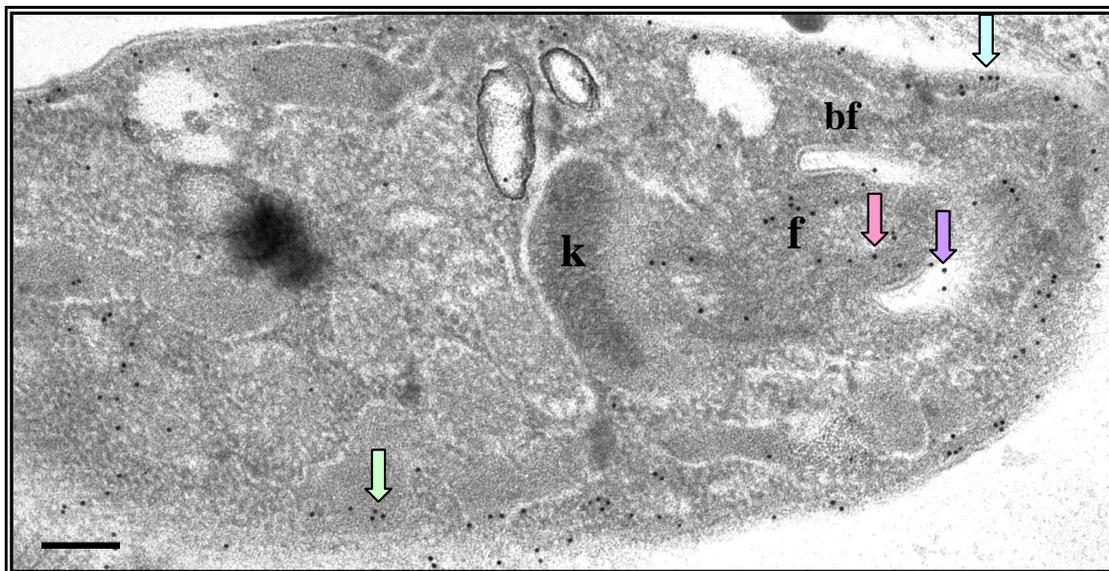
#### **4.12) Modulação da expressão de moléculas semelhantes à cruzipaína por diferentes substratos protéicos**

Já é sabido que compostos nitrogenados exógenos são capazes de modular a expressão de polipeptídeos e peptidases em diversos microrganismos. A partir do exposto, foram realizados diversos ensaios para avaliar a influência de distintos compostos protéicos na expressão de moléculas semelhantes à cruzipaína de superfície em *P. serpens*. Inicialmente, promastigotas vivos de *P. serpens* foram incubados durante 3 h em PBS-glucose suplementado com diferentes substratos protéicos, tais como: BSA, HSA, mucina, SFB, IgG, hemoglobina e concentrações crescentes de extrato natural de tomate (0,1–10%). As glândulas salivares íntegras de *O. fasciatus* (inseto fitófago) também foram utilizadas neste ensaio. Análises por citometria de fluxo, utilizando-se o anticorpo anti-cruzipaína, demonstraram que das proteínas utilizadas, apenas IgG e hemoglobina foram capazes de estimular a produção de moléculas semelhantes à cruzipaína na superfície de *P. serpens* (Fig 21A). Além disso, concentrações crescentes do extrato de tomate também estimularam a expressão destas moléculas de maneira dose-dependente (Fig 21B). Contrariamente, as glândulas salivares intactas de *O. fasciatus* não aumentaram, de forma significativa, a expressão dos homólogos de cruzipaína em *P. serpens* (Fig 21C).

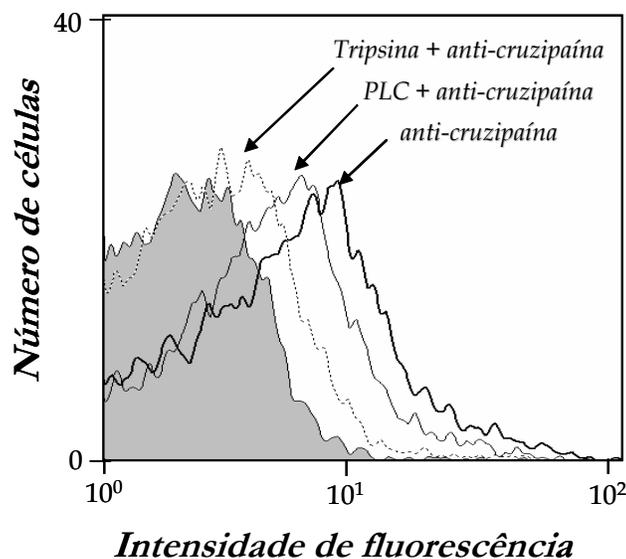
Para explorar por completo o ciclo deste flagelado, a expressão de moléculas similares à cruzipaína também foi analisada em parasitos recolhidos diretamente da hemolinfa de insetos fitófagos (*O. fasciatus*) previamente infectados com promastigotas vivos de *P. serpens*. Neste ensaio, a expressão destas cisteínas peptidases similares à cruzipaína foi comparada nos parasitos recolhidos da hemolinfa e de meio complexo de crescimento - BHI. Os resultados permitiram constatar que a passagem dos flagelados pela hemolinfa do inseto fitófago influenciou positivamente a expressão das moléculas semelhantes à cruzipaína: um aumento de aproximadamente oito vezes na expressão destas moléculas foi observado nos parasitos recolhidos da hemolinfa quando comparados àqueles cultivados em meio complexo (Fig 21C).



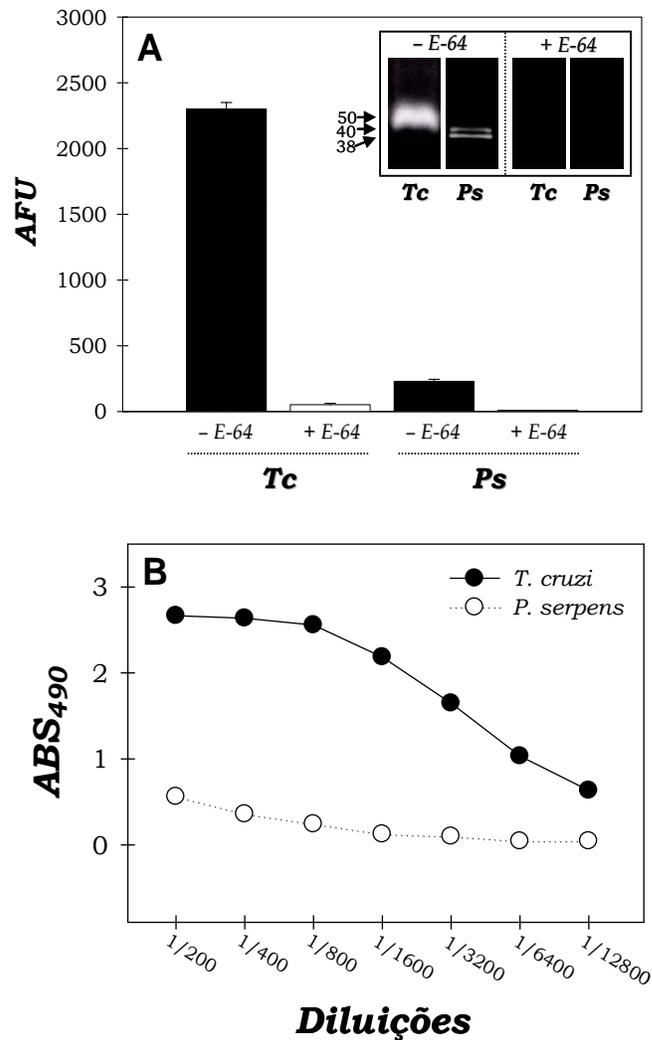
**Figura 15: Detecção de moléculas semelhantes à cruzipaina em *P. serpens*.** (A) As células fixadas com paraformaldeído foram permeabilizadas (3) ou não (1, 2) com Triton X-100 a 0,01% por 15 min. Estas células foram em seguida incubadas na ausência (1) e na presença (2, 3) de anticorpo anti-cruzipaina e analisadas através de citometria de fluxo. O inset indica o reconhecimento dos polipeptídios de *P. serpens* pelo anticorpo anti-cruzipaina através de Western blotting: (a) extrato total, (b) fração hidrofílica e (c) fração hidrofóbica após extração com Triton X-114. Os números à esquerda se referem às massas moleculares dos polipeptídios reativos. (B) Teste de aglutinação direta (quadros à esquerda) e imunofluorescência (quadros à direita) utilizando-se o anticorpo policlonal anti-cruzipaina. As células foram incubadas com soro pré-imune de coelho (a) e anticorpo anti-cruzipaina na diluição de 1:250 (b). Na análise de aglutinação direta, após a incubação com o anticorpo primário, os sistemas foram observados através de microscopia óptica. A seta preta em (b) indica a aglutinação dos parasitos pelo anticorpo anti-cruzipaina. Na análise de imunofluorescência, após a incubação com o anticorpo primário, os sistemas foram incubados com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína diluída a 1:400. Barra preta: 5  $\mu$ M. Barra branca: 1  $\mu$ M



**Figura 16: Localização imunocitoquímica das moléculas semelhantes à cruzipaina em células de *P. serpens*.** As seções dos parasitos foram inicialmente incubadas na presença do anticorpo anti-cruzipaina (1:50) e em seguida na presença de anticorpos conjugados a ouro coloidal. A marcação é evidente em compartimentos intracelulares (seta verde), flagelo (seta rosa), bolsa flagelar (seta roxa) e superfície do parasito (seta azul). Barra: 4  $\mu$ M. k - cinetoplasto. f- flagelo



**Figura 17: Detecção de uma possível âncora de GPI nas moléculas semelhantes à cruzipaína associadas a superfície de *P. serpens*.** Citometria de fluxo utilizando anticorpo anti-cruzipaína contra antígenos de *P. serpens* após tratamento dos parasitos com PLC e tripsina. Células fixadas em paraformaldeído 2% foram tratadas por 24 h a 37°C com tripsina (40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e PLC (2 U/ $\mu\text{L}$ ). Após a digestão enzimática, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo policlonal anti-cruzipaína (1:250) por 2 h. Em seguida, estas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína e analisadas através de citometria de fluxo. A curva cinza indica a autofluorescência das células.



**Figura 18: Comparação entre a atividade de cisteína peptidase detectada em epimastigotos de *T. cruzi* (*Tc*) e promastigotas de *P. serpens* (*Ps*).** (A) A atividade enzimática foi determinada quantitativamente através da hidrólise do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC a 20  $\mu$ M por lisados dos parasitos na ausência e na presença de E-64 a 1  $\mu$ M. Os resultados foram expressos através de unidades arbitrárias de fluorescência (UAF) e os valores representam médias de três experimentos independentes. O inset demonstra o perfil de peptidases observado em gelatina-SDS-PAGE. Os géis foram incubados a 37°C por 48 h em tampão fosfato, pH 5,0, suplementado com DTT a 2 mM na ausência e na presença de E-64 a 1  $\mu$ M. As massas moleculares, expressas em kDa, estão representadas na esquerda. (B) ELISA demonstrando o padrão de reatividade dos extratos celulares (5  $\mu$ g) de *P. serpens* e *T. cruzi* contra diluições seriadas do anticorpo anti-cruzipaína. Os resultados expressos no gráfico já foram descontados os valores de reatividade com soro pré-imune.

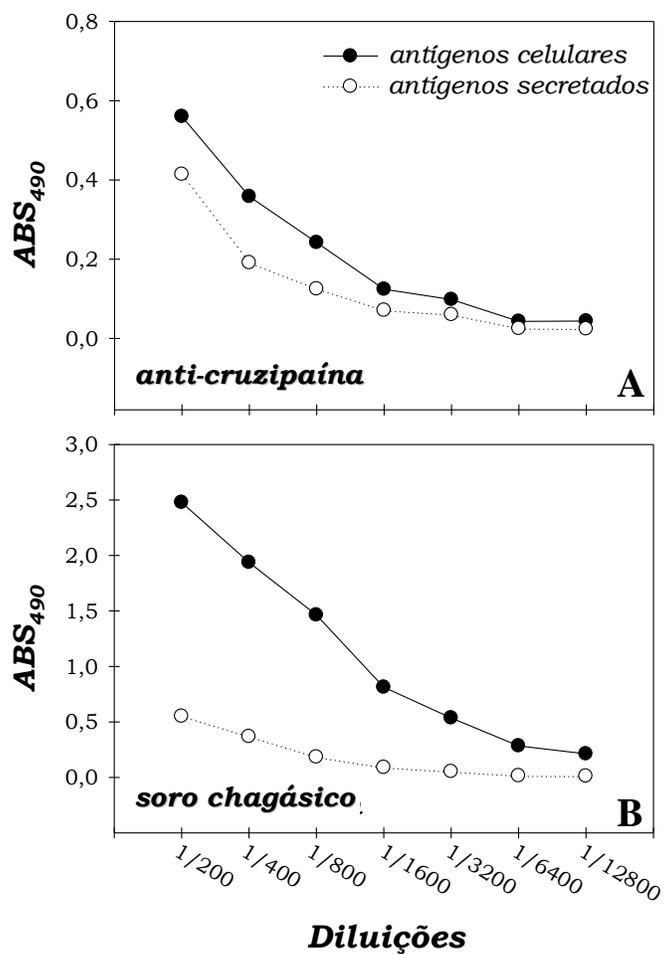
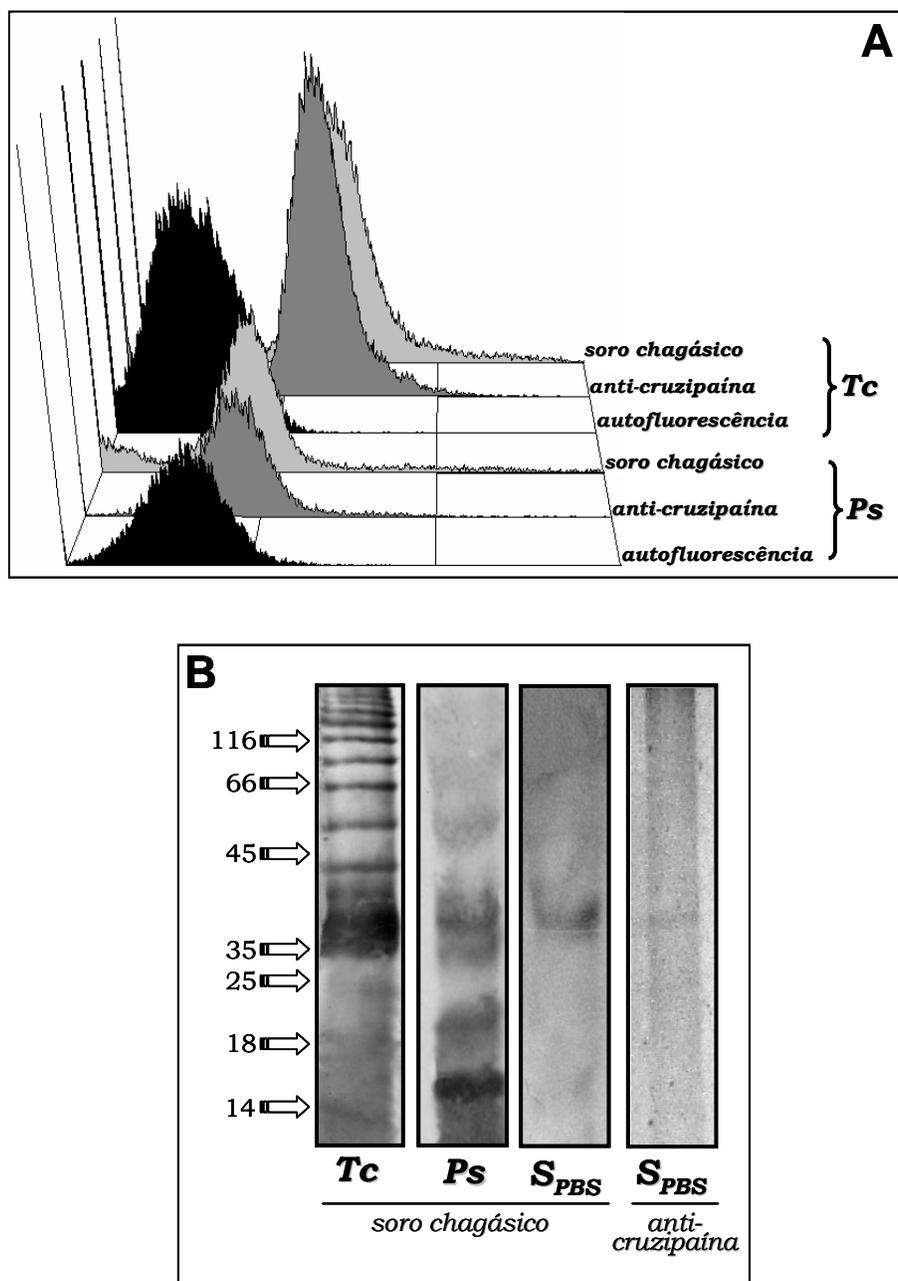
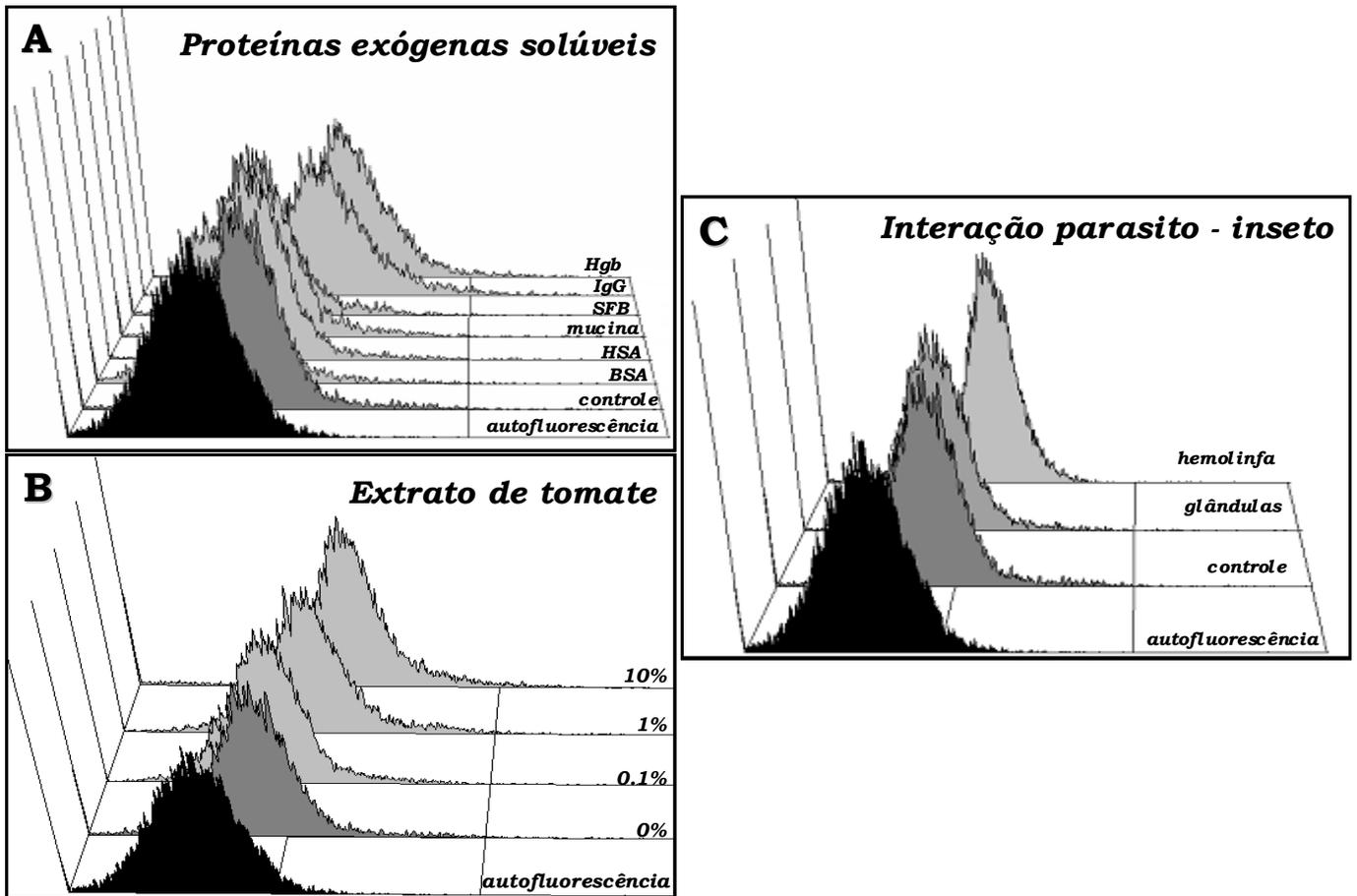


Figura 19: Expressão de moléculas semelhantes à cruzipaina em extrato celular e sobrenadante condicionado de *P. serpens*. ELISA demonstrando o padrão de reatividade dos extratos celulares e extracelulares (5 µg) de promastigotas de *P. serpens* contra diluições seriadas do anticorpo policlonal anti-cruzipaina ou soro de paciente chagásico. Os gráficos expressam resultados de absorbância obtidos com soro imune subtraídos dos resultados com soro não imune.



**Figura 20: Soro de pacientes chagásicos e anti-cruzipaína - reconhecimento de antígenos em *P. serpens* e *T. cruzi*.** (A) Citometria de fluxo demonstrando a ligação do anticorpo anti-cruzipaína e do soro de paciente chagásico na superfície de *P. serpens* (Ps) e *T. cruzi* (Tc). Os parasitos foram incubados na ausência (autofluorescência) ou na presença dos anticorpos, como descrito no material e métodos e analisados em citômetro de fluxo. (B) Western blotting demonstrando o perfil de polipeptídios reconhecidos pelo soro de paciente chagásico nos extratos celulares totais de *P. serpens* e *T. cruzi*, assim como no sobrenadante de *P. serpens* (S<sub>PBS</sub>). O sobrenadante condicionado de *P. serpens* foi também revelado utilizando-se o anticorpo anti-cruzipaína. Os números à esquerda indicam as massas moleculares aparentes, expressas em kilodalton.



**Figura 21: Modulação da expressão de moléculas semelhantes à cruzipaina por diferentes substratos protéicos. (A)** Citometria de fluxo demonstrando a ligação do anticorpo anti-cruzipaina à superfície de *P. serpens* após incubação dos parasitos vivos com diferentes compostos protéicos durante 3 h: hemoglobina (Hgb), imunoglobulina G (IgG), soro fetal bovino (SFB), mucina, soro albumina humana (HSA) e soro albumina bovina (BSA). **(B)** Os parasitos também foram incubados com concentrações crescentes de extrato natural de tomate (0,1–10%) e analisados através do citômetro de fluxo para determinar a expressão de moléculas semelhantes à cruzipaina. **(C)** Promastigotas de *P. serpens* foram incubados em PBS glucose 2% suplementado com glândulas salivares intactas de *O. fasciatus* e alternativamente inoculados neste inseto fitófago e recuperados da hemolinfa 4 dias após a infecção. Assim como descrito para os experimentos anteriores, a expressão de moléculas semelhantes à cruzipaina foi analisada através de citometria de fluxo.

### ➤ Parte III: Secreção de peptidases por *P. serpens*

#### 4.13) Liberação de cisteína peptidases semelhantes à cruzipaína por *P. serpens*

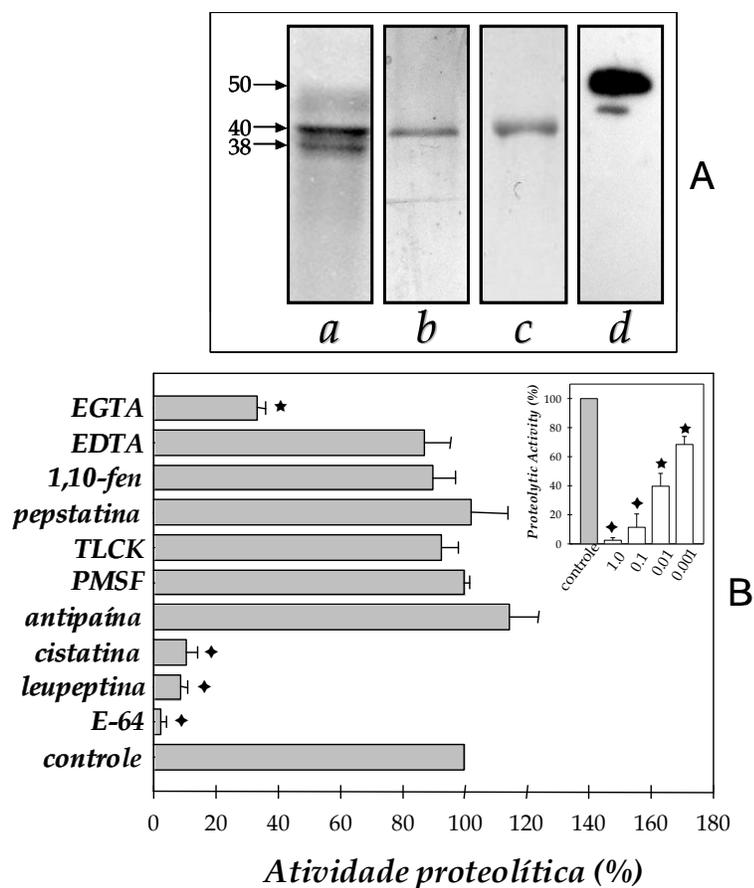
O item 4.7 descreveu o ensaio imunocitoquímico realizado com o anticorpo anti-cruzipaína e promastigotas de *P. serpens*. Este anticorpo foi capaz de reconhecer moléculas semelhantes à cruzipaína em toda a extensão da membrana plasmática, corpo celular, flagelo e compartimentos intracelulares, como observado na figura 16. Curiosamente, moléculas similares a cruzipaína também foram detectadas na bolsa flagelar, livres ou associadas a pequenas vesículas membranares, o que sugere a possível secreção destas moléculas para o meio extracelular. Com o objetivo de confirmar a liberação destas proteínas para o meio extracelular, foi realizado inicialmente um Western blotting utilizando-se o sobrenadante de cultura (BHI) concentrado obtido após crescimento de *P. serpens*. Os resultados demonstraram a presença de um polipeptídeo reativo de 40 kDa, encontrado também no extrato total e na fração de membrana deste parasito (Fig 22A). Em paralelo, para determinar se no extrato extracelular de *P. serpens* havia a atividade de cisteína peptidase, foi realizada uma dosagem química utilizando-se gelatina solúvel como substrato protéico. Inibidores específicos das quatro principais classes de peptidases foram utilizados neste ensaio para confirmar a natureza das enzimas liberadas por *P. serpens*. Os inibidores de cisteína peptidases testados (E-64, leupeptina e cistatina) foram capazes de reduzir significativamente a atividade proteolítica secretada detectada em relação ao controle. Já os inibidores utilizados contra as classes de metalo- (1,10-fenantrolina e EDTA), serina- (PMSF e TLCK) e aspártico- (pepstatina A) não modularam de forma significativa a atividade catalítica da peptidase extracelular, com exceção do EGTA (Fig 22B). O E-64, inibidor de cisteína peptidase, reduziu a atividade proteolítica secretada de forma dose-dependente (Fig 22B, inset).

#### 4.14) Degradação de diferentes substratos protéicos pelas enzimas proteolíticas extracelulares de *P. serpens*

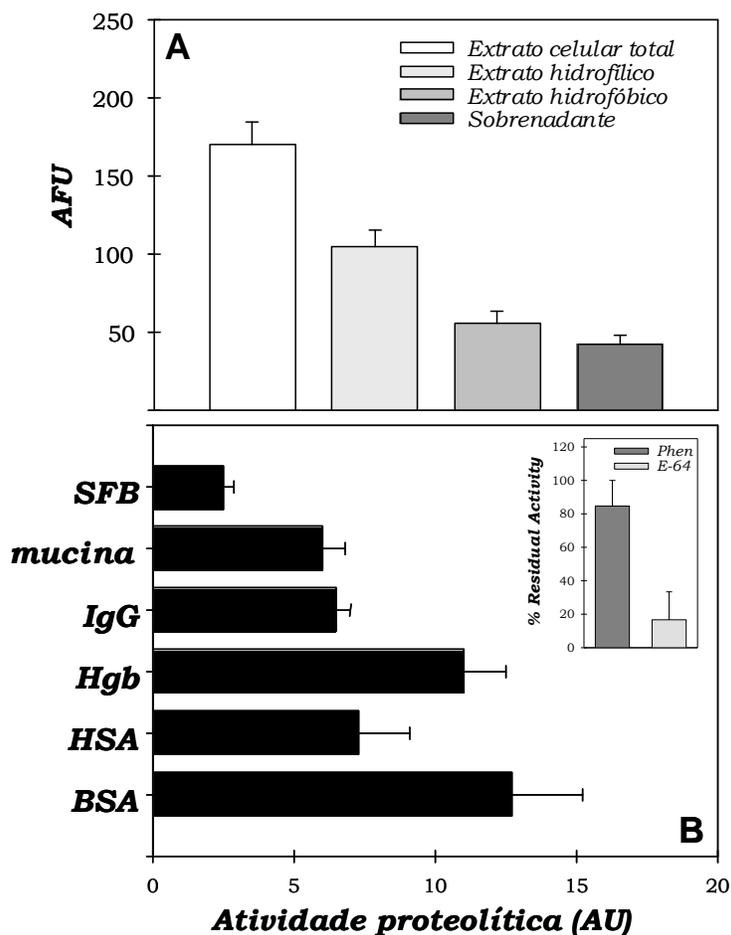
Como já comprovado através de vários ensaios descritos anteriormente, as cisteína peptidases similares à cruzipaína expressas por *P. serpens* estão distribuídas em vários compartimentos celulares deste parasito, o que inclui regiões citoplasmáticas e de membrana. Além disso, como descrito no item anterior, estas enzimas podem ser liberadas de forma ativa para o meio extracelular. No presente ensaio, a atividade de cisteína peptidase foi confirmada

através do uso de um substrato sintético específico. Para tanto, promastigotas de *P. serpens* foram submetidos à extração de membrana com Triton X-114; as frações obtidas e o sobrenadante condicionado (PBS-glucose) foram utilizados para quantificar a atividade proteolítica. A atividade de cisteína peptidase foi duas vezes maior quando quantificada em compartimentos citoplasmáticos quando comparados às regiões de membrana ou no sobrenadante (Fig 23A).

As cisteína peptidases associadas às células de *P. serpens*, citoplasmáticas ou de membrana, são capazes de degradar uma grande variedade de substratos protéicos, como já descrito anteriormente. Desta forma, com o objetivo de avaliar a capacidade hidrolítica das enzimas liberadas para o meio extracelular, o sobrenadante condicionado foi incubado com diferentes substratos protéicos na ausência e na presença de inibidores proteolíticos específicos. Os resultados indicaram que a cisteína peptidase extracelular é capaz de clivar BSA, HSA, hemoglobina, IgG, mucina e proteínas presentes no SFB. E-64 foi capaz de reduzir significativamente a atividade catalítica destas enzimas liberadas para o meio extracelular (Fig 23B).



**Figura 22: Liberação de cisteína peptidases semelhantes à cruzipaina por *P. serpens*.** (A) Western blotting demonstrando polipeptídeos semelhantes à cruzipaina detectados no extrato celular total (a), fração de membrana obtida após extração com Triton X-114 (b) e sobrenadante (c) de *P. serpens*. O extrato celular total de epimastigotos de *T. cruzi* foi utilizado como controle positivo (d). Os números à esquerda indicam as massas moleculares aparentes dos polipeptídeos reativos, expressas em kilodalton. (B) Análise quantitativa da atividade proteolítica extracelular de *P. serpens*. Neste experimento, o sobrenadante de cultivo foi tratado com diferentes inibidores proteolíticos: pepstatina A 1  $\mu$ M, E-64 1  $\mu$ M, leupeptina 1  $\mu$ M, cistatina 1  $\mu$ M, antipaina 1  $\mu$ M, PMSF 1 mM, TLCK 1 mM, 1,10-fenantrolina 1 mM, EDTA 1 mM e EGTA 1 mM. A gelatina foi então adicionada aos diferentes sistemas para incubação por 2 h a 37°C. Os resultados são expressos como porcentagem da atividade remanescente em relação ao controle sem inibidor. A atividade detectada no controle foi considerada 100%. Os valores representam médias de três experimentos diferentes realizados em triplicata. O inset demonstra o efeito de diferentes concentrações de E-64 na atividade extracelular de *P. serpens*. O sobrenadante utilizado neste ensaio estava livre de células, como confirmado através de dosagem química de malato desidrogenase (resultado não demonstrado).



**Figura 23: Análise quantitativa da atividade proteolítica em diferentes compartimentos celulares de *P. serpens*.** (A) Parasitos foram cultivados em BHI e lisados com adição de CHAPS para obtenção do extrato celular total. Alternativamente, parasitos foram submetidos à extração com Triton X-114 para obtenção de duas frações: hidrofílica (fração citoplasmática) e hidrofóbica (fração de membrana). A atividade proteolítica foi mensurada através da hidrólise do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC a 20  $\mu$ M pelos diferentes extratos do parasito. Os resultados são expressos através de unidades arbitrárias de fluorescência (AFU). (B) Clivagem de diferentes substratos protéicos pelas peptidases extracelulares de *P. serpens*. O sobrenadante de PBS-glucose condicionado foi incubado individualmente com soro albumina bovina (BSA), soro albumina humana (HSA), hemoglobina (Hgb), imunoglobulina G (IgG), soro fetal bovino (SFB) e mucina. Os resultados são expressos através de unidades arbitrárias de atividade proteolítica (AU). O inseto demonstra o efeito de E-64 e 1,10-fenantrolina sobre a atividade detectada no sobrenadante de *P. serpens*.

➤ **Parte IV: Interação *in vitro* entre *P. serpens* e tomates da espécie  
*Solanum lycopersicum***

**4.15) Perfil de proteínas e quantificação da atividade proteolítica em *P. serpens* cultivada em extrato natural de tomate**

Como já mencionado no início deste estudo, os perfis de proteínas e peptidases sintetizados por *P. serpens* têm sido pouco explorados em trabalhos bioquímicos que se referem a este parasito. Logo, a ausência de estudos relativos aos eventos bioquímicos envolvidos na interação *P. serpens*-*S. lycopersicum* (tomate) se torna um fato óbvio. Desta maneira, através de dosagens químicas de atividade proteolítica e de SDS-PAGE foram evidenciadas as proteínas e peptidases expressas por *P. serpens* quando cultivado em meio complexo suplementado com diferentes concentrações de extrato natural de tomate a 25 e 50 %.

A eletroforese, revelada através da coloração com Coomassie brilliant blue, demonstrou um perfil de polipeptídeos muito similar a células crescidas em BHI, independente da concentração do extrato natural de tomate (dados não mostrados). Além do perfil de proteínas, a expressão de enzimas proteolíticas em *P. serpens* também foi avaliada através de dosagens químicas de atividade proteolítica utilizando-se BSA como substrato protéico. Os resultados permitiram observar um aumento na expressão das cisteína peptidases produzidas por *P. serpens* de acordo com a concentração do extrato de tomate: parasitos crescidos em concentrações altas de extrato de tomate (50%) apresentam maior expressão destas enzimas quando comparado ao controle, isto é, flagelados crescidos na ausência de extrato de tomate. (Fig. 24).

**4.16) Detecção de moléculas semelhantes à cruzipaina**

Promastigotas de *P. serpens* são capazes de aumentar a expressão de moléculas semelhantes à cruzipaina quando em contato com extrato natural de tomate por apenas 3 h, como descrito no item 4.12. A partir deste resultado, com o objetivo de explorar adequadamente a relação *P. serpens*-*S. lycopersicum*, os parasitos foram cultivados em meio complexo (BHI) suplementado com diferentes concentrações de extrato filtrado de tomate durante 48 h. Em seguida, para determinar se as moléculas semelhantes à cruzipaina sofriam alguma modulação exercida pela presença do extrato do tomate no meio de cultura, os flagelados foram analisados através de citometria de fluxo utilizando-se o anticorpo anti-cruzipaina. Os resultados indicaram que concentrações crescentes de extrato de tomate aumentaram a expressão de moléculas

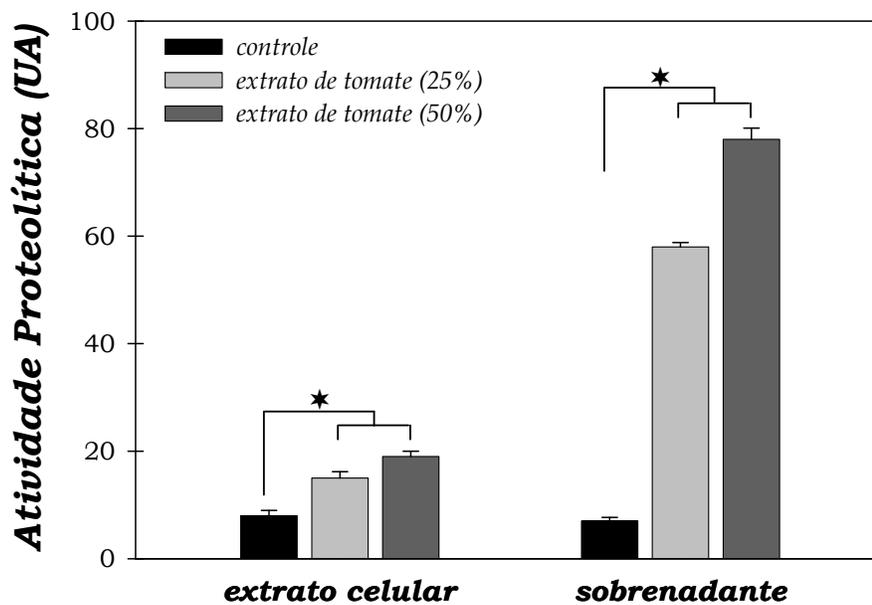
homólogas à cruzipaína na superfície do parasito, confirmando a existência de compostos importantes no conteúdo do tomate, capazes de modular a expressão de cisteína peptidases produzidas por *P. serpens* (Fig. 25).

#### **4.18) Infecção *in vitro* de tomates (*S. lycopersicum*): detecção de moléculas semelhantes à cruzipaína**

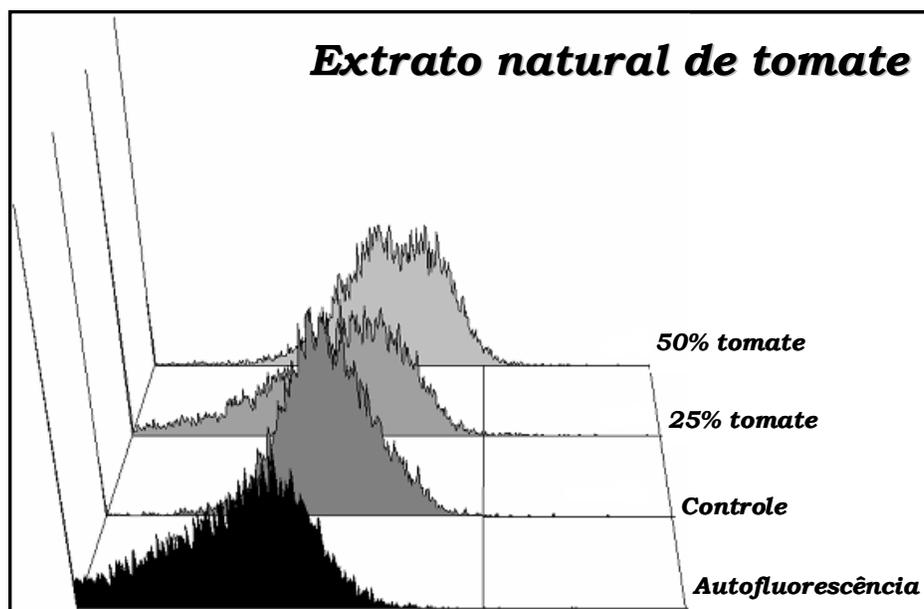
Promastigotas de *P. serpens* foram capazes de aumentar a expressão de moléculas semelhantes à cruzipaína quando em contato com extrato natural de tomate por apenas 3 h (item 4.12) e quando cultivados em meio complexo suplementado também com tomate por 48 h (item 4.17). Para que a análise da modulação exercida pela presença de compostos do tomate nas moléculas de *P. serpens* ficasse completa, foi realizado um novo ensaio: promastigotas foram inoculados diretamente no tomate, cultivados por sete dias e coletados para análise através de citometria de fluxo. Os resultados confirmaram os dados obtidos anteriormente, uma vez que os flagelados obtidos diretamente do tomate expressaram uma quantidade maior de moléculas semelhantes à cruzipaína quando comparados com parasitos controles, ou seja, cultivados somente em meio de cultura (Fig. 26).

#### **4.19) Identificação de receptor para *P. serpens* em *S. lycopersicum***

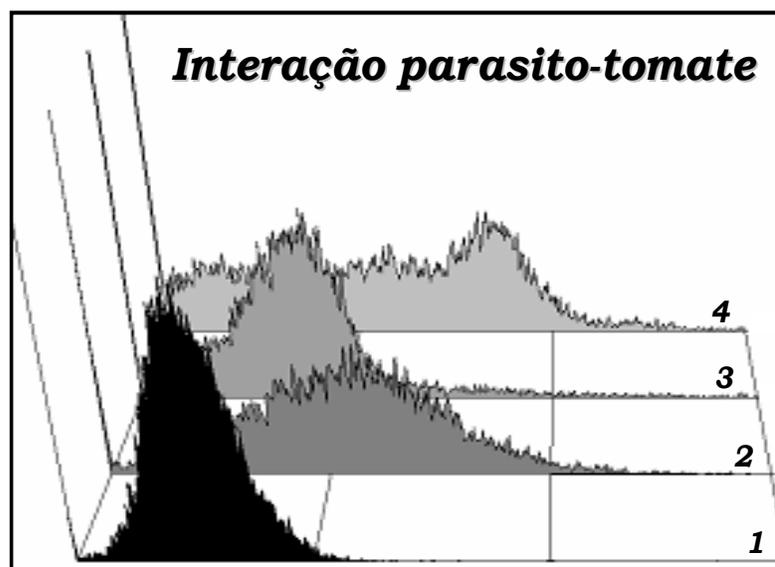
A interação observada entre *P. serpens* e *S. lycopersicum* despertou curiosidade. Assim, além de observar a modulação exercida pelos componentes presentes no tomate em relação à expressão de moléculas semelhantes à cruzipaína, foi realizado também um experimento para determinar a existência de um receptor protéico específico existente no tomate para ligação do parasito. Para tanto, o extrato protéico do tomate foi submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida para separação das proteínas; estas foram em seguida transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Paralelamente, promastigotas vivos de *P. serpens* foram biotinilados e colocados em contato com a membrana contendo o extrato de tomates. Os resultados foram evidenciados através de quimioluminescência utilizando avidina conjugada à peroxidase. Os flagelados foram capazes de se ligar a um receptor de aproximadamente 110 kDa. Curiosamente, o tratamento prévio dos flagelados com anti-cruzipaína foi capaz de reduzir em aproximadamente 50% a ligação destes parasitos ao receptor protéico do tomate, sugerindo participação das moléculas semelhantes à cruzipaína neste processo de interação (Fig. 27).



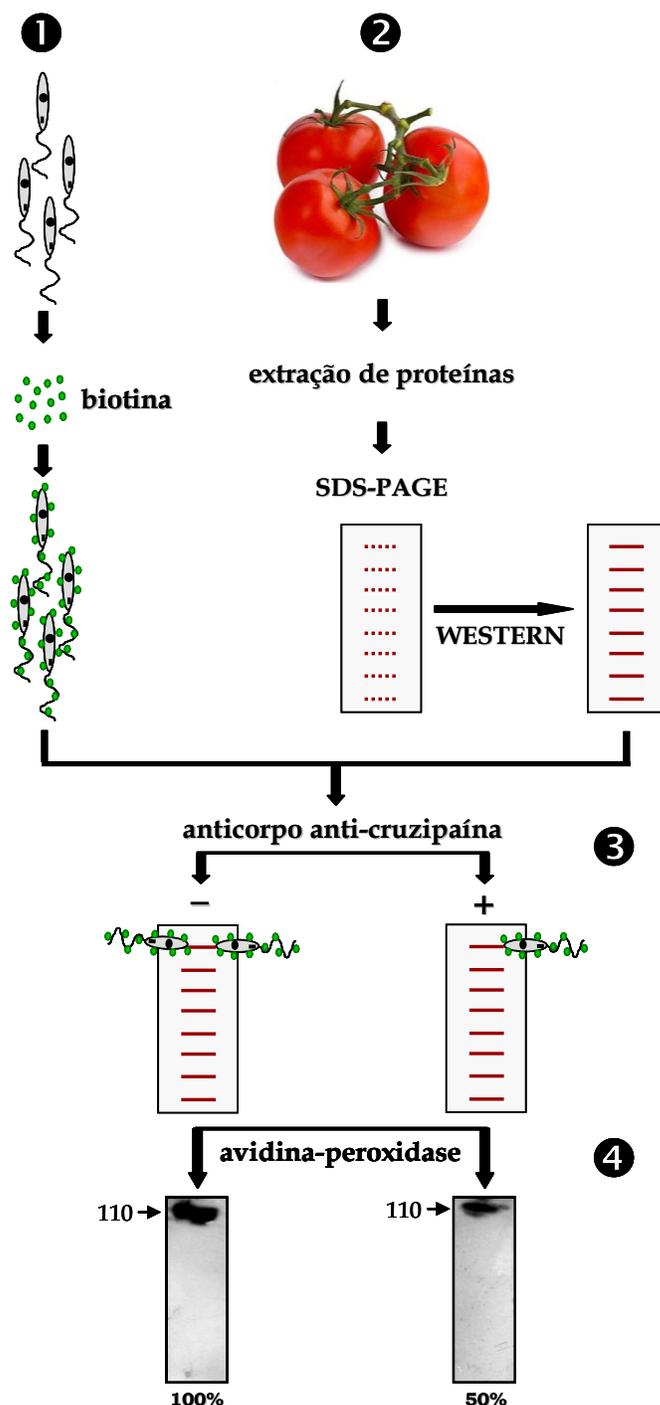
**Figura 24:** Quantificação da atividade proteolítica em *P. serpens* cultivada em extrato natural de tomate. Dosagem química da atividade proteolítica em *P. serpens* após crescimento em meio complexo (BHI) por 48 h na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações de extrato natural de tomate (25 e 50%). Os asteriscos indicam os valores em que a atividade proteolítica, expressa em unidades arbitrárias (UA), é diferente dos respectivos sistemas controle.



**Figura 25: Detecção de moléculas semelhantes à cruzipáina em *P. serpens* cultivada em extrato natural de tomate.** Citometria de fluxo demonstrando o perfil de ligação do anticorpo anti-cruzipáina à superfície de *P. serpens* após crescimento dos flagelados em meio complexo (BHI) por 48 h na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações de extrato natural de tomate (25 e 50%). Os parasitos foram coletados por centrifugação, lavados em PBS e incubados com anticorpo anti-cruzipáina por 2 h. Em seguida estes foram incubados com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína e observados através de citometria de fluxo. A autofluorescência corresponde aos parasitos tratados somente com anticorpo secundário.



**Figura 26: Infecção in vitro de tomates (*S. lycopersicum*) - detecção de moléculas semelhantes à cruzipaina.** Citometria de fluxo comparando o perfil de ligação do anticorpo anti-cruzipaina à superfície de *P. serpens* após crescimento dos flagelados por sete dias em tomate e em meio complexo (BHI). Os parasitos foram coletados, separados por centrifugação, lavados em PBS e incubados com anticorpo anti-cruzipaina por 2 h. Em seguida estes foram incubados com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína e observados através de citometria de fluxo. **(1)** Autofluorescência dos parasitos crescidos em BHI. **(2)** Ligação do anti-cruzipaina aos flagelados crescidos em BHI. **(3)** Autofluorescência dos parasitos crescidos em tomate. **(4)** Ligação do anti-cruzipaina aos flagelados crescidos em tomate.



**Figura 27: Identificação de receptor para *P. serpens* em *S. lycopersicum*.** Western blotting demonstrando a ligação de *P. serpens* a um receptor protéico de 110 kDa presente no extrato de tomate. **(1)** Os parasitos foram incubados com biotina durante 30 min a 4°C. Em paralelo, **(2)** tomates tipo salada foram macerados, suas proteínas foram extraídas, separadas através de SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose. **(3)** Os parasitos biotinizados vivos foram incubados na presença e na ausência do anticorpo anti-cruzipaína e colocados em contato com a membrana durante 3 h. **(4)** As membranas foram reveladas através de quimioluminescência e um receptor de 110 kDa foi observado, evidenciando a ligação de *P. serpens*-tomate. Os parasitos incubados previamente com anti-cruzipaína tiveram sua capacidade de ligação ao receptor reduzida em aproximadamente 50%.

# Discussão

## 5) DISCUSSÃO

Em 1909, o gênero *Phytomonas* foi criado para designar os tripanossomatídeos capazes de parasitar plantas; estes foram descobertos inicialmente em euforbiáceas e posteriormente detectados em uma grande variedade de vegetais. Alguns parasitos estão relacionados a patologias em plantas de grande importância econômica, tais como o café (DOLLET, 1984), coco (PARTHASARATHY, 1976), mandioca (ARAGÃO, 1927) e dendê (LOPEZ *et al.*, 1975). Os parasitos pertencentes ao gênero *Phytomonas* também podem ser encontrados infectando frutos comestíveis e sementes, como o tomate, laranja, goiaba, uva e milho (DOLLET, 1984; JANKEVICIUS *et al.*, 1993; CAMARGO, 1990; CAMARGO, 1999).

De um modo geral, as plantas apresentam diversos mecanismos de proteção contra microrganismos fitopatogênicos (JACKSON *et al.*, 1996; MALEK *et al.*, 1999; STOTZ *et al.*, 1999). Logo, para que parasitos de plantas atuem como patógenos em seus hospedeiros, os mecanismos de defesa devem ser superados. Os componentes mais importantes desses mecanismos são compostos protéicos, que se destacam como ferramentas eficazes de proteção apresentando ação antimicrobiana (ex: lectinas) ou atuando como inibidores de peptidases (FRITIG *et al.*, 1998; GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1998). Assim, a produção de enzimas proteolíticas representa uma das estratégias mais eficazes dos fitopatógenos contra os mecanismos de defesa das plantas. Através destas peptidases os parasitos adquirem o necessário para proliferação e conseguem ultrapassar as barreiras protetoras dos vegetais, pois podem clivar proteínas antimicrobianas e degradar componentes protéicos de parede celular (revisado por MOSOLOV, 2001, 2004).

Nesse contexto, é notável a importância do estudo de enzimas proteolíticas em microrganismos fitopatogênicos. Flagelados da espécie *P. serpens* são capazes de causar prejuízos em tomates (*Solanum lycopersicum*), alterando características morfológicas e provocando queda na qualidade desses frutos (PODLIPAEV, 1986). Desta maneira, tripanossomatídeos desta espécie podem potencialmente provocar prejuízos econômicos, o que ressalta a relevância do seu estudo. Além disso, parasitos da espécie *P. serpens* representam excelentes modelos para estudos bioquímicos e moleculares (CARVALHO *et al.*, 1993; TEIXEIRA *et al.*, 1997; FERNANDEZ-RAMOS *et al.*, 1999; VERMELHO *et al.*, 2003; PAPPAS *et al.*, 2005), uma vez que expressam similaridades descritas com tripanossomatídeos patogênicos para humanos (BREGANÓ *et al.*, 2003; D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006). Estes parasitos são também relevantes para estudos referentes a processos de interação parasito-inseto hospedeiro (DIAS, 2003).

Com base em todos os dados apresentados, se torna clara a relevância do estudo com *P. serpens*. Porém, existem poucos grupos de pesquisadores que dedicam seus trabalhos à caracterização bioquímica de moléculas expressas pelos flagelados dessa espécie. Logo, a caracterização bioquímica detalhada neste estudo procurou observar inicialmente a expressão de polipeptídios e enzimas proteolíticas, investigando algumas variantes que possivelmente provocariam modificações nestes perfis.

De uma maneira geral, os tripanossomatídeos promovem mudanças em seu metabolismo e organização celular para obter os nutrientes necessários à sua proliferação e sobrevivência. Como já mencionado anteriormente, as informações disponíveis sobre tais mudanças em tripanossomatídeos, especialmente em *P. serpens*, são extremamente escassas. No entanto, é sabido que algumas formas adaptativas utilizam aminoácidos presentes nos hospedeiros para obtenção de energia. Neste contexto, enzimas proteolíticas se destacam ao serem utilizadas pelos tripanossomatídeos para obtenção de aminoácidos, uma vez que são capazes de hidrolisar proteínas de forma eficaz. No entanto, a produção de peptidases em tripanossomatídeos está intimamente relacionada às condições de cultivo: a composição química do meio é um dos principais fatores que modulam a produção diferencial destas enzimas, como já descrito em diversos trabalhos (SANTOS *et al.*, 2001; NOGUEIRA DE MELO *et al.*, 2002, 2006; D'AVILA-LEVY *et al.*, 2005). Para avaliar se tal modulação também ocorria em *P. serpens*, os flagelados foram cultivados em diferentes meios durante 96 h e curvas de crescimento foram construídas a partir da contagem dos parasitos nesse período. A diferença de proliferação celular de acordo com os meios de cultivo foi notável, indicando a importância da composição química destes para a multiplicação dos flagelados. O meio Warren favoreceu intensamente o crescimento de *P. serpens*, enquanto o meio com extrato de levedura pareceu não apresentar os nutrientes adequados para uma proliferação abundante. Após análise das curvas de crescimento, polipeptídios foram extraídos dos tripanossomatídeos e analisados através de SDS-PAGE. Desta maneira, foi possível observar se ocorria síntese diferencial de proteínas e peptidases entre parasitos cultivados em meios distintos e parasitos em diferentes fases dos seus ciclos celulares. A análise dos zimogramas permitiu concluir que o perfil de proteínas e enzimas proteolíticas expresso por *P. serpens* independe da fase do ciclo celular na qual o parasito se encontra e não sofre modulações significativas quando os flagelados são cultivados em diferentes meios. A grande similaridade dos perfis de proteínas e enzimas proteolíticas associadas às células dos parasitos sugere alguma restrição metabólica, grande desvantagem para o parasito, uma vez que este é heteroxênico e

encontra ambientes muito distintos durante o seu ciclo de vida (GIBBS, 1957; JANKEVICIUS *et al.*, 1988; JANKEVICIUS *et al.*, 1989; FIORINI, 1993).

O perfil de proteínas apresentado pelas formas promastigotas de *P. serpens* é muito complexo e revela a expressão de polipeptídios com massas moleculares entre 15 e 250 kDa. Este perfil também permite a identificação de proteínas com expressão majoritária, que apresentam massas moleculares aparentes entre 25 e 85 kDa. Tamaña complexidade pode representar um fator compensatório perante a restrição metabólica detectada quando o parasito sofre mudanças de ambiente ou atravessa diferentes fases do seu ciclo celular. O perfil proteolítico é composto por duas bandas majoritárias de 38 e 40 kDa, detectadas através de SDS-PAGE-gelatina e analisadas através de densitometria. Esta análise permitiu a detecção de diferenças quantitativas sutis na expressão das peptidases nos quatro meios distintos: os meios BHI e Warren apresentaram halos de digestão mais fortes nos zimogramas, quando comparados ao EL e LIT. De maneira similar, *Crithidia guilhermei* também não apresenta alterações notáveis de perfil proteolítico quando cultivada em quatro diferentes meios (NOGUEIRA DE MELO *et al.*, 2002). Por outro lado, *Herpetomonas samuelpessoai*, *Herpetomonas megaseliae* e *Blastocrithidia culicis* sofrem modulações intensas de perfil enzimático quando o tempo de incubação ou a composição química do meio de cultivo são alterados (SANTOS *et al.*, 2003, D'AVILA-LEVY *et al.*, 2005, NOGUEIRA DE MELO *et al.*, 2006).

O efeito de inibidores na atividade proteolítica indica o tipo catalítico de uma peptidase. Deste modo, as duas enzimas associadas às células de *P. serpens* foram classificadas como cisteína peptidases, pois demonstraram susceptibilidade a inibidores específicos desta classe, como E-64, leupeptina e cistatina. Comumente, cisteína peptidases atuam com pH ótimo em valores próximos da neutralidade, embora algumas destas enzimas, como as lisossomais, sejam extremamente ativas também em pH ácido (RAO *et al.*, 1998). Através da análise dos zimogramas, notou-se uma peculiaridade em relação às cisteína peptidases expressas por este flagelado: estas atuam em ampla faixa de pH (3,0 – 9,0), com atividade ótima em pH ácido (5,0). Outra característica comum das cisteína peptidases é a relação de dependência entre a atividade catalítica e a presença de um agente redutor, como cisteína ou ácido cianídrico (HCN) (RAO *et al.*, 1998). A análise dos extratos celulares de *P. serpens* submetidos à SDS-PAGE-gelatina na presença e ausência de agentes redutores confirmou a dependência das cisteína peptidases expressas pelos flagelados em relação a tais agentes, como exemplo a L-cisteína e o DTT.

Em um vasto número de tripanossomatídeos, cisteína peptidases são freqüentemente detectadas em compartimentos citoplasmáticos ácidos, principalmente em lisossomos ou

organelas similares (SOUTO-PADRON *et al.*, 1990; BRANQUINHA *et al.*, 1996; CAZZULO *et al.*, 2001; SAJID & MCKERROW, 2002). Além da localização intracelular, as cisteína peptidases de flagelados também podem atuar com propriedades catalíticas quando associadas às superfícies das células. Análises ultraestruturais e métodos bioquímicos possibilitaram a caracterização de cisteína peptidases associadas às membranas celulares de *T. cruzi* (SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990; CAZZULO *et al.*, 2001) e outros tripanossomatídeos (MOTTRAM *et al.*, 2004, D'ÁVILA-LEVY *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2006). Através da extração de membrana com Triton X-114, as cisteína peptidases de 38 e 40 kDa produzidas por *P. serpens* foram detectadas na fração hidrofílica – correspondente à porção citoplasmática, enquanto apenas a enzima de 40 kDa foi também observada na fração hidrofóbica – correspondente à fração de membrana. Desta maneira, os resultados corroboraram os dados já descritos, uma vez que as cisteína peptidases de *P. serpens* foram encontradas majoritariamente em compartimentos intracelulares, porém também apresentaram atividade quando associadas a domínios de membrana.

A produção de enzimas proteolíticas para degradar barreiras do hospedeiro é uma estratégia comum utilizada pelos microrganismos para colonizar tecidos, provocar doenças e superar mecanismos de defesa. Dessa forma, quanto maior for a plasticidade destas enzimas, mais eficazes estas serão em processos de colonização do hospedeiro. Neste contexto, a capacidade hidrolítica das cisteína peptidases associadas às células de *P. serpens* foi avaliada, através de SDS-PAGE com diferentes compostos protéicos incorporados ao gel. Os resultados evidenciaram que as enzimas proteolíticas do parasito apresentaram amplo espectro de clivagem, sendo capazes de degradarem gelatina, albumina, caseína, hemoglobina, imunoglobulina, mucina e extrato das glândulas salivares de *O. fasciatus*. Esta ampla capacidade hidrolítica pode auxiliar os flagelados na obtenção dos aminoácidos necessários à nutrição e sobrevivência. Além disso, tamanha flexibilidade pode também ser útil para a degradação de peptídeos antimicrobianos produzidos por plantas, como já mencionado anteriormente (MOSOLOV, 2001). Alternativamente, estas enzimas podem atuar para superar os mecanismos de defesa do hospedeiro invertebrado, como o sistema profenoxidase (proPO). Este sistema é dependente da ativação de peptidases do inseto (AZAMBUJA *et al.*, 1999), que por sua vez podem ser degradadas pelas enzimas de *P. serpens*. Logo, o amplo espectro catalítico das peptidases expressas por este tripanossomatídeo pode ser uma ferramenta valiosa na quebra das barreiras de defesa de plantas/insetos. Além desta função hidrolítica de importância óbvia, as enzimas produzidas por *P. serpens* também podem ser úteis na interação parasito–hospedeiro invertebrado. Nosso grupo de pesquisa já sugeriu a importância destas moléculas em processos diretos de adesão entre parasitos e as glândulas salivares de *O.*

*fasciatus*, um inseto fitófago utilizado como modelo experimental (SANTOS *et al.*, 2006, 2007). Nos ensaios aqui demonstrados, as cisteína peptidases produzidas por promastigotas de *P. serpens* foram capazes de clivar ao menos um polipeptídio de 115 kDa localizado na superfície das glândulas salivares de *O. fasciatus*. Desta forma, sugere-se uma função indireta destas enzimas em processos de interação, uma vez que tais peptidases podem clivar receptores de superfície importantes, expondo epítomos essenciais para conexões celulares entre parasito e tecido hospedeiro.

Em 2003, BREGANÓ e colaboradores sugeriram a presença de antígenos comuns entre *P. serpens* e *T. cruzi*. De acordo com os dados apresentados por BREGANÓ e colaboradores, estes tripanossomatídeos, filogeneticamente distintos, compartilham moléculas antigênicas fortemente reconhecidas pelos soros de pacientes com doença de Chagas. Além disso, estes antígenos seriam capazes de induzir imunidade protetora em modelo murino (BALB/c). No presente estudo, a similaridade então descrita foi direcionada para as cisteína peptidases de *P. serpens* e a principal cisteína peptidase do *T. cruzi*, a cruzipaína. As características bioquímicas básicas da cruzipaína representam os primeiros indícios de semelhança: elevada atividade hidrolítica em pH ácido, exigência de agente redutor e perfil de inibição. Todos estes atributos podem também ser observados nas enzimas de *P. serpens*. Através do uso de anticorpos policlonais anti-cruzipaína, foram realizados testes de aglutinação direta e microscopia de fluorescência; estas técnicas revelaram os primeiros resultados que permitiam sugerir homologia entre as cisteínas peptidases de *P. serpens* e a cruzipaína do *T. cruzi*. Em seguida, para corroborar os dados iniciais, foi realizado um Western blotting testando as frações hidrofílica e hidrofóbica obtidas da lise dos parasitos com Triton X-114. As enzimas de 38 e 40 kDa reagiram com o anticorpo policlonal, indicando homologia tanto das peptidases localizadas em conteúdo citoplasmático quanto daquelas relacionadas a domínios de membrana. Os resultados da citometria de fluxo comprovaram esse dado e a distribuição destas enzimas homólogas a cruzipaína foi visualizada através de ensaios imunocitoquímicos. Estes permitiram a observação de moléculas semelhantes à cruzipaína em toda a extensão da membrana celular do parasito e em compartimentos intracelulares, além da marcação evidente do flagelo e da bolsa flagelar.

A presença de cisteína peptidases associadas à membrana plasmática de *T. cruzi* via âncora de GPI já foi sugerida por FRESNO e colaboradores (1994). No presente estudo, a via de ligação das moléculas semelhantes à cruzipaína em *P. serpens* também foi investigada. Para tanto, foi realizada uma citometria de fluxo utilizando anticorpo anti-cruzipaína em parasitos previamente tratados com PLC e tripsina. É importante ressaltar que a PLC cliva moléculas de superfície

ancoradas via GPI e a tripsina cliva moléculas protéicas presentes na membrana do parasito que apresentam na sua composição química resíduos carboxi-terminais de arginina ou lisina. Os resultados permitiram sugerir que as cisteína peptidases expressas pelo parasito são provavelmente ancoradas via GPI à membrana do parasito. A localização das cisteína peptidases e a interação com a membrana plasmática via âncora de GPI, características identificadas até então, acentuam a similaridade entre estas enzimas hidrolíticas de *P. serpens* e *T. cruzi*.

Moléculas semelhantes à cruzipaína não são encontradas somente em *P. serpens*: a presença de cisteína peptidases com similaridade imunológica com a cruzipaína de *T. cruzi* também já foi descrita em *Blastocrithidia culicis*, um tripanossomatídeo monoxênico que apresenta um endossimbionte bacteriano em seu citoplasma (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2005). Coletivamente, estes dados sugerem que a presença de moléculas homólogas à cruzipaína entre os membros da família Trypanosomatidae pode ser uma característica conservada ao longo da evolução. Este traço pode ser observado também com outra peptidase: a gp63 (MSP ou leishmanolisina), a principal metalopeptidase de *Leishmania*, pode ser observada em todos os tripanossomatídeos analisados até hoje, incluindo uma série de tripanossomatídeos monoxênicos, *Phytomonas* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006a, 2006b, revisado por Santos *et al.*, 2006b), *T. brucei* (LACOUNT *et al.*, 2003) e *T. cruzi* (CUEVAS *et al.*, 2003). Desta forma, embora proteínas semelhantes à cruzipaína tenham sido descritas apenas em *P. serpens* e *B. culicis*, é plausível supor que sejam encontradas em outros tripanossomatídeos, devido às suas semelhanças bioquímicas e metabólicas.

Esta grande semelhança encontrada entre os membros da família Trypanosomatidae é um reflexo óbvio da proximidade filogenética existente entre seus membros. Como já mencionado, é extremamente comum encontrar os mesmos antígenos em tripanossomatídeos distintos (BREGANÓ *et al.*, 2003; NOGUEIRA DE MELO *et al.*, 2006; D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006a; SANTOS *et al.*, 2006, 2007). Essa repetição de moléculas pode ser uma ferramenta valiosa para o desenvolvimento de drogas antiparasíticas ou métodos diagnósticos para doenças provocadas por estes microrganismos. Até então, as cisteína peptidases de *P. serpens* foram caracterizadas bioquimicamente e analisadas quanto à similaridade com a cruzipaína do *T. cruzi*. A partir dos dados obtidos, o presente estudo então focou nesta similaridade, tendo a cruzipaína como alvo principal de comparação entre os dois tripanossomatídeos, tendo em vista sua clara importância para ambos os ciclos celulares.

Inicialmente, a atividade de cisteína peptidase foi comparada entre *P. serpens* e *T. cruzi*, através do uso de um substrato sintético específico. As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram capazes de produzir cisteína peptidases com atividade catalítica dez vezes maior quando

comparada às enzimas produzidas por *P. serpens*. SDS-PAGE contendo gelatina como substrato protéico demonstrou a presença de uma cisteína peptidase majoritária de 50 kDa no extrato celular de *T. cruzi* e duas cisteína peptidases promovendo discretos halos de degradação em *P. serpens*. Como esperado, o ensaio de ELISA demonstrou que as cisteína peptidases foram reconhecidas pelo anticorpo anti-cruzipaína em títulos mais altos quando epimastigotas de *T. cruzi* são testados e comparados a promastigotas de *P. serpens*. Em seguida, com o objetivo de determinar se a cruzipaína estaria presente entre os antígenos totais compartilhados entre *P. serpens* e *T. cruzi*, novos ensaios foram realizados utilizando anticorpo anti-cruzipaína e o soro de um paciente com doença de Chagas. Os resultados indicaram que os antígenos celulares e extracelulares de *P. serpens* foram reconhecidos pelo soro chagásico, inclusive a molécula semelhante à cruzipaína de 40 kDa. A cruzipaína é uma proteína extremamente antigênica em indivíduos infectados com o *T. cruzi*, uma característica relevante para o desenvolvimento de vacinas contra doença de Chagas em humanos (SCHNAPP *et al.*, 2002). A maioria dos pacientes chagásicos apresenta anticorpos reativos contra a cruzipaína presentes em seus soros (SHARFSTEIN *et al.* 1986; MARTINEZ *et al.* 1991, 1993; GONZÁLEZ *et al.* 1996). A imunidade específica induzida por esta proteína independe da cepa do parasito e pode ser observada em pacientes de diversas regiões endêmicas. Além disso, as células T específicas para cruzipaína geradas em indivíduos infectados com *T. cruzi* são capazes de produzir IFN- $\gamma$  e não IL-4 (ARNHOLDT *et al.*, 1993), indicando que a cruzipaína induz resposta do tipo Th1, favorável ao hospedeiro. Outros dados sugerem que a imunização de BALB/c com cruzipaina é capaz de induzir proteção contra infecção de mucosa com *T. cruzi* (SCHNAPP *et al.*, 2002). Todas estas informações confirmam a importância desta molécula durante o curso da doença de Chagas.

O presente estudo descreve diversos ensaios para comprovar que o soro de pacientes com doença de Chagas é capaz de reconhecer um grande número de antígenos em *P. serpens*, incluindo a molécula semelhante à cruzipaína. Neste contexto, estes flagelados de plantas poderiam então ser utilizados como uma fonte alternativa de antígenos imunogênicos para doença de Chagas, inibindo a progressão e curso natural da infecção: a imunização oral com *P. serpens* em modelo murino, por exemplo, não induz processos inflamatórios no tecido do coração e reduz a quantidade de amastigotas presentes neste tecido (PINGE FILHO *et al.*, 2005). Alternativamente, este tripanossomatídeo não patogênico pode representar um modelo de vacinação contra infecção por *T. cruzi* (BREGANÓ *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2007). Estes protistas também podem ser utilizados como uma fonte de antígenos viável, segura, não infectiva e barata (LOPES *et al.*, 1981; BREGANÓ *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2007), facilitando o diagnóstico da doença

de Chagas, por exemplo. Várias tentativas já foram realizadas com o objetivo de estabelecer uma imunização confiável e eficaz utilizando o *T. cruzi*: parasitos vivos e mortos (PEREIRA *et al.*, 1990; KIERZENBAUM *et al.*, 1975), formas atenuadas (PAIVA *et al.*, 1999), frações subcelulares (RUIZ *et al.*, 1986), transferência de soro imune (KRETTLI *et al.*, 1982) e imunização genética (COSTA *et al.*, 1998). Todas apresentaram sucesso limitado. Desta maneira, fica clara a importância do estudo das relações *P. serpens*-*T. cruzi* e do uso dos antígenos deste flagelado de planta como uma alternativa imunogênica contra doença de Chagas, como por exemplo, funcionando como um adjuvante na formulação de novas vacinas.

As cisteína peptidases de *P. serpens* foram investigadas, caracterizadas bioquimicamente e identificadas como moléculas homólogas a cruzipaína de *T. cruzi*. Deste modo, uma nova etapa deste estudo foi averiguar a possibilidade de liberação das cisteína peptidases associadas às células de *P. serpens*. A secreção de moléculas para o meio extracelular pode ser um mecanismo adaptativo importante durante o ciclo de vida de um parasito. Metalopeptidases são as principais enzimas secretadas por *Leishmania* (YAO *et al.*, 2007) e por todos os tripanossomatídeos monoxênicos estudados até então (revisado por SANTOS *et al.*, 2006b), com exceção de *Crithidia deanei* e *Crithidia desouzai*, que também liberam cisteína peptidases para o meio extracelular (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2001). No presente estudo, a atividade de cisteína peptidase foi detectada no sobrenadante de cultivo de *P. serpens* através de uma dosagem química quantitativa utilizando a gelatina como substrato protéico. Esta atividade proteolítica extracelular foi fortemente reduzida por inibidores específicos de cisteína peptidase, como: E-64, cistatina e leupeptina. Através do uso de um substrato sintético específico, foi possível avaliar comparativamente a atividade de cisteína peptidase em diferentes compartimentos celulares de *P. serpens*: estas enzimas são evidenciadas em maiores quantidades em compartimentos intracelulares quando comparadas à fração de membrana ou sobrenadante de cultivo. Embora as peptidases liberadas tenham mantido sua capacidade hidrolítica ativa, uma vez que foram capazes de degradar diferentes compostos protéicos, a atividade detectada é duas vezes menor quando comparada às enzimas hidrofílicas. Além disso, para determinar a homologia com a cruzipaína destas enzimas liberadas, o sobrenadante de cultivo foi testado com o anticorpo anti-cruzipaína através de Western blotting. Um polipeptídeo reativo de 40 kDa foi detectado no sobrenadante; este também foi evidenciado na fração hidrofóbica e extrato celular total de *P. serpens*. Todos estes resultados confirmam dados anteriores que descreveram a presença de moléculas semelhantes à cruzipaína na bolsa flagelar do parasito, local a partir do qual moléculas são liberadas para o meio extracelular em tripanossomatídeos. Curiosamente, em *T. cruzi* o mesmo fenômeno pode ser observado:

tripomastigotas são capazes de secretar cisteína peptidases para o ambiente, incluindo a cruzipaína (YOKOYAMA-YASUNAKA *et al.*, 1994). Além disso, esta molécula também pode ser observada na bolsa flagelar do parasito (CAZZULO *et al.*, 1997, 2001).

Até então, as cisteína peptidases de *P. serpens* foram caracterizadas bioquimicamente, identificadas como moléculas homólogas a cruzipaína do *T. cruzi* e estudadas quanto a sua secreção para o meio extracelular. *P. serpens* é um flagelado heteroxênico, capaz de encontrar ambientes extremamente distintos durante seu ciclo de vida, como já extensivamente descrito no presente estudo. Desta forma, a etapa seguinte deste estudo foi avaliar o comportamento destas cisteína peptidases homólogas à cruzipaína frente a diferenças de ambiente. Para tanto, os flagelados foram incubados com diferentes substratos protéicos e a expressão das moléculas semelhantes à cruzipaína foi avaliada através de citometria de fluxo. Os resultados indicam que alguns compostos protéicos, tais como hemoglobina e IgG, foram capazes de aumentar significativamente a expressão de cisteína peptidases na superfície de *P. serpens*, fenômeno que também ocorre com parasitos incubados com concentrações crescentes de extrato de tomate ou retirados diretamente da hemolinfa de *O. fasciatus*. Estes dados sugerem que os distintos ambientes encontrados por *P. serpens* durante seu ciclo celular – tomates e hemolinfa de insetos – promovem notáveis alterações na maquinaria celular deste flagelado, o que sugere novamente a importância das moléculas semelhantes à cruzipaína em processos de interação parasito-hospedeiro. O aumento da expressão destes homólogos frente à IgG e hemoglobina remetem à similaridade com a cruzipaína e a conservação destas moléculas na família Trypanosomatidae, uma vez que *P. serpens* não encontra naturalmente estas proteínas durante seu ciclo de vida.

O aumento da expressão de cisteína peptidases de superfície promovido pela presença de extrato natural de tomate despertou interesse suficiente para levar o presente trabalho a uma nova etapa: estabelecer o cultivo de *P. serpens* em extrato natural de tomate e avaliar o comportamento das enzimas nestas condições. O flagelado é capaz de crescer em meio complexo (BHI) com até 50% de extrato natural de tomate. Através de dosagem química quantitativa utilizando BSA como substrato protéico, foi possível observar que a expressão de cisteína peptidases aumenta em parasitos cultivados com altas concentrações de extrato de tomate, de forma dose-dependente. Este resultado reflete na presença de moléculas semelhantes à cruzipaína na superfície de *P. serpens*: flagelados cultivados com 50% de tomate apresentam quantidade significativamente maior destes homólogos quando comparados a parasitos cultivados somente em meio complexo. O aumento na expressão de proteínas semelhantes à cruzipaína também pôde ser observado na interação direta *P. serpens*-*S. lycopersicum* (tomate). O cultivo dos flagelados em

tomates maduros promoveu uma expressão de cisteínas peptidases de superfície duas vezes maior quando comparada a parasitos cultivados somente em BHI, dado obtido através de citometria de fluxo utilizando o anticorpo anti-cruzipaína. A partir destes dados, o último passo destes ensaios foi determinar a presença de um ligante no tomate para *P. serpens*, comprovando diretamente a importância das cisteína peptidases na relação deste flagelado com seu hospedeiro vegetal e justificando seu aumento durante os processos de interação. Os resultados demonstraram um polipeptídeo de 110 kDa presente no extrato protéico do tomate que se liga a *P. serpens*. A pré-incubação dos flagelados com anticorpo anti-cruzipaína reduziu significativamente a capacidade de reconhecimento deste polipeptídeo, demonstrando a participação de epítomos presentes nas moléculas semelhantes à cruzipaína no processo de interação ligante-receptor. Coletivamente, todos os dados tornaram notável a participação das moléculas semelhantes à cruzipaína para crescimento de *P. serpens* e interação com o hospedeiro *S. lycopersicum*.

As funções biológicas das peptidases em tripanossomatídeos de plantas são pouco conhecidas. Este estudo fornece alguns dados relevantes sobre enzimas proteolíticas de *P. serpens*, um flagelado importante enquanto parasito de frutos e excelente modelo de estudo dentro da família Trypanosomatidae. As similaridades descritas com o *T. cruzi* ratificam a importância de estudar parasitos desta espécie, uma vez que estes são capazes de induzir imunidade protetora contra a doença de Chagas. Nesse contexto, os dados apresentados se mostram relevantes, abrindo novas janelas para estudos futuros.

# Conclusões

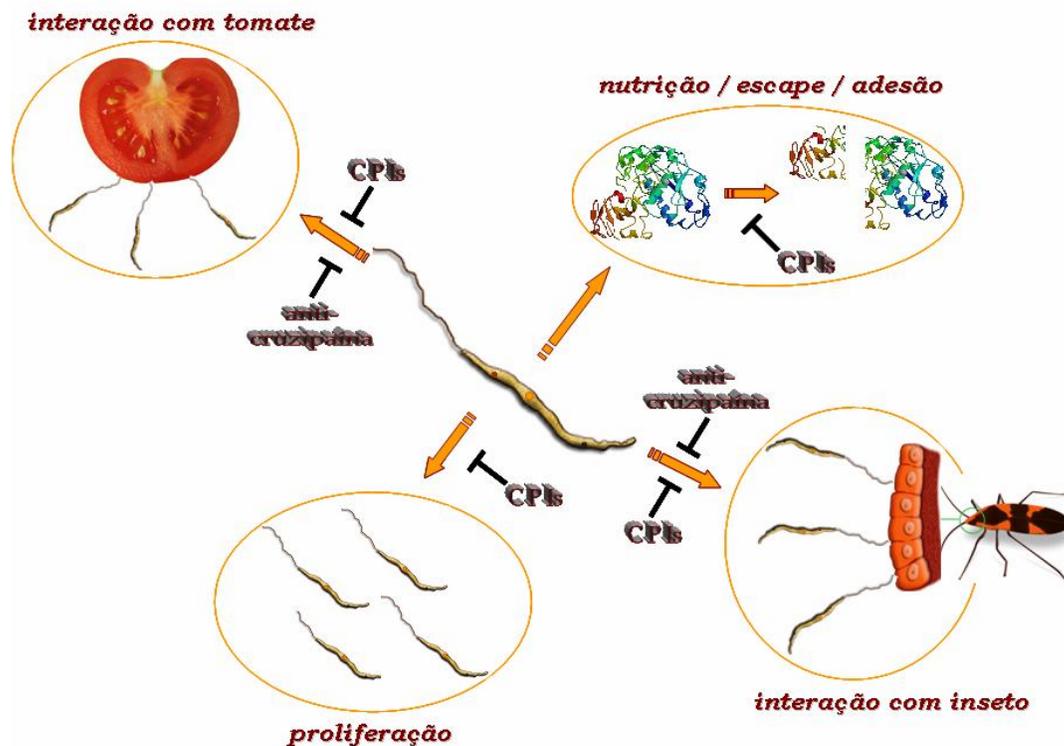
## 6) CONCLUSÕES

- I. *P. serpens* produziu essencialmente duas peptidases citoplasmáticas, ativas em pH ácido, com massas moleculares aparentes de 38 e 40 kDa. Estas enzimas foram fortemente inibidas por E-64, leupeptina e cistatina, inibidores específicos de cisteína peptidases. Além disso, as cisteína peptidases de *P. serpens* mostraram-se dependentes de agentes redutores, apresentaram um amplo espectro catalítico e foram capazes de clivar antígenos de superfície presentes na glândula salivar de *Oncopeltus fasciatus*, em especial um polipeptídeo de 115 kDa. A peptidase de 40 kDa foi também detectada na superfície celular deste fitoflagelado, associada à membrana citoplasmática via uma âncora de GPI.
- II. Os perfis de proteínas e peptidases não sofreram alterações marcantes no que tange sua composição qualitativa, mas sim quantitativa, quando promastigotas de *P. serpens* foram cultivados em quatro diferentes meios de cultura, independentemente da fase de crescimento.
- III. As cisteína peptidases de *P. serpens* apresentaram reatividade imunológica cruzada com a cruzipaína de *T. cruzi* e com soro de paciente chagásico, como comprovado através de ELISA, Western blotting, citometria de fluxo e imunofluorescência. Além disso, proteínas exógenas, tais como: hemoglobina e IgG, foram capazes de estimular a expressão de moléculas similares à cruzipaína na superfície de *P. serpens*.
- IV. A cisteína peptidase de 40 kDa produzida por *P. serpens* foi detectada numa forma cataliticamente ativa no conteúdo extracelular, sendo capaz de degradar um amplo espectro de substratos protéicos.
- V. As cisteína peptidases de *P. serpens* estão envolvidas em processos de interação entre o parasito e *S. lycopersicum* (tomate), seu hospedeiro natural. A presença de

extrato bruto de tomate foi capaz de estimular a expressão destas enzimas homólogas à cruzipaina. Além disso, estas moléculas também parecem ter importância na adesão dos flagelados a proteínas presentes no tomate, com ênfase a um polipeptídeo de 110 kDa reconhecido pelos parasitos vivos.

VI. As cisteínas peptidases de *P. serpens* parecem ter importância também na interação com o hospedeiro invertebrado, uma vez que tiveram suas expressões aumentadas, após infecção dos parasitos no inseto fitófago *O. fasciatus*.

A figura 28 resume a importância e enfatiza as possíveis funções das cisteína peptidases de *P. serpens*.



**Figura 28: Possíveis funções das cisteínas peptidase de *P. serpens*.** Promastigotas de *P. serpens* produzem duas principais cisteínas peptidases de 38 e 40 kDa, que apresentam similaridades imunológicas e bioquímicas com a cruzipaina. Estas enzimas: (a) degradam diferentes compostos protéicos gerando um aporte de aminoácidos para a nutrição do parasito, (b) devido seu amplo espectro de ação, podem clivar proteínas importantes geradas durante a resposta imune dos hospedeiros, bem como proteínas presentes na superfície celular da glândula salivar do inseto fitófago e proteínas presentes no tomate e (c) participam da proliferação celular. Em contrapartida, inibidores de cisteína peptidases (CPIs) e anticorpos anti-cruzipaina são capazes de inibir estes processos biológicos relevantes ao desenvolvimento destes fitoflagelados.

# Referências Bibliográficas

## 7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, J., COOMBS, G.H. & MOTTRAM, J.C. 1998. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J. Immunol.* **161**: 6794-6801.
- ALFIERI, S.C.; BALANCO, J.M.F. & PRAL, E.M.F. 1995. A radioiodinated peptidyl diazomethane detects similar cysteine proteinases in amastigotes and promastigotes of *Leishmania (L.) mexicana* and *L. (L.) amazonensis*. *Parasitol. Res.* **81**: 240-244.
- ALMEIDA, F.V.S., GIOVANNI-DE-SIMONE, S., BRANQUINHA, M.H. & VERMELHO, A.B. 2003. Extracellular metalloproteinase activity in *Phytomonas françai*. *Parasitol. Res.* **89**: 320-322.
- ARAGÃO, H.B. 1927. Sur on flagellé du látex de *Manihot palmata*, *Phytomonas françai*. n. sp. *Comp. R. S. Soc. Biol.* **97**: 1077-1080.
- ARNHOLDT, A.C.V., PIUVEZAM, M.R. & RUSSO, D.M. 1993. Analysis and partial epitope mapping of human T cell responses to *Trypanosoma cruzi* cysteinyl proteinase. *J. Immunol.* **151**: 3171.
- AUTHIÉ, E., DUVALLET, G., ROBERTSON, C. & WILLIAMS, D. J. L. 1993. Antibody response to a 33 kDa cysteine protease of *Trypanosoma congolense*: relationship to 'trypanotolerance' in cattle. *Parasite Immunol.* **15**: 465-474.
- AZAMBUJA, P., FEDER, D., MELLO, C.B., GOMES, S.A.O. & GARCIA, E.S. 1999. Immunity in *Rhodnius prolixus*: trypanosomatid-vector interactions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **94**: 219-222.
- BARRETT, A.J. 1986. An introduction to the proteinases. In: Barret, A.J. & Salvesen. G., eds. *Proteinase Inhibitors*. Amsterdam Elsevier Science, pp. 3-22.
- BARRETT, A.J. 1995. Proteolytic enzymes: aspartic and metallopeptidases. *Methods Enzymol.* **248**: 183.
- BARRETT, A.J., 1994. Classification of peptidases. *Methods Enzymol.* **244**: 1-15.
- BARRETT, A.J., 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* **244**: 1-15.
- BARRETT, A.J., RAWLINGS, N.D. & O'BRIEN, E.A. 2001. The MEROPS database as a protease information system. *J. Struct. Biol.* **134**: 95-102.
- BARRETT, A.J., TOLLE, D.P. & RAWLINGS, N.D. 2003. Managing peptidases in the genomic era. *Biol. Chem.* **384**: 873-882.

- BATES, P.A., ROBERTSON, C.D. & COOMBS, G.H. 1994. Expression of cysteine proteinases by metacyclic promastigotes of *Leishmania mexicana*. J. Eukaryot. Microbiol. **41**: 199-203.
- BEZERRA, J.L. & DE FIGUEREDO, J.M. 1982. Ocorrência de *Phytomonas staheli* Mcghee & Mcghee em coqueiro (*Cocos nucifera* L.) no estado da Bahia, Brasil. Fitopatol. Bras. **7**: 139-143.
- BOND, J.S. & BUTLER, P.E. 1987. Intracellular proteases. Annu. Rev. Biochem. **56**: 333-364.
- BORDIER, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solutions. J. Biol. Chem. **256**: 1604-1607.
- BRANDÃO, A.A., MIRANDA, A., DEGRAVE, W.M & SOUSA, M.A. 2000. The heterogenicity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analysed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. Parasitol. Res. **86**: 336-341.
- BRANQUINHA, M.H.; VERMELHO, A.B.; GOLDENBERG, S. & BONALDO, M.C. 1996. Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase in a wide range of trypanosomatids. J. Eukaryot. Microbiol. **43**: 131-135.
- BREGANÓ, J.W., PICÃO, R.C., GRAÇA, V.K., MENOLLI, R.A, JANKEVICIUS, S.I, PINGE FILHO & P. JANKEVICIUS, J.V. 2003. *Phytomonas serpens*, a tomato parasite, shares antigens with *Trypanosoma cruzi* that are recognized by human sera and induce protective immunity in mice. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **39**: 257-264.
- BRITTINGHAM, A., CHEN, G., MCGWIRE, B.S., CHANG, K.P & MOSSER, D.M. 1999. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellula receptors for fibronectin. Infect. Immun. **67**: 4477-4484.
- BUROKER-KILGORE, M. & WANG, K.K. 1993. A Coomassie brilliant blue G-250-based colorimetric assay for measuring activity of calpain and other proteases. Anal. Biochem. **208**: 387-392.
- CAMARGO, E.P. 1999. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. Adv. Parasitol. **42**: 29-112.
- CAMARGO, E.P., & WALLACE, F.G. 1994. Vectors of plant parasites of the genus *Phytomonas* (Protozoa, Zoomastigophorea, Kinetoplastida) In: Advances in disease vector research. Springer-Verlag Inc. New York. Vol. X. pp. 333-359.
- CAMARGO, E.P., KASTELEIN, P. & ROITMAN, I. 1990. Trypanosomatid parasites of plants (*Phytomonas*). Parasitol. Today. **6**: 22-25.
- CAMPETELLA, O., HENRIKSSON, J., ASLUND, L., FRASCH, A.C.G., PETTERSON, U. & CAZZULO, J.J. 1992. The major cysteine proteinase (cruzipain) from the *Trypanosoma cruzi* is

- encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **50**: 225-234.
- CARDOSO DE ALMEIDA, M.L. & HEISE, N. 1993. Proteins anchored via glycosylphosphatidylinositol and solubilizing phospholipases in *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Res.* **26**: 285-312.
- CARDOSO DE ALMEIDA, M.L. & TURNER, M.J. 1983. The membrane form of variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. *Nature.* **302**: 349-352.
- CARVALHO, S.D.; PEREZ-MORGA, D. & TRAUB-CSEKO, Y.M. 1993. Characterization of kinetoplast DNA from *Phytomonas serpens*. *J Eucaryot. Microbiol.* **40**: 317-322.
- CAZZULO, J.J., CAZZULO FRANKE, M.C., MARTINEZ, J. & FRANKE DE CAZZULO, B.M. 1990. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1037**: 186-191.
- CAZZULO, J.J., STOKA, V. & TURK, V. 1997. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol. Chem.* **378**: 1-10.
- CAZZULO, J.J., STOKA, V. & TURK, V. 2001. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.* **7**: 1143-1156.
- CHANG, C.S. & CHANG, K.P. 1986. Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of *Leishmania*-macrophages binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 100-104.
- CHEN, D.Q., KOLLI, B.K., YADAVA, N., LU, H.G., GILMAN-SACHS, A. & PETERSON, D.A. 2000. Episomal expression of specific sense and antisense mRNA in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes *in vitro*. *Infect. Immun.* **68**: 80-86.
- CHICARRO, C. ALVAR, J. 2003. Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients. *Annu. Trop. Med. Parasitol.* **97**: 75-78.
- CLAYTON, C., HANSLER, T. & BLATTNER, J. 1995. Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. *Microbiol. Rev.* **59**: 325-344.
- COSTA, F., FRANCHIN, G., PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L., RIBEIRAO, M., SCHENKMAN, S. & RODRIGUES, M.M. 1998. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of *trans*-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine.* **16**: 768-774.
- CUEVAS, I.C., CAZZULO, J.J. & SANCHEZ, D.O. 2003. gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in the host cell infection. *Infect. Immun.* **71**: 5739-5749.

- CUNHA, M., GOMES, V.M., XAVIER-FILHO, J., ATTIAS, M., DE SOUZA, W., MIGUENS, F.C. 2000. The laticifer system of *Chamaesyce thymifolia*: a closed host environment for plant trypanosomatids. *Biocell*. **24**: 123-132.
- D'AVILA-LEVY, C.M., NOGUEIRA DE MELO, A.C., VERMELHO, A.B. & BRANQUINHA, M.H. 2001. Differential expression of proteolytic enzymes in endosymbiont-harboring *Crithidia* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**: 73-77.
- D'AVILA-LEVY, C., SOUZA R.S., GOMES, R.C., VERMELHO, A.B. & BRANQUINHA, M.H. A novel extracellular calcium-dependent cysteine proteinase from *Crithidia deanei*. 2003. *Arch. Biochem. Biophys.* **420**: 1-8.
- D'AVILA-LEVY, C.M., ARAUJO, F.M., VERMELHO, A.B., BRANQUINHA, M.H., ALVIANO, C.S., SOARES, R.M.A. & SANTOS, A.L.S. 2004. Differential lectin recognition of glycoproteins in choanomastigote-shaped trypanosomatids: taxonomic implications. *FEMS Microbiol. Lett.* **231**: 171-176.
- D'AVILA-LEVY, C.M., ARAÚJO, F.M., VERMELHO, A.B., SOARES, R.M.A., SANTOS, A.L.S. & BRANQUINHA, M.H. 2005. Proteolytic expression in *Blastocrithidia culicis*: influence of the endosymbiont and similarities with virulence factors of pathogenic trypanosomatids. *Parasitology* **130**: 413-420.
- D'AVILA-LEVY, C.M., DIAS, F.A., NOGUEIRA DE MELO, A.C., MARTINS, J.L., LOPES, A.H.C.S., SANTOS, A.L.S., VERMELHO, A.B. & BRANQUINHA, M.H. 2006a. Insights into the role of gp63-like proteins in lower trypanosomatids. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**: 149-156.
- D'AVILA-LEVY, C.M., SANTOS, L.O., MARINHO, F.A., DIAS, F.A., LOPES, A.H.C.S., SANTOS, A.L.S. & BRANQUINHA, M.H. 2006b. gp63-like molecules in *Phytomonas serpens*: possible role in the insect interaction. *Curr. Microbiol.* **52**: 439-444.
- D'AVILA-LEVY, C.M., SOUZA, R.F., GOMES, R.C., VERMELHO, A.B. & BRANQUINHA, M.H. 2003. A metalloproteinase extracellularly released by *Crithidia deanei*. *Can. J. Microbiol.* **49**: 625-632.
- DE SOUZA, W. 1984. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol.* **86**: 197-283.
- DEDET, J.P., RECHE, B., PRATLONG, F., CALES-QUIST, D. JOUANNELLE, J. BENICHO, J.C. & HUERRE, M. 1995. Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV. *Transact. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**: 644-646.

- DIAS, F.A., SANTOS, A.L.S., FERREIRA-PEREIRA, A., ROMEIRO, A., ZIMMERMANN, L.T., NASCIMENTO, M.T.C., ATELLA, G.C., SARAIVA, E.M., LINDEN, R. & LOPES, A.H.C.S. 2007. A novel ligand blot assay using biotinylated live cells. *J. Biomol. Screen.* **12**: 1006-1010.
- DOCAMPO, R., SOUZA, W., MIRANDA, K., ROHOLFF, P. & MORENO, N.J.M. 2005. Acidocalcisomes: conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 251-261.
- DOLLET, M. 1984. Plant diseases caused by flagellate protozoa (*Phytomonas*). *Annu. Rev. Phytopathol.* **22**: 115-132
- DOLLET, M. LOPEZ, G. & GENTY, P. DZIDO, J.L. 1979. Recherches actuelles de IÍRHO sur les dépérissements du cocotier et du palmier à huile en Amérique du Sud, associés aux protozoaires flagellés intraphloémiques (*Phytomonas*). *Oléagineux* **34**: 449-452.
- DONOVAN, C. 1909. Kala-azar in Madras, specially with regard to its connection with the dog and the bug (*Conorhinus*). *Lancet.* **177**: 1495-1496.
- DUTRA, P.M.L.; DIAS, F.A.; SANTOS, M.A.A.; RODRIGUES, C.O.; ROMEIRO, A.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W.; LOPES, A.H.C.S. & MEYER-FERNANDES, J.R. 2001. Secreted phosphatase activities in trypanosomatid parasites of plants modulated by platelet-activating factor. *Phytopathology* **91**: 408-414.
- ELIAS, C.G.R.; PEREIRA, F.M.; SILVA, B.A.; ALVIANO, C.S.; SOARES, R.M.A. & SANTOS, A.L.S. 2006. Leishmanolysin (gp63 metalloproteinase)-like activity extracellularly released by *Herpetomonas samuelpessoai*. *Parasitology* **130**: 79-88.
- ETGES, R. 1992. Identification of a surface metalloproteinase on 13 species of *Leishmania* isolated from humans, *Crithidia fasciculata*, and *Herpetomonas samuelpessoai*. *Acta Trop.* **50**: 205-217.
- ETGES, R.; BOUVIER, J. & BORDIER, C. 1987. The promastigote surface protease of *Leishmania* in host-parasite cellular and molecular interactions in protozoal infection. Springer Verlag Berlin Heidelberg, NATO ASI Series H, vol II, pp. 165-168.
- FERNANDEZ-RAMOS, C.; LUQUE, F.; FERNANDEZ-BECERRA, C.; OSUNA, A.; JANKEVICIUS, S.I.; JANKEVICIUS, J.V., ROSALES, M.J. & SANCHEZ-MORENO, M. 1999. Biochemical characterization of flagellates isolated from fruits and seeds from Brazil. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 343-352.
- FIORINI, J.E., FARIA E SILVA, P.M., BRAZIL, R.P., ATTIAS, M., ESTEVES, M.J.G. & ANGLUSTER, J. 1993. Axenic cultivation of pathogenic *Phytomonas* species isolated from tomato fruit and from its phytophagic insect vector, *Phthia picta* (Hemiptera: Coreidae). *Cytobios.* **75**: 163-170.

- FRESNO, M.; HERNANDEZ-MUNAIN, C.; DE-DIEGO, J.; RIVAS, L.; SCHARFSTEIN, J. & BONAY, P. 1994. *Trypanosoma cruzi*: identification of a membrane cysteine proteinase linked through a GPI anchor. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **27**: 431-437.
- FRITIG, B., HEITZ, T. & LEGRAND, M. 1998. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 16-22.
- GADELHA, C., WICKSTEAD, B., SOUZA, W., GULL, K. & CUNHA-E-SILVA, N. 2005. Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa. *Eukaryot. Cell.* **4**: 516-525.
- GARCIA-OLMEDO, F., MOLINA, A., ALAMILLO, J. M. & RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. 1998. Plant defense peptides. *Biopolymers.* **47**: 479-491.
- GIBBS, A.J., 1950. *Crithidia familiars* n. sp. parasitic in *Cenaus carnifex* Fabr. (Hemiptera). *Parasitology* **40**: 322-327.
- GIBBS, A.J., 1957. *Leptomonas serpens* n. sp., parasitic in the digestive tract and the salivary glands of *Nezara viridula* (Pentatomidae) and in the sap of *Solanum lycopersicum* (tomato) and other plants. *Parasitology* **47**: 297-303.
- GONZALEZ, J., RAMALHO-PINTO, F.J., FREVERT, U., GHISO, J., TOMLINSON, S., SCHARFSTEIN, J., COREY, E.J. & NUSSENZWEIG, V. 1996. Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. *J. Exp. Med.* **184**: 1909-1918.
- GULL, K. 1999. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 629-655.
- HAJMOVÁ, M., CHANG, K.P., KOLLI, B. & VOLFF, P. 2004. Down-regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis*. *Microb. Infect.* **6**: 646-649.
- HIBBS, M. S.; HASTY, K. A.; SEYER, J. M.; KANG, A. H. & MAINARDI, C. L. 1985. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* **260**: 2493-2500.
- HOARE, C.A. & WALLACE, F.G. 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature.* **212**: 1385-1386.
- JACKSON, A. O. & TAILOR, C. B. 1996. Plant microbe interaction: life and death at the interface. *Plant Cell.* **8**: 1651-1668.
- JAFFE, C.L. & DWYER, D.M. 2003. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. *Parasitol. Res.* **91**: 229-237.
- JANKEVICIUS, J.V. 1992. Ciclo biológico de *Phytomonas serpens*. Tese de doutorado, Curso de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia da Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

- JANKEVICIUS, J.V., JANKEVICIUS, S.I., CAMPANER, M., CONCHON, I., MAEDA, L.A., TEIXEIRA, M.M.G., FREYMULLER, E. & CAMARGO, R.P. 1989. Life cycle and culturing of *Phytomonas serpens* (gibbs), a trypanosomatid parasite of tomatoes. *J. Protozool.* **36**: 265-271.
- JANKEVICIUS, J.W., ITOW-JANKWEVICIUS, S., MAEDA, L.A., CAMPANER, M., CONCHON, I., DO CARMO, J.B., DUTRA-MENEZES, M.C., MENEZES, J.R., CAMARGO, E.P. & ROITMAN, I. 1988. Ciclo biológico de *Phytomonas*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **85**: 601-610.
- JANKEVICIUS, S.I., ALMEIDA, M.L., JANKEVICIUS, J.V., CAVAZZANA, M., ATTIAS, M. & DE SOUZA, W. 1993 Axenic cultivation of trypanosomatid found in corn (*Zea mays*) and in phytophagous hemipterans (*Leptoglossus zonatus* Coreidae) and their experimental transmission. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**: 576-581.
- JOSHI, P.B., KELLY, B.L., KAMHAWI, S., SACKS, D.L. & MCMASTER, W.R. 2002. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol. Biochem. Parasitol.* **120**: 33-40.
- JOSHI, P.B., SACKS, D.L., MODI, G. & MCMASTER, W.R. 1998. Target gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (gp63). *Mol. Microbiol.* **27**: 519-530
- KIERSZENBAUM, F. & BUDZKO, D.B. 1975. Immunization against experimental Chaga's disease by using culture forms of *Trypanosoma cruzi* killed with a solution of sodium perchlorate. *Infect. Immun.* **12**: 461-5.
- KITAJIMA, E.W., VAINSTEIN, M.H. & SILVEIRA, J.S.M. 1986. Flagellate protozoon associated with poor development of the root system of cassava in the Espirito Santo State, Brazil. *Phytopathology* **76**: 638-642.
- KRETTLI, A.U. Antibodies to *T. cruzi* in experimental and human infections. *Afr. J. Clin. Exp. Immunol.* **3**: 327-45.
- LACOUNT, D.J., GRUSZYNSKI, A.E., GRANDGNETT, P.M., BANGS, D.J. & DONELSON, J.E. 2003. Expression and function of the *Trypanosoma brucei* major surface proteases (gp63) genes. *J. Biol. Chem.* **278**: 24658-24664.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- LAFONT, A. 1909. Sur la presence d'une parasite de la classe des flagellés dans le latex de l'*Euphorbia pilulifera*. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **66**: 1011-1013.
- LANDFEAR, S.M. & IGNATUSCHCHENKO, M. 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **115**: 1-17.

- LOPES, J.D., CAULADA, Z., BARBIERI, C.L. & CAMARGO, E.P. 1981. Cross-reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas disease. *Am. J. Med. Hyg.* **30**: 1183-1188.
- LOPEZ, G., GENTY, P. & OLLAGNIER, M. 1975. Control preventivo et la "marchitez sorpressiva" del *Elaeis guineensis* en America Latina. *Oléagineux* **30**: 243-250.
- LOWRY, O. H., ROZEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- MALEK, K. & DIETRICH, R. A. 1999. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies?. *Trends Plant Sci.* **4**: 215-219.
- MARTINEZ, J., CAMPETELLA, O., FRASCH, A.C.C. & CAZZULO, J.J. 1991. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is antigenic in human infections. *Infect. Immun.* **59**: 4275-4280.
- MARTINEZ, J., CAMPETELLA, O., FRASCH, A.C.C. & CAZZULO, J.J. 1993. The reactivity of sera from chagasic patients against different fragments of cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*, suggests the presence of defined antigenic and catalytic domains. *Immunol. Lett.* **35**: 191-196.
- MARTINEZ-LOPEZ, G., JIMENEZ, O. & MENA-TACSON, E. 1980. Flagellated protozoan in coconut palms in the south west of Colombia. *Univ. Fla. Agric. Rep.* **80**: 17.
- MASLOV, D.A. & SIMPSON, L. 1995. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. *Parasitol. Today* **1**: 30-32
- MAUEL, J. 1996 Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.* **38**: 1-51.
- MBAWA, Z. R., WEBSTER, P. & LONSDALE-ECCLES, J. D. 1991. Immunolocalization of a cysteine protease within the lysosomal system of *Trypanosoma congolense*. *Cell Biol.* **56**: 243-250.
- MCBRIDE, M.O.; FISHER, M.; SKINNER, C.J.; GOLDEN, R. & MAIN, J. 1995. An unusual gastrointestinal presentation of leishmaniasis. *Scand. J. Infect. Dis.* **27**: 297-298.
- McCOY, R.E., RODRIGUEZ, R.A. & GUZMAN, J.A. 1984. *Phytomonas* flagellates associated with diseased coconut palm in Central America. *Plant Dis.* **68**: 537.
- MCDONALD, J.K. 1985. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: Aspects related to nomenclature and classification. *Histochemistry.* **17**: 773-785.
- MCGHEE, R.B. & COSGROVE, W.B. 1980. Biology and physiology of the lower trypanosomatids. *Microbiol. Rev.* **44**: 140-173.

- MCGHEE, R.B. & HANSON, W.L. 1964. Comparison of the life cycle of *Leptomonas oncopelti* e *Phytomonas elmanssiani*. J. Protozool. **11**: 555-562.
- MCGHEE, R.B. & MCGHEE, A.N. 1979. Biology and structure of *Phytomonas staheli* sp. n., a trypanosomatid located in sieve tubes of coconut oil palms. Eukaryot. Microbiol. **26**: 348-351.
- McGWIRE, B.S., CHANG, K. & ENGMAN, D.M. 2003. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. Infect. Immun. **71**: 1008-1010.
- MCKERROW, J.H. 1989. Parasite proteases. Exp. Parasitol. **68**: 111-115.
- MCKERROW, J.H., 1999. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation and the mechanisms of action. Int. J. Parasitol. **29**: 833-837.
- MCKERROW, J.H., SUN, E., ROSENTAL, P.J. & BOUVIER, J. 1993. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. Annu. Rev. Microbiol. **47**: 821-853
- MEDINA-ACOSTA, E., KARESS, R.E. & RUSSEL, D.G. 1993. Structurally distinct genes for the surface peptidase of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. Mol. Biochem. Parasitol. **57**: 31-46.
- MICHELS, P.A.M., HANNAERT, V. & BRINGAUD, F. 2000. Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae - new data and views. Parasitol. Today **16**: 482-489.
- MILLER, R.F. 2000. Clinical presentation and significance of emerging opportunistic infections. J. Eukaryot. Microbiol. **47**: 21-23.
- MIRANDA, K., RODRIGUES, C.O., HENTCHEL, J., VERCESI, A., PLATTNER, H., SOUZA, W. & DO CAMPO, R. 2004. Acidocalcisomes of *Phytomonas françai* possess distinct morphological characteristics and contain iron. Microsc. Microanal. **10**: 647-655.
- MOSOLOV, V.V. & VALUEVA, T.A. 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense. Biochemistry. **69**: 1305-1309.
- MOSOLOV, V.V., GRIGOR'EVA, L.I. & VALUEVA, T.A. 2001. Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection. Appl. Biochem. Microbiol. **37**: 115-123.
- MOTTRAM, J.C., COOMBS, G.H. & ALEXANDER, J. 2004. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. Curr. Opin. Microbiol. **7**: 375-381.
- MOTTRAM, J.C., SOUZA, A.E., HUTCHISON, J.E., CARTER, R., FRAME, M.J. & COOMBS, G.H. 1996. Evidence from disruption of the *lmcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**: 6008-6013.

- MURTA, A.C.M., PERSECHINI, P.M., SOUTO-PADRÓN, T., DE SOUZA, W., GUIMARÃES, J.A. & SCHARFSTEIN, J. 1990. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **43**: 27-38.
- NASCIMENTO, A.E. & SOUZA, W. 1996. High resolution localization of cruzipain and Ssp4 in *Trypanosoma cruzi* by replica staining label fracture. *Biol. Cell.* **86**: 53-58.
- NOGUEIRA DE MELO, A.C., D'AVILA-LEVY, C.M., BRANQUINHA, M.H. & VERMELHO, A.B. 2002. *Crithidia guilhermei*: gelatin- and henoglobin- degrading extracellular metalloproteinases. *Exp. Parasitol.* **102**: 150-156.
- NOGUEIRA DE MELO, A.C., D'AVILA-LEVY, C.M., DIAS, F.A., ARMADA, J.L., SILVA, H.D., LOPES, A.H.C.S., SANTOS, A.L.S., BRANQUINHA, M.H. & VERMELHO, A.B. 2006. Peptidases and gp63-like proteins in *Herpetomonas megaseliae*: possible involvement in the adhesion to the invertebrate host. *Int. J. Parasitol.* **36**: 415-422.
- NOGUEIRA DE MELO, A.C., GIOVANNI-DE-SIMMONE, S., BRANQUINHA, M.H. & VERMELHO, A.B. 2001. *Crithidia guilhermei*: purification and partial characterization of a 62-kDa extracellular metalloproteinase. *Exp. Parasitol.* **97**: 1-8.
- NORTH, M.J. 1982. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. *Microbiol. Rev.* **46**: 308-340.
- PAIVA, C.N., CASTELO-BRANCO, M.T., LANNES-VIEIRA, J. & GATTASS, C.R. 1999. *Trypanosoma cruzi*: protective response of vaccinated mice is mediated by CD8+ cells, prevents signs of polyclonal T lymphocyte activation, and allows restoration of a resting immune state after challenge. *Exp. Parasitol.* **91**: 7-19.
- PAPPAS, G.J.; BENABDELLAH, K.; ZINGALES, B. & GONZALEZ, A. 2005. Expressed sequence tags from the plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **142**: 149-157.
- PARTHASARATHY, M.V. 1976. Trypanosomatid flagellates in the phloem of diseased coconut palms. *Science.* **192**: 1346-1348.
- PEREIRA, F.M., BERNARDO, P.S., DIAS, P.F.J., SILVA, B.A., ROMANOS, M.T., D'AVILA-LEVY, C.M., BRANQUINHA, M.H. & SANTOS, A.L.S. 2009. Differential influence of gp63-like molecules in three distinct *Leptomonas* species on the adhesion to insect cells. *Parasitol. Res.* *in press*.
- PEREIRA, M.E.S. & KRETTLI, A.U. 1990. The effect of reinoculation with trypomastigotes on the level of protective antibodies in mice chronically infected with *T. cruzi*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **23**: 283-292.

- PINGE-FILHO, P., PERÓN, J.P.S., MOURA, T.R., MENOLLI, R.A., GRAÇA, V.K., ESTEVÃO, D., TADOKORO, C.E., JANKEVICIUS, J.V. & RIZZO, L.V. 2005. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* provided by oral immunization with *Phytomonas serpens*: role of nitric oxide. *Immunol. Lett.* **96**: 283-290.
- PODLIPAEV, S.A & ROKITSKAYA, T.A. 1999. Classification of isolate of insects trypanosomatids: isoenzyme analysis. *Parasitology (ST Petersburg)* **33**: 350-57
- PODLIPAEV, S.A. 1986. *Phytomonas elmanssiani* (Mastigophora: Trypanosomadina) from the plant *Cynanchum sibiricum* (Asclepiadaceae) in Central Asia and Kazakhstan. *Proc. Zool. Inst. Acad. Sci. USSR.* **144**: 61-65.
- RAO, M.B., TANKSALE, M.A., MOHINI S.G. & DESHPANDE, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 597-635.
- RAWLINGS, N.D. & BARRETT, A.J. 2000. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **28**: 323-325.
- RAWLINGS, N.D., O'BRIEN, E. & BARRETT, A.J. 2002. MEROPS: the protease database. *Nucleic Acids Res.* **30**: 343-346.
- RAWLINGS, N.D., TOLLE, D.P. & BARRETT, A.J. 2004a. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **32**: 160-164.
- RAWLINGS, N.D., TOLLE, D.P. & BARRETT AJ. 2004b. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* **378**: 705-716.
- ROCHA, G.M., BRANDÃO, B.A., MORTARA, R.A., ATTIAS, M., SOUZA, W. & CARVALHO, T.M.U. 2006. The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *J. Struct. Biol.* **154**: 89-99.
- ROMEIRO, A., LEAL, L.H.M., DE SOUZA, W. & ATTIAS, M. 2003. Interaction of *Leptomonas wallacei* with the intestinal tract of its natural hosts *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* **47**: 208-220.
- ROSENTHAL, P.J., 1999. Peptidases of protozoan parasites. *Adv. Parasitol.* **43**: 106-159.
- RUIZ, A.M., ESTEVA, M., RIARTE, A., SUBIAS, E. & SEGURA, E.L. 1986. Immunoprotection of mice against *T. cruzi* with a lyophilized flagellar fraction of the parasite plus adjuvant. *Immunol. Lett.* **12**: 1-4.
- RUSSEL, D.G. 1987. The macrophage-attachment glycoprotein, gp63, is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania* promastigotes. *Eur. J. Biochem.* **164**: 213-221.
- RUSSO, D.C.W., WILLIAMS, D.J.L. & GRAB, D.J. 1994. Directional movement of variable surface glycoprotein-antibody complexes in *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Res.* **80**: 487-492.

- SAJID, M. & McKERROW, J.H. 2002. Cysteine protease of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* **120**: 1-21.
- SANCHEZ-MORENO, M., LASZITTY, D., COPPENSI, I. & OPPERDOESF, F.R. 1992. Characterization of carbohydrate metabolism and demonstration of glycosomes in a *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbias characias*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **54**: 185-199.
- SANTOS, A.L.S., ABREU, C.M., BATISTA, L.M., ARAÚJO-SOARES, R.M., ALVIANO, C.S. & SOARES, R.M.A. 2000a. Morphological features suggesting a sexual process or a cell cycle arrest during the dimethylsulfoxide-induced differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai*? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **95**: 157.
- SANTOS, A.L.S., ALVIANO, C.S. & SOARES, R.M.A. 2005. Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. *Parasitology* **130**: 79-88.
- SANTOS, A.L.S., ABREU, C.M., BATISTA, L.M., ALVIANO, C.S. & SOARES, R.M.A. 2001. Cell-associated and extracellular proteinases in *Blastocrithidia culicis*: influence of growth conditions. *Curr. Microbiol.* **43**(2): 100-6.
- SANTOS, A.L.S., BRANQUINHA, M.H. & D'ÁVILA-LEVY, C.M. 2006 The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **78**: 687-714.
- SANTOS, A.L.S., D'ÁVILA-LEVY, C.M., ELIAS, C.G.R., VERMELHO, A.B., BRANQUINHA, M.H., 2007. *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microb. Infect.* **9**: 15-921.
- SANTOS, A.L.S., FERREIRA, A., FRANCO, V.A., ALVIANO, C.S. & SOARES, R.M.A. 1999. Characterization of proteinases in *Herpetomonas angusteri* and *Herpetomonas roitmani*. *Curr. Microbiol.* **43**: 100-106.
- SANTOS, A.L.S., RODRIGUES, M.L., ALVIANO, C.S., ANGLUSTER, J. & SOARES, R.M.A. 2003. *Herpetomonas samuelpessoai*: dimethylsulfoxide-induced differentiation is influenced by proteinase expression. *Curr. Microbiol.* **46**: 11-17.
- SCHARFSTEIN, J., SCHECHTER, M., SENNA, M., PERALTA, J.M., MENDONÇA-PREVIATO, L. & MILES, M.M. 1986. *Trypanosoma cruzi*: characterization and isolation of a 57/51,000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. *J. Immunol.* **137**: 1336-1341.
- SCHNAPP, A.R., EICKHOFF, C.S., SIZEMORE, D., CURTISS, R. & HOFT, D.F. 2002. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Infect. Immun.* **70**: 5065-5076.

- SCHNEIDER, P. & GLASER, T.A. 1993. Characterization of a surface metalloprotease from *Herpetomonas samuelpeessoai* and comparison with *Leishmania major* promastigote surface protease. *Mol. Biochem. Parasitol.* **58**: 277-282.
- SHIH, S., STENBERG, P & ULLMAN, B. 1998. Immunolocalization of *Trypanosome brucei* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase to the glycosome. *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**: 367-371.
- SIELECKI, A. R.; FUJINAGA, M.; READ, R. J. & JAMES, M. N. G. 1991. Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* **219**: 671-692.
- SILVEIRA, J.S.M & PEREIRA, A.V. 1983. Anomalias de causa desconhecida em mandioca (*manihot esculenta* Crantz.) no estado de Espírito Santo. *Anais do Terceiro Congresso Brasileiro de Mandioca*, pp. 37.
- SOUSA, M.A. & CORTE-REAL, S. 1991. Postnuclear kinetoplast in choanomastigotes of *Crithidia deanei* Carvalho, 1973: proposal of a new genus. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **33**: 58.
- SOUSA, M.A. 2000. Tripanosomatídeos de insetos e plantas: análise do crescimento, diferenciação e divisão celular, biometria e fenômenos sugestivos de sexualidade: valor taxonômico. Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- SOUSA, M.A., PEREIRA, M.C.S & CÔRTE-REAL, S. 1997. *Leishmania major*: parasite interactions suggesting sexuality. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **92**: 761-766.
- SOUTO-PADRÓN, T.; CAMPETELLA, O.E.; CAZZULO, J.J. & DE SOUZA, W. 1990. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J. Cell Sci.* **96**: 485-490.
- SOUZA, W. 2008. Electron microscopy of trypanosomes: a historical view. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **103**: 313-325.
- STAHEL, G. 1931. Zur Kenntnis der Siebröhrenkrankheit (Phloemnekrose) des Kaffeebaumes in Surinam. I. Mikroskopische untersuchungen und infektionsversuche. *Phytopathol. Zeitsch.* **4**: 65-82.
- STOKA, V., NYCANDER, M., LENARCIC, B., LABRIOLA, C., CAZZULO, J.J., BJORK, I. & TURK, V. 1995. Inhibition of cruzipain, the major cysteine proteinase of the protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, by the proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. *FEBS Lett.* **370**: 101-104.
- STOTZ, H. U., KROYMANN, J. & MITCHELL-OLDS, T. 1999. Plant-insect interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 268-272

- TEIXEIRA, M.M.G., CAMPANER, M. & CAMARGO, E.P. 1995. Characterization of the target antigens of *Phytomonas*-specific monoclonal antibodies. *J. Eukaryot. Microbiol.* **42**: 232-237.
- TEIXEIRA, M.M.G.; TAKATA, C.S.A.; CONCHON, I; CAMPANER, M. & CAMARGO, E.P. 1997. Ribosomal and kDNA markers distinguish two subgroups of *Herpetomonas* among old species and new trypanosomatids isolated from flies. *J. Parasitol.* **83**: 58-65.
- THOMPSON, H. ADRIAN, T., RUDOLF, K.T. & HEDDERICH, R. 1998. Two malate dehydrogenases in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **170**: 38-42.
- VERMELHO, A.B., ALMEIDA, F.V.S., BRONZATO, L.S. & BRANQUINHA, M.H. 2003. Extracellular metalloproteinases in *Phytomonas serpens*. *Can. J. Microbiol.* **49**: 221-224.
- VICKERMAN, K. & PRESTON, T.M. 1976. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In: *Biology of the kinetoplastida*. Academic Press, New York, vol. I, pp. 35-130.
- VICKERMAN, K. 1990. Phylum Zoomastigina - class kinetoplastida. In: *Handbook of protoctista*. James and Barlett Publishers. Boston. pp. 215-238
- VICKERMAN, K. 1994. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *Int. J. Parasitol.* **24**: 1317-1331.
- VOLLER, A., BARTLETT, A. & BIDWELL, D.E. 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* **33**: 165-167.
- WALLACE, F.G. 1966. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Exp. Parasitol.* **18**: 124-193.
- WALLACE, F.G., 1977. Development stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology revisited. *J. Protozool.* **3**: 51-56.
- YAO, C., DONELSON, J.E. & WILSON, M.E. 2007. Internal and surface-localized major surface proteases of *Leishmania* spp. and their differential release from promastigotes. *Eukaryot. Cell.* **6**: 1905-1912.
- YAO, C., LEIDAL, K.G., BRITTINGHAM, A., TARR, D.E., DONELSON, J.E. & WILSON, M.E. 2002. Biosynthesis of the major surface protease GP63 of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **121**: 119-28.
- YOKOYAMA-YASUNAKA, J.K.U., PRAL, E.M.F., OLIVEIRA, O.C., ALFIERI, S.C. & STOLF, A.M.S. 1994. *Trypanosoma cruzi*: identification of proteinases in shed components of trypomastigote forms. *Acta Trop.* **57**: 307-312.

# Anexos

**Os resultados obtidos nesta tese deram origem aos seguintes trabalhos científicos:**

1. SANTOS ALS, D'AVILA-LEVY CM, ELIAS CGR, VERMELHO AB & BRANQUINHA MH. (2007). *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microbes and Infection*, **9**: 915–921.
2. SANTOS ALS, D'AVILA-LEVY CM, DIAS FA, RIBEIRO RO, PEREIRA FM, ELIAS CGR, SOUTO-PADRÓN T, LOPES AHCS, ALVIANO CS, BRANQUINHA MH & SOARES RMA. (2006). *Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion. *International Journal for Parasitology*, **36**: 47–56.
3. ELIAS CGR, PEREIRA FM, DIAS FA, ALVES E SILVA TL, LOPES AHCS, D'AVILA-LEVY CM, BRANQUINHA MH & SANTOS ALS. (2008). Cysteine peptidases in the tomato trypanosomatid *Phytomonas serpens*: influence of growth conditions, similarities with cruzipain and secretion to the extracellular environment. *Experimental Parasitology*, **120**: 343–352.
4. ELIAS CGR, AOR-ZAQUEU AC, D'AVILA-LEVY CM, BRANQUINHA MH & SANTOS ALS. (2009). Cysteine peptidases and cruzipain-like molecules in *Trypanosoma cruzi* and *Phytomonas serpens*: biochemical and immunological approaches. Submetido a FEMS Immunology and Medical Microbiology.
5. ELIAS CGR, DIAS FA, D'AVILA-LEVY CM, LOPES AHCS, BRANQUINHA MH & SANTOS ALS. (2009). Cruzipain-like molecules in *Phytomonas serpens* are up-regulated by exogenous proteinaceous compounds: implications on the parasite-tomato interactions. Em fase de escrita para posterior submissão à *International Journal for Parasitology*.

**Outros trabalhos científicos não relacionados à dissertação de Mestrado:**

6. ELIAS CGR, PEREIRA FM, SILVA BA, ALVIANO CS, SOARES RMA & SANTOS ALS. (2006). Leishmanolysin (gp63 metallopeptidase)-like activity extracellularly released by *Herpetomonas samuelpessoai*. *Parasitology*, **132**: 37–47.
7. PEREIRA FM, ELIAS CGR, D'AVILA-LEVY CM, BRANQUINHA MH & SANTOS ALS. (2009). Cysteine peptidases in *Herpetomonas samuelpessoai* are modulated by temperature and dimethylsulfoxide-triggered differentiation. *Parasitology*, **136**: 45–54.
8. NOGUEIRA DE MELO AC, PARAGUAI DE SOUZA E, ELIAS CGR, SANTOS ALS, BRANQUINHA MH, D'AVILA-LEVY CM, PEREIRA MCS, MEIRELLES MNL & VERMELHO AB. (2009). *Trypanosoma cruzi* peptidases: modulation of expression by growth conditions and detection of matrix metallopeptidase-9 homologues. Em fase final de revisão na *Experimental Parasitology*.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)