FERNANDA MACHADO PEREIRA

"EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS SIMILARES À GP63 EM *HERPETOMONAS SAMUELPESSOAI*: IMPLICAÇÕES FUNCIONAIS NA INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO INVERTEBRADO E VERTEBRADO"

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 Biológicas (Microbiologia)

Orientador: *André Luis Souza dos Santos*

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
JULHO DE 2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

PEREIRA, Fernanda Machado
Expressão de moléculas similares a gp63 em *Herpetomonas samuelpessoai*: implicações funcionais na interação com o hospedeiro invertebrado e vertebrado/ Fernanda Machado Pereira - Rio de Janeiro, 2009
XIV, 83
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientador: André Luis Souza dos Santos
Referências bibliográficas: f 69
1. gp63 2. *Aedes aegypti* 3. *Herpetomonas samuelpessoai*
4. metalopeptidase 5. Interação parasito-hospedeiro 6. Tripanossomatídeos
I. Santos, André. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia). III. Expressão de moléculas similares à gp63 em *Herpetomonas samuelpessoai*: implicações funcionais na interação com o hospedeiro invertebrado e vertebrado

FERNANDA MACHADO PEREIRA

"EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS SIMILARES À GP63 EM *HERPETOMONAS SAMUELPESSOAI:* IMPLICAÇÕES FUNCIONAIS NA INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO INVERTEBRADO E VERTEBRADO"

Rio de Janeiro, 23 de julho de 2009

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

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

(Daniela Salles Alviano, Doutora, IMPPG-UFRJ)

(Suzete Gomes, Doutora, FIOCRUZ)

(Marta Helena Branquinha de Sá, Doutora, 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 do Professor André Luis Souza dos Santos.

“Não há vitória sem luta, não existe autoridade moral sem sacrifício.”

AGRADECIMENTOS

Ao melhor orientador de todos, Prof. André Santos, por ter sido bem mais que professor e ter se tornado meu “pai-científico”. Agradeço a confiança, a oportunidade e a amizade.

A professora Marta Branquinha por sempre me acolher em seu laboratório, pela ajuda preciosa e pela revisão dessa dissertação, e a todo seu grupo, em especial a Fernanda por sempre estar disposta a ajudar em tudo.

A Camila, pela amizade infinita e pelo companheirismo fundamental.

A Bib´s pela convivência que nos tornou mais do que amigas de bancada.

Ao Felipe, pela ajuda nos experimentos, pelas sugestões e pelo exemplo de profissional.

Aos meus companheiros diários de laboratório, que se tornaram amigos e confidentes: Bianca, Camila, Lys, Ana Luiza, Carina, Ana Carolina, Polli, Roberta, Erika e Anderson.

A todo grupo dos Professores Márcio e Leonardo em especial Débora, Fabiane, Fernanda e Mariana, pela agradável convivência e troca de experiências.

A Geralda pela ajuda fundamental para o bom andamento do trabalho.

Aos meus amigos de sempre, de infância, de hoje e de ontem.

A Prof[a] Rosangela Soares, a Prof[a] Daniela Salles e a pesquisadora Suzete Gomes pela participação nessa banca.

A minha família, pelo apoio incondicional.

Ao meu irmão Henrique, pelo exemplo de determinação e pela cumplicidade.

A minha “cunha” Luiza (Ló), pela amizade, pelo companheirismo e por sua alegria contagiante.

Aos meus pais, Virmondes e Luzia, pelo patrocínio, por tudo que eles já fizeram por mim e pelos sonhos que sempre me ajudam a realizar.

Ao meu grande amor Rodrigo, pelo apoio, pela confiança e pelo amor e carinho que sempre me dá.

A Deus, por ter colocado na minha vida pessoas tão especiais.

A FAPERJ e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte dessa conquista.

RESUMO

FERNANDA MACHADO PEREIRA

"EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS SIMILARES À GP63 EM *HERPETOMONAS SAMUELPESSOAI:* IMPLICAÇÕES FUNCIONAIS NA INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO INVERTEBRADO E VERTEBRADO"

ORIENTADOR: ANDRÉ LUIS SOUZA DOSSANTOS

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.

Herpetomonas samuelpessoai, um tripanossomatídeo monoxênico, produz uma metalopeptidase de superfície de 66 kDa, que apresenta similaridades com a gp63 de *Leishmania* spp. Este estudo visou caracterizar a peptidase secretada e a de superfície desse parasito, assim como inferir uma função para essas enzimas. O extrato celular, a fração de membrana e o sobrenadante de cultivo foram aplicados em gel de SDS-PAGE para evidenciar o perfil de proteínas e em gelatina-SDS-PAGE para identificar a atividade proteolítica. Detectou-se uma metalopeptidase de 66 kDa em todas as 3 porções. Tanto a peptidase secretada quanto a de membrana apresentaram características bioquímicas (pH ótimo 6,0, temperatura ótima 37^{o}C e sensibilidade a 1,10-fenantrolina) muito similares, sugerindo que se trata da mesma peptidase. Western blotting mostrou um polipeptídeo de 63 kDa reconhecido pelo anticorpo anti-gp63, associado tanto ao extrato celular quanto ao sobrenandante. Citometria de fluxo e microscopia de fluorescência corroborororaram com a presença de moléculas similares à gp63 na superfície. Parasitos foram tratados ou não com 1,10-fenantrolina (inibidor de metalopeptidase) ou *p*-CMPS (inibidor de fosfolipase C, PLC) e o sobrenadante foi analisado em gelatina SDS-PAGE, mostrando que a secreção era através de proteólise, uma vez que era inibida por 1,10-fenantrolina. Também foi visto que sua expressão não foi influenciada pela diferenciação celular, quando esta foi induzida pela temperatura ou pela presença de dimetilsulfóxido no meio de cultura. Além disso, a gp63 foi capaz de hidrolisar diferentes substratos protéicos, sugerindo um amplo espectro de utilização de substratos. Para implicar uma função à essa molécula, mosquitos da espécie *Aedes aegypti* foram alimentados com tampão contendo parasitos vivos: os

parasitos foram capazes de colonizar o intestino desse inseto durante oito dias. Os parasitos foram pré-tratados com diferentes moduladores: inibidores de metalopeptidase, anticorpos anti-gp63 e PLC, resultando numa significativa redução da interação com intestinos explantados. Em adição, a pré-incubação de intestinos com gp63 purificada também causou inibição da adesão. Há também um aumento tanto da expressão da enzima na superfície quanto da secreção para o meio extracelular quando em contato com os intestinos. Visto a incidência de parasitoses oportunistas em pacientes HIV positivos, a relevância dessa molécula foi testada na interação com o hospedeiro vertebrado. Parasitos crescidos tanto a 26 quanto a 37°C eram capazes de se associar aos macrófagos peritoniais de forma crescente até o período de 4 horas, sendo debelados pela atividade microbicida dos macrófagos depois de 6 e 24 h. O pré-tratamento dos parasitos com 1,10-fenantrolina e anticorpos anti-gp63, assim como dos macrófagos com a gp63 purificada, foi capaz de diminuir a interação celular. Também foi observada uma maior secreção da enzima após o contato do parasito com o hospedeiro vertebrado.

Palavras Chave: Tripanossomatídeos, *Herpetomonas samuelpessoai*, metalopeptidase, gp63, interação parasito-hospedeiro, *Aedes aegypti*

Rio de Janeiro
Julho de 2009

ABSTRACT

FERNANDA MACHADO PEREIRA

"EXPRESSION OF GP63-LIKE MOLECULES IN *HERPETOMONAS SAMUELPESSOAI:* FUNCTIONAL IMPLICATIONS ON THE INTERACTION WITH THE INVERTEBRATE AND VERTEBRATE HOSTS"

ORIENTADOR: ANDRÉ LUIS SOUZA DOSSANTOS

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.

Previous works showed that *Herpetomonas samuelpessoai*, a monoxenous trypanosomatid, produces a great amount of a 66 kDa cell surface-located metallopeptidase, which shares similar properties with *Leishmania* spp gp63. This study aimed to characterize the extracellularly released and the major surface metallopeptidase of this parasite, as well as to infer a probable function for these enzymes. First, the parasite extract, the membrane fraction and the culture supernatant were applied on SDS-PAGE to evidence the protein profile and on gelatin-SDS–PAGE to identify the proteolytic activity. A metallopeptidase of 66 kDa was detected in all three extracts. The secreted and the surface proteolytic enzymes showed similar biochemical features (optimum pH 6.0, optimum temperature 37^{o}C and sensibility to 1,10-phenanthroline), suggesting that they are the same peptidase. Western blotting assay revealed a polypeptide of 63 kDa recognized by the anti-gp63 antibody, present in the cellular extract as well as in the culture supernatant. Flow cytometric and fluorescence microscopy confirmed the presence of gp63-like molecules on the surface of *H. samuelpessoai*. In order to propose a secretion mechanism, parasites were treated or not with 1,10-phenanthroline (a metallopeptidase inhibitor) or *p*-CMPS (a phospholipase C inhibitor, PLC), and then the supernatants were analyzed on gelatin-SDS–PAGE, showing that the peptidase secretion was through autoproteolysis since it was inhibited by 1,10-phenanthroline. It was also seen that its expression is not influenced by cell differentiation when it is induced by temperature or by the presence of dimethylsulfoxide in the culture medium. Moreover, this peptidase was able to hydrolyze different proteinaceous substrates, suggesting a wide spectrum of

substrate utilization. In an effort to implicate a possible role for this gp63, *Aedes aegypti* mosquitoes were fed with phosphate buffer containing live parasites. The parasites were capable of colonizing the *A. aegypti* gut during 8 days. Then, the parasites were pre-treated with different modulators, such as: metallopeptidase inhibitors, anti-gp63 antibodies and PLC, which resulted in a significant reduction on the interaction process. Moreover, the incubation of explanted guts with purified gp63 protein also caused a drastic inhibition on the adhesion process. It was also seen by flow cytometry and western blotting that there is an increase of both the surface expression of the enzyme and in the secretion to the extracellular environment when in contact with the insect guts. In view of the incidence of opportunistic parasites in HIV-positive patients, the relevance of this molecule was also tested on the interaction with vertebrate hosts. It was observed that parasites grown both at 26 and at 37°C were able to associate to peritoneal macrophages in increasing levels up to 4 hours, and then quashed by the macrophage microbicidal activity after 6 to 24 h. Pre-treatment of *H. samuelpessoai* cells with 1,10-phenanthroline and anti-gp63 antibodies, as well as of macrophages with purified gp63, were also able to decrease the interaction. An increased secretion of the enzyme was observed after the parasite contact with the vertebrate host. Collectively, these results suggest that the metallopeptidase from *H. samuelpessoai* presents an important role in the interaction with the invertebrate and vertebrate hosts.

Key words: Trypanosomatids, *Herpetomonas samuelpessoai*, metallopeptidase, gp63, parasite-host interaction, *Aedes aegypti*

Rio de Janeiro
Julho de 2009

ÍNDICE

INTRODUÇÃO **1**

1) Família Trypanosomatidae **2**

1.1) Características gerais dos tripanossomatídeos **3**

1.2) Tripanossomatídeos Inferiores **5**

1.2.1) *Herpetomonas samuelpessoai* **6**

2) Peptidases **8**

2.1) Inibidores proteolíticos **11**

2.2) Peptidases em Tripanossomatídeos **11**

3) Metalopeptidase **12**

3.1) Leishmanolisina (Gp63 em *Leishmania*) **12**

3.2) Gp63 em *Trypanosoma* **15**

3.2.1) *Trypanosoma brucei* **15**

3.2.2) *Trypansoma cruzi* **16**

3.3) Gp63 em Tripanossomatídeos inferiores **16**

4) Interação entre Tripanossomatídeos Monoxênico e Hospedeiros Invertebrados e Vertebrados **19**

4.1) *Aedes aegypti* – modelo de inseto para estudos de interação **22**

4.2) Macrófagos peritoniais – modelo de interação com hospedeiros vertebrados **24**

OBJETIVOS **25**

MATERIAIS E MÉTODOS **28**

RESULTADOS **39**

DISCUSSÃO **58**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **69**

ANEXOS **83**

ABREVIATURAS

BHI	– infusão de cérebro e coração (“brain heart infusion”)
BSA	– soro albumina bovina
C3	– proteína 3 do sistema complemento
Ca^{+2}	– íons cálcio
CD4	– determinante celular de linfócitos T (“cell determinant”)
CR3	– receptor de C3
CRD	– determinante de reação cruzada (“cross reactive determinant”)
DFP ou DIFP	– diisopropilfluorfosfato
DispF	– diisopropilfluorfosfofluorideto
DNA	– ácido desoxirribonucléico
E-64	– L-*trans*-epoxisuccinil leucilmido-(4-guanidino) butano
EDTA	– ácido etileno-diamino tetracético
EGTA	– etileno glycol-bis (β-aminoetil éter)
FITC	– isotiocianato de fluoresceína
g	– gravidade
GP63	– glicoproteína 63 kDa
GPI	– glicosilfosfatidilinositol
h	– hora
HIV	– vírus da imunodeficiência humana
IgG	– imunoglobulina G
kDa	– kilodalton
LDH	– lactato desidrogenase
M	– molar
mA	– miliampere
Mg^{+2}	– íons magnésio
MHC	– complexo principal de histocompatibilidade
min	– minuto
ml	– mililitro
mM	– milimolar
mm	– milímetro
MSP	– principal peptidase de superfície (“major surface peptidase”)

Na^{+2}	– íons sódio
NADH	– nicotinamida adenosina dinucleotídeo
NEM	– N-etilmaleimida
nm	– nanômetro
P	– fósforo
p-CMPS	– *p*-cloromercuriofenilsulfônico
pH	– potencial hidrogeniônico
p-HMB	– *p*-hidroximercuriobenzoato
PLC	– fosfolipase C
PMSF	– fluoreto de fenilmetanosulfonil
PSP	– peptidase de superfície de formas promastigotas (“promastigote surface peptidase”)
SDS	– dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	– eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SFB	– soro fetal bovino
sp.	– espécie
TLCK	– *N-p*-tosil-lisina-clorometil cetona
TPCK	– L-1-tosilamido-2-feniletil clorometil cetona
U	– unidade
V	– volts
VSG	– glicoproteína variante de superfície (“variant surface glicoprotein”)
v/v	– volume por volume
Zn^{+2}	– íons zinco
µg	– micrograma
µl	– microlitro
µm	– micrômetro
µM	– micromolar

Introdução

1) Família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae pertence à ordem Kinetoplastida do sub-reino Protozoa, e foi proposta para agrupar exclusivamente os protozoários monoflagelados que possuem cinetoplasto, uma estrutura subcelular única que contém um agregado do DNA mitocondrial (k-DNA) (WALLACE,1966).

Os tripanossomatídeos estão divididos em doze gêneros, de acordo principalmente com características morfológicas (forma do corpo celular, ponto de emersão do flagelo e posição do cinetoplasto em relação ao núcleo) (WALLACE,1979) e especificidade por hospedeiros (invertebrado, vertebrado e planta) (MCGHEE & COSGROVE,1980; VICKERMAN,1994).

Os parasitos heteroxênicos possuem ao longo do ciclo de vida dois hospedeiros, sendo geralmente transmitidos de insetos a vertebrados ou plantas (WALLACE,1966; VICKERMAN,1994; MOMEM,2001) (Figura 1). Estes apresentam importante relevância na área médica, já que seus constituintes são potencialmente patogênicos ao homem (EX.: *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*), assim como no setor agropecuário, devido aos prejuízos econômicos provocados pelo gênero *Phytomonas*, um pátogeno de vegetais (tomate, café, coco, mandioca, entre outras) (CAMARGO,1999) e pelo gênero *Trypanosoma*, causador de doenças em gado, eqüinos e camelos (HOARE,1972; MCGHEE & COSGROVE,1980).

Os parasitos monoxênicos são representados pelos gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Wallaceina*, *Angomonas*, *Strigomonas* e *Rhynchoidomonas* (revisto por SANTOS, BRANQUINHA & D´AVILA-LEVY,2006) (Figura 1). Estes têm apenas um hospedeiro ao longo do ciclo de vida, sendo encontrados somente em invertebrados, principalmente em insetos, e teoricamente não causam doenças em humanos (HOARE & WALLACE,1966; VICKERMAN,1976; MCGHEE & COSGROVE,1980; VICKERMAN,1994). Contudo, alguns estudos recentes reportaram o surgimento de parasitoses oportunistas, causadas por esses tripanossomatídeos classicamente não-patogênicos, principalmente em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (JIMÉNEZ *et al.*,1996; PACHECO *et al.*,1998; revisto por CHICARRO & ALVAR,2003). Alguns autores consideram a possibilidade de certas espécies de *Herpetomonas* e *Crithidia* serem isoladas de hospedeiros vertebrados e/ou plantas, sugerindo um ciclo de vida similar aos tripanossomatídeos heteroxênicos (MCGHEE & COSGROVE,1980; CAMARGO,1999; SOUSA,2000).

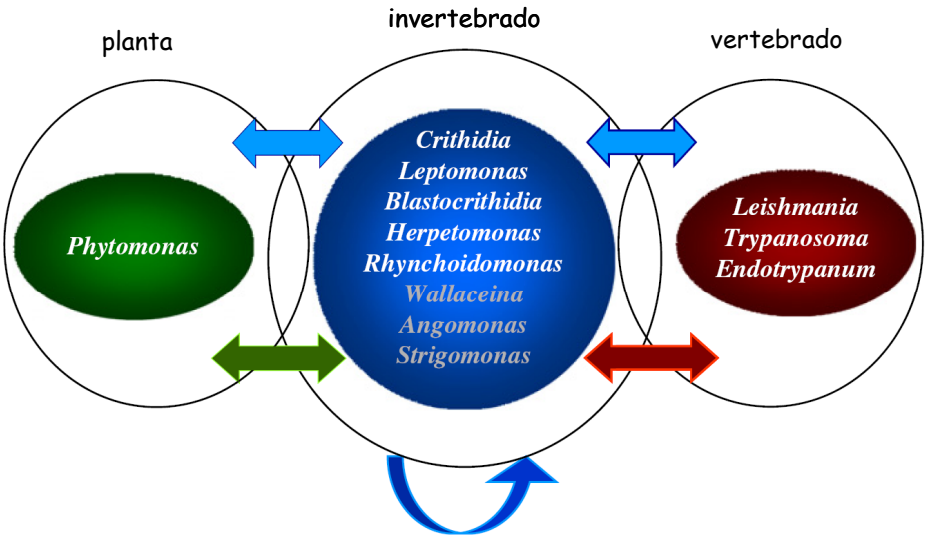

Figura 1: Relação espécie-hospedeiro dos tripanossomatídeos. Tripanossomatídeos heteroxênicos alternam entre hospedeiros invertebrados e vertebrados (seta vermelha) ou plantas (seta verde). O desenvolvimento dos parasitos monoxênicos ocorre em um único hospedeiro invertebrado (seta azul escura), embora 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).

1.1) Características gerais dos tripanossomatídeos

De uma forma geral, os tripanossomatídeos são organismos unicelulares e eucariotos, logo possuem um núcleo e organelas intracelulares delimitadas por uma membrana bilipídica (WALLACE,1966; MCGHEE & COSGROVE,1980; VICKERMAN,1994) (Figura 2). Destacam-se nestes organismos algumas características peculiares, como a presença de uma mitocôndria única e ramificada, que percorre todo corpo celular e cujo DNA consiste em uma rede de cadeias circulares concatenadas e compactas, denominada cinetoplasto (MASLOV & SIMPSON,1995). O glicossoma também é uma organela singular dessa família e está relacionado com o peroxissoma de organismos eucariotos superiores. Além de tornar a transformação de glucose em piruvato mais eficiente em tripanossomatídeos que em outros organismos eucariotos, já que compartimentaliza a via glicolítica (revisto por VICKERMAN,1994), o glicossoma também possui outras funções relacionadas à biossíntese de pirimidinas, recuperação de purinas, síntese de éter-lipídios e β-oxidação de ácidos graxos (revisto por MICHELS, HANNAERT & BRINGAUD,2000). Outra estrutura peculiar é o acidocalcissoma, uma organela de caráter acídico que armazena íons, caracterizada por sua elétron-densidade e grande concentração de cálcio (Ca^{+2}), fósforo (P), magnésio (Mg^{+2}), sódio (Na^{+}) e zinco (Zn^{+2}), além de possuir em sua membrana várias proteínas trocadoras, o que ressalta sua importância na osmorregulação, armazenamento intracelular de energia e íons

para diversos processos bioquímicos essenciais, como sinalização e diferenciação celular (revisto por DOCAMPO *et al.*,2005). Os tripanossomatídeos apresentam também citoesqueleto formado por uma camada de microtúbulos subpeliculares, associados entre si e à membrana plasmática, conferindo a forma celular e impedindo o tráfego de moléculas (revisto por GULL,1999). A região desprovida desses microtúbulos, a bolsa flagelar, representa o sítio para endocitose/exocitose de macromoléculas (VICKERMAN & PRESTON,1976; DE SOUZA,1984; revisto por VICKERMAM,1994). Outro componente dos tripanossomatídeos é o flagelo único composto basicamente por um axonema e um corpo paraxial, que emerge da bolsa flagelar e se encontra ancorado à célula pelos corpos basais, os quais estão associados à mitocôndria (revisto por LANDFEAR & IGNATUSHCHENKO,2001). O flagelo é fundamental na locomoção do microrganismo, podendo em algumas espécies participar na adesão a tecidos hospedeiros (VICKERMAN,1990; VICKERMAN & TETLEY,1990) (Figura 2).

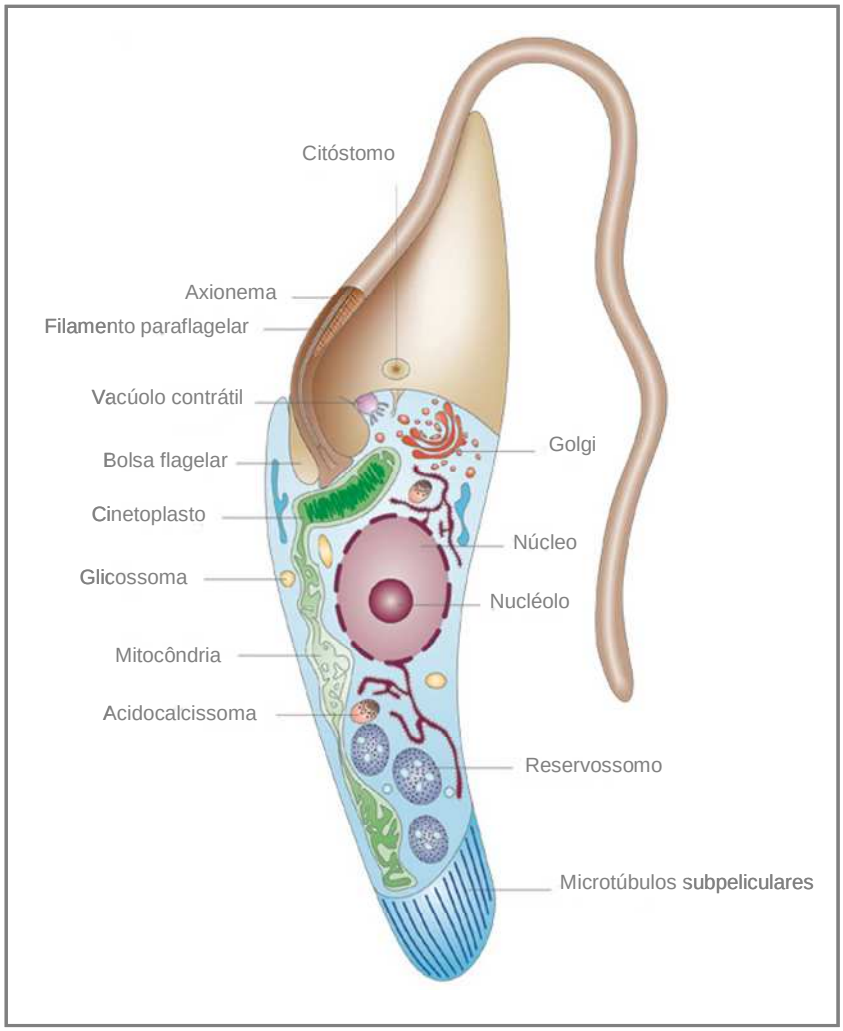

Figura 2: Esquema geral da morfologia dos tripanossomatídeos (DOCAMPO *et al.*,2005)

Durante seu ciclo de vida, os tripanossomatídeos se defrontam com ambientes diferentes; ora um hospedeiro invertebrado, ora um hospedeiro vertebrado ou uma planta (Figura 1). Por isso, faz-se necessária a adaptação desses flagelados a diversos ambientes e isto se dá através de modificações morfo-fisiológicas nos parasitos. Essas diferentes formas evolutivas são caracterizadas pela morfologia do corpo celular, pela 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; YOSHIDA *et al.*,1978; VICKERMAN,1990,1994; TEIXEIRA *et al.*,1997) (Figura 3).

A reprodução desses tripanossomatídeos é assexuada e ocorre por divisão binária (MCGHEE & COSGROVE,1980), embora existam relatos sugerindo troca de material genético em algumas espécies (VICKERMAN,1990; SOUSA, PEREIRA & CÔRTE-REAL,1997; SANTOS *et al.*,2000).

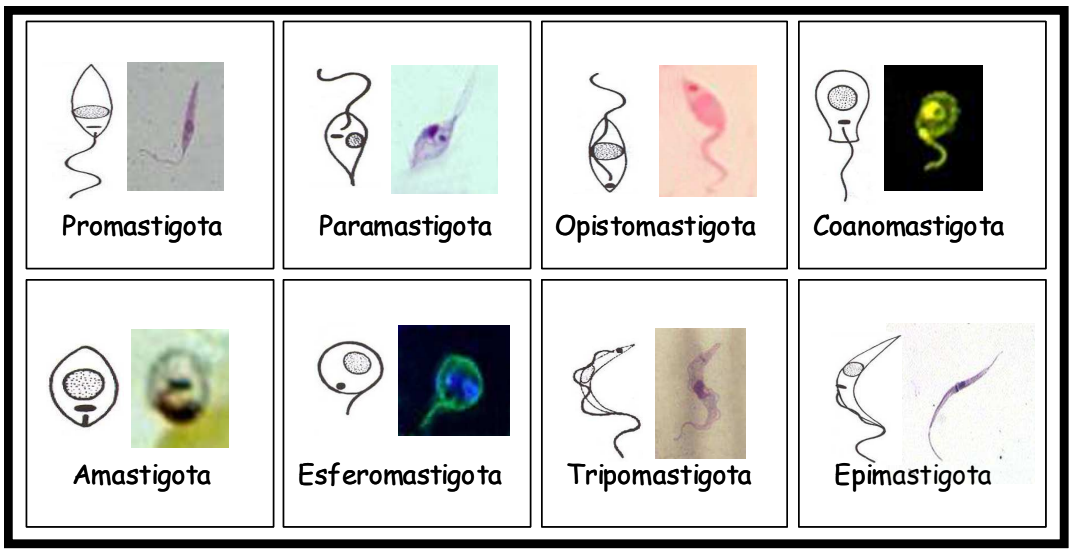

Figura 3: Formas evolutivas dos tripanossomatídeos (adaptado de SOUSA,2000).

1.2) Tripanossomatídeos inferiores

Os tripanossomatídeos monoxênicos, juntamente com os heteroxênicos do gênero *Phytomonas*, constituem um grupo denominado informalmente de "tripanossomatídeos inferiores" (WALLACE,1966). As diversas similaridades com patógenos humanos clássicos ressalta o interesse no estudo desse grupo (WALLACE,1966; MCGHEE & COSGROVE,1980; VICKERMAN,1994; PODLIPAEV,2000), quando enfocam a busca de possíveis antígenos para aplicações imunológicas em bioensaios (SOUZA *et al.*,1974), o possível uso no biocontrole de vetores ou patógenos (SCHAUB,1992) e o seu emprego como modelos para estudos fisiológicos, bioquímicos, moleculares, ultraestruturais e desenvolvimento de novas drogas

quimioterápicas (McGhee & Cosgrove,1980; Vickerman,1994). Alguns tripanossomatídeos inferiores são facilmente cultivados axenicamente e estabelecidos experimentalmente em insetos, o que ressalta seu uso como modelo biológico dentro da família Trypanosomatidae (Wallace,1979; McGhee & Cosgrove,1980; Vickerman,1994).

Além disso, algumas publicações demonstraram casos de doenças semelhantes a leishmanioses causadas por tripanossomatídeos inferiores em pacientes imunodeprimindos (geralmente infectados pelo HIV) (McGhee & Cosgrove,1980; McBride *et al.*,1995; Mondain-Miton *et al.*,1995; Jiménez *et al.*,1996; Pacheco *et al.*,1998; Ibrahim *et al.*,1997; Miller,2000; Chicarro & Alvar,2003). O aparecimento desses casos e o aumento crescente do número de indivíduos infectados pelo HIV podem, num futuro próximo, levar os tripanossomatídeos inferiores a figurar como importantes patógenos oportunistas em áreas de clima tropical, onde insetos hematófagos da ordem Diptera estão freqüentemente infectados por esses microrganismos (Dedet *et al.*,1995; Dedet & Pratlog,2000). Recentemente, Barreto-de-Souza e colaboradores (2008) demonstraram que a infecção *in vitro* de macrófagos por HIV-1 diminuía a capacidade dessas células fagocíticas profissionais de eliminar o protozoário não-patogênico *Blastocrithidia culicis*, além de facilitar sua replicação. Portanto, esses dados enfatizam a necessidade de melhor caracterizar parasitos "*Leishmania*-like" isolados de pacientes com HIV e seus fatores de virulência, que permitem uma interação efetiva com hospedeiros vertebrados e invertebrados.

1.2.1) *Herpetomonas samuelpessoai*

A espécie *Herpetomonas samuelpessoai* é um parasito monoxênico, não patogênico e que é extensivamente usado como modelo em estudos fisiológicos, bioquímicos, ultraestruturais e moleculares (McGhee & Cosgrove,1980). É facilmente cultivado em meio quimicamente definido ou em meio complexo preferencialmente a 26°C, temperatura de insetos invertebrados (Angluster *et al.*,1977; McGhee & Cosgrove,1980). No entanto, são capazes de crescer também a 37°C, característica de tripanossomatídeos heteroxênicos que possuem um hospedeiro mamífero em seu ciclo de vida (Roitman, Roitman & Azevedo,1972).

O gênero *Herpetomonas* é encontrado parasitando principalmente a ordem Diptera; no entanto, podem também ser encontrados em outras ordens, incluindo hemípteros e lepdópteros (Wallace,1966; Vickerman,1976). A espécie *H. samuelpessoai* foi originalmente isolada do inseto predador *Zelus leucogramus*, pertencente à família Reduviidae (Galvão *et al.*,1970).

No entanto, várias outras espécies de *Herpetomonas* foram isoladas de outras diferentes classes de insetos, o que demonstra a capacidade deste gênero em colonizar distintos hospedeiros invertebrados. Como por exemplo, já foram isolados *Herpetomonas* sp. do inseto *Aedes aegypti* (WEINMAN & CHEONG,1978). Além disso, MARÍN e colaboradores (2007) relataram o isolamento de parasitos do gênero *Herpetomonas* em tomates (*Lycopersicon esculentum*).

Parasitos pertencentes ao gênero *Herpetomonas* apresentam durante seu ciclo de vida três estágios evolutivos: pro-, para- e opistomastigotas, caracterizados pela posição relativa do cinetoplasto ao núcleo (ANGLUSTER, BUNN & DE SOUZA,1977). O mecanismo de diferenciação de *H. samuelpessoai* é desencadeado por mudanças na composição do meio de cultura, condições de incubação e por adição de substâncias no meio de cultura que interagem com componentes da membrana plasmática, como concanavalina A (SOUZA *et al.*,1980), drogas colinérgicas (THOMAS *et al.*, ,1981a), lidocaína (THOMAS *et al.*,1981b) e dimetilsulfóxido (CASTELLANOS, ANGLUSTER & DE SOUZA ,1981; SANTOS *et al.*,2001). Essas substâncias induzem mudanças na composição sacarídica (SOARES *et al.*,1984; SANTOS *et al*.,2002a), na carga de superfcie celular (SOARES *et al.*,1988), na síntese de proteínas (SANTOS *et al.*,2001), na produção de fosfatase (SANTOS *et al.*,2002b) e na expressão de enzimas proteolíticas (SANTOS *et al.*,2003).

Sabe-se também que *H. samuelpessoai* compartilha antígenos com *Trypanosoma cruzi* (WALLACE,1966; SOUZA *et al.*,1974) e *Leishmania* spp. (ETGES,1992; SCHNEIDER & GLASER,1993), fato que favorece a utilização deste protozoário como modelo conveniente para procura de novas drogas tripanocidas. Nesse sentido, culturas vivas de *H. samuelpessoai* já foram capazes de proteger parcialmente camundongos contra o desafio de formas sangüíneas de *T. cruzi* (SOUZA *et al.*,1974).

Além disso, em 2003, *H. samuelpessoai* foi isolado do sangue de um indivíduo HIV-positivo (MORIO *et al.*,2008). O paciente era um homem de 42 anos, morador do sul da França, sem nenhuma viagem recente para fora do país, que foi internado com febre (38,9°C) e dor de cabeça frontal contínua. O paciente trabalhava como florista, era homossexual, não tinha histórico de uso de drogas, mas era portador do HIV desde 1991, apresentando vários fracassos com diferentes terapias antiretrovirais. Durante sete anos, a contagem de suas células $CD4^+$ foi de 20 células/mm^3 e, além disso, apresentou diversas infecções oportunistas, como condiloma anal, herpes zoster e múltiplos episódios de candidíase oral. No momento da admissão no hospital, o paciente foi tratado com abacavir, lamivudine, ritonavir, amprenavir e

cotrimoxazol. Seu exame físico foi normal, sem nenhuma anormalidade neurológica nem nenhum sítio primário de infecção. O exame laboratorial revelou uma moderada síndrome inflamatória, anemia, neutropenia e trombocitopenia. A biópsia da medula óssea, feita quatro dias após a internação, mostrou um processo regenerativo. Assim mesmo, exames buscando doenças bacterianas, virais, fúngicas e parasitológicas foram realizados no escarro, sangue, líquor e medula óssea, porém todos os resultados deram negativos. No entanto, sendo a leishmaniose endêmica no sul da França, uma amostra do sangue foi inoculada num meio de cultura específico e após quatro semanas um protozoário flagelado foi encontrado. A coloração de Giemsa revelou uma morfologia claramente diferente de promastigotos de *Leishmania*. Na identificação molecular, a comparação da porção 5S do rRNA revelou 92% de similaridade com uma seqüência de *H. samuelpessoai* e 99,8% de similaridade com *Herpetomonas* sp. Já a comparação da região 18S do rRNA revelou 99,8% de similaridade com a seqüência de *H. samuelpessoai*. Estes resultados sugerem que o protozoário pertencia ao gênero *Herpetomonas* e que era geneticamente relacionado à *H. samuelpessoai* (MORIO *et al.*,2008). Nesse sentido, o estudo desse protozoário torna-se ainda mais importante, uma vez comprovada a sua capacidade de infectar pacientes imunocomprometidos.

2) Peptidases

As peptidases, proteases ou peptídeo-hidrolases são enzimas que clivam ligações peptídicas em proteínas ou fragmentos protéicos (Figura 4) (BARRETT, RAWLINGS & O'BRIEN,2001). As enzimas proteolíticas são ubíquas, sendo encontradas em sistemas biológicos diversos, como plantas, animais e microrganismos. Esta classe de enzimas hidrolíticas desempenha diversos papéis e são fatores essenciais no controle homeostático tanto em procariotos quanto em eucariotos. Logo, as peptidases são responsáveis pelos complexos processos envolvidos na fisiologia normal das células, assim como na patofisiologia de muitas doenças (NORTH,1982; MCKERROW *et al.*,1993; RAO *et al.*,1998; SAJID & MCKERROW,2002; YAO, DONELSON & WILSON,2003).

Classicamente, as peptidases são classificadas baseadas em três critérios principais: (i) o tipo de reação catalisada, (ii) a natureza química do sítio catalítico e (iii) as relações evolutivas com referência à seqüência de aminoácidos e a estrutura da proteína (BARRET, RAWLING & O'BRIEN,2001).

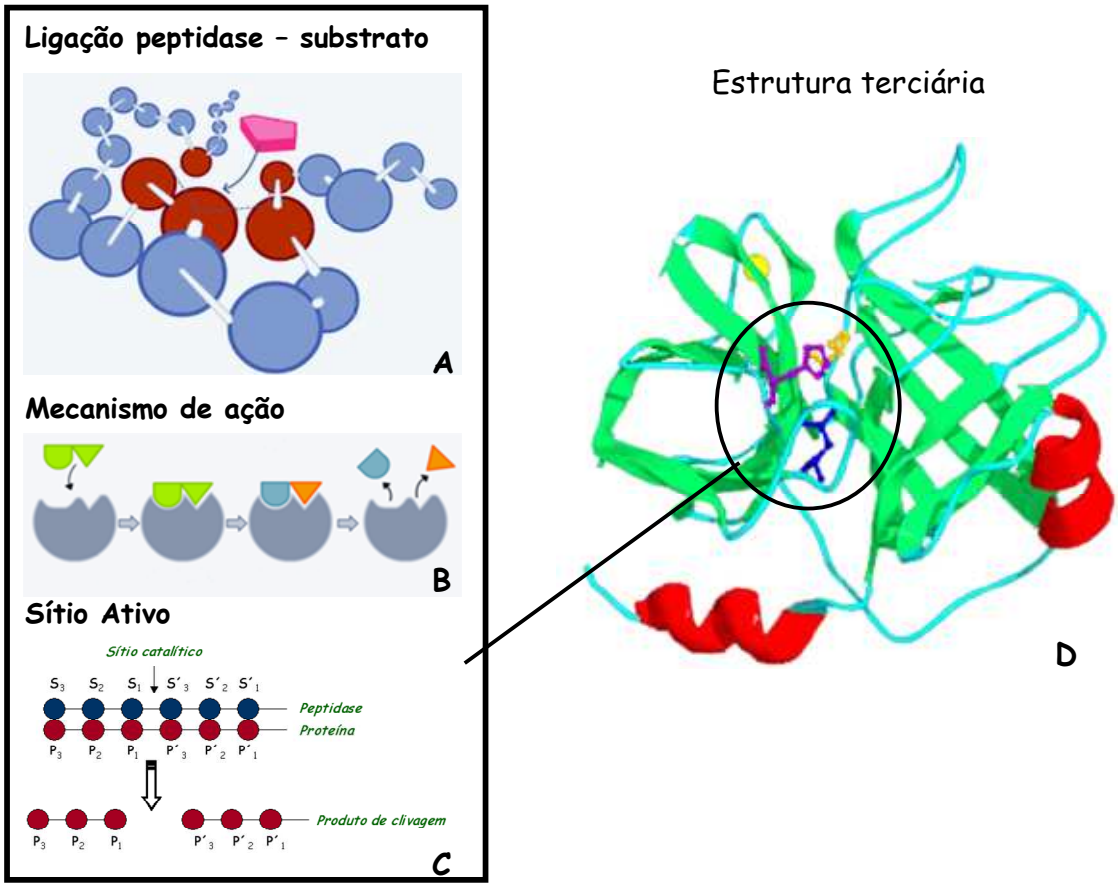

Figura 4: (A) Esquema geral da ligação do substrato (rosa) ao sítio ativo de uma peptidase (vermelho). **(B)** Mecanismo de ação de uma peptidase (cinza) após ligação do substrato (verde) e conseqüente formação do produto (azul, laranja). **(C)** Ligação dos aminoácidos do sítio ativo da peptidase (S'_1-S_3) aos aminoácidos específicos do substrato (P'_1-P_3). **(D)** Exemplo ilustrativo da estrutura terciária de uma enzima, com sítio ativo evidenciado. (Adaptado de BOND & BUTLER (1987), MEROPS database (http://merops.sanger.ac.uk)).

Dependendo do local de hidrólise na cadeia polipeptídica, as peptidases podem ser divididas em duas classes: as exopeptidases (E.C. 3.4.11-19), que clivam ligações peptídicas nas extremidades da cadeia, podendo ser genericamente denominadas amino- ou carboxipeptidases; e as endopeptidases (E.C. 3.4.21-99), que clivam ligações peptídicas internas na molécula do substrato (BOND & BUTLER,1987; MCDONALD,1985; BARRET,1986) (Figura 5).

As endopeptidases podem ser divididas em subclasses baseadas nos grupamentos químicos que se localizam no sítio ativo dessas enzimas. Elas podem ser do tipo cisteína, serina, metalo, treonina, aspártico e glutâmico endopeptidases. Algumas enzimas não se encaixam nessas subclasses e formam o grupo 3.4.99, de mecanismo catalítico desconhecido (revisto por BARRET, RAWLING & O'BRIEN,2001) (Figura 5).

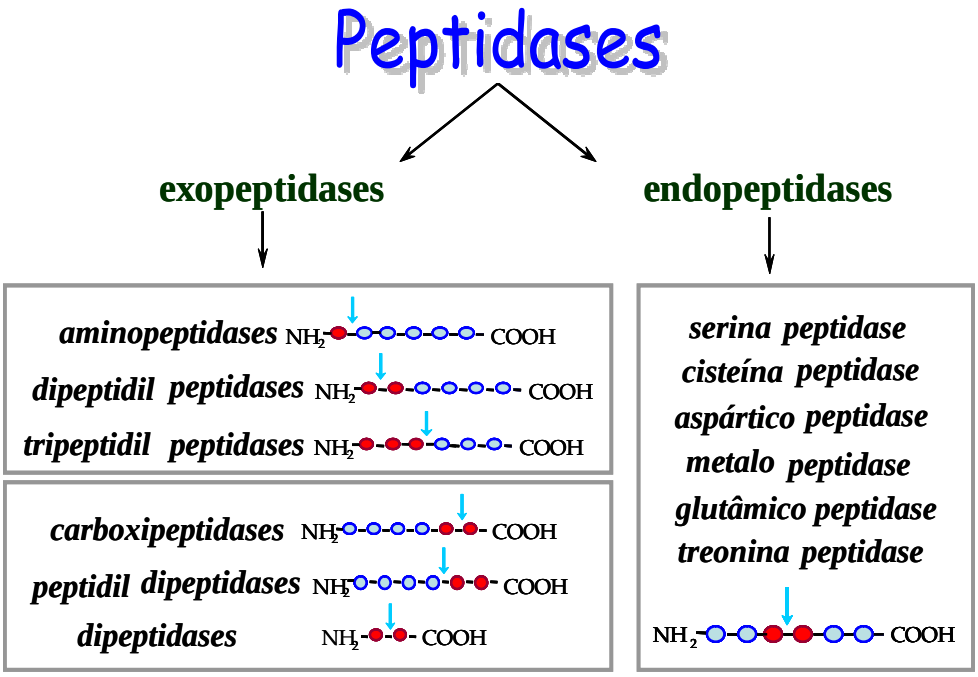

Figura 5: Esquema da classificação das peptidases quanto ao tipo de reação catalisada e a natureza química do sítio ativo (adaptado de BOND & BUTLER,1987).

A seqüência de aminoácidos na região amino-terminal das peptidases permite analisar as relações evolutivas existente entre estas; a identificação de similaridades estruturais reflete importantes correlações entre mecanismos catalíticos e outras propriedades (BARRET,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://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; BARRET, RAWLING & O´BRIEN,2001; RAWLINGS, O'BRIEN & BARRETT,2002; RAWLINGS, TOLLE & BARRETT,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).

2.1) Inibidores Proteolíticos

Muitos inibidores proteolíticos naturais e sintéticos têm sido identificados (BARRETT,1986; BODE & HUBER,1992). Inibidores naturais desenvolvem funções importantes na regulação pós-traducional da atividade proteolítica em microrganismos e em seus hospedeiros (LUSTIGMAN *et al.*,1992). Inibidores sintéticos são usados como ferramentas importantes na subclassificação das peptidases em seus grupos principais (BARRETT,1986). Os efeitos de inibidores sobre a atividade enzimática podem determinar a classe das peptidases (BARRETT,1994). Os inibidores proteolíticos podem ser agrupados de acordo com sua especificidade: aqueles que reagem com mais de uma classe de peptidase; os que são específicos por uma única classe; e finalmente, aqueles que possuem alta especificidade por uma única peptidase (BEYNON & BOND,1989).

Todas as serina peptidases conhecidas são inibidas por diisopropilfluorfosfato (DFP ou DIFP) ou diisopropilfluorfosfofluorideto (DispF), muitas por fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), e algumas por clorometil cetonas [*N*-*p*-tosil-lisina-clorometil cetona (TLCK), L-1-tosilamido-2-feniletil clorometil cetona (TPCK)]. Entretanto, PMSF e clorometil cetonas também inibem algumas cisteína peptidases. As cisteína peptidases são em geral inibidas por pequenas concentrações de *p*-hidroximercuriobenzoato (*p*HMB, o produto de hidrólise do *p*-cloromercuriobenzoato), L-*trans*-epoxisuccinil leucilamido-(4-guanidino) butano (E-64) e reagentes alcalinos, tais como acetato de iodo, iodoacetamida e N-etilmaleimida (NEM). As aspártico peptidases são inibidas especificamente por pepstatinas e compostos diazoacetílicos, tal como o diazoacetil-L-fenil-metil éster. Metalo peptidases são geralmente inibidas por agentes quelantes, como ácido etileno-diamino tetracético (EDTA), quelante de Mg^{+2}, etileno glicol-bis (β-aminoetil éter) (EGTA), que quela Ca^{+2}, e 1,10-fenantrolina, quelante de Zn^{+2} (RAO *et al.*,1998).

2.2) Peptidases em Tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos produzem uma enorme variedade de peptidases com diferentes especificidades, tanto intra quanto extracelulares, além de peptidases de superfície

(exopeptidases). Muitas delas já foram purificadas, caracterizadas e seus genes clonados e seqüenciados. É proposto que as peptidases desempenham diferentes funções de acordo com a fase do ciclo celular em que se encontra o parasito, sendo relevantes em diversos aspectos da relação parasito-hospedeiro, incluindo: adsorção, penetração, sobrevivência intracelular, replicação, diferenciação, escape do sistema imune e nutrição (revisto por MCKERROW *et al.*,1993; CAZZULO, STOKA & TURK,1997; SAJID & MCKERROW,2002). Além disso, devido a suas características estruturais não muito comuns, as peptidases de parasitos parecem ser alvos alternativos para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (NORTH,1982; MCKERROW *et al.*,1993; MEDINA-ACOSTA, BEVERLEY & RUSSELL,1993; MEDINA-ACOSTA, KARESS & RUSSELL,1993; YAO, DONELSON & WILSON,2003).

Os estudos sobre as peptidases de tripanossomatídeos são relevantes por servirem de modelo para compreensão da função e evolução das peptidases em geral. A comparação de seqüências de aminoácidos, estruturas tridimensionais e mecanismo bioquímico de ação ajudam a decifrar o curso de evolução das peptidases (MEDINA-ACOSTA, KARESS & RUSSELL,1993; RAWLINGS, O'BRIEN & BARRETT,2002; RAWLINGS, TOLLE & BARRETT,2004a).

Nos tripanossomatídeos, as metalo e cisteína peptidases são as enzimas proteolíticas mais amplamente estudadas (NORTH,1982; MCKERROW *et al.*,1993; BRANQUINHA *et al.*,1994;1996; SANTOS *et al.*,2006;2007).

3) Metalopeptidades

3.1) Leishmanolisina (Gp63 em *Leishmania*)

As metalopeptidases são enzimas amplamente detectadas em diferentes espécies de tripanossomatídeos (BRANQUINHA *et al.*,1996; SANTOS *et al.*,2006;2007). A mais estudada e melhor caracterizada metalopeptidase expressa por um parasito constituinte da família Trypanosomatidae é uma glicoproteína de 60-65 kDa, denominada gp63, leishmanolisina, PSP ("promastigote surface peptidase") ou MSP ("major surface peptidase") (revisto por YAO, DONELSON & WILSON,2003) (Figura 6). Já foram identificados genes que codificam proteínas homólogas à gp63 em *T. brucei* (NAJIB, EL-SAYED & DONELSON,1997) e *T. cruzi* (CUEVAS, CAZZULO & SÁNCHEZ,2003), além de peptidases com reação cruzada que foram detectadas em alguns tripanossomatídeos inferiores (INVERSO *et al.*,1993; SCHNEIDER & GLASER,1993; revisto por SANTOS, BRANQUINHA & D'AVILA-LEVY,2006).

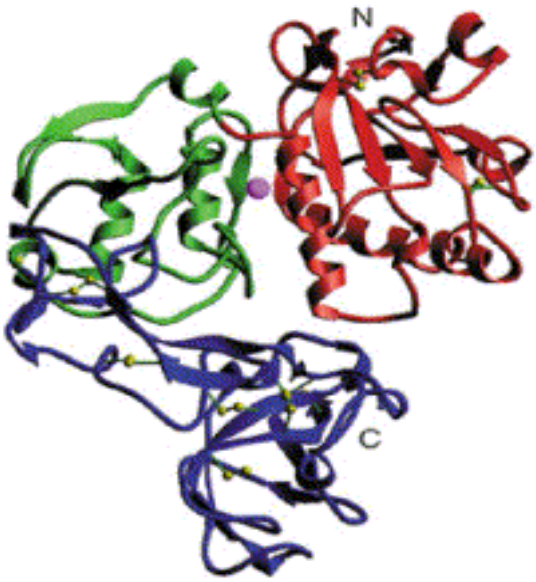

Figura 6: Estrutura da leishmanolisina de *L. major*. Representação das fitas da estrutura com o domínio N-terminal mostrado em vermelho, o domínio central em verde e o domínio C-terminal em azul. Pontes dissulfeto estão mostradas em amarelo e o sítio ativo com o átomo de zinco é representado pela esfera rosa (SCHLAGENHAUF, ETGES & METCALF,1998).

Assim como a maioria das moléculas de superfície em tripanossomatídeos, essa glicoproteína está ligada à membrana via uma âncora de GPI (BORDIER *et al.*,1986), mas também pode ser detectada no meio extracelular. Como a sua secreção é fortemente inibida pelo quelante de metal 1,10-fenantrolina, sugere-se que este processo é dependente de autoproteólise (MCGWIRE *et al.*,2002; YAO *et al.*,2002).

Diversas espécies de *Leishmania* spp. contêm classes distintas dos genes que codificam a gp63, os quais são regulados nos diferentes estágios do ciclo de vida dos parasitos. Todas elas têm pelo menos 6 cópias randômicas de genes relacionados intimamente, que codificam diferentes proteínas gp63; no entanto, algumas espécies podem ter até mais de ,20 genes randômicos desta proteína (SZARFMAN *et al.*,1981; MEDINA-ACOSTA, BEVERLEY & RUSSELL,1993; STEINKRAUS *et al.*,1993). Uma simples interpretação para tal fato seria a de que múltiplas moléculas de gp63 poderiam apresentar diferentes funções durante o ciclo de vida de *Leishmania* (NAJIB, EL-SAYED & DONELSON,1997). A gp63 é abundantemente expressa na superfície da forma promastigota procíclica (parasitos em fase log de crescimento) (ETGES, BOUVIER & BORDIER,1987), que é infectiva ao inseto, tem sua expressão aumentada nas formas promastigotas metacíclicas infectivas ao homem (fase estacionária), e tem um baixo, porém detectável nível de expressão na forma amastigota intracelular (MEDINA-ACOSTA, BEVERLEY & RUSSELL,1993; MEDINA-ACOSTA, KARESS & RUSSELL,1993). Entretanto, nem todas as espécies de *Leishmania* expressam a gp63 na forma amastigota

(revisto por YAO, DONELSON & WILSON,2003). Conseqüentemente, essa proteína desempenha importantes papéis nos diferentes estágios do ciclo celular da *Leishmania*.

A gp63 é uma endopeptidase capaz de hidrolisar diversos substratos protéicos *in vitro*, incluindo proteínas do soro: albumina, componentes do sistema complemento, fibrinogênio, hemoglobina e imunoglobulinas (BOUVIER *et al.*,1990), assim como componentes da matriz extracelular, tais como colágeno do tipo IV e fibronectina, o que facilita a migração do parasito através da membrana basal subendotelial, facilitando sua disseminação nos tecidos (MCGWIRE, CHANG & ENGEMAN,2003). Porém, *in vivo*, os substratos da gp63 não são conhecidos. Essa ampla capacidade de degradação é um forte indicativo de que a enzima também auxilia na nutrição do parasito (revisto por SANTOS, BRANQUINHA & D'AVILA-LEVY,2006). Além disso, foi testada a hipótese de que a gp63 era capaz de proteger os parasitos dos efeitos citolíticos de vários peptídeos antimicrobianos, componentes importantes do sistema imune inato dos vertebrados (KULKARNI *et al.*,2006). Foi visto que α- e θ-defensinas, mangainina e catelicidinas têm uma atividade leishmanicida maior contra a espécie *L. major* após nocaute para gp63. Usando um análogo da magainina, a pexiganana, como modelo de peptídeo, mostrou-se que a evasão era devido a rápida e extensa degradação do peptídeo por parasitas selvagens. O tratamento de parasitas nocautes com pexiganana induzia a maior permeabilidade da membrana e expressão de características típicas de apoptose, incluindo diminuição do tamanho celular, exposição de fosfatidil serina assim como indução da via das caspases. Esses resultados mostram a gp63 como um fator de virulência, protegendo o parasito da morte programada induzida pelos peptídeos antimicrobianos (KULKARNI *et al.*,2006).

Várias possíveis funções já foram sugeridas para a molécula de gp63 quando o promastigota de *Leishmania* está presente no hospedeiro vertebrado, tais como: estímulo da fagocitose através dos receptores CR3 dos macrófagos (MOSSER & EDELSON,1987; RUSSELL, TALAMAS-ROHANA & ZELECHOWSKI,1989; BRITTINGHAM *et al.*,1995); auxílio no escape do sistema imune, clivando MHC de classe I (GARCIA *et al.*,1997) e suprimimdo a proliferação de células NK (natural killer) (LIEKE *et al.*,2008); auxílio na sobrevivência ao ataque microbicida dos macrófagos; escape do sistema complemento através da lise do componente C3 (CHAUDHURI & CHANG,1988) e conversão do componente C3b em uma forma inativa – C3bi (BRITTINGHAM *et al.*,1995); e diminuição da resposta das células T através da clivagem de receptores de superfície, como CD4 (HEY *et al.*,1994). Sabe-se também que a gp63 purificada de *L. donovani* encapsulada em lipossomas catiônicos pode induzir uma proteção

contra leishmaniose visceral em camundongos BALB/c quando desafiados poucos dias após a indução, assim como após doze semanas (BHOWMIICK, RAVIDRAN & ALI,2008).

Contudo, durante a colonização e interação com o inseto vetor, somente especulações são feitas sobre a relevância da gp63. Nesse contexto, sabe-se que a gp63 é predominantemente presente na superfície de promastigotas residentes no intestino do inseto vetor flebotomíneo (GRIMM *et al.*,1987; DAVIES *et al.*,1990). Entretanto, dados mostram que o nocaute dos genes da gp63 em *L. major* não interfere na sua sobrevivência dentro do inseto, uma vez que o número de promastigotas no intestino de *Phlebotomus dubosqui* foi comparável quando estes são infetados com as espécies selvagem e mutante (JOSHI *et al.*,2002). Contrariamente, na espécie *L. amazonensis* a diminuição da expressão de gp63, num primeiro momento da infecção, afeta o desenvolvimento dos parasitos dentro do inseto *Lutzomyia longipalpis* (HAJMOVÁ *et al.*,2004). Provavelmente, a gp63 desempenha funções diferentes nas distintas espécies de *Leishmania* no que se refere à interação com seus respectivos hospedeiros invertebrados (HAJMOVÁ *et al.*,2004).

3.2) Gp63 no gênero *Trypanosoma*

3.2.1) *Trypanosoma brucei*

T. brucei é o agente causador da doença do sono em humanos e da nagana em bovinos, sendo disseminado em áreas extensas de diferentes regiões do continente africano (BANGS *et al.*,2001). Já foi observada em *T. brucei* a existência de múltiplos genes homólogos a *gp63* de *Leishmania* (NAJIB, EL-SAYED & DONELSON,1997; BANGS *et al.*,2001). Estes genes podem ser agrupados em três famílias (*TbMSP-A*, *TbMSP-B* e *TbMSP-C*), baseadas na diferença de expressão durante o ciclo de vida do parasito. As formas sanguíneas têm mRNA para os três tipos, enquanto as formas procíclicas, existentes no hospedeiro invertebrado, só possuem mRNA para *TbMSP-B* (GRANDGENETT *et al.*,2007). Além disso, quando expressos, esses genes codificam proteínas similares à gp63 (NAJIB, EL-SAYED & DONELSON,1997; LACOUNT *et al.*,2003), que apresentam-se também como uma glicoproteína de superfície (BANGS *et al.*, ,1997) com atividade de zinco-metalopeptidase (LACOUNT *et al.*,2003).

Já se sabe que a gp63 homóloga desses tripanossomas contribui para aumentar a resistência contra o sistema complemento (MOSSER & ROBERTS,1992; NAJIB, EL-SAYED & DONELSON,1997), auxiliando o parasito a burlar o sistema imune (DONELSON,2003). Além disso, a enzima está envolvida na proliferação do parasito no interior de seus hospedeiros (BANGS *et al.*,2001) e na diferenciação das formas sanguíneas para as formas procíclicas

(GRANDGENETT *et al.*,2007). Entretanto, ainda é preciso investigar mais sobre a função da proteína homóloga à gp63 nesses tripanossomas e sua relação com a gp63 de *Leishmania*, já que esses tripanossomas não interagem com macrófagos nem têm nenhum estágio intracelular durante o seu ciclo de vida, que envolve humanos e insetos invertebrados – a mosca tsetsé (NAJIB, EL-SAYED & DONELSON,1997).

3.2.2) *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é o parasito flagelado causador da doença de Chagas no continente americano, em especial na América Latina. Seu ciclo de vida é complexo, envolvendo um inseto vetor hematófago – um barbeiro – e um hospedeiro mamífero (CUEVAS, CAZZULO & SÁNCHEZ,2003).

No caso da *Leishmania*, o número de genes de *gp63* é variável, oscilando entre 6 e 20, sendo todos com regiões altamente conservadas (BUTTON *et al.*, ,1989; WEBB, BUTTON & MCMASTER,1991; ROBERTS *et al.*,1993; STEINKRAUS *et al.*,1993; VOTH *et al.*,1998). Em contraste, estudos de biologia molecular sugerem que em *T. cruzi* pelo menos 70 genes codificam para moléculas homólogas à gp63 (GRANDGENETT *et al.*,2000).

GRANDGENETT e colaboradores (2000) verificaram que pelo menos 8 diferentes genes homólogos à gp63 são expressos nos estágios amastigotas e epimastigotas do ciclo de vida do *T. cruzi*, sendo que na fase epimastigota (a forma encontrada no inseto) a expressão é aumentada. Já foi mostrado também que os homólogos de gp63 expressos em *T. cruzi* apresentam um comportamento similar a zinco metalopeptidade e à gp63 de outros organismos (SCHLAGENHAUF, ETGES & METCALF,1998; GRANDGENETT *et al.*,2000). Verificou-se que essa proteína homóloga à gp63 está ligada à membrana via uma âncora de GPI e participa da interação de formas tripomastigotas com células Vero *in vitro* (CUEVAS, CAZZULO & SÁNCHEZ,2003).

3.3) Gp63 em Tripanossomatídeos Inferiores

O primeiro relato da presença de homólogo de gp63 em tripanossomatídeos inferiores foi em *Crithidia fasciculata* e *H. samuelpessoai* (ETGES,1992). A presença de uma metalopeptidase funcional conservada na superfície desses parasitos sugeriu que a gp63 em *Leishmania* não estaria envolvida somente na infecção de hospedeiros mamíferos, mas também contribuiria na sobrevivência dos parasitos dentro do trato digestivo do inseto, uma vez que o único ponto de interseção entre o ciclo de vida destes parasitos monoxênicos e os heteroxênicos é o inseto vetor. É interessante notar que a metalopeptidase de membrana

presente na forma móvel de *C. fasciculata* era diferente da presente na forma aderente, sugerindo a expressão diferenciada de gp63, dependendo da fase de desenvolvimento do parasito (ETGES,1992). Já foi detectada a presença de um gene em *C. fasciculata* com elevada homologia à *gp63* de *Leishmania*, que apresenta um local de ligação para o zinco e um provável sítio para adição de âncora de GPI (INVERSO *et al.*,1993).

Outras similaridades entre gp63 de *Leishmania* e uma metalopeptidase de *H. samuelpessoai* foram demonstradas, como a presença da âncora de GPI, localização na superfície e sensibilidade a 1,10-fenantrolina (SCHNEIDER & GLASER,1993). A metalopeptidase de 63 kDa expressa na superfície de *H. samuelpessoai* também foi detectada no conteúdo citoplasmático (SANTOS *et al.*, 2002a), o que indicava a ocorrência de isoformas hidrofílicas ou a detecção da atividade enzimática da molécula precursora, que ainda não havia sido transportada para a membrana plasmática (SANTOS *et al.*,2003). De forma similar, *L. mexicana* apresenta uma proteína lisossomal, relacionada à gp63 de superfície, em amastigotas (ILG, HARBECKE & OVERATH,1993). Células de *H. samuelpessoai* também são capazes de secretar para o meio extracelular a metalopeptidase de superfície de 63 kDa (SANTOS *et al.*,2002a). Provavelmente, em *H. samuelpessoai* essa metalopeptidase é expressa na superfície na forma de diferentes isoenzimas, já que três bandas distintas de proteólise foram observadas na região de 63 kDa, quando as células são fixadas e tratadas com fosfolipase C (PLC) (SANTOS *et al.*,2002a). A diferença na migração da gp63 em SDS-PAGE pode ser explicada pela heterogeneidade gerada pelos processos pós-traducionais, como a glicosilação (BORDIER *et al.*,1986). Corroborando este fato, a proteína gp63 de *H. samuelpessoai* foi capaz de se ligar à lectina Concanavalina A, fato atribuído à sua natureza glicoprotéica (SANTOS *et al.*,2002b).

Proteínas com reação cruzada com a gp63 já foram detectadas em vários outros tripanossomatídeos inferiores, como por exemplo: *B. culicis* (D'AVILA-LEVY *et al.*,2005a), *Crithidia deanei* (D'AVILA-LEVY *et al.*,2003,2006a), *C. fasciculata* (ETGES,1992, INVERSO *et al.*,1993, BRANQUINHA *et al.*,1996), *Crithidia guilhermei* (BRANQUINHA *et al.*,1996, NOGUEIRA DE MELO *et al.*,2001, D'AVILA-LEVY *et al.*,2006a), *Crithidia lucilae* (JAFFE & DWYER,2003, BRANQUINHA *et al.*,1996), *Herpetomonas megaseliae* (NOGUEIRA DE MELO *et al.*,2006), *Herpetomonas anglusteri* e *Herpetomonas roitmani* (SANTOS *et al.*,1999; SANTOS *et al.*,2006), *H. samuelpessoai* (SCHNEIDER & GLASER,1993, BRANQUINHA *et al.*,1996, SANTOS *et al.*,2003), *Leptomonas seymouri* (JAFFE & DWYER,2003, SANTOS *et al.*,2005), *Leptomonas collosoma*, *Leptomonas samueli*, *Leptomonas wallacei* (PEREIRA *et al.*,2009), *Phytomonas*

françai (ALMEIDA *et al.*,2003, D'AVILA-LEVY *et al.*,2006a) e *Phytomonas serpens* (VERMELHO *et al.*,2003, D'AVILA-LEVY *et al.*,2006b) (Tabela 1). A ubíqua expressão desta molécula sugere que a gp63 vem sendo conservada ao longo da evolução, já que os tripanossomatídeos monoxênicos encontram-se próximos ao gênero *Leishmania* na árvore filogenética (Figura 7). Pensando assim, como o único ponto em comum entre os dois ciclos (os parasitos monoxênicos e heteroxênicos) é o hospedeiro invertebrado, sugere-se que a peptidase tenha alguma função no intestino do inseto vetor (ETGES,1992, INVERSO *et al.*,1993; SANTOS, BRANQUINHA & D'AVILA-LEVY,2006), mas poucas evidências experimentais foram realizadas no intuito de confirmar esta hipótese (D'AVILA-LEVY *et al.*,2006a). Dessa forma, alguns estudos tentando elucidar a função da gp63 vêm sendo desenvolvidos em tripanossomatídeos inferiores, pois além de poder ser somente um vestígio evolucionário da era em que os tripanossomatídeos inferiores tinham outro hospedeiro, a molécula similar à gp63 pode estar protegendo o parasito da resposta imunológica do inseto ou então tem alguma função ainda não descoberta (NAJIB, EL-SAYED & DONELSON,1997).

Tabela 1: Presença de Moléculas Similares à gp63 em Tripanossomatídeos Inferiores

Tripanossomatídeo	Massa molecular da proteína [1]	Presença de âncora de GPI [2]	A tividade de Metalo [3]	Ppapel na adesão com invertebrado [4]
Blastocrithidia culicis	50 (c,s)	+	50,55,76	não determinado
Crithidia deanei	62(c,s), 67 (c)	+	51,58	*Aedes aegypti*
Crithidia fasciculata	54 (s)[a]	+[a]	59,63	não determinado
Crithidia guilhermei	62(c,s), 67(c)	não determinado	57,61	*Aedes aegypti*
Crithidia lucilae	75(s, 97(s), >100(s)	não determinado	55,61	não determinado
Herpetomonas megaseliae	52(c,s), 60(c),63(c)	+	50,60,70	*Megaseliae scalaris* *Aedes aegypti*
Leptomonas seymouri	97(s)	não determinado	65,70,78,80	não determinado
Phytomonas françai	62(c), 67(c,s)	não determinado	não determinado	*Aedes aegypti*
Phytomonas serpens	52(c), 60(c,s), 63(c)	+	não detectado	*Oncopeltus fasciatus*

[1] A massa molecular das proteínas similares à gp63 (em kDa) foi determinada por comparação com proteínas padrões após SDS-PAGE e Western blotting, usando anticorpo policlonal anti-gp63. (c) celular; (s) sobrenadante de cultura

[2] A presença da âncora de GPI foi detectada tratando os parasitos com fosfolipase C e incubando os polipetídeos liberados com anticorpo anti-CRD.

[3] Os números indicam as massas moleculares relativas em kDa das metalopeptidases detectadas por SDS-PAGE com gelatina incorporada ao gel.

[4] O possível papel dos homólogos da gp63 na adesão com o hospedeiro invertebrado foi determinado através de experimentos de interação. No caso do *Aedes aegypti* os parasitos se aderem ao intestino, no *Oncopeltus fasciatus*, às glândulas salivares.
[a] O gene com alta homologia com gp63 foi clonado e seqüenciado em *C. fasciculata*, e esse gene contém um provável local para adição da âncora de GPI. (adaptado de SANTOS, BRANQUINHA & D'AVILA-LEVY,2006).

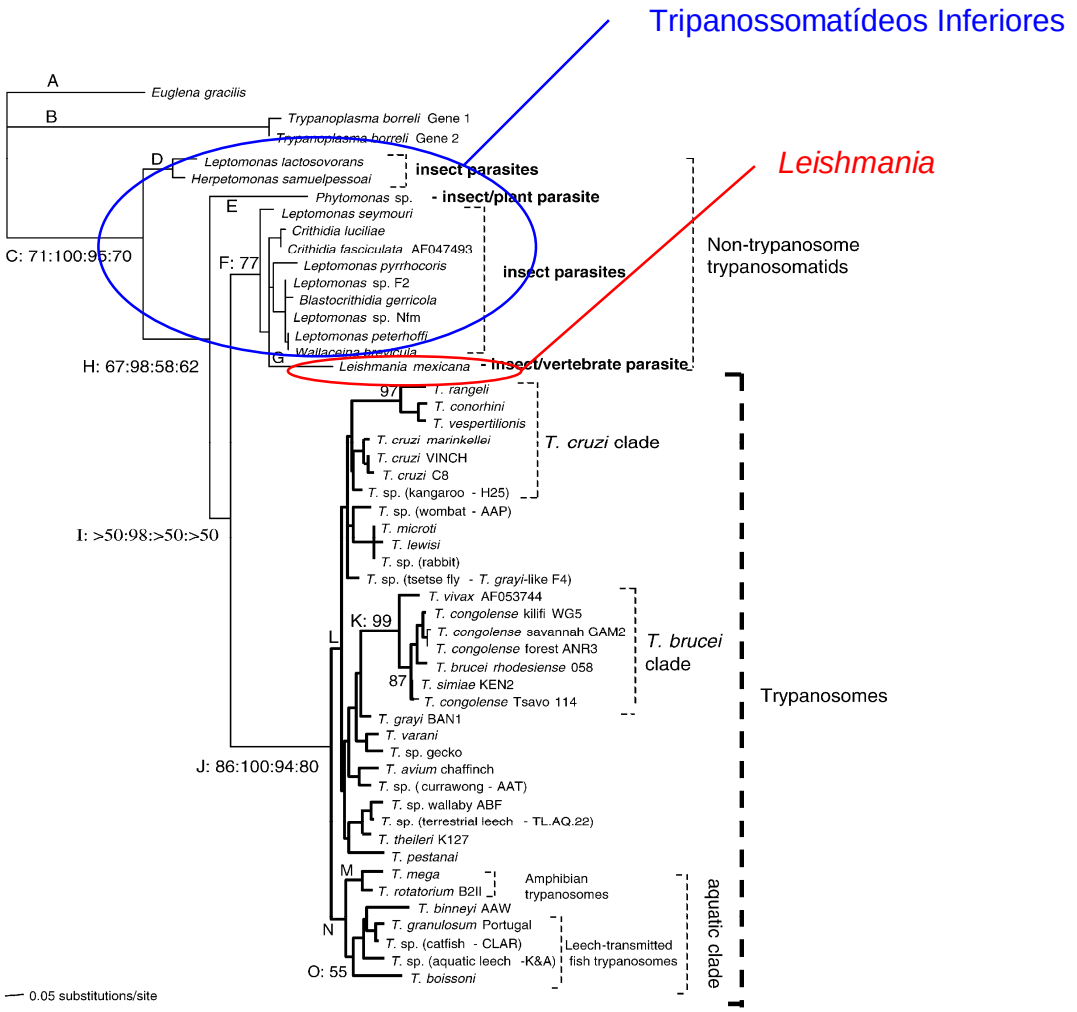

Figura 7: Árvore filogenética evidenciando a proximidade dos tripanossomatídeos monoxênicos com *Leishmania* (Adaptado de MASLOV & SIMPSON,1995).

4) Interação entre Tripanossomatídeos Monoxênicos e Hospedeiros Invertebrados e Vertebrados

Os tripanossomatídeos monoxênicos proliferam no tubo digestivo do inseto e, eventualmente, invadem a hemolinfa. Diversos aspectos da associação parasito-hospedeiro já foram estudados utilizando-se como modelo vários gêneros de parasitos monoxênicos (MOLYNEUX,1977; MCGHEE & COSGROVE,1980), contudo esses aspectos se restringiam principalmente ao nível ultraestrutural (BROOKER,1971; BAILEY & BROOKS,1972b;

BRUN,1974; LAUGÉ & NISHIOKA,1977; MOLYNEUX & ASHFORD,1975; MOLYNEUX, CROFT & LAVIN,1981; ROWTON, LUSHBAUGH & MCGHEE,1981; TIESZEN, HEYWOOD & MOLYNEUX,1983; TIESZEN, MOLYNEUX & ABDEL-HAFEZ,1986; BEARD, BUTTLER & GREINER,1989; TIESZEN & MOLYNEUX,1989).

Já se sabe que o trato digestivo é o primeiro ambiente que o parasito encontra quando entra no hospedeiro, e a adesão às células epiteliais é essencial para sua sobrevivência (SINDEN & BILLINGSLEY,2001). Foi demonstrado que os tripanossomatídeos que contêm um endossimbionte em seu citoplasma interagem melhor com intestinos explantados de insetos (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Lutzomyia longipalpis*), quando comparado ao mesmo parasito livre de endossimbionte (cepas aposimbióticas) (FAMPA *et al.*,2003). Além disso, a ligação tanto do flagelo quanto do corpo celular com o epitélio do intestino do inseto é estável o bastante para suportar a colonização por estes tripanossomatídeos ao longo de vários dias (FAMPA *et al.*,2003). Também já foi demonstrado que o número de protozoários encontrados por intestino na interação entre *B. culicis* e *Aedes albopictus* foi semelhante ao que já havia sido reportado na interação de *Leishmania major* com *Phlebotomus papatasi* e *Leishmania donovani* com *Phlebotomus argentipes*, seus hospedeiros naturais, respectivamente (PIMENTA *et al.*,1994; SACKS *et al.*,1995), o que corrobora o uso do gênero *Aedes* como modelo de estudo para interação com tripanossomatídeos inferiores. Além disso, CORRÊA-DA-SILVA e colaboradores (2006) demonstraram que *B. culicis* era capaz de colonizar o intestino de *A. aegypti* por longos períodos, enfatizando a grande capacidade desse parasito em colonizar insetos vetores e reforçando a idéia de que tripanossomatídeos monoxênicos têm baixa especificidade pelos seus hospedeiros (WALLACE,1966; PODLIPAEV,2001; PODLIPAEV *et al.*,2004).

Estudos foram conduzidos em vários aspectos do ciclo de vida de *H. samuelpessoai*, incluindo transmissão, infectividade, patogenicidade, órgão de colonização preferencial e ligação a tecidos hospedeiros (BECKER,1923a,b; STRICKLAND & ROY,1925; WALLACE & CLARK,1959; BAILEY & BROOKS,1972a,b; BRUN,1974). Na interação desses parasitos com *Musca domestica*, foram observados flagelados perto da inserção da glândula retal (HUPPERICH, CAMARGO & MILDER,1992), diferentemente dos casos de interação entre *Crithidia* (TIESZEN, MOLYNEUX & ABDEL-HAFEZ,1989), *Leptomonas* (LAUGÉ & NISHIOKA,1977; TIESZEN, MOLYNEUX & ABDEL-HAFEZ,1986) e *Blastocrithidia* (SCHAUB & BOKER,1984; TIESZEN, MOLYNEUX & ABDEL-HAFEZ,1986) e seus respectivos insetos hospedeiros. Células de *H. samuelpessoai* presentes em *M. domestica* apresentam-se

majoritariamente como promastigotas, estando algumas células diferenciadas em paramastigotas. No modelo de infecção com *M. domestica*, os parasitos foram encontrados livres no intestino, ou presos à superfície do epitélio. Opistomatigotas foram encontrados em menores números no início da infecção nesses locais, porém estavam presentes no reto por todo o período da colonização. Os flagelados nunca foram encontrados no lúmen ou nos túbulos de Malphighi (HUPPERICH, CAMARGO & MILDER,1992). Aparentemente, *H. samuelpessoai* mantém a infecção por longos períodos, provavelmente por contaminação fecal-oral, garantindo a perpetuação desses tripanossomatídeos na natureza (HUPPERICH, CAMARGO & MILDER,1992).

Na interação entre *L. wallacei* e *Oncopeltus fasciatus* somente são observados parasitos no intestino do inseto, encontrando-se livres de parasitos a hemolinfa e as glândulas salivares (MCGHEE & HANSON,1962). Os sítios preferenciais são as porções média e final do intestino, no qual os parasitos encontram-se aderidos via flagelo (ROMEIRO *et al.*,2003).

No momento da interação, a membrana celular do parasito é o primeiro ponto de contato com as superfícies do hospedeiro. Sendo assim, os glicoconjugados de superfície tanto da membrana celular do parasito quanto da célula hospedeira exercem funções importantes na interação entre diferentes tipos de microrganismos e seus hospedeiros (KARRISON,1989). Nos tripanossomatídeos, essa classe de moléculas está envolvida em processos de reconhecimento, adesão, adsorção, penetração, apresentação e variação de antígenos e virulência. Além disso, podem ter uma função reguladora nos processos de interação (NOLAN & FARREL,1985; DE SOUZA,1989; PIMENTA *et al.*,1992; DE SOUZA,1995; MCCONVILLE,1995; COLLI & ALVES,1999; DESCOTEAUX & TURCO,1999). Logo, são bastante relevantes os estudos que visam detectar e caracterizar moléculas de superfície, que sejam diretamente responsáveis pelo início ou persistência de uma possível infecção (DE SOUZA,1995).

Já se sabe que glicoconjugados de superfície de *Leishmania* spp. e de *T. cruzi* estão envolvidos em eventos importantes na interação com seus hospedeiros invertebrados (VILLALTA & KIERSZEBAUM ,1983, ,1985; PIMENTA *et al.*,1992). Em tripanossomatídeos inferiores das espécies *Blastocrithidia culicis* e *Crithidia deanei* mostrou-se que glicoconjugados ricos em ácido siálico, presentes na superfície, são capazes de auxiliar a interação com o intestino do inseto *A. aegypti*, uma vez que o pré-tratamento desses intestinos com mucina, fetuína, sialolactose e α-metil-D-manosídeo inibem consideravelmente a interação (D'AVILA-LEVY *et al.*,2005b). Da mesma forma acontece com a presença de

moléculas sialiladas na superfície de *H. megaseliae* e a interação com o intestino de *A. aegypti* (SILVA *et al.*,2009).

Sendo conhecida a presença de um glicoconjugado de 63 kDa semelhante ao de *Leishmania* em tripanossomatídeos inferiores que supostamente vem sendo conservado evolutivamente, é interessante pesquisar o papel dessa molécula na interação com o hospedeiro invertebrado. No caso da espécie *C. deanei*, demostrou-se que a própria molécula similar à gp63 na superfície desses parasitos era importante na interação com o hospedeiro invertebrado (D'AVILA-LEVY *et al.*,2008). Para as espécies *Leptomonas samueli* e *L. wallacei* a molécula similar à gp63 também se mostra relevante, já que o pré-tratamento dessa vez dos parasitos com anticorpos anti-gp63 diminui a interação com a linhagem celular de *Aedes albopictus* (C6/36) (PEREIRA *et al.*,2009). Nesse sentido, a presença de proteínas similares à gp63 expressas em tripanossomatídeos inferiores já foi demonstrada como relevante na interação desses parasitos com intestinos de *A. aegypti* (revisado por SANTOS, BRANQUINHA, D'AVILA-LEVY,2006).

As peptidases também são extremamente importantes na interação dos tripanossomatídeos com o hospedeiro vertebrado. Sabe-se que as cisteína peptidases de *T. cruzi* auxiliam a interação e a penetração das formas tripomastigotas nas células hospedeiras, (revisto por CAZZULO, STOKA & TURK,1997). Em relação à cisteína peptidase de *Leishmania* (CPB), informações sobre o seu papel na interação com o hospedeiro foram obtidas criando um mutante deficiente em CPB. Foi mostrado que esses promastigotas mutantes infectam em menor proporção os macrófagos do que os parasitos selvagens (*in vitro*) e causam apenas pequenas lesões quando inoculados em camundongos BALB/c, pois possuem crescimento lento (MOTTRAM *et al.*, ,1996). Já a metalopeptidase gp63 de *Leishmania* é um antígeno com importante papel na internalização dos parasitas por macrófagos (CHAKRABARTY *et al.*,1996; BRITTINGHAM *et al.*,1999; PUENTES *et al.*,1999). Essa peptidase possui seqüências gênicas relacionadas com a fibronectina que são reconhecidas por receptores na superfície dos macrófagos, contribuindo para um aumento da interação com o hospedeiro vertebrado (SOTERIADOU *et al.*,1992). Em relação aos tripanossomatídeos inferiores, no caso da espécie *C. deanei*, demostrou-se que a molécula similar à gp63 na superfície desses parasitos era capaz de auxiliar a interação com fibroblastos de mamíferos (MATTEOLI *et al.*,2008).

Além disso, LLOYD-SMITH, POSS E GRENFELL (2008) demonstraram que o HIV-1 pode facilitar a invasão por parasitos, pois aumenta a susceptibilidade celular, causando assim a

emergência de novas espécies parasitárias. Nesse sentido, ressalta-se a importância de compreender o papel funcional das peptidases na interação com os hospedeiros.

4.1) *Aedes aegypti* – modelo de inseto para estudos de interação

O díptero da família Culicidae *A. aegypti* apresenta comportamento hematófago entre as fêmeas e fitófago entre os machos. É um mosquito pequeno, cujo corpo é escuro, com marcas brancas bem evidentes e pernas articuladas (Figura 8). Apresenta-se como vetor de viroses importantes, como a dengue e a febre amarela, e é bastante comum em áreas de clima tropical (http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Aedes_aegypti.htm, acessado em 11/07/2009).

A. aegypti foi colonizado pelos parasitos da espécie *B. culicis* e, além disso, *B. culicis* e *C. deanei* foram capazes de se ligar aos intestinos extraídos desse mosquito (FAMPA *et al.*,2003). D´AVILA-LEVY e colaboradores (2006a) mostraram que os protozoários *P. françai*, *C. deanei* e *C. guilhermei* aderem ao intestino do *A. aegypti*, possivelmente mimetizando o reconhecimento natural do epitélio do intestino pelos parasitos. As moléculas similares à gp63 nestes parasitos reconheceram uma proteína de aproximadamente 50 kDa no extrato protéico proveniente do intestino de mosquitos fêmeas de *A. aegypti*, apontando para a presença de um possível receptor para a gp63.

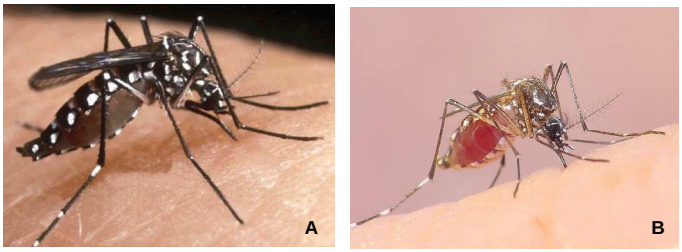

Figura 8: (A) Foto do mosquito *A. aegypti*. **(B)** Fêmea do *A. aegypti* durante a sua alimentação com sangue (DOGGETT,2003).

O intestino do mosquito é o primeiro tecido de interação com os parasitos, constituindo uma barreira a ser vencida por muitos deles (Figura 9). Ele é formado por uma camada simples de células epiteliais colunares, sendo o tipo predominante cheio de microvilosidades (ZIELER *et al.*,2000). Estudos ultraestruturais realizados com intestinos parasitados por *Plasmodium gallinaceum* mostraram que oocinetos interagem com as células epiteliais e induzem mudanças morfológicas, como inchaço celular e desenvolvimento de "blebs" de membrana na superfície e aparecimento de vesículas (ZIELER *et al.*,1998). Já na interação entre *B. culicis* e *A. aegypti*, o parasito insere o flagelo entre as microvilosidades das

células epiteliais, preferencialmente nas regiões de junções, sendo capazes de atingir a hemolinfa e destruir essas junções (CORRÊA-DA-SILVA *et al.*,2006).

Além disso, NOGUEIRA DE MELO e colaboradores (2006) mostraram que os perfis de interação entre *H. megaseliae* e seu hospedeiro natural (*Megaselia scalaris*) e o mesmo parasito com o *A. aegypti* (hospedeiro experimental) foram muito similares. Logo, com todas essas evidências e sendo de fácil manutenção em colônias em laboratório, o *A. aegypti* pode ser um importante modelo nos estudos de interação entre tripanossomatídeos e seus insetos hospedeiros.

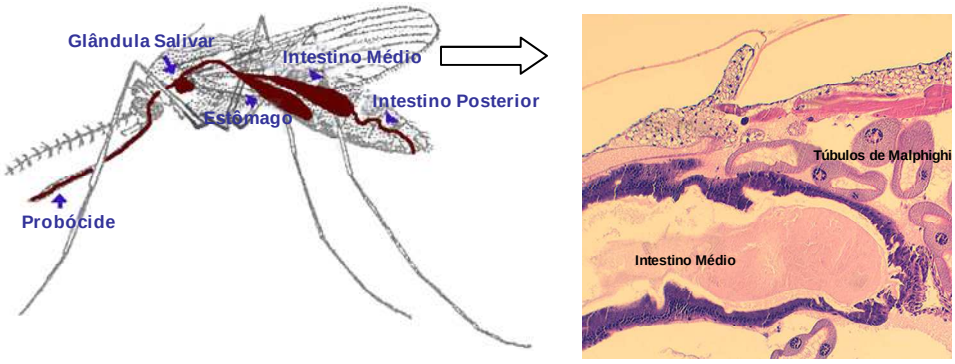

Figura 9: Esquema do trato digestivo do *Aedes aegypti* e corte histológico do intestino médio deste mosquito (adaptado de SWAN & PAPP,1972).

4.2) Macrófagos peritoniais – modelo de interação com hospedeiros vertebrados

O surgimento das parasitoses oportunistas causadas por tripanossomatídeos inferiores nos indivíduos imunocomprometidos justifica a pesquisa da interação desses parasitos com o hospedeiro vertebrado. Já foi visto que esses tripanossomatídeos inferiores são capazes de interagir e até mesmo se multiplicar em culturas de macrófagos derivados de medula óssea, como foi visto com duas cepas isoladas de seres humanos infectados pelo HIV nas Antilhas Francesas (GARIN *et al.*,2001).

Além disso, os macrófagos podem ser encontrados simultaneamente infectados com HIV-1 e co-patógenos nos linfonodos, como descrito para *Pneumocystis carinii* e *Mycobacterium avium* (ORENSTEIN, FOX & WAHL,1997; WAHL *et al.*,1998). Em alguns episódios clínicos da co-infecção, o crescimento de ambos é reforçado, facilitando um estado clínico mais grave (GOLETTI *et al.*,1996; NAKATA *et al.*,1997). Esses relatos feitos *in vivo* já tem sido reproduzidos em alguns modelos experimentais (GOLETTI *et al.*,1996; ZHAO, PAPADOPOULOU & TREMBLAY,2004) usando tripanossomatídeos classicamente patógenos. E

mais recentemente, a mesma constatação foi feita, porém usando um modelo experimental com macrófagos, HIV-1 e *B. culicis* (BARRETO DE SOUZA *et al.*,2006).

Objetivos

PARTE I:

Identificação e caracterização bioquímica e imunológica da peptidase similar à gp63 de *Leishmania* spp. produzida por *Herpetomonas samuelpessoai*

a. Avaliar o perfil proteolítico (extrato total, fração de membrana e sobrenadante de cultura) de *H. samuelpessoai*.
b. Identificar proteínas similares à gp63 em *H. samuelpessoai* e caracterizar a similaridade imunológica (através de western blotting usando anticorpos anti-gp63) com a gp63 de *Leishmania* spp.
c. Localizar a peptidase no parasito e identificar a presença de âncora de GPI através de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, utilizando anticorpo anti-gp63 e tratamento com fosfolipase C.
d. Caracterizar a similaridade bioquímica com a gp63, verificando temperatura e pH ótimos, além de determinar a sensibilidade da peptidase frente a diferentes inibidores proteolíticos.
e. Identificar sua forma de secreção e também caracterizar essa enzima secretada bioquímica e imunologicamente, para comprovar se é a mesma presente na superfície.

PARTE II:

Papel da molécula similar à gp63 em *Herpetomonas samuelpessoai* na diferenciação celular e na degradação de diferentes substratos protéicos

f. Estudar a relevância desta peptidase no processo de diferenciação celular, induzida pela temperatura e por dimetilsulfóxido.
g. Avaliar a degradação de diferentes substratos protéicos pela gp63.

PARTE III:

Interação entre *Herpetomonas samuelpessoai* e o intestino do hospedeiro invertebrado *Aedes aegypti*

h. Verificar a capacidade de colonização do parasito no inseto *A. aegypti* e observar a interação do parasito com o intestino do *A. aegypti*, através de microscopia óptica.
i. Verificar o comportamento dessa interação na ausência e na presença dos seguintes moduladores: inibidores proteolíticos de metalopeptidase, fosfolipase C, anticorpos anti-gp63 e a proteína purificada similar à gp63.
j. Avaliar a secreção da gp63 durante a interação do parasito com o intestino de *A. aegypti*.
k. Avaliar a expressão da gp63 durante a colonização do inseto vetor.

PARTE IV:

Interação *in vitro* entre *Herpetomonas samuelpessoai* e macrófagos peritoniais de camundongos

l. Avaliar a capacidade de associação de *H. samuelpessoai* crescidas a 26°C e 37°C com macrófagos peritoniais.
m. Avaliar a secreção de gp63 durante a interação do parasito com os macrófagos peritoniais.
n. Verificar o comportamento dessa interação na ausência e na presença de diferentes moduladores: 1,10-fenantrolina, anticorpos anti-gp63 e a proteína gp63 purificada.

Materiais e Métodos

PARTE I:

Identificação e caracterização bioquímica e imunológica da peptidase similar à gp63 de *Leishmania* spp. produzida por *Herpetomonas samuelpessoai*

1) Microrganismos

No presente trabalho foram utilizados os seguintes tripanossomatídeos: *H. samuelpessoai* (CT-IOC-067), gentilmente cedido pela Coleção de Tripanossomatídeos da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, e *Leishmania amazonensis* cepa Josefa (MHOM/BR/75 Josefa), cedido pela Dra. Elvira Saraiva (Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ).

2) Inóculo e Cultivo

Os parasitos foram mantidos através de repiques semanais em meio complexo BHI (infusão de cérebro e coração) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). O meio foi distribuído em alíquotas de 5 ml, em tubo de rosca de 18×150 mm, e autoclavado a 121°C durante 20 min. As células foram, então, cultivadas a 26°C, por 48 h. O inóculo consistiu de 2% de uma cultura de 48 h, que corresponde à aproximadamente 1×10^6 células/ml.

3) Contagem do Número de Células e Avaliação da Viabilidade Celular

O número de células foi estimado através de contagem em câmara hematocitométrica de Neubauer (Neubauer Improved Chamber).

A viabilidade celular dos parasitos foi monitorada, quando necessária, através da visualização de mobilidade (microscopia óptica) e observação da ausência de lactato desidrogenase, uma enzima exclusivamente intracelular, no sobrenadante de cultivo (WROBLEWSKI & LADUE,1955).

4) Obtenção dos Extratos Celulares Totais

Os parasitos (1×10^8 células) foram coletados, na fase logarítmica de crescimento (48 h de cultivo), através de centrifugação a 1500*g* a 4ºC por 3 min. O sedimento, correspondente às células, foi lavado 3 vezes em tampão salina-fosfato (PBS) gelado (NaCl 150 mM, tampão fosfato 20 mM, pH 7,2). Para análise eletroforética, essas células foram ressuspensas em água

e adicionadas de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e submetidas a 3 ciclos de 2 min no gelo e 1 min no vórtex; desta maneira, os parasitos foram lisados, possibilitando a obtenção dos extratos protéicos totais.

5) Partição de Proteínas de Membrana com Triton X-114

Células dos parasitos foram coletadas por centrifugação após crescimento durante 48 h e, em seguida, foi realizada a extração das proteínas de membrana utilizando-se Triton X-114 2% em TBS (Tris 10 mM; NaCl ,190 mM, pH 7,5) como previamente descrito por BORDIER (1981). Após adição do detergente, foram feitos 5 ciclos de vórtex (1 min) e gelo (15 min); então a solução foi deixada em repouso por 1 h no gelo. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 7.000*g* por 15 min. O sobrenadante obtido foi incubado por 30 min a 37^{o}C e, em seguida, centrifugado por 3.000*g* por 20 min, obtendo-se dessa maneira duas fases: a fase superior (hidrofílica), lavada 3 vezes com Triton X-114 à 5% e a fase inferior (hidrofóbica), lavada 3 vezes com tampão Tris-HCl, pH 7,4.

6) Quantificação Química de Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método descrito por LOWRY e colaboradores (,1951), usando soro albumina bovina (BSA) como padrão.

7) Análise do Perfil de Proteínas por SDS-PAGE

Para análise do perfil de proteínas, alíquotas dos extratos celulares, equivalentes a 50 μg, foram adicionadas de tampão Tris-HCl 62 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0,01% e β-mercaptoetanol 1 mM, aquecidas a 100ºC por 5 min e aplicadas em eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) a 10%, contendo gel de empacotamento a 3%, de acordo com o sistema descrito por LAEMMLI (,1970). A eletroforese foi processada a 1,20 V/1,20 mA, a 4ºC. As proteínas foram reveladas através da coloração com Coomassie brilliant blue R-250 0,2% em metanol:ácido acético:água (50:10:40) ou coloração de prata (GONÇALVES, NEHME & MOREL,1984). As massas moleculares aparentes das diferentes proteínas separadas no gel foram calculadas, tendo-se como base as posições de proteínas padrões (GIBCO BRL – Grand Island, NY, USA), aplicadas no mesmo gel.

8) Análise do Perfil de Peptidases Celulares

Para análise qualitativa das peptidases celulares, foi realizada uma SDS-PAGE a 10% com gelatina 0,1% co-polimerizada (HEUSSEN & DOWDLE,1980). 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 não-desnaturantes. A eletroforese foi processada a 1,20 V/1,20 mA, a 4ºC. Ao fim da corrida eletroforética, os géis foram lavados por 1 h com Triton X-100 1% para que o excesso de SDS seja removido. Em seguida, foi realizada a incubação do gel por 48 h a 37^{o}C em tampão de proteólise fosfato de sódio 50 mM, pH 5,5, suplementado com ditiotreitol (DTT) 2 mM. Finalmente os géis foram corados com Coomassie brilliant blue e descorados em uma solução contendo metanol-ácido acético-água (5:10:85). As massas moleculares das peptidases foram estimadas através da comparação da migração destes com a de proteínas padrão (SANTOS *et al.*,1999).

8.1) Efeito do pH, da Temperatura e de Inibidores Proteolíticos

A modulação da atividade proteolítica foi avaliada através de ensaios com gelatina-SDS-PAGE. O efeito do pH foi determinado incubando-se as tiras dos géis a 37ºC por ,20 h nos seguintes tampões: citrato de sódio 10 mM (pH 2–4), fosfato de sódio 50 mM (5–8) e glicina-NaOH 50 mM (pH 9–10). As enzimas proteolíticas também foram analisadas através de SDS-PAGE com gelatina incorporada como substrato em diferentes temperaturas (4, 26, 37, 50 e 60ºC) em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, por 20 h. Adicionalmente, as tiras dos géis foram incubadas em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, por 20 h a 37ºC na ausência e na presença dos seguintes inibidores proteolíticos: PMSF 10 mM, 1,10-fenantrolina 10 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM e E-64 10 μM (SANTOS *et al.*,2002a). Finalmente os géis foram corados com Coomassie brilliant blue e descorados em uma solução contendo metanol-ácido acético-água (5:10:85).

9) Western Blotting

Extratos protéicos de parasitos foram separados em SDS-PAGE 10%, como descrito no item 7, e transferidos (100 V/300 mA, 2 h, 4ºC) 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 4ºC em tampão de bloqueio (PBS, 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 policlonal anti-gp63 de *L. amazonensis* diluído 1:500, gentilmente cedido pelo Dr. Peter Overath (Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Membranbiochemie, Alemanha); 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). Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas e reveladas através de quimioluminescência (sistema ECL).

10) Microscopia de Fluorescência e Citometria de Fluxo

Parasitos (5×10^6 células) foram lavados e fixados durante 30 min a 4ºC em paraformaldeído 4% diluído em PBS. Após fixação, as células foram lavadas três vezes em PBS gelado. Os parasitos então foram incubados por 1 h com o anticorpo primário policlonal anti-gp63 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 (FACScan) e montadas em sistema de lâmina-lamínula para observação através de microscopia de fluorescência (Axioplan-2). Células não tratadas e tratadas somente com anticorpo secundário foram utilizadas como controles negativos.

10.1) Tratamento com Fosfofolipase C

Os parasitos foram coletados por centrifugação, lavados três vezes em TBS, fixados em paraformaldeído 2% e contados em câmara de Neubauer. As células (3×10^7) fixadas lavadas foram incubadas na presença de fosfolipase C (PLC) 0,5 U/µl numa mistura contendo Tris-acetato 100 mM suplementado com Triton X-100 0,1% por 3 h. Parasitos fixados foram analisados por microscopia óptica para observação da integridade morfológica. Posteriormente, as células foram centrifugadas e lavadas extensivamente em TBS. Estas foram então incubadas por 1 h com o anticorpo primário policlonal anti-gp63 diluído 1:250, lavadas extensivamente em TBS e incubadas com anticorpo secundário (IgG) conjugado a FITC (1:250). Finalmente, as células foram lavadas e examinadas por citometria de fluxo.

11) Experimento de Secreção e Obtenção do Sobrenadante PBS-condicionado

Os parasitos foram colhidos na fase logarítimica de crescimento (48 h) através de centrifugação a 2500*g* por 15 min a 4ºC e lavados três vezes com PBS. Após estimar o número de parasitos, cerca de 1×10^{10} células intactas foram ressuspensas em 10 ml de PBS

isotônico estéril. Alíquotas de 2,5 ml (contendo $2,5\times10^9$ parasitos) foram separadas em 4 tubos, os quais foram incubados por períodos de tempos diferentes (de 1 a 4 h) a 26ºC. Após intervalos de 1 h, as células foram removidas por centrifugação (2500*g* / ,20 min / 4ºC) e o sobrenadante foi filtrado em uma membrana com poros de 0,22 µm (Millipore), para obtenção do sobrenadante PBS-condicionado (D'AVILA-LEVY *et al.*,2003b).

11.1) Modulação da Secreção Proteolítica

Células vivas de *H. samuelpessoai* ($2,5\times10^8$ células) foram pré-tratadas ou não com 1,10-fenantrolina (inibidor de metalopeptidase zinco-dependente) nas concentrações de 1 e 10 mM por 30 min à temperatura ambiente. Alternativamente, o mesmo número de parasitos foi incubado na ausência e na presença de *p*-CMPS (inibidor de PLC) nas concentrações de 0,1 e 1 µM por 1 h. A viabilidade dos parasitos não foi afetada com nenhum destes tratamentos. A seguir, as células foram lavadas cinco vezes com PBS e o experimento de secreção foi repetido, sendo as células incubadas por 3 h à temperatura ambiente. O sobrenadante foi aplicado em gel de gelatina-SDS-PAGE.

11.2) Ensaio quantitativo da Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi mensurada espectofotometricamente usando gelatina como substrato, de acordo com o método descrito por JONES e colaboradores (1998). Resumidamente, 50 µl de cada sobrenadante de PBS-condicionado de *H. samuelpessoai* e 350 µl de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, foram adicionados a 600 µl da solução de substrato (1% de gelatina em água destilada) e a mistura foi incubada a 37ºC por 2 h. Um controle, onde o substrato foi adicionado apenas quando as reações foram paralisadas, foi usado como o branco. Amostras de 300 µl foram removidas de cada mistura e adicionadas à 400 µl de isopropanol gelado (a fim de paralisar a reação e precipitar as proteínas). Em seguida, após 1 h na geladeira, as amostras foram centrifugadas a 16000×*g* por 30 min, o sobrenadante foi removido e a absorbância medida a 280 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar em 0,01 a unidade de absorbância.

PARTE II:

Papel da molécula similar à gp63 em *Herpetomonas samuelpessoai* na diferenciação celular e na degradação de diferentes substratos protéicos

12) Diferenciação Celular

Para quantificar a porcentagem de diferenciação celular, os parasitos foram crescidos com dimetilsulfóxido (DMSO) 4% adicionado assepticamente ao meio de cultura e alternativamente foram crescidos em duas temperaturas diferentes (26 e 37°C) pelo mesmo período de tempo. Após esse período, a porcentagem dos estágios de diferenciação foi determinada, utilizando coloração específica de Giemsa. Em lâminas de vidro se adicionou uma alíquota da suspensão celular e, após secar, as células foram fixadas com metanol por 5 min. Em seguida, a preparação foi tratada com HCl 6N por 15 min. As lâminas foram lavadas em água corrente para se retirar todo o excesso de HCl. Após, as lâminas foram coradas com Giemsa, previamente diluído em PBS (2 gotas de Giemsa para cada 1 ml de PBS) por 90 min. Finalmente as lâminas coradas foram observadas em microscópio óptico binocular, com objetiva de imersão (100×). Foram examinadas 400 células por esfregaço e a partir daí analisou-se os três estágios evolutivos desse protozoário: promastigota (cinetoplasto em posição anterior em relação ao núcleo), paramastigota (cinetoplasto em posição lateral ao núcleo) e opistomastigota (cinetoplasto em posição posterior ao núcleo). A participação da gp63 na diferenciação celular foi avaliada em gelatina-SDS-PAGE.

13) Capacidade Hidrolítica das Peptidases de *H. samuelpessoai*

A capacidade de degradação das peptidases de *H. samuelpessoai* foi avaliada através de SDS-PAGE a 10% contendo 0,1% de diferentes substratos co-polimerizados: BSA, soro albumina humana (HSA), caseína, gelatina, hemoglobina, mucina e extrato do intestino (0,07 μg/μl de proteína no gel) de *A. aegypti*. Alíquotas dos extratos celulares dos parasitos, equivalentes a 50 μg, foram adicionadas de tampão de amostra em condições não desnaturantes. A eletroforese foi processada a 1,20 V/60 mA, a 4ºC. 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^{o}C em tampão de proteólise fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, 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).

13.1) Extração de Proteínas Totais do Intestino do Inseto *Aedes aegypti*

Os intestinos intactos foram macerados em PBS e o mesmo volume de pérolas de vidro foi adicionado à mistura. O sistema foi agitado três vezes em vórtex, intercalado com banho de gelo por 2 min. Após, o homogenato foi centrifugado a 5000*g* por 10 min, a 4°C, e o sobrenadante, contendo o extrato protéico do intestino, foi recolhido e aquecido a 100°C por 5 min para inibir a atividade hidrolítica das enzimas endógenas.

PARTE III:

Interação entre *Herpetomonas samuelpessoai* e o intestino do hospedeiro invertebrado *Aedes aegypti*

14) Colônia de Insetos

Os insetos utilizados – *Aedes aegypti* – foram inicialmente adquiridos do Laboratório de Fisiologia e Controle de Vetores, Departamento de Entomologia (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil), sendo então mantidos em nosso laboratório, a 26ºC, e alimentados com sacarose 10% em água destilada.

15) Intestinos

Os insetos adultos (fêmeas) foram dissecados e cuidadosamente seus intestinos extraídos e acondicionados por no máximo 30 min, à temperatura ambiente em PBS, pH 7,2, como uma etapa inicial do processo de interação.

16) Experimento de Colonização

Os mosquitos *A. aegypti* foram alimentados com uma solução contendo PBS, sacarose 10% e parasitos *H. samuelpessoai* vivos (1×10^7 células/ml). A solução é colocada em erlenmayer onde é adicionado um pequeno rolo de gase limpa. O líquido que sobe por capilaridade na gase e então sugado pelos insetos. Após 24 h, os insetos foram dissecados e seus intestinos removidos e macerados separadamente em tubos Eppendorf contendo 50 µl de PBS (PIMENTA *et al.*,1994; FAMPA *et al.*,2003). As células dos parasitos presentes nesses intestinos foram contadas em câmara de Neubauer. Essa contagem foi repetida todos os dias durante 8 dias consecutivos.

16.1) Avaliação da Expressão de gp63 *in vivo*

Após 6 dias de colonização, os intestinos de 150 insetos foram dissecados e bem macerados em PBS, para liberar os parasitas aderidos. Esperou-se por ,20 minutos a mistura contendo os parasitos e debris de intestinos decantar, para separar os parasitos no sobrenandante. Assim sendo esses parasitas foram coletados, lavados com PBS e submetidos à citometria de fluxo na presença de anticorpo anti-gp63, como descrito no item 10.

17) Interação dos Parasitos com Intestinos Explantados de *A. aegypti*

Os intestinos explantados foram incubados em 1 ml de PBS, pH 7,2, com 1×10^7 parasitos colhidos na fase exponencial, para o sistema controle. Nos sistemas testes, os parasitos foram previamente tratados por 1 h com inibidores proteolíticos (1,10-fenantrolina 0,1 mM, EGTA 0,1 mM e EDTA 0,1 mM), 0,2 U/µl de PLC e anticorpos anti-gp63 diluídos 1:100 (H50 [contra gp63 recombinante] e H52 [contra gp63 sem a âncora]), além do soro pré-imune (1:100) (cedidos pelo Dr. Peter Overath [Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Membranbiochemie, Alemanha]); e somente após estes tratamentos foram incubados com os intestinos por 1 h. Em outros sistemas testes, os intestinos foram previamente incubados por 1 h com 5 µg da proteína similar à gp63 purificada do sobrenadante de *C. deanei*, a mesma proteína inativada pelo calor e sua apoenzima (D'AVILA-LEVY *et al.*,2003). As incubações foram feitas em lâmina escavada e em câmara úmida, por 1 h, a 26ºC. Em cada sistema foram incubados 10 intestinos. Após a incubação, os parasitos não associados, ou seja, aqueles que não estavam aderidos ou internalizados aos intestinos, foram eliminados durante 3 lavagens consecutivas desses intestinos em placa de Petri com 15 ml de PBS. Depois da lavagem, os intestinos foram macerados separadamente em tubos Eppendorf contendo 50 µl de PBS. As contagens de parasitos associados a cada intestino foram feitas em câmara de Neubauer, de acordo com PIMENTA e colaboradores (1994). Somente as células com mobilidade foram consideradas nas contagens.

18) Microscopia Óptica

Os intestinos de *A. aegypti* foram obtidos e incubados com 1×10^7 parasitos durante 1 h. Logo após, o sistema foi lavado, em seguida fixado com paraformaldeído 4%, montado em sistema de lâmina-lamínula e observado ao microscópio óptico, para observação da interação celular.

19) Avaliação do Sobrenandante de Interação com Hospedeiro Invertebrado

O sobrenadante da interação foi centrifugado, filtrado em uma membrana com poros de 0,22 µm (Millipore), concentrado em "speed vac" até a secura e, em seguida, submetido a Western blotting (item 9). Em seguida, foi realizada uma incubação por 2 h, sob agitação, com anticorpo primário policlonal anti-gp63 de *L. amazonensis* diluído 1:500 e anticorpo secundário (anti-IgG de coelho) conjugado à peroxidase (1:2500). As membranas foram reveladas através de quimioluminescência (sistema ECL).

PARTE IV:

Interação *in vitro* entre *Herpetomonas samuelpessoai* e macrófagos peritoniais de camundongos

20) Obtenção dos Macrófagos

Os macrófagos foram previamente estimulados com tioglicolato 3% por 4 dias e obtidos através da lavagem da cavidade peritoneal de fêmeas de camundongos BALB/c, com aproximadamente 3 meses de idade, utilizando-se PBS pH 7,2 a 4^{o}C. As células foram então plaqueadas na proporção de 10^5 macrófagos por poço em lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro em placa de 24 poços. Para aderência das células, as placas foram incubadas por 1 h a 37^{o}C em uma atmosfera de 5% de CO_2 e posteriormente as monocamadas foram lavadas com PBS 37°C para remoção das células não-aderentes.

21) Interação de *H. samuelpessoai* Crescidos a 26°C e 37°C com Macrófagos Peritoniais

Formas promastigotas de *H. samuelpessoai* foram cultivadas em meio BHI a 26°C e 37°C durante 48 h. Após, os parasitos foram obtidos por centrifugação, lavados em PBS e, em seguida, incubados com macrófagos peritoniais na proporção de 10:1 (parasitos/macrófagos). A interação foi realizada por 1, 2, 3, 4, 6 e 24 h a 37^{o}C em atmosfera de 5% CO_2, e após este período os protozoários livres foram removidos por lavagens sucessivas em PBS. As monocamadas foram imediatamente fixadas em metanol absoluto, coradas com Giemsa 36% por 40 min e desidratadas em soluções de acetona progressivamente substituídas por xilol. A porcentagem de macrófagos infectados foi determinada pela contagem randômica de pelo menos 200 células em cada lamínula da duplicata. O índice de associação foi calculado multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitos por macrófagos infectados (SANTOS *et al.*,2009).

22) Efeito de Moduladores na Interação de *H. samuelpessoai* com Macrófagos Peritoniais

Os macrófagos obtidos do peritônio de murinos foram incubados durante 1 h na proporção 10:1 com parasitos da espécie *H. samuelpessoai* crescidos a 26^{o}C durante 48 h. Nos sistemas testes, os parasitos foram previamente tratados por 1 h com o inibidor proteolítico 1,10-fenantrolina a 0,1 mM e anticorpos anti-gp63 diluídos 1:100 (H50, H52 e 180 [anti-sheep gp63], cedido pelo Dr. Mary Wilson [Department of Internal Medicine, University of Iowa, EUA]), além do soro pré-imune (1:100); e somente após estes tratamentos foram incubados com os macrófagos por 1 h a 37^{o}C em atmosfera de 5% CO_2. Em outro sistema teste, os macrófagos foram previamente incubados por 1 h com 5 µg da proteína gp63 (purificada do sobrenadante de *C. deanei* – D'AVILA-LEVY *et al.*,2003). Após este período, o mesmo procedimento descrito no item 21 foi realizado para obtenção dos índices de associação.

23) Avaliação do Sobrenandante de Interação com o Hospedeiro Vertebrado

O sobrenadante da interação foi centrifugado, filtrado em uma membrana com poros de 0,22 µm (Millipore), concentrados em "speed vac" até a secura e submetido a Western blotting (item 9). Em seguida, foi realizada uma incubação por 2 h, sob agitação, com o anticorpo primário policlonal anti-gp63 de *L. amazonensis* diluído 1:500 e anticorpo secundário (anti-IgG de coelho) conjugado à peroxidase (1:2500). As membranas foram reveladas através de quimioluminescência (sistema ECL).

24) Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A média e o erro padrão de pelo menos três experimentos distintos foram determinados. As análises estatísticas foram avaliadas pelo teste *t* de Student usando o softwar EPI-INFO 6.04 (programa de dados e estatísticas para saúde pública). Valores de *P* iguais ou menores a 0,05 foram considerados significativos.

Resultados

PARTE I:

Identificação e caracterização bioquímica e imunológica da peptidase similar à gp63 de *Leishmania* spp. produzida por *Herpetomonas samuelpessoai*

Em trabalhos anteriores (SANTOS *et al.*,2002a;2003), mostrou-se que *H. samuelpessoai* produzia uma grande quantidade de uma metalopeptidase de superfície (60-70 kDa) que apresentava propriedades bioquímicas similares a gp63 de *Leishmania* spp., a qual é conhecidamente um importante fator de virulência expresso por esses parasitos (YAO, DONELSON & WILSON,2003). Para evidenciar que *H. samuelpessoai* apresentava em sua superfície, bem como secretava, uma peptidase de massa molecular semelhante à peptidase de *Leishmania* spp., o extrato celular total, a fração de membrana e o sobrenadante de cultivo foram analisados através de SDS-PAGE com gelatina incorporada ao gel (Figura 10 A). No extrato celular total (Figura 10 A linha a), duas principais classes de peptidases foram detectadas, uma mais proeminente de aproximadamente 66 kDa, classificada como metalopetidase, uma vez que foi inibida por 1,10-fenantrolina 10mM (dados não mostrados), e outra com menor atividade de 45 kDa, classificada como cisteína peptidase, inibida por E-64 1 μM (dados não mostrados). A metalopeptidase também foi detectada na fração de membrana (Figura 10 A linha b), assim como no sobrenadante de cultivo (Figura 10 A linha c) como principal peptidase secretada. No intuito de confirmar que a peptidase de superfície e a peptidase secretada produzida por *H. samuelpessoai* eram membros da família gp63, o extrato celular, o extrato de membrana e o sobrenadante de cultivo foram incubados com anticorpo policlonal anti-gp63 através da técnica de Western blotting (Figura 10 B). Esse anticorpo reconheceu uma única banda com massa molecular de 63 kDa nos diferentes sistemas (Figura 10 B).

A microscopia confocal (módulo fluorescência) mostrou que o anticorpo policlonal anti-gp63 foi capaz de reconhecer moléculas similares à gp63 em *H. samuelpessoai* (Figura 10 C). Tendo sido os parasitos permeabilizados, observou-se marcação ao longo de todo corpo celular exceto no núcleo, assim como em toda a extensão do flagelo. Observaram-se também algumas células com marcação mais intensa que outras, sugerindo que a expressão da peptidase pode estar relacionada com a fase do ciclo celular que o parasito se encontra (Figura 10 C).

A análise de citometria de fluxo realizada usando o mesmo anticorpo anti-gp63 corroborou o fato de que esse anticorpo reconhece moléculas similares à gp63 na superfície

celular de *H. samuelpessoai*. O pico da intensidade de fluorescência mostrou-se mais deslocado para a direita quando as células foram incubadas com o anticorpo (Figura 10 D, *–PLC*) quando comparado ao pico correspondente às células controle (não tratadas com o anticorpo) (Figura 10 D, *autofluorescência*). A presença de dois picos de fluorescência, observados nas células marcadas com o anticorpo, evidencia a presença de duas populações distintas, corroborando também a expressão heterogênea da molécula de gp63.

Para evidenciar a maneira que essas moléculas encontravam-se ancoradas à membrana plasmática, antes do tratamento com o anticorpo, as células foram incubadas com PLC, que cliva moléculas ancoradas à membrana via âncora de GPI. Nesse caso, o pico de intensidade de fluorescência voltou consideravelmente para a esquerda, significando uma diminuição da marcação das células pelo anticorpo, sugerindo que as moléculas similares à gp63 estão ancoradas na superfície de *H. samuelpessoai* via GPI (Figura 10 D, *+PLC*). A análise em gelatina-SDS-PAGE corroborou o fato de que a peptidase de 66 kDa está ancorada via GPI, já que a intensidade de hidrólise da gelatina diminuiu significantemente quando as células foram tratadas com PLC em relação às células não tratadas (Figura 10 D, *inset*).

O pH e a temperatura ótimos da peptidase de superfície de 66 kDa foram determinados através de análise por SDS-PAGE. Usando gelatina como substrato, a enzima apresentou um máximo de atividade em pH 6,0; contudo, essa atividade foi reduzida nos valores de pH abaixo de 4,0 e acima de 8,0 (Figura 10 E). Em relação à temperatura ótima, a peptidase de 66 kDa apresentou maior atividade hidrolítica a 37°C, havendo um decréscimo significativo da atividade quando incubada a 65°C (Figura 10 E).

Em seguida, foi analisado se a peptidase de 66 kDa liberada para o meio extracelular apresentava as mesmas propriedades bioquímicas que a peptidase de superfície, bem como foi estudado o mecanismo de secreção desta enzima para o meio extracelular. A figura 11 mostra o perfil de secreção de proteínas e peptidase em *H. samuelpessoai* após incubação de parasitos vivos em PBS durante 4 h. Os resultados demonstraram que os parasitos secretam vários polipeptídeos (Figura 11 B) e uma peptidase de 66 kDa (Figura 11 D). O conteúdo total de proteína aumenta linearmente ao longo de 2 a 4 h e o máximo de peptidase liberada é alcançada na terceira hora de incubação em PBS-glucose (Figura 11 A). A viabilidade celular foi verificada monitorando-se a mobilidade celular dos parasitos. Não foram detectadas células imóveis e/ou mortas durante as 4 h de incubação (dados não mostrados). Análise por SDS-PAGE mostrou que pelo menos 12 polipetídeos, entre 40 e 100 kDa, foram secretados pelos parasitos (Figura 11 B). O aumento na secreção da peptidase de 66 kDa também foi

aparente quando o PBS-glucose condicionado foi analisado por gelatina-SDS-PAGE (Figura 11 D) ou por "imunoblotting" usando-se o anticorpo anti-gp63 (Figura 11 C).

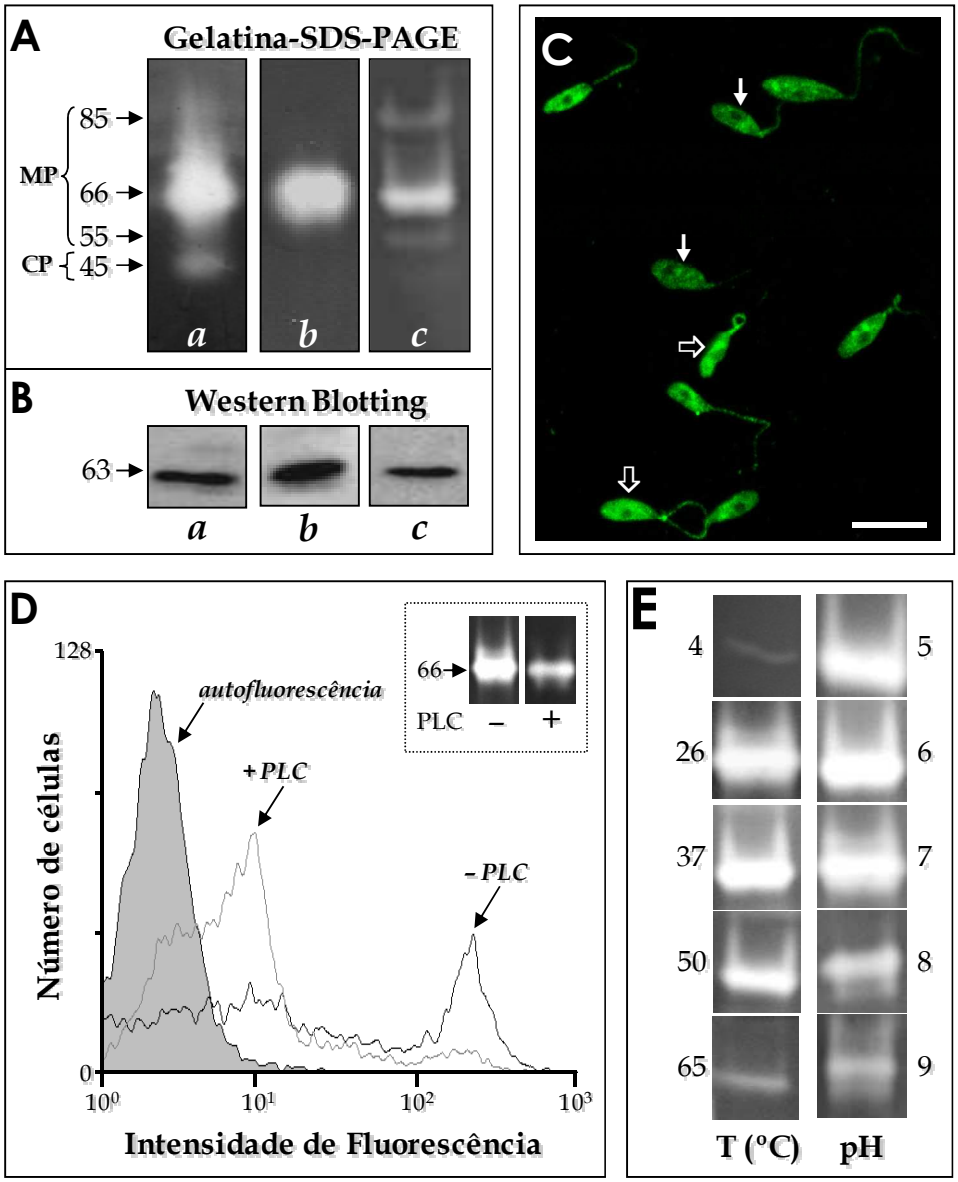

Figura 10: (A) Gelatina-SDS-PAGE e **(B)** Western blotting evidenciando a presença de uma peptidase similar à gp63 detectada no extrato total (a), na fração de membrana (b) e no sobrenadante de cultivo (c) de *Herpetomonas samuelpessoai*. Os números à esquerda correspondem às massas moleculares aparentes das peptidases expressas em kilodaltons. MP, metalopeptidases e CP, cisteína peptidase. **(C)** Microscopia confocal (módulo de fluorescência) dos parasitos seqüencialmente incubados com anticorpo anti-gp63 e anticorpo secundário conjugado à FITC. As setas apontam parasitos com diferenças na intensidade de marcação pelo anticorpo: setas abertas, parasitos com alta fluorescência e setas fechadas, parasitos com menor marcação pelo anticorpo. Barra: 1 µm. **(D)** Análise de citometria de fluxo mostrando a ligação do anticorpo anti-gp63 à superfície celular de *H. samuelpessoai*. As células foram incubadas na ausência (autofluorescência) e na presença de anti-gp63 (–PLC). As células previamente tratadas com PLC (+PLC) tiveram uma marcação diminuída, pois a PLC removeu os polipeptídeos ancorados via GPI. O extrato celular analisado por gelatina-SDS-PAGE confirmou a diminuição da atividade proteolítica da enzima de 66 kDa associada à célula após tratamento com PLC (inset). **(E)** Efeito da temperatura e do pH na peptidase de 66 kDa. As tiras de géis à esquerda foram incubadas durante 20 h em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0, em diferentes temperaturas (4, 26, 37, 50 e 65ºC), enquanto as tiras de géis à direita foram incubadas por ,20 h a 37ºC nos seguintes sistemas tampões: tampão fosfato 50 mM (pH 5,0, 6,0 e 7,0) e tampão glicina-NaOH ,20 mM (pH 8,0 e 9,0).

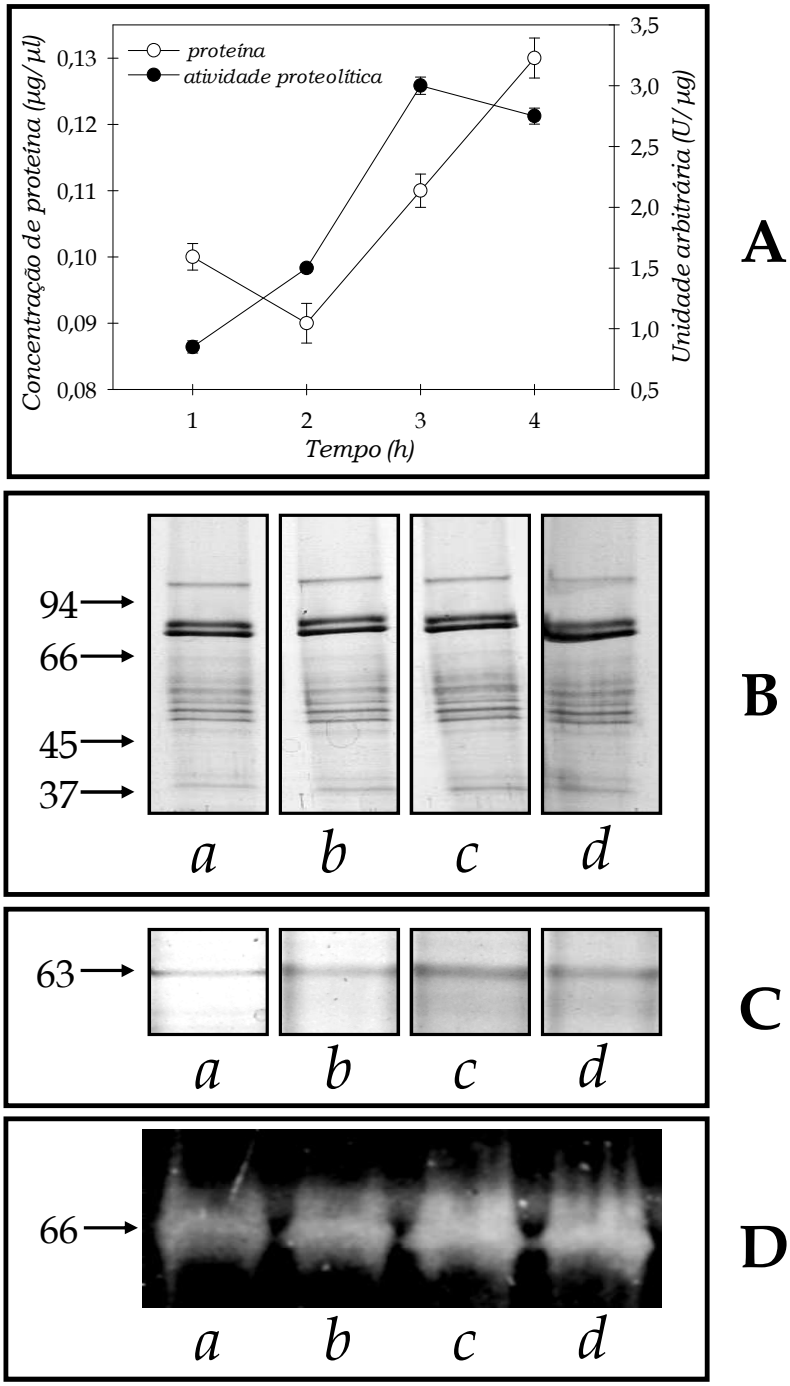

Figura 11: (A) Medidas quantitativas da atividade proteolítica, usando gelatina como substrato solúvel, e secreção de proteína para o meio extracelular. **(B)** SDS-PAGE mostrando o perfil de proteínas secretadas (coloração de prata), **(C)** western blotting mostrando o polipeptídeo reativo com o anticorpo anti-gp63 de *L. amazonensis* e **(D)** gelatina-SDS-PAGE evidenciando a peptidase extracelular de 66 kDa secretada por *H. samuelpessoai* durante 1 (a), 2 (b), 3 (c) e 4 h (d) de incubação em PBS-glucose. Os números da esquerda correspondem às massas moleculares aparentes expressas em kilodaltons.

A caracterização do pH e da temperatura ótimos também foram feitos para a enzima secretada. Dessa vez, eles foram determinados por densitometria através da medida dos halos de digestão, após análise por gelatina-SDS-PAGE. Os perfis de atividade proteolítica foram muito semelhantes aos da peptidase de superfície, sendo o pH 6,0 (Figura 12 A) e a temperatura de 37°C como os ótimos para evidenciação da atividade proteolítica (Figura 12 B).

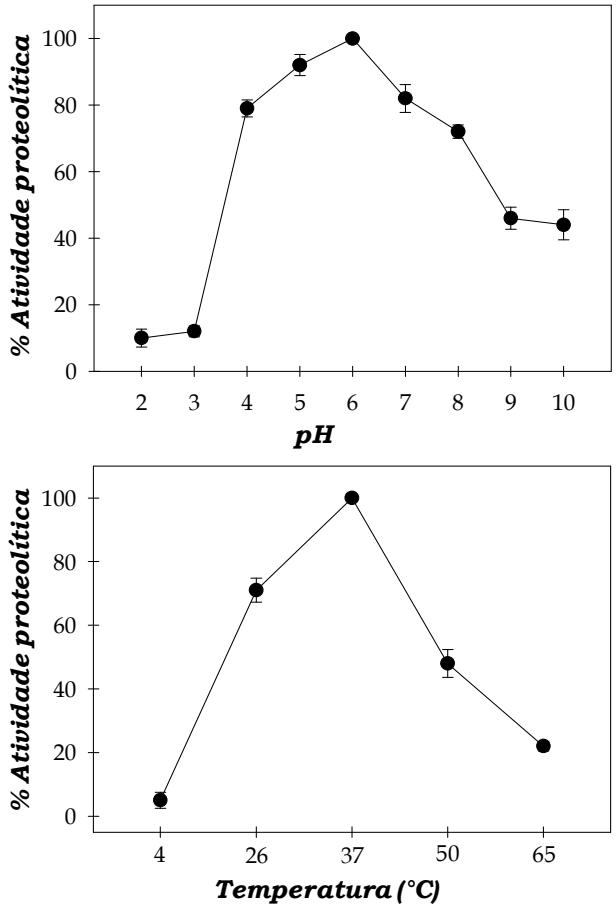

Figura 12: Efeito do pH **(A)** e da temperatura **(B)** na peptidase de 66 kDa secretada por *H. samuelpessoai* após 3 h de incubação em PBS-glucose. As tiras de géis foram incubadas em diferentes sistemas tampões (pH 2,0 – 10,0) por 20 h a 37ºC. Alternativamente, os géis foram incubados em tampão fosfato (pH 6,0) por ,20 h em diferentes temperaturas (variando entre 4 a 65ºC). As maiores atividades proteolíticas (pH 6,0 e T 37ºC) foram consideradas como 100% de atividade proteolítica. Os valores porcentuais representados significam a média de três medidas independentes correspondentes à densitometria dos halos de digestão após análise por gelatina-SDS-PAGE.

Tratando-se então da mesma enzima, foi feita a determinação da sensibilidade da peptidase frente a diferentes inibidores proteolíticos. Tanto a peptidase secretada quanto a peptidase de superfície tiveram sua atividade diminuída (≈ 90%) quando tratadas com 1,10-fenantrolina10 mM, um inibidor de metalopeptidases (Figura 13). Dois outros inibidores de metalopeptidases, EDTA e EGTA, também promoveram uma inibição significativa na atividade da peptidade de 66 kDa. E-64, um inibidor de cisteína peptidase, inibiu fracamente a enzima. No entanto, PMSF não interferiu significativamente na atividade enzimática (Figura 13).

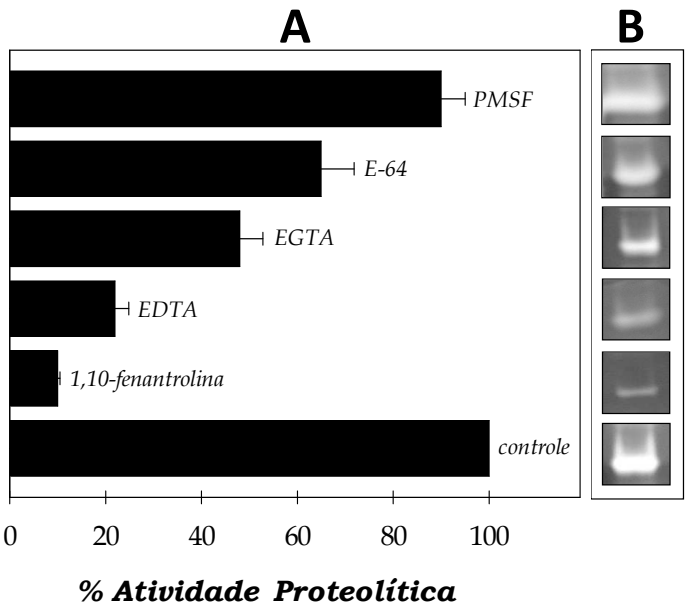

Figura 13: Gelatina-SDS-PAGE mostrando a modulação da atividade proteolítica extracelular da peptidase de 66 kDa de *H. samuelpessoai*, quando os géis foram incubados na ausência (controle) e na presença de diferentes inibidores proteolíticos: 1,10-fenantrolina 10 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, PMSF 10 mM e E-64 10 µM **(B)**. O gráfico representa as medidas de densitrometria dos halos de digestão **(A)**, sendo a atividade proteolítica mensurada no sistema controle considerada 100%. Os valores porcentuais representados significam a média de três medidas independentes. Resultados similares foram detectados para a enzima associada à célula (dados não mostrados).

Confirmada a presença da mesma metalopeptidase tanto na superfície celular quanto no meio extracelular, tornou-se necessário a identificação do mecanismo de secreção dessa peptidase similar à gp63 em *H. samuelpessoai*. Nossos resultados mostraram que células de *H. samuelpessoai* tratadas com 1,10-fenantrolina apresentaram uma considerável redução na secreção da peptidase de 66 kDa para o meio extracelular (Figura 14 A). A inibição da secreção da peptidase mostrou-se dose-dependente, aumentando de 56 para 87% com a concentração de 1,10-fenantrolina variando de 1 para 10 mM. Por outro lado, *p*-CMPS, um inibidor de PLC, nas concentrações de 0,1 e 1 µM não interferiu na secreção da peptidase de 66 kDa (Figura 14 B). É importante ressaltar que ambos os inibidores, nas concentrações

usadas, não afetaram a viabilidade dos parasitos. Estes resultados sugerem que a secreção da peptidase de 66 kDa presente na superfície de *H. samuelpessoai* seja por mecanismos dependentes de proteólise ao invés de fosfolipólise.

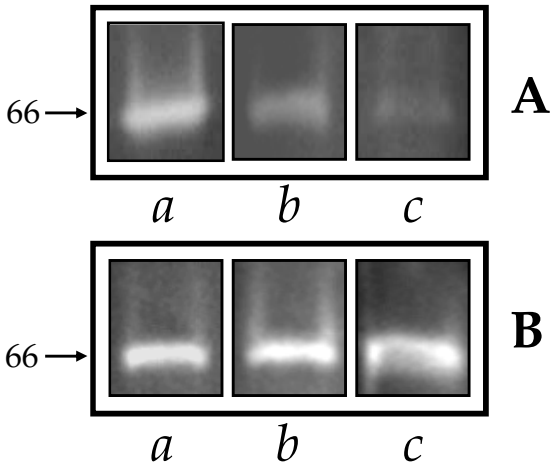

Figura 14: Efeito dos inibidores de metalopeptidase (1,10-fenantrolina) e de PLC (*p*-CMPS) na secreção da peptidase de 66 kDa por células vivas de *H. samuelpessoai*. Os parasitos foram tratados por 30 min na ausência (a) e na presença de 1,10-fenantrolina 1 mM (b) e 10 (c) mM; em seguida, as células foram lavadas em PBS, centrifugadas e então colocadas para secretar por mais 1 h em PBS-glucose **(A)**. Em paralelo, as células foram incubadas por 1 h na ausência (a) e na presença de *p*-CMPS 0,1 µM (b) e 1 (c) µM, e o sobrenadante foi obtido após etapas de centrifugação e filtração **(B)**. Todos esses sobrenadantes foram analisados em gelatina-SDS-PAGE, para evidenciar a atividade proteolítica secretada. O número à esquerda corresponde à massa molecular aparente da peptidase expressa em kilodaltons.

PARTE II:

Papel da molécula similar à gp63 em *Herpetomonas samuelpessoai* na diferenciação celular e na degradação de diferentes substratos protéicos

Através da técnica de SDS-PAGE contendo gelatina como substrato incorporado ao gel, o perfil proteolítico celular de *H. samuelpessoai* revelou a presença de uma metalopeptidase majoritária de 66 kDa e uma cisteína peptidase minoritária de 45 kDa, quando os parasitos foram crescidos a 26°C durante 48 h (SANTOS *et al.*,2003, Figura 15 B). Comparando-se a expressão da peptidase de 45 kDa em parasitos crescidos por 48 h (fase exponencial) a 26°C e a 37°C, foi visto que essa cisteína peptidase tinha sua atividade drasticamente reduzida quando os parasitos foram crescidos na maior temperatura (Figura 15 B e 15 D). No entanto, a atividade correspondente à metalopeptidase de 66 kDa não foi afetada pela temperatura de crescimento dos parasitos. Além disso, parasitos crescidos nas duas temperaturas apresentaram um perfil protéico similar (Figura 15 C). Curiosamente, outra cisteína peptidase

de 50 kDa foi observada quando os parasitos foram cultivados a 26°C. Contudo, essa enzima parecia ser muito instável, uma vez que sua detecção nem sempre foi possível, em contraste com a principal metalopeptidase de 66 kDa e a cisteína peptidase de 45 kDa (comparar Figuras 15 B e 16 B). A modulação da expressão da cisteína peptidase parece estar ligada ao processo de diferenciação celular, uma vez que o aumento da temperatura foi capaz de desencadear a transformação das formas promastigotas em formas paramastigostas (Figura 15 A).

Os resultados mostraram também que a cisteína peptidase de 45 kDa tinha sua expressão reduzida em aproximadamente 70% nas primeiras 24 h de crescimento (fase lag) dos parasitos na presença de DMSO (Figura 16 B), um agente capaz de induzir a diferenciação celular em *H. samuelpessoai*. A banda de 45 kDa referente aos parasitas crescidos na presença de DMSO foi reduzida em 55% após 48 h (fase log) e 65% após 72 h (fase estacionária) de crescimento, quando comparadas aos seus respectivos controles. Esse resultado foi validado através da observação de que *H. samuelpesoai* crescida na ausência de DMSO apresentava uma preponderância de formas promastigotas na cultura durante 24 a 72 h, enquanto que os parasitos incubados na presença de DMSO, o número de formas promastigotas decresceu significativamente e o número de formas paramastigotas e opistomastigotas aumentaram (Figura 16 A). De forma contrária, a metalopeptidase de 66 kDa não foi significantemente alterada pela presença do DMSO (Figura 16 B). Uma vez que a mesma quantidade de proteína foi submetida à eletroforese nesses experimentos (Figura 16 C), os resultados sugerem que as diferenças na produção de peptidases pode ser uma consequência da expressão diferenciada da cisteína peptidase de 45 kDa nas diversas formas evolutivas de *H. samuelpessoai*.

A habilidade da peptidase similar à gp63 em *H. samuelpessoai* de hidrolisar diferentes substratos protéicos foi testada em SDS-PAGE. Os resultados demonstraram que hemoglobina, caseína, IgG, mucina, albumina bovina e albumina humana, assim como gelatina, foram degradadas pela ação hidrolítica dessa peptidase (Figura 17 A). Essa degradação foi dependente do substrato testado, uma vez que diferentes extensões de hidrólise foram observadas, como podem ser evidenciadas após as análises desitométricas dos halos de digestão (Figura 17 B). De forma similar, quando o extrato do intestino de *A. aegypti*, um modelo experimental de hospedeiro invertebrado (revisto por SANTOS *et al.*,2006), foi incorporado ao gel de SDS-PAGE, observou-se a atividade da metalopeptidase de 66 kDa (Figura 17 B).

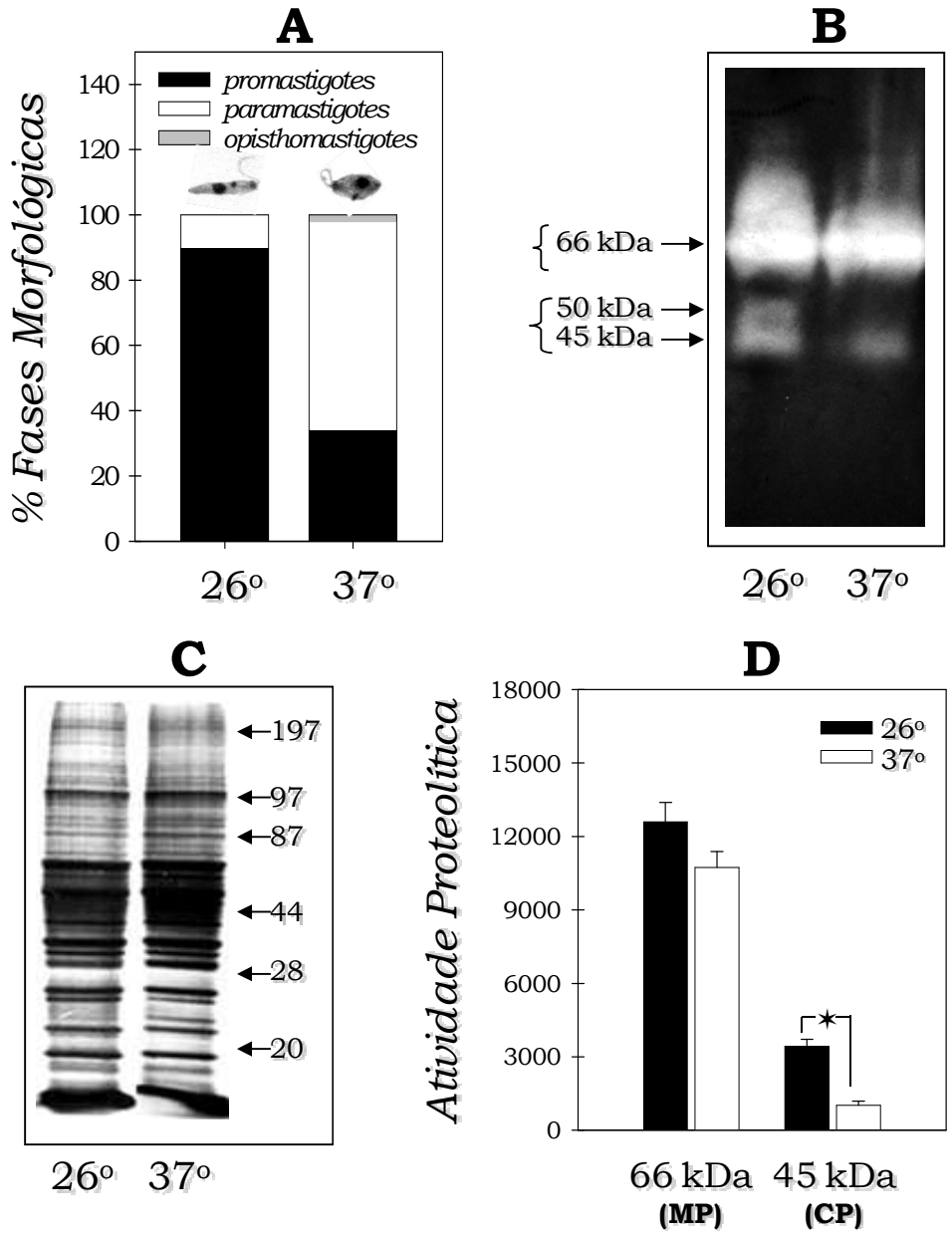

Figura 15: (A) Porcentagem de cada estágio morfológico observado em *H. samuelpessoai* quando cultivada em meio BHI por 48 h a 26°C e a 37°C. No topo de cada gráfico há uma imagem representativa da forma morfológica mais abundante observada a 26°C (promastigotas) e a 37°C (paramastigotas). **(B)** Expressão diferencial de peptidases observadas após cultivo de *H. samuelpessoai* a 26°C (temperatura do inseto vetor) e a 37°C (temperatura de mamíferos). As massas moleculares das peptidases, expressas em kilodaltons (kDa), estão representadas à esquerda. **(C)** O perfil proteico dos dois sistemas foi usado como controle para amostras corridas no gel. As massas moleculares referentes ao padrão de proteínas estão representadas à direita. **(D)** Medições densitométricas dos halos de digestão das peptidases de 66 e 45 kDa são mostradas no gráfico. Os valores representam medidas do desvio padrão de três experimentos diferentes. A atividade proteolítica foi expressa em unidades arbitrárias. O asterisco indica diferença estatística entre os grupos analisados ($P<0,05$; teste *t* de Student). MP: metalopeptidase, CP: cisteína peptidases.

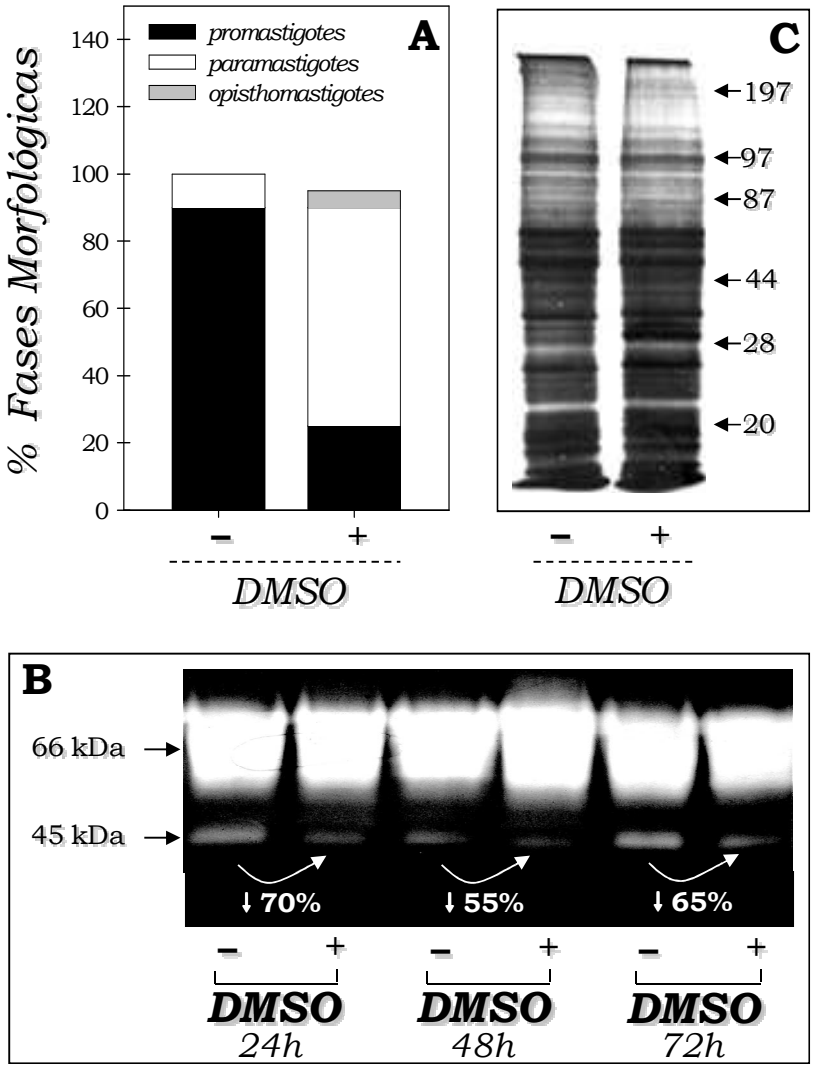

Figura 16: (A) Porcentagem de cada estágio morfológico observado em *Herpetomonas samuelpessoai*, quando cultivada em meio BHI por 48 h a 26°C na ausência (–) e na presença de 4% de DMSO (+). **(B)** Gelatina-SDS-PAGE mostrando o perfil de peptidases produzidas por *H. samuelpessoai* quando cultivada durante 24 a 72 h na ausência e na presença de DMSO. Os números em branco na figura mostram, através de análise densitométrica, a redução da atividade da peptidase de 45 kDa em parasitos tratados com DMSO em comparação com os não-tratados. **(C)** SDS-PAGE mostra o perfil proteico dos parasitos não-tratados e tratados com DMSO por 48 h, que foi usado como controle da quantidade de proteínas aplicadas ao gel em cada sistema. Os números à direita correspondem às massas moleculares aparentes expressas em kilodaltons.

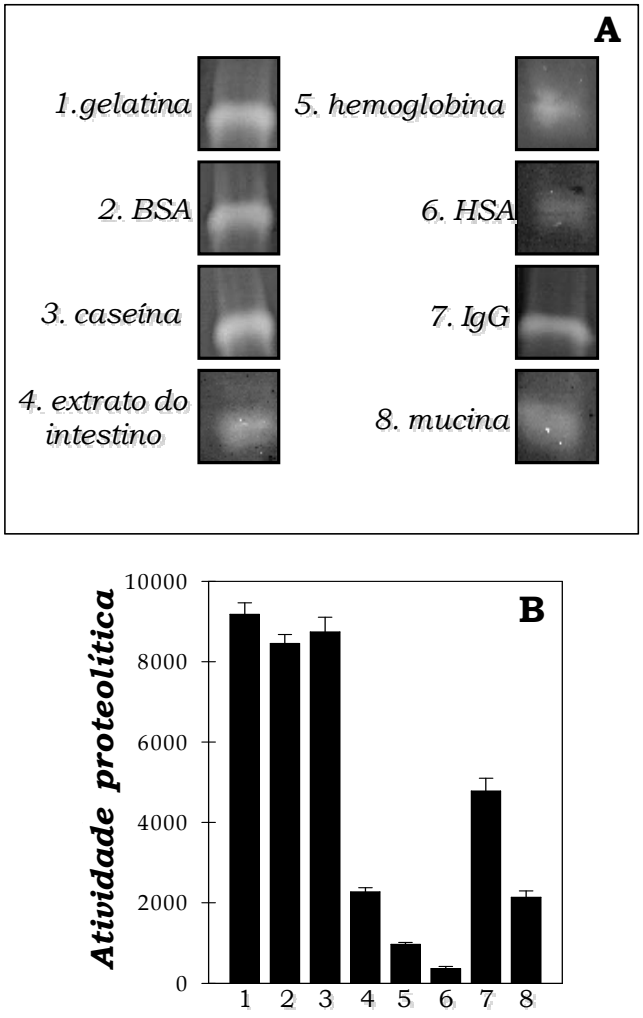

Figura 17: Capacidade de hidrolisar diferentes substratos incorporados a SDS-PAGE pela metalopeptidase de superfície de 66 kDa expressa em *H. samuelpessoai*. Gelatina (1), albumina bovina (2) (BSA), caseína (3), extrato do intestino do inseto de *Aedes aegypti* (4), hemoglobina (5), albumina humana (6) (HSA), imunoglobulina G (IgG) (7) e mucina (8) foram individualmente incorporados ao gel para evidenciar atividade proteolítica. Os géis foram aplicados com 50 µg do extrato de membrana obtido após extração com Triton X-110 e incubados em tampão fosfato (pH 6,0) por ,20 h a 37ºC **(A)**. Análises densitométricas dos halos de digestão, expressas em unidades arbitrárias de atividade proteolítica **(B)**.

PARTE III:

Interação entre *H. samuelpessoai* e o intestino do hospedeiro invertebrado *Aedes aegypti*

Para implicar uma provável função biológica à metalopeptidase de *H. samuelpessoai*, procurou-se estabelecer uma relação entre a enzima e o hospedeiro invertebrado. Foi usado o inseto *A. aegypti* como modelo de estudo nos experimentos de interação celular (D´AVILA-LEVY *et al.*,2006a, NOGUEIRA DE MELO *et al.*,2006, SILVA *et al.*,2009). Para isto, inicialmente, foi preciso comprovar que os parasitos eram capazes de colonizar efetivamente o

intestino de *A. aegypti*. Nesse intuito, os insetos foram alimentados por 24 h com uma solução contendo os parasitos e, em seguida, ao longo de 8 dias consecutivos, os intestinos de *A. aegypti* foram extraídos e dissecados para a avaliação da possível colonização por *H. samuelpessoai* (Figura 18 A). Ao longo de oito dias foram detectados parasitos vivos colonizando o intestino deste inseto (Figura 18 A). A microscopia óptica do intestino dissecado, obtido do inseto infectado, mostrou a presença de parasitos aderidos à parede deste órgão (Figura 18 B).

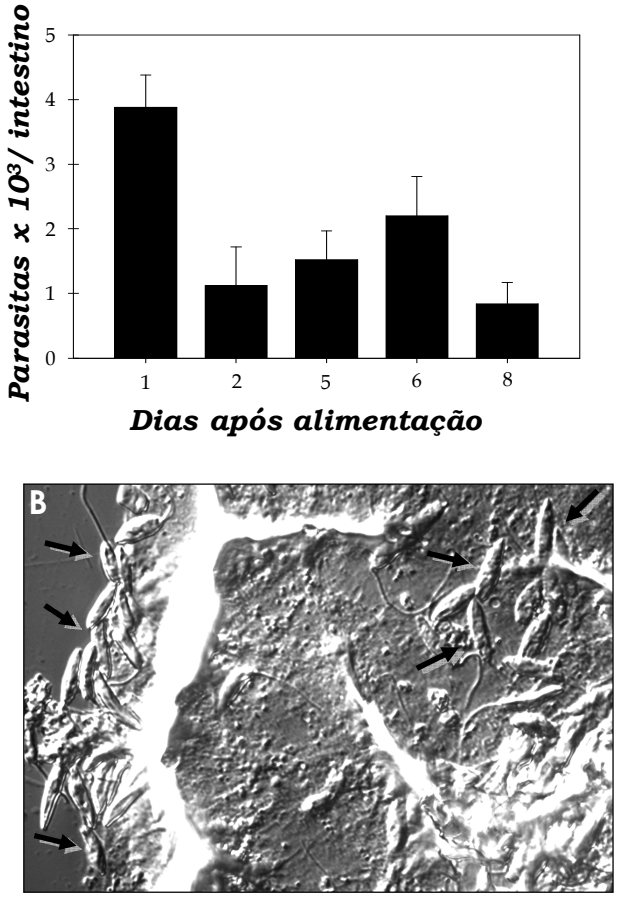

Figura 18: (A) Insetos da espécie *A. aegypti* alimentados com uma solução contendo PBS, sacarose 10% e parasitos *H. samuelpessoai* (1×10^7 células/ml) foram dissecados após 1, 2, 5, 6 e 8 dias, tendo seus intestinos removidos. As células de parasitos presentes nesses intestinos foram contadas em câmara de Neubauer. O experimento foi realizado três vezes, onde quinze intestinos foram avaliados por dia. **(B)** Microscopia óptica da interação dos parasitos *H. samuelpessoai* vivos (setas) com a parede do intestino extraído do inseto *A. aegypti*, após 6 dias da infecção.

Em seguida, foram realizados experimentos para tentar inferir uma provável função para as moléculas similares à gp63 na interação de *H. samuelpessoai* e intestinos dissecados de *A. aegypti*. Após uma hora de interação, mais de 12.000 parasitos encontravam-se aderidos aos intestinos. Para analisar a influência das moléculas similares à gp63 de *H. samuelpessoai* neste processo, antes da interação, os parasitos foram pré-tratados com inibidores de

metalopeptidases (EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM e 1,10-fenantrolina 1 mM). Os resultados mostraram uma significativa redução na interação celular. No entanto, estes tratamentos podem gerar uma inibição indireta da enzima e conseqüentemente da interação, uma vez que esses inibidores são capazes de bloquear outras enzimas além de metalopeptidases, que também podem ser importantes para a adesão. Também houve diminuição na interação, quando os parasitos foram pré-tratados com PLC. De forma similar, a PLC pode clivar as âncoras de GPI de outras moléculas também relevantes na interação. Para uma análise mais específica, os parasitos foram pré-tratados com anticorpos anti-gp63, e os resultados obtidos demonstraram uma drástica redução da interação. Para garantir que não eram outros anticorpos do coelho que estavam diminuindo a interação (uma vez que o anticorpo é policlonal), os parasitos foram pré-tratados com o soro pré-imune e não se detectou redução significativa da interação. Contudo, por ser muito grande, a molécula de anticorpo poderia bloquear fisicamentente outros receptores que auxiliariam na adesão. Para elucidar essa questão, dessa vez os intestinos foram pré-tratados com a proteína gp63 purificada (obtida de *C. deanei*). Assim sendo, a proteína iria saturar os receptores do intestino e quando em contato com os parasitos, se fossem as moléculas similares à gp63 importantes para adesão, esses parasitos não seriam capazes de se aderir, o que foi observado através de uma drástica redução da interação. Podendo a peptidase purificada ter atuado proteoliticamente sobre os receptores do intestino realmente importantes para a adesão, foi realizada uma nova interação usando a proteína purificada na sua forma de apoenzima, ou seja, inativada pela remoção dos cátions importantes para sua ação hidrolítica e também na sua forma inativada pelo calor. Nesses dois casos a interação foi também drasticamente reduzida (Figura 19).

Além de apresentar em sua superfície uma peptidase de 63 kDa semelhante à peptidase de *Leishmania* spp., *H. samuelpessoai* também é capaz de secretá-la para o meio extracelular. Dessa forma, do sistema controle do experimento de interação foi recolhido o sobrenadante e submetido à técnica de Western blotting. Observou-se que durante a interação com o intestino do hospedeiro invertebrado os parasitos secretam maior quantidade da peptidase similar à gp63 quando comparado a parasitos incubados somente em PBS (Figura 19 inset). Os parasitos previamente tratados com 1,10-fenantrolina não foram capazes de secretar a molécula similar à gp63 durante a interação com o intestino de *A. aegypti* (Figura 19 inset).

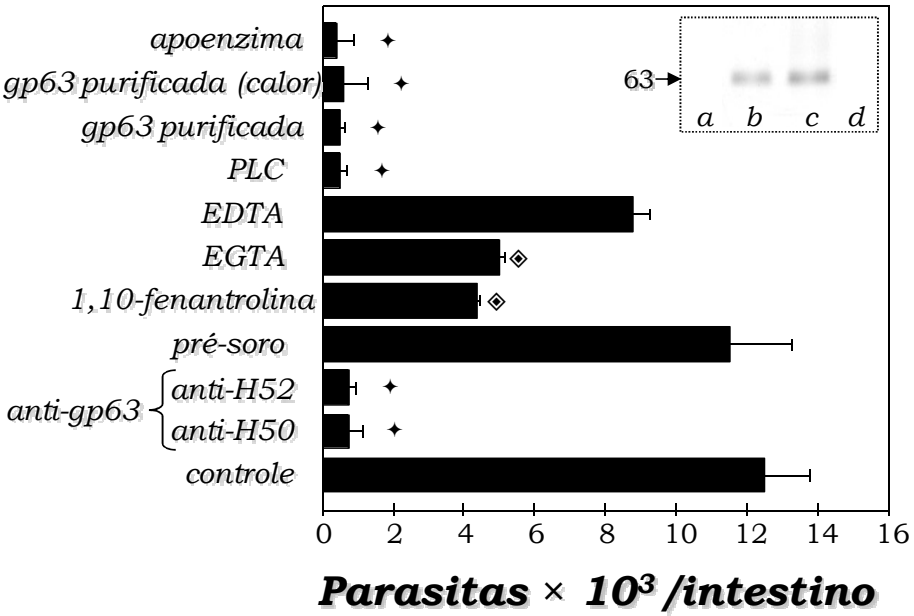

Figura 19: Células de *H. samuelpessoai* foram tratadas por diferentes moduladores (indicados à esquerda do gráfico) e colocadas para interagir com o intestino de *Aedes aegypti*. Verificou-se que a interação celular diminuiu significativamente quando as células foram pré-tratadas com 1,10-fenantrolina, com anticorpos anti-gp63 e também quando os intestinos foram pré-tratados com a proteína gp63 purificada de *C. deanei* (✦, P<0,001; ◈, P<0,05). Estes dados representam a média de três experimentos independentes. O inset mostra a identificação da proteína similar à gp63 através da técnica de Western blotting usando anticorpo anti-gp63 no sobrenadante de 1 h de interação: (a) intestinos isolados, (b) parasitos isolados, (c) parasitos mais intestinos e (d) parasitos tratados com 1,10-fenantrolina mais intestinos. O número à esquerda indica a massa molecular do polipeptídeo reativo.

Partindo das evidências de que a molécula similar à gp63 é importante na interação com o hospedeiro invertebrado e sendo a mesma secretada em maior quantidade durante a interação *in vitro*, avaliamos em seguida a expressão dessa enzima *in vivo*. Para isso, os mosquitos foram alimentados durante 24 h com uma solução contendo os parasitos e após 6 dias de colonização, os intestinos de *A. aegypti* foram extraídos, dissecados e os parasitos presentes foram recolhidos, analisados por citometria de fluxo e comparados aos parasitos cultivados em meio de cultura BHI por 6 dias (Figura 20). A análise de citometria evidenciou um aumento na expressão da molécula similar à gp63 em *H. samuelpessoai* após passagem pelo inseto *A. aegypti*. Nesse contexto, os parasitos crescidos no meio de cultura apresentaram 40% das células marcadas, ao passo que aqueles que entraram em contato com o intestino do inseto apresentaram 95% das células marcadas com o anticorpo anti-gp63 (Figura 20).

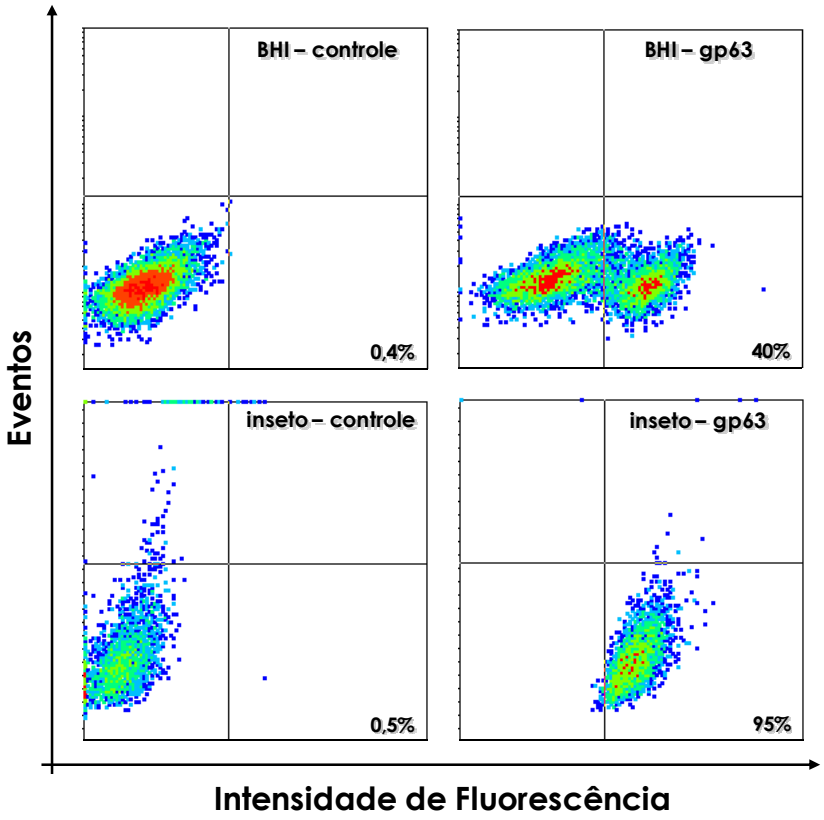

Figura 20: Análise de citometria de fluxo mostrando a ligação do anticorpo anti-gp63 à superfície celular de *H. samuelpessoai*. Os parasitos cultivados em meio BHI apresentaram marcação menor do que os parasitos que foram recolhidos após 6 dias de colonização no inseto *A. aegypti*. (BHI-controle e inseto-controle: autoflurescência; BHI-gp63 e inseto-gp63: parasitos marcados com anti-gp63).

PARTE IV:

Interação *in vitro* entre *Herpetomonas samuelpessoai* e macrófagos peritoniais de camundongos

Uma vez que a molécula similar à gp63 está envolvida em inúmeros eventos na interação do gênero *Leishmania* com células do hospedeiro vertebrado e sabendo que a incidência de parasitoses oportunistas vem aumentando ao longo dos anos em pacientes imunocomprometidos, avaliou-se o papel da molécula de gp63 expressa por *H. samuelpessoai* na interação com um modelo de célula hospedeira de vertebrado, os macrófagos peritoniais de camundongos.

A princípio, foi verificado o comportamento dessa interação durante diferentes períodos de tempo, utilizando-se parasitos cultivados a 26°C (temperatura do inseto vetor) e a 37°C (temperatura do hospedeiro vertebrado). Não foram detectadas diferenças significativas no índice de associação entre macrófagos e os parasitos crescidos nas duas diferentes temperaturas. Durante as 4 primeiras horas de interação observou-se que o índice de

associação foi crescente, atingindo o máximo depois de 3 h. Quando deixados interagir por 6 e 24 h, verificou-se uma diminuição no índice de associação, provavelmente decorrente da ação microbicida dos macrófagos (Figura 21 A). Diferentes associações foram observadas durante a interação desse parasito com macrófagos peritoniais. Na maioria dos casos, foi vista a internalização de parasitos nas formas alongadas com o cinetoplasto anterior ao núcleo, caracterizando as formas promastigotas (Figura 21 C -*setas pretas cheias*). No entanto, algumas vezes, formas mais arrendondadas foram encontradas no interior dos macrófagos (Figura 21 C -*setas brancas*). Em ambos os casos, os parasitos sempre se encontravam dentro de vacúolos fagocíticos. Algumas imagens sugerem que os parasitos estejam sendo mortos pela ação antimicrobiana dos macrófagos (Figura 21 C -*setas pretas vazadas*).

Para avaliar se, como na interação com o hospedeiro invertebrado, o contato do parasito com o hospedeiro vertebrado era capaz de aumentar a secreção de moléculas de gp63 para o meio extracelular, o sobrenadante da interação após 3 h foi testado através de Western blotting usando-se o mesmo anticorpo anti-gp63. Os resultados mostraram que na presença dos macrófagos os parasitos secretam maior quantidade da enzima quando comparados com parasitos incubados somente em meio de cultura (Figura 21 B).

Em seguida, para analisar a influência das moléculas similares à gp63 de *H. samuelpessoai* na interação com macrófagos peritoniais, parasitos cultivados a 26°C, antes da interação, foram pré-tratados com alguns moduladores, dentre os quais: 1,10-fenantrolina (inibidor de metalopeptidases) e anticorpos anti-gp63 (H50, H52 e 180). Os resultados obtidos demonstraram uma drástica redução da interação após estes tratamentos em relação ao sistema controle. Para garantir que não eram outros anticorpos do coelho que estavam diminuindo a interação (uma vez que o anticorpo é policlonal), os parasitos foram pré-tratados com o soro pré-imune e não se detectou redução significativa da interação. Outra interação foi realizada e dessa vez os intestinos foram pré-tratados com a proteína gp63 purificada (obtida de *C. deanei*), sendo também observada uma drástica redução da interação (Figura 22).

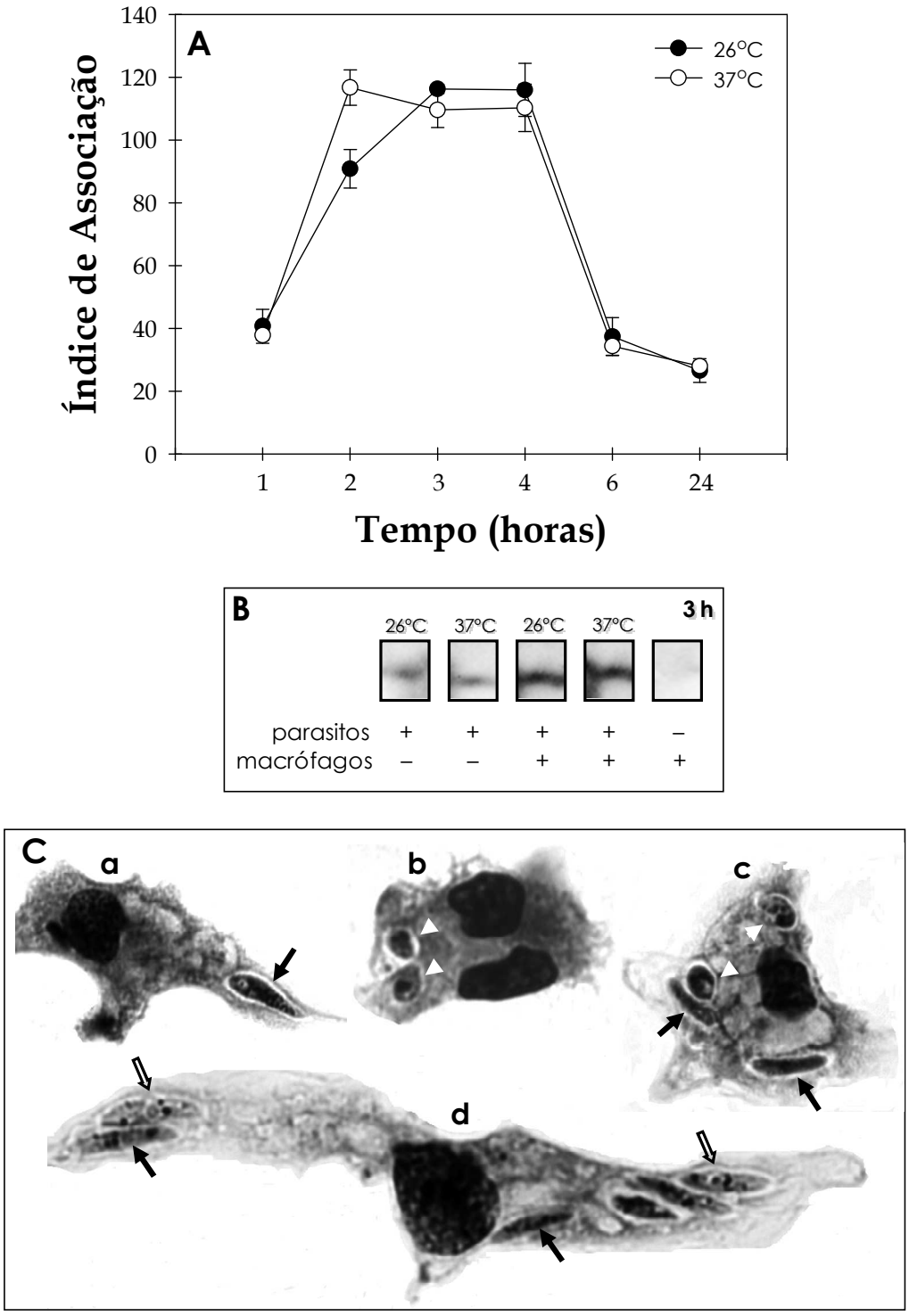

Figura 21: (A) Gráfico mostrando o comportamento da interação de *H. samuelpessoai* com macrófagos peritoniais durante 1, 2, 3, 4, 6 e 24 h. Estes dados representam a média de três experimentos independentes. **(B)** Identificação de moléculas similares à gp63, presentes no sobrenadante de interação após 3 h, através da técnica de Western blotting usando-se o anticorpo anti-gp63. **(C)** Fotografias ilustrando as diferentes visões da interação: parasitos na forma promastigotas dentro de vacúolos (setas pretas cheias), parasitos com forma arredondada no interior de vacúolos (cabeças de setas brancas) e parasitos com inúmeros grânulos ao longo do citoplasma, evidenciando uma provável injúria celular (setas pretas vazadas).

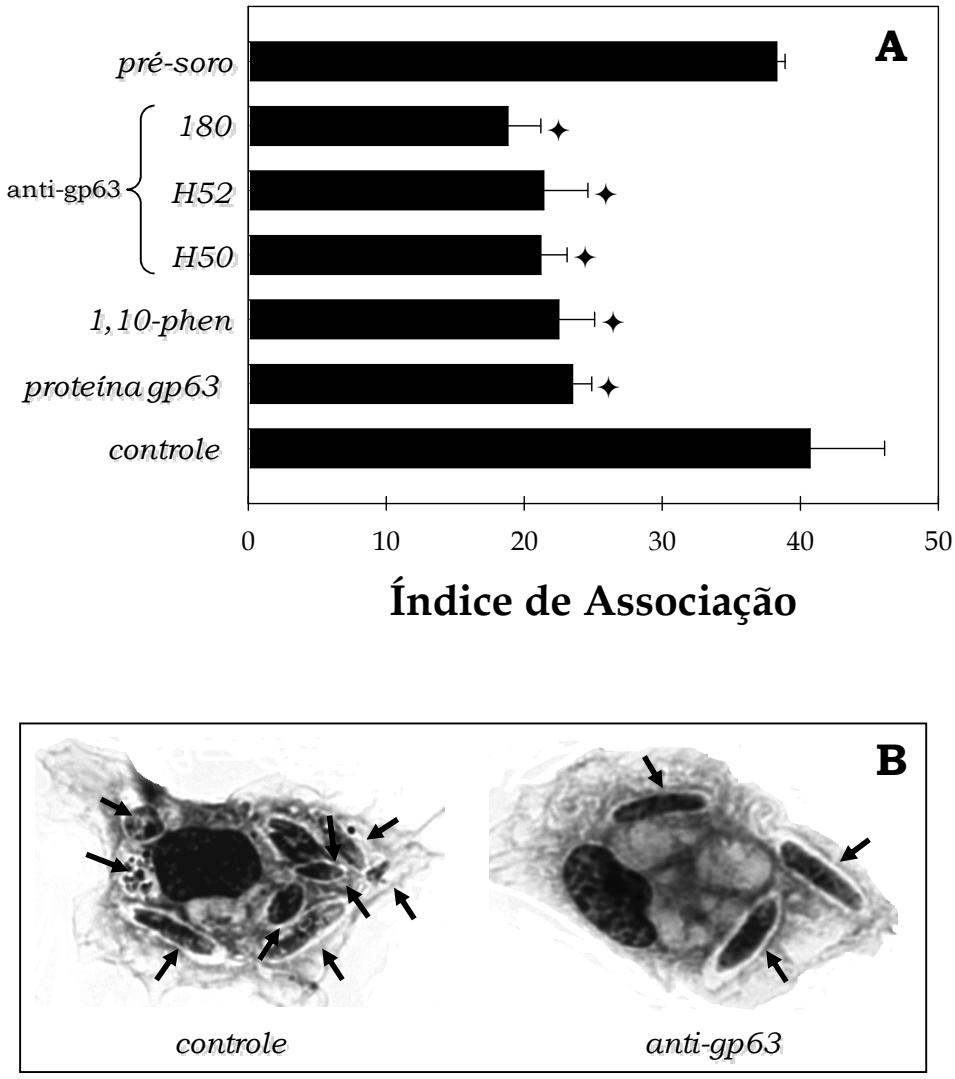

Figura 22: Efeito de moléculas similares à gp63 na interação de *H. samuelpessoai* e macrófagos. **(A)** Células de *H. samuelpessoai* foram tratadas com diferentes moduladores (indicados à esquerda do gráfico) e colocadas para interagir com macrófagos peritoniais. Verificou-se que a interação celular diminuiu significativamente quando as células foram pré-tratadas com 1,10-fenantrolina, com anticorpos anti-gp63 e também quando os intestinos foram pré-tratados com a proteína gp63 purificada de *C. deanei*. Estes dados representam a média de três experimentos independentes. **(B)** Microscopia óptica ilustrando a diminuição da interação quando parasitos (setas) foram pré-tratados com anticorpos anti-gp63 em comparação ao sistema controle. (✦ $P<0,05$)

Discussão

Na superfície de *H. samuelpessoai* está localizada uma molécula similar à gp63, como foi mostrado em estudos anteriores através de caracterização bioquímica e enzimática (ETGES,1992, SANTOS *et al.*,2003). Esse presente estudo traçou um paralelo com estudos anteriores mostrando semelhanças bioquímicas através de SDS-PAGE, além de demonstrar uma reação cruzada entre antígenos de *H. samuelpessoai* e o anticorpo anti-gp63 de *L. amazonensis* usado na análise de Western blotting, citometria de fluxo e microscopia confocal. Em adição, diversos grupos já reportaram que uma significante proporção de gp63 é secretada por promastigotas de *Leishmania* (MCGWIRE *et al.*,2002, YAO *et al.*,2002, JAFFE & DWYER,2003). Nesse contexto, também foi mostrada a expressão de atividade secretada da proteína similar à gp63 por células de *H. samuelpessoai*.

Nas análises de SDS-PAGE foi demonstrado que a massa molecular da peptidase presente em *H. samuelpessoai,* tanto na superfície quanto secretada, é de 66 kDa e quando analisada em condições desnaturantes, de 63 kDa.

Na análise de microscopia confocal de fluorescência, interessantemente, a marcação não foi homogênea, uma vez que alguns parasitos estão mais fluorescentes que outros. A primeira explicação para essa observação pode ser porque a expressão da peptidase esteja relacionada à fase do ciclo de vida em que o parasito se encontra, uma vez que as culturas desses parasitos não são sincronizadas. Além disso, a ocorrência de subpopulações distintas pode demonstrar a diferença de expressão da molécula de superfície similar à gp63 nos três estágios de desenvolvimento do parasito (promastigota, paramastigota e opistomastigota) quando cultivados *in vitro*, ou mesmo uma diminuição no acesso dessa molécula a ligantes externos, como proposto para outros glicoconjugados em *H. samuelpessoai* (SANTOS *et al.*,2002a). Em *Leishmania*, isoformas de gp63 são diferencialmente expressas durante o crescimento de promastigotas desde a fase logarítmica até a fase estacionária (revisto por YAO, DONELSON & WILSON,2003). Além disso, produtos dos genes de *gp63* podem ser dispostos de forma diferente na célula, sendo retidas no citoplasma e/ou na membrana ou secretadas, sugerindo que as menores diferenças nas seqüências das isoformas de gp63 podem ter conseqüências funcionais. Seguindo o mesmo raciocínio, é possível que essas pequenas diferenças nas isoformas possam fazer com que elas sejam expressas em diferentes compartimentos do parasito e/ou em diferentes etapas do ciclo de vida (revisto por YAO, DONELSON & WILSON,2003).

Parasitos tratados com PLC mostraram uma redução significativa, tanto na marcação de superfície com anticorpos anti-gp63 bem como na atividade proteolítica correspondente à

metalopeptidase de 66 kDa quando comparados com os não-tratados, justificando que estas moléculas de superfície são ancoradas via GPI (ETGES,1992, SCHNEIDER & GLASER,1993, SANTOS *et al.*,2002a). MCGWIRE e colaboradores (2002) demonstraram que a liberação da gp63 ancorada via GPI para o meio extracelular é reduzida drasticamente pelo tratamento com 1,10-fenantrolina em *Leishmania*. Nesse sentido, o inibidor de zinco-metalopeptidase foi capaz de reter a secreção dessa enzima de forma dose-dependente, enquanto o inibidor de PLC (p-CMPS) não alterou o padrão de secreção da molécula similar a gp63 em *H. samuelpessoai*. Coletivamente, estes resultados sugerem que a gp63 de *H. samuelpessoai* também é secretada a partir da superfície do parasito por proteólise, e não por fosfolipólise.

Como previamente proposto, a existência de moléculas similares à gp63 em tripanossomatídeos monoxênicos, que são parasitos de insetos e não infectam vertebrados, sugere uma função primária para essa peptidase no intestino médio do inseto vetor. O pH no intestino do inseto (pH 6-7), o habitat natural para *H. samuelpessoai* (MCGHEE & COSGROVE,1980), coincide com o pH ótimo da peptidase extracelular e de superfície, como foi observado no presente trabalho. Usando proteínas nativas como substratos, CHAUDHURI & CHANG (1988) observaram um pH ótimo entre 3,0-4,0 para a gp63 de promastigotas de *Leishmania mexicana amazonensis*; enquanto TZINIA & SOTERIADOU (1991) reportaram dois picos de atividade no pH 5,8 e pH 7,2 para clivagem de insulina por 7 diferentes espécies de *Leishmania*. ETGES e colaboradores (1987) afirmaram que a gp63 de promastigotas de *Leishmania major* era mais ativa contra azocaseína em torno de pH 7,0. Essas diferenças quanto ao pH ótimo da gp63 de diferentes espécies de *Leishmania* podem ser explicadas devido ao uso de substratos globulares versos substratos lineares (YAO, DONELSON & WILSON,2003). Adicionalmente, em estudos anteriores, foi reportado que *H. samuelpessoai* produz uma metalopeptidase de 60-70 kDa que apresenta atividade catalítica em um amplo espectro de pH (5,0 a 10,0) (SANTOS *et al.*,2003).

Nesse estudo, comparou-se a atividade da metalopeptidase extracelular e de superfície em diferentes temperaturas. Em *H. samuelpessoai*, foiobservada uma expressão semelhante de metalopeptidase de superfície nas temperaturas de 26 e 37°C. Porém, a metalopeptidase secretada apresenta diferença na capacidade hidrolítica a 26 e a 37°C. À temperatura do inseto vetor (26°C), essa enzima proteolítica foi menos ativa que na temperatura do vertebrado (37°C). Esse fato pode ser explicado pela ausência da âncora de GPI na peptidase secretada, que pode modificar sua estrutura tridimensional, alterando sua capacidade hidrolítica frente a diferentes temperaturas.

O efeito dos inibidores na atividade proteolítica indica qual o tipo de catálise da peptidase. Neste sentido, a proteína similar à gp63 extracelular de *H. samuelpessoai* demonstrou similaridade com a peptidase de superfície deste parasito e com a gp63 de *Leishmania*, como a sensibilidade a 1,10-fenantrolina. Outros tripanossomatídeos inferiores também secretam peptidases inibidas por 1,10-fenantrolina (SANTOS *et al.*,1999; 2001a; 2005; 2008; D'AVILA-LEVY *et al.*,2001; ALMEIDA *et al.*,2003; JAFFE & DWYER,2003; VERMELHO *et al.*,2003). Outros inibidores de metalopeptidase, como EDTA e EGTA, também diminuíram a atividade proteolítica, porém menos significativamente. E-64, um inibidor de cisteína peptidase, diminuiu levemente a atividade da metalopeptidase de 66 kDa de *H. samuelpessoai*. Isso pode indicar a presença de um grupamento tiol próximo ao sítio ativo, como já sugerido para outras metalopeptidases produzidas por tripanossomatídeos (SANTOS *et al.*,2002a). O PMSF, inibidor de serina peptidase, pouco inibiu a atividade dessa metalopeptidase.

O ciclo de vida dos tripanossomatídeos é caracterizado por uma série de diferenciações e variações no metabolismo. Os eventos de diferenciação requerem mudanças específicas nos processos biológicos básicos das células e são reflexos de estímulos ambientais. Diversos fatores são capazes de desencadear a diferenciação celular em tripanossomatídeos, incluindo fatores bióticos e abióticos (PARSONS & RUBEN,2000). Já é conhecido que a temperatura de crescimento de diferentes microrganismos pode modular a expressão de diversas moléculas, incluíndo enzimas proteolíticas. Em *H. samuelpessoai*, a temperatura de mamíferos (37°C) e a exposição ao DMSO induzem o parasito a se diferenciar das formas promastigotas (tipicamente encontrada a 26°C, sem nenhum estímulo) às formas paramastigotas e opistomastigotas (ROITMAN *et al.*,1972; ANGLUSTER *et al.*,1977, CASTELLANOS *et al.*,1981; SANTOS *et al.*,2001, 2002a, 2003). A fim de correlacionar a expressão da peptidase similar à gp63 com o processo de diferenciação celular em *H. samuelpessoai*, as enzimas de parasitos crescidos unicamente a 26°C, na mesma temperatura porém na presença de DMSO e a 37°C nas mesmas condições foram analisadas por gelatina-SDS-PAGE. Os resultados mostraram alterações significativas na expressão da metalopeptidase de *H. samuelpessoai*, somente a atividade de cisteína peptidases foi significativamente diminuída quando o parasita foi crescido a 37°C, sugerindo uma possível influência da temperatura de crescimento na produção desta classe de peptidase. Uma vez que a atividade da cisteína peptidase de 45 kDa depende da temperatura, pode-se correlacionar essa enzima a processos metabólicos que ocorram a 26°C (temperatura do inseto vetor), o que não ocorre quando o parasito cresce a

37°C. Essa variação na atividade pode também estar relacionada à diferenciação do parasito, já que a principal forma evolutiva observada a 37°C é a paramastigota, enquanto que a 26°C as formas promastigotas são predominantes (ROITMAN *et al.*,1972; ANGLUSTER *et al.*,1977).

Outro forte agente capaz de desencadear a diferenciação celular em vários sistemas biológicos, incluindo *H. samuelpessoai*, é o DMSO (CASTELLANOS *et al.*,1981; revisto por SANTOS *et al.*,2003). Sabe-se que a redução da proliferação do parasito é acompanhada pelo aumento da taxa de diferenciação em *H. samuelpessoai* (SANTOS *et al.*,2007), e quando o parasito cresce na ausência de DMSO apresenta uma preponderância de formas promastigotas durante 24 a 72 h (CASTELLANOS *et al.*,1981; SANTOS *et al.*,2001,2002a,2003). Porém, quando incubados na presença de DMSO, o número de promastigotas diminui, e juntos paramastigotas e opistomastigotas aumentam para aproximadamente 60 a 70% durante 24 a 72 h (CASTELLANOS *et al.*,1981; SANTOS *et al.*,2001,2002a,2003). Em trabalhos anteriores, demonstrou-se que, em *H. samuelpessoai*, a diferenciação induzida por DMSO é dependente da expressão de peptidase, uma vez que inibidores proteolíticos bloquearam esse processo (SANTOS *et al.*,2003). Nesse trabalho, foi confirmado que o DMSO induz a diferenciação e que a redução na expressão de cisteína peptidase nas células promastigotas são eventos conectados. Por outro lado, a expressão da metalopeptidase de 66 kDa não é significativamente alterada na presença do DMSO, como foi visto nos ensaios de gelatina-SDS-PAGE e western blotting.

A gp63 de *Leishmania* é sabidamente uma enzima capaz de degradar diferentes substratos protéicos, incluindo gelatina, caseína, azocaseína, albumina, hemoglobina e fibrinogênio (BOUVIER *et al.*,1990). Certamente, sua habilidade em hidrolisar tal espectro de substratos fez da mesma uma proteína conveniente para interagir com as moléculas encontradas em ambientes diversos do hospedeiro vertebrado ou do inseto vetor. A proteína similar à gp63 em *H. samuelpessoai*, presente na superfície do parasito, foi capaz de hidrolizar também um amplo espectro de proteínas: gelatina, caseína, BSA, hemoglobina, soro albumina humana, IgG, mucina assim como o extrato do intestino do inseto *Aedes aegypti*. O amplo espectro de degradação dessa peptidase pode possivelmente auxiliar esse parasito na obtenção de aminoácidos para sua nutrição, assim como clivar barreiras para promover sua disseminação, pois os insetos comumente apresentam diversos mecanismos de proteção contra microrganismos, como a produção de peptídeos com ação antimicrobiana. Dessa forma, os tripanossomatídeos que passam pelo menos uma fase do seu ciclo celular dentro de um inseto devem apresentar mecanismos de maneira a escapar desses mecanismos. A produção de

peptidases é o aparato mais importante que os parasitos dispõem para escapar desses mecanismos de defesa dos insetos (revisto por MOSOLOV *et al.*,2008). Por este meio, o amplo espectro de ação da proteína similar à gp63 de *H. samuelpessoai* também pode melhorar a sua capacidade de ultrapassar as barreiras de defesa do inseto. Do mesmo modo, moléculas produzidas por *Leishmania* são capazes de hidrolisar as várias proteínas relevantes do hospedeiro assim como clivar diferentes peptídeos antimicrobianos (KULKARNI *et al.*,2006).

A atividade de gp63 também já foi descrita em outros tripanossomatídeos patógenos de humanos, incluindo *T. cruzi* e *T. brucei*. Nesse último, sugeriu-se que a atividade da metalopeptidase de superfície era responsável pelo "shedding" da VSG (glicoproteína variante de superfície) durante a diferenciação celular (BANGS *et al.*,1997). De fato, uma das famílias de gp63 do *T. brucei* está envolvida na liberação de VSG transgênica (LACOUNT *et al.*,2003). O *T. cruzi* possui uma família de genes de gp63 compostos de grupos múltiplos (CUEVAS, CAZZULO & SÁNCHEZ,2003). Dois destes grupos, *Tcgp63-I* e *-II*, estão presentes como genes com alto número de cópias, e anticorpos anti-Tcgp63-I foram capazes de bloquear parcialmente a infecção de células Vero por tripomastigotas, sugerindo um possível papel para esta metalopeptidase durante o processo de interação *in vitro* (CUEVAS, CAZZULO & SÁNCHEZ,2003).

Várias funções podem ser especuladas para a metalopeptidase similar a gp63, como por exemplo: pode permitir que os parasitos evadam uma variedade de fatores antimicrobianos no ambiente extracelular, incluindo a degradação de serina peptidases, que são mediadoras em muitos aspectos da imunidade do invertebrado, como a coagulação da hemolinfa e ativação da síntese do peptídeo antimicrobiano (GORMAN & PASKEWITZ,2001). Além disso, dentro do inseto vetor, a gp63 pode favorecer a utilização de nutrientes presentes no sangue ingerido durante os primeiros estágios do desenvolvimento, assim como proteger o parasito contra enzimas digestivas do vetor (SCHLEIN, SCHNUR & JACOBSON,1990). Nesse sentindo, tentou-se implicar uma provável função para a proteína similar à gp63 de *H. samuelpessoai* dentro do intestino do inseto vetor. O *A. aegypti* é um eficiente vetor dos vírus da dengue e da febre amarela devido a sua proximidade com os humanos e de seu comportamento em alimentar-se de múltiplos hospedeiros durante um único ciclo gonotrófico (GUBLER,2004). Desde que tripanossomatídeos monoxênicos foram associados a lesões em pacientes imunodeprimidos (MCGHEE & COSGROVE,1980; MCBRIDE *et al.*,1995; MONDAIN-MITON *et al.*,1995; JIMÉNEZ *et al.*,1996; PACHECO *et al.*,1998; IBRAHIM *et al.*,1997; MILLER,2000; CHICARRO & ALVAR,2003; MORIO *et al.*,2008), a relevância de se estudar a

interação entre esses tripanossomatídeos e insetos hematófagos aumentou vertiginosamente. *A. aegypti* também foi escolhido como modelo experimental porque já foi mostrado que *Herpetomonas* sp. foi capaz de colonizar repetidamente este inseto (WEINMAN & CHEONG,1978). Além disso, foi estabelecido que *B. culicis* e *C. deanei* são capazes de se ligar *in vitro* a intestinos dissecados de *A. aegypti* (FAMPA *et al.*,2003, D'AVILA-LEVY *et al.*,2005b,2006a) e que *B. culicis* pode colonizar intestinos *de A. aegypti* (FAMPA *et al.*, 2003). Os tripanossomatídeos das espécies *P. françai*, *C. guilhermei* (D´AVILA-LEVY *et al.*,2006a) e *H. megaseliae* (SILVA *et al.*,2009) também são capazes de interagir com o intestino de *A. aegypti*. Além disso, foi demonstrado que ocorre o mesmo perfil de interação entre o hospedeiro natural (*Megaselia scalaris*) e o *A. aegypti* para *H. megaseliae*, um forte indicador que esse inseto pode ser usado como hospedeiro experimental na infecção com tripanossomatídeos (NOGUEIRA DE MELO *et al.*,2006).

Os resultados desse trabalho corroboram mais uma vez para o uso deste inseto como modelo na interação com *H. samuelpessoai*, uma vez que estes parasitos foram capazes de colonizar o intestino de *A. aegypti* por até oito dias. Assim que o *A. aegypti* foi confirmado como um bom modelo experimental para estudos de interação com tripanossomatídeos inferiores, foram realizados ensaios de interação com promastigotas de *H. samuelpessoai* previamente tratados com inibidores proteolíticos e PLC, tendo sido a interação reduzida, porém não especificando a atuação direta da proteína similar à gp63 nesse processo. Assim, foram feitos ensaios mais específicos usando anticorpos anti-gp63. Esse tratamento levou a uma significante redução na capacidade de adesão dos parasitos aos intestinos. Por outro lado, parasitos tratados com IgG irrelevante aderiram ao intestino de forma similar ao controle. Esses dados sugerem um provável envolvimento das moléculas de gp63 no processo de ligação de *H. samuelpessoai* com a parede do intestino de *A. aegypti*. No entanto, não era possível descartar uma possível inibição da interação como resultado de impedimento estérico do anticorpo. Para minimizar esta questão, outra evidência do papel da gp63 em intestinos de inseto foi demonstrada pré-tratando-se os intestinos explantados com a metalopeptidase purificada (gp63) de *C. deanei*. O tratamento do intestino reduziu a interação, indicando que moléculas similares à gp63 são relevantes nesse processo. Foi testado também o efeito da enzima inativada e da apoenzima para excluir a hipótese de que a atividade proteolítica da gp63 tenha degradado receptores e diminuído a interação; no entanto, os mesmos resultados foram observados, sugerindo uma saturação dos receptores do intestino pela proteína purificada. Estes resultados de modulação da interação entre *H. samuelpessoai* e intestinos de

A. aegypti podem ser sumarizados esquematicamente, como demonstrado nas figuras 23 e 24 (SANTOS, BRANQUINHA E D'AVILA-LEVY,2006).

Como células de *H. samuelpessoai* são capazes de secretar a proteína similar à gp63 para o meio extracelular, a pesquisa dessa molécula no sobrenadante da interação com os intestinos de *A. aegypti* se fez relevante. Assim, a análise por western blotting dessa reação, obtida após 1 h de interação, demonstrou um aumento na secreção de moléculas similares à gp63 (cerca de 2 vezes) em comparação com parasitos isolados em meio de cultura. Como esperado, intestinos isolados não apresentam qualquer reatividade cruzada contra a molécula de gp63. Do mesmo modo, parasitos pré-tratados com 1,10-fenantrolina e, em seguida, colocados pra interagir com os intestinos não foram capazes de secretar a molécula, o que se justifica pelo fato da gp63 ser secretada via proteólise. Pode-se sugerir, com base nesses resultados, que a molécula similar à gp63 de *H. samuelpessoai*, assim como de outros tripanossomatídeos inferiores (SANTOS, BRANQUINHA E D'AVILA-LEVY,2006), é realmente relevante na adesão do parasito ao hospedeiro invertebrado, e parece ter sua expressão aumentada quando em contato com os intestinos de vetores. Através da análise de citometria de fluxo, pode-se confirmar esse fato, uma vez que as células que foram recolhidas do intestino do inseto após colonização por 6 dias tiveram uma maior marcação com o anticorpo anti-gp63 quando comparadas às células cultivadas em BHI.

Uma outra questão levantada mais recentemente diz respeito à possibilidade de tripanossomatídeos monoxênicos serem capazes de infectar e sobreviver dentro de hospedeiros mamíferos, incluindo seres humanos. Isso acontece em pacientes imunocomprometidos que ficam vulneráveis à infecção por tripanossomatídeos (ou outros parasitos) que nem sobrevivem ou não são detectados em indivíduos imunocompetentes (CHICARRO & ALVAR,2003). Além disso, uma revisão na literatura revela outros casos de infecção de mamíferos por tripanossomatídeos monoxênicos (revisto por MCGHEE & COSGROVE,1980). Como por exemplo, JANSEN e colaboradores (1988) demonstraram que as glândulas de cheiro de gambás experimentalmente infectadas suportam o crescimento de *C. deanei* por pelo menos 6 meses. Além disso, células biotiniladas de *C. deanei* reconhecem 2 polipeptídeos no lisado de fibroblastos, indicando que esses tripanossomatídeos podem aderir e invadir com sucesso esse tipo de célula (MATTEOLI *et al.*,2009), corroborando o fato de que *C. deanei* e *H. roitmani* (cepas selvagens) podem infectar e sobreviver em fibroblastos de pele de camundongos (SANTOS *et al.*,2004).

Assim sendo, o estudo da interação entre esses tripanossomatídeos classicamente não patogênicos com hospedeiros vertebrados tornou-se relevante. Nesse sentido, usando macrófagos peritoniais de camumdongos, realizou-se um modelo de interação entre *H. samuelpessoai* e o hospedeiro vertebrado. Foi observado que os parasitos crescidos tanto a 26 quanto a 37°C eram capazes de se associar aos macrófagos de forma crescente até o período de 4 horas, sendo muito provavelmente debelados por sua atividade microbicida depois de 6 até 24 h. Também foi encontrada maior quantidade de gp63 secretada quando os parasitos entram em contato com os macrófagos, sugerindo novamente um aumento de expressão dessa molécula no momento da interação. Além disso, foram realizados ensaios de interação com promastigotas de *H. samuelpessoai* previamente tratados com inibidor de metalopeptidase (1,10-fenantrolina) e anticorpos anti-gp63, e todos esses moduladores foram capazes de diminuir a interação entre os parasitos e o hospedeiro vertebrado, evidenciando sua importância também nesse tipo de interação. Seguindo o mesmo raciocínio da interação com o hospedeiro invertebrado, foi testado também o pré-tratamento dos macrófagos com a gp63 purificada, que da mesma forma saturou os receptores; nesse caso, as evidências eram maiores, pois já foi relatado que os macrófagos possuem receptores para fibronectina e a gp63 tem seqüências relacionadas à fibronectina que são reconhecidas por esses receptores (SOTERIADOU *et al.*,1992). Assim sendo, nesse caso também houve diminuição da interação, comprovando a importância dessa molécula para *H. samuelpessoai*.

A proximidade evolutiva de *H. samuelpessoai* com importantes patógenos humanos, inclusive espécies de *Leishmania* (HUGHES & PIONTKIVSKA,2003), é possivelmente refletida na similaridade de alguns aspectos da maquinaria celular básica destes parasitos. Esses resultados corroboram que existem similaridades bioquímicas e imunológicas entre a gp63 de *Leishmania* e a peptidase de *H. samuelpessoai*, e isso pode sugerir que esta molécula tenha sido conservada evolutivamente. Essa é uma evidência de que a molécula gp63 é realmente importante para sobrevivência dos tripanossomatídeos no interior de seus respectivos hospedeiros invertebrados. No entanto, esta hipótese não exclui o papel desta molécula no contexto da interação com o hospedeiro vertebrado, como já demonstrado por vários autores.

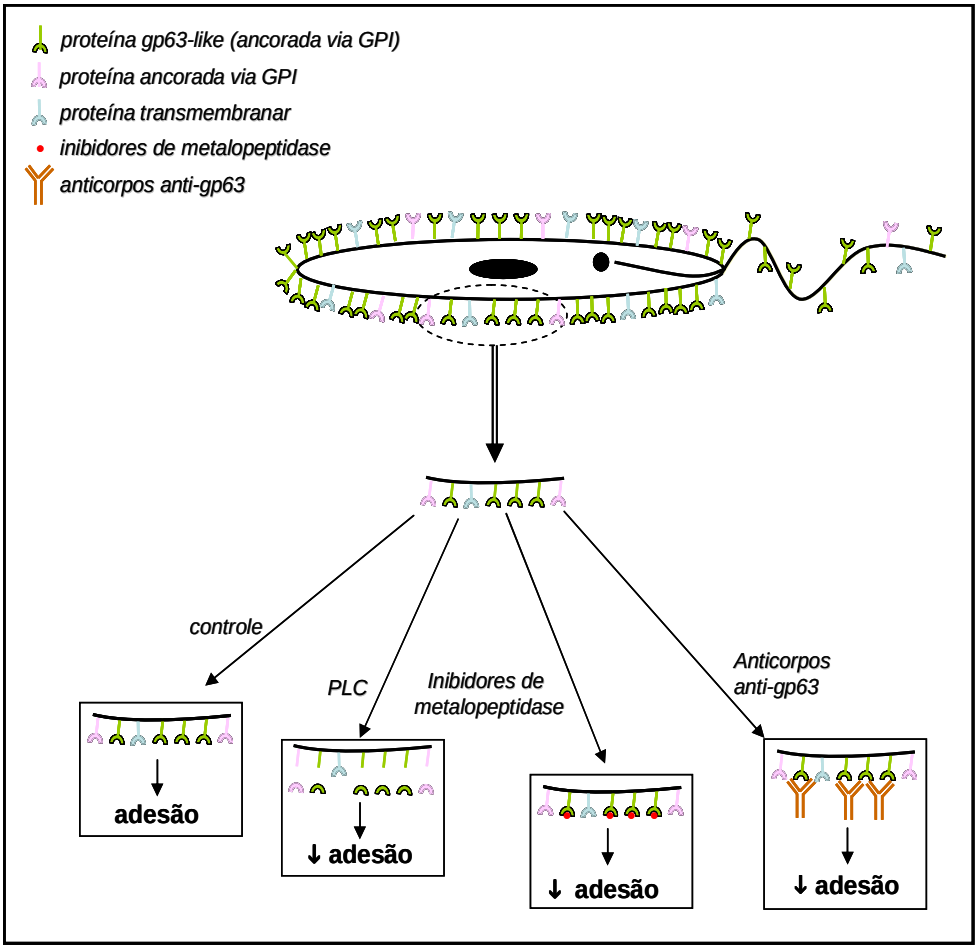

Figura 23: Esquema indicando diferentes sistemas empregados para demonstrar um possível papel desempenhado pela proteína similar à gp63 na interação de *H. samuelpessoai* com o hospedeiro invertebrado. A representação mostra o tripanossomatideo expressando moléculas similares à gp63 de superfície e outras proteínas transmembranares ou ancoradas via GPI. A adesão ao epitélio do intestino *in vitro* é avaliada em parasitos não tratados (controle) e tratados com inibidores de metalopeptidase, fosfolipase C (PLC) ou anticorpos anti-gp63. Esses tratamentos reduzem o nível de adesão devido a remoção ou inativação da proteína similar à gp63 de superfície (adaptado de SANTOS, BRANQUINHA & D'AVILA-LEVY,2006).

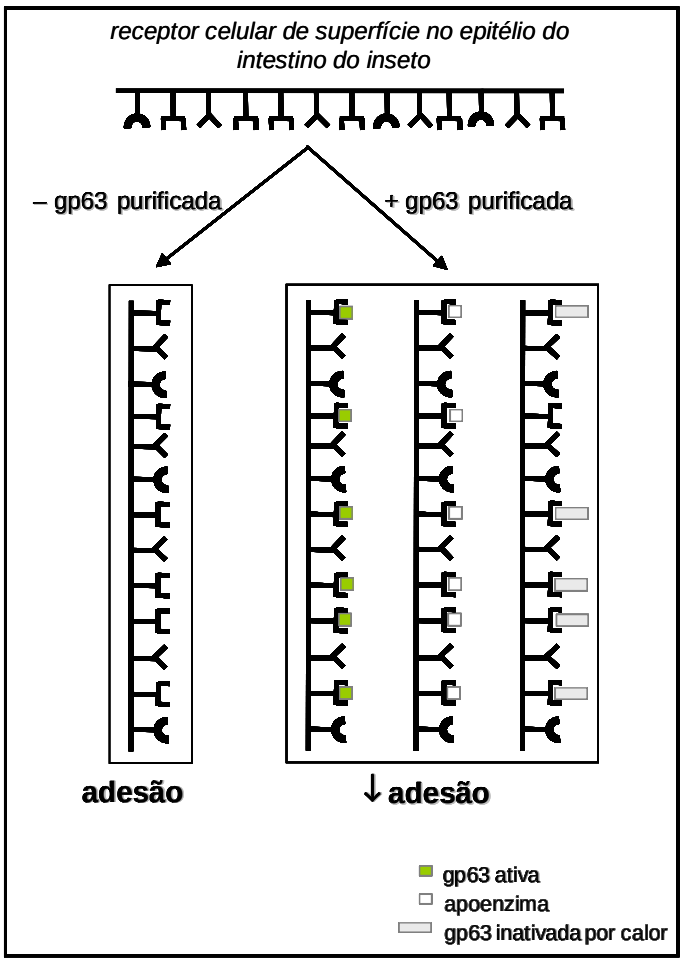

Figura 24: Esquema indicando diferentes sistemas empregados para demonstrar um possível papel desempenhado pela proteína similar à gp63 na interação de *H. samuelpessoai* com o hospedeiro invertebrado. A representação da inibição da adesão do parasito por uma proteína similar à gp63 purificada (intacta, inativada por calor ou por remoção dos íons - apoenzima), sugere saturação dos receptores do intestino (adaptado de SANTOS, BRANQUINHA & D'AVILA-LEVY,2006).

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, F.V.S.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S.; BRANQUINHA, M.H. & VERMELHO, A.B. (,2003). **Extracellular metalloproteinase activity in Phytomonas françai.** Parasitol. Res. 89: 3,20–322.

ANGLUSTER, J.; BUNN, M.M. & DE SOUZA, W. (,1977**). Effect of 2-deoxy-D-glucose on differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai.*** J. Parasitol. 63: 922-924.

ANGLUSTER, J.; BUNN, M.M. & DE SOUZA, W. (,1977). **Effect of 2-deoxy-D-glucose on differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai.*** J. Parasitol. 63: 922-924.

BAILEY C.H. & BROOKS W.M. (,1972a). **Effects of *Herpetomonas muscarum* on development & longevity of the eye gnat, *Hippelates pusio* (Diptera: Chloropidae).** J. Invertebr. Pathol. ,20: 31-36.

BAILEY C.H. & BROOKS W.M. (,1972b). **Histological observations on larvae of the eye gnat, *Hippelates pusio* (Diptera: Chloropidae), infected with the flagellate *Herpetomonas muscarum***. J. Invertebr. Pathol. ,19: 342-353.

BANGS, J.D.; RANSON, D.A.; MCDOWELL, M.A. & BROUCH, E.M. (,1997). **Expresion of bloodstream variant surface glycoproteins in procyclic satage *Trypanosoma brucei*: role of GPI anchors in secretion.** EMBO J. 16: 4285-4294.

BANGS, J.D.; RANSON, D.A.; NIMICK, M.; CHRISTIC, C. & HOOPER, N.M. (,2001). **In vitro cytocidal effects on *Trypanosoma brucei* & inhibition of *Leishmania major* gp63 by peptidomimetic metallopeptidase inhibitors.** Mol. Biochem. Parasitol. 114: 111-117.

BARRET A.J. (,1986). **An introduction to the proteinases**. In: Barret AJ & Salvesen G., eds. Proteinase Inhibitors. Amsterdam Elsevier Science. pp. 2-33

BARRET, A.J. (,1994). **Classification of peptidases.** Meth. Enzymol. 244: 1-15.

BARRETO-DE-SOUZA, V.; PACHECO, G.; SILVA, A.; CASTRO-FARIA-NETO, H.; BOZZA, P.; SARAIVA, E.M. & BOU-HABIB, D.C.(,2006). **Increased Leishmania replication in HIV-1-infected macrophages is mediated by tat protein through cyclooxygenase-2 expression & prostagl&in E2 synthesis.** J. Infect. Dis. ,194: 846-854.

BARRETO-DE-SOUZA,V.; MEDEIROS, T.X.; MOTTA, M.C.M.; BOU-HABIB, D.C. & SARAIVA, E.M. (,2008). **HIV-1 infection & HIV-1 Tat protein permit the survival & replication of a non-pathogenic trypanosomatid in macrophages through TGF-β1 production**. Microbes & infection. 10(6):642-649.

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.

BEARD C.B.; BUTTLER, J.F. & GREINER, E.C. (,1989). **In vitro growth characterization & host-parasite relationsship of *Leptomonas pulexsimulantis* n. sp., a trypanosomatid flagellate of the flea *Pulex simulans***. J. Parasitol. 75: 658-668.

BECKER, E.R. (,1923a). **Observations on the morphology & the life history of *Herpetomonas muscae-domesticae* in North American muscoid flies**. J. Parasitol. 9: ,199-214.

BECKER, E.R. (,1923b). **Transmission experiments on the specificity of *Herpetomonas muscae-domesticae* in muscoid flies**. J. Parasitol. 10: 25-31.

BEYNON, R.J. & BOND, J. S. (,1989). **Proteolitic enzymes a pratical approach.** In: The pratical approach Series. IRL Press at Oxford University Press.

BHOWMIICK, S.; RAVIDRAN, R & ALI, N. (,2008). **Gp63 in stable cationic liposomes confers sustained vaccine immunity to susceptible BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*.** Inf. Imm. 76:1003-1015.

BODE W. & HUBER R. (,1992). **Natural protein proteinase inhibitors & their interaction with proteinases.** Eur. J. Biochem. ,204: 433-451.

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

BORDIER, C.; ETGES, R.J.; WARD, J.; TURNER, M.J. & CARDOSO DE ALMEIDA, M.L. (,1986). ***Leishmania* & *Trypanosoma* surface glycoproteins have a common glycophospholipid membrane anchor.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 5988–5991.

BOUVIER, J.; SCHNEIDER, P.; ETGES, R. & BORDIER, C. (,1990). **Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*.** Biochemistry 29: 10113–101,19.

BRANQUINHA, M.H.; VERMELHO, A.B.; GOLDENBERG, S. & BONALDO, M.C. (,1994). **Characterization of proteinases in trypanosomatids.** Braz. J. Med. Biol. Res. 27: 495–499.

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

BRITTINGHAM, A.; CHEN, G.; MCGWIRE, B.S.; CHANG, K.P. & MOSSER, M.D. (,1999). **Interaction of leishmania gp63 with cellular receptors for fibronectin.** Infect. Immun. 67 (9): 4477-4484.

BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C.J.; MCMASTER, W.R.; MCGWIRE, B.S.; CHANG, K.P. & MOSSER, D.M. (,1995). **Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, & resistance to complement-mediated lysis.** J. Immunol. 155: 3102–3111.

BROOKER, B.E. (,1971). **Flagellar attachment & development of *Crithidia fasciculata* to the gut wall of *Anopheles gambiae*.** Protoplasma 73: ,191-,202.

BRUN, R. (,1974). **Ultrastruktur und Zyklus von *Herpetomonas muscarum*, "*Herpetomonas mirabilis*", & *Crithidia luciliae* in Chrysomya chloropyga**. Acta Trop. 31: 2,19-289.

BUTTON, L.L; RUSSEL, D.G.; KLEIN, H.L.; MEDINA-ACOSTA, E.; KARRES, R.E. & MCMASTER, W.R. (,1989). **Genes enconding the major surface glycoprotein in *Leishmania* are t&enly linked at a single chromosomal locus & are constitutively transcribed.** Mol. Biochem. Parasilto. 32: 271-283.

CAMARGO, E.P. (,1999). ***Phytomonas* & other trypanosomatid parasites of plants & fruit.** Adv. Parasitol. 42: 29-112.

CAMARGO, E.P. (,1999). ***Phytomonas* & other trypanosomatid parasites of plants & fruit**. Adv. Parasitol. 42: 29-112.

CASTELLANOS, G.B.; ANGLUSTER, J. & DE SOUZA, W. (,1981). **Induction of differentiation in *Herpetomonas samuelpessoai* by dimethylsulfoxide.** Acta. Trop. 38:29-37.

CAZZULO, J.J.; STOKA, V. & TURK, V. (,1997). **Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parsite *Trypanosoma cruzi*.** Biol. Chem. 378: 1-10.

CHAKRABARTY, R.; MUKHERJEE, S.; LU, H.G.; MCGWIRE, B.S.; CHANG, K.P. & BASU, M.K. (,1996). **Kinetics of entry of virulent & avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules (gp63 & LPG).** J. Parasitol. 82: 632-635.

CHAUDHURI, G. & CHANG, K.P. (,1988). **Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes**. Mol. Biochem. Parasitol. 27: 43–52.

CHICARRO, C. & ALVAR, J. (,2003). **Lower trypanosomatids in HIV/AIDS patients**. Ann. Trop. Med. Parasitol. 97: 75–80.

COLLI, W. & ALVES, M.J.M. (,1999). **Relevant glycoconjugates on the surface of *Trypanosoma cruzi*.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz 94: 37-49.

CORRÊA-DA-SILVA, M. S.; FAMPA, P.; LESSA, L.P.; SILVA, E.R.; MALLET, J.R.S.; SARAIVA, E. & MOTTA, M.C.M. (,2006). **Colonization of *Aedes aegypti* midgut by the endosymbiont-bearing trypanosomatid *Blastocrithidia culicis*.** Parasitol. Res. 99: 384-391.

CUEVAS, I.C., CAZZULO, J.J. & SÁNCHEZ, D.O. (,2003). **Gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity & a possible role in host cell infection**. Infec. Immun. 71: 5739-5749.

D. GOLETTI, D. WEISSMAN, R. JACKSON, N. GRAHAM, D. VLAHOV, R. KLEIN (,1996). **Effect of *Mycobacterium* tuberculosis on HIV replication. Role of immune activation**. J. Immunol. 157:1271-1278.

D´AVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, L.O.; MARINHO, F.A.; MATTEOLI, F.P.; LOPES, A.H.; MOTTA, M.C.; SANTOS, A.L.S. & BRANQUINHA, M.H. (,2008). ***Crithidia deanei*: influence of parasite gp63 homologue on the interaction of endosymbiont-harboring & aposymbiotic strains with *Aedes aegypti* midgut.** Exp. Parasitol. 118 (3): 345-353.

D'AVILA-LEVY, C.M.; ARAÚJO, F.M.; VERMELHO, A.B.; SOARES, R.M.A.; SANTOS, A.L.S. & BRANQUINHA, M.H. (,2005a). **Proteolytic expression in *Blastocrithidia culicis*: influence of the endosymbiont & similarities with virulence factors of pathogenic trypanosomatids.** Parasitology 130: 413–4,20.

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 on the role of gp63-like proteins in insect trypanosomatids.** FEMS Microbiol. Lett. 254: 149–156.

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.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 on the insect interaction.** Curr. Microbiol. 52: 439-444.

D'AVILA-LEVY, C.M.; SILVA, B.A.; HAYASHI, E.A.; VERMELHO, A.B.; ALVIANO, C.S.; SARAIVA, E.M.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L.S. (,2005b). **Influence of the endosymbiont of *Blastocrithidia culicis* & *Crithidia deanei* on the glycoconjugate expression & on Aedes aegypti interaction.** Fems Microbial. Lett. 252(2):279-286.

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.

DAVIES, C.R.; COOPER, A.M.; PEACOCK, C.; LANE, R.P. & BLACKWELL, J.M. (,1990). **Expression of LPG & GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the s&fly *Phlebotomus papatasi*. Parasitology 101: 337–343.**

DE SOUZA, W. (,1984). **Cell biology of *Trypanosoma cruzi***. Int. Rev. Cytol. 86: ,197-283.

DE SOUZA, W. (,1989). **Components of the cell surface of trypanosomatids**. Prog. Protistol. 3: 87-184.

DE SOUZA, W. (,1995). **Structural organization of the cell surface of pathogenic protozoa.** Micron. 26: 405-430.

DEDET, J.P. & PRATLONG, F. (,2000). ***Leishmania, Trypanosoma* & monoxenous trypanosomatids as emerging opportunistic agents**. J. Eukaryot. Microbiol., 47: 37-39.

DEDET, J.P.; ROCHE, B.; PRATLONG, F.; CALES-QUIST, D.; JOUANNELLE, J.; BENICHOU, J.C. & HUERRE, M. (,1995). **Diffuse cutaneous infection caused by a presumed monoxenous trypanosomatid in a patient infected with HIV.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 89: 644-646.

DESCOTEAUX, A. & TURCO, S.J. (,1999). **Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity**. Biochim. Biophys. Acta, 1455: 341-352.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIR&A, K.; ROHLOFF, P & MORENO, S.N.J. (,2005). **Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man**. Nat. Rer. Microbiol. 3: 251-261.

DOGGETT, S. L. (,2003) Imagem: http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos/aedes_aegypti_adult.jpg (Acessado em 21/05/,2006).

DONELSON, J.E. (,2003). **Antigenic variation & the role of the African trypanosome genome.** Acta Trop. 58: 391-404.

ETGES, R. (,1992). **Identification of a surface metalloproteinase on 13 species of *Leishmania* isolated from humans, *Crithidia fasciculata*, & *Herpetomonas samuelpessoai*.** Acta Trop. 50: ,205–217.

ETGES, R.; BOUVIER, J. & BORDIER, C. (,1987). **The major surface protein of *Leishmania* promastigotes**. J. Biol. Chem. 261: 9099-9101

FAMPA, P.; CORRÊA-DA-SILVA, M.S.; LIMA, D.C.; OLIVEIRA, S.M.P.; MOTTA, M.C.M. & SARAIVA, E.M.B. (,2003). **Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, & fly & the respective insect cell lines.** Int J Parasitol 33: 10,19–1026.

GALVÃO, A.B.; OLIVEIRA, R.L.; CARVALHO, A.L.M. & VEIGA, G.P. (,1970). ***Leptomonas pessoai* sp. n. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida, Protozoa).** Rev. Goiana Med. 16: 229-236.

GARCIA, M.R.; GRAHAM, S.; HARRIS, R.A.; BEVERLEY, S.M. & KAYNE, P.M. (,1997). **Epitope cleavage by *Leishmania* endopeptidases(s) limits the efficiency of the exogenous pathway of major histocompatibility complex class I-associated antigen presentation**. Eur. J. Immunol. 27: 1005–1013.

GARÍN, Y.J.; SULAHIAN, A.; MÉNECEUR, P.; PRATLONG, F.; PRINA, E.; GANGNEUX, J. & DEROUIN, F. (,2001). **Experimental pathogenicity of a presumed monoxenous trypanosomatid isolated from humans in a murine model.** J. Eukaryot. Microbiol. 48: 170-176.

GONÇALVES, A.M.; NEHME, N.S. & MOREL, C.M. (,1984). In: Genes, Antigens & Parasites. Carlos Morel (ed), Rio de Janeiro. p. 106-107

GORMAN, M. J. & PASKEWITZ, S. M. (,2001). **Serine protease as mediators of mosquito immune responses.** Insect Biochem. Mol. Biol. 31: 257-262.

GR&GENETT, P.M.; COUGHLIN, B.C.; KIRCHHOFF, L.V. & DONELSON, J.E. (,2000**). Differential expression of Gp63 genes in *Trypanosoma cruzi*.** Mol. Biochem. Parasitol. 110: 409-415.

GR&GENETT, P.M.; OTSU, K., WILSON, H.R., WILSON, M.E. & DONELSON, J.E. (,2007). **A function for a specific zinc metalloprotease of African Trypanosomes**.Plos Pathog. 3 (10) 150: 1432-1445.

GRIMM, F.; JENNI, L.; BOUVIER, J.; ETGES, R.J. & BORDIER, C. (,1987). **The promastigote surface protease of *Leishmania donovani infantum* in the midgut of *Phlebhotomus perniciosus*.** Acta Trop. 44: 375–377.

GUBLER, D.J. (,2004). **The changing epidemiology of yellow fever & dengue, ,1900 to ,2003: full circle?** Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 27: 3,19–330.

GULL, K. (,1999). **The cytoskeleton of trypanosomatid parasites**. Annu. Rev. Microbiol. 53: 629-55.

HAJMOVÁ, M.; CHANG, K.P.; KOLLI, B. & VOLF, P. (,2004). **Down-regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis*.** Microb. Infect. 6: 646–649.

HEY, A.S; THE&ER, T.G.; HVIID, L.; HAZRATI, S.M.; KEMP, M. & KHARAZMI, A. (,1994). **The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* & *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells.** J. Immunol. 152: 4542–4548.

HOARE, C.A. (,1972). **The Trypanosomes of Mammals**. In: A zoological monograph classification. Oxford: Blackwell Scientific Publications. p.60-80.

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

http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Aedes_aegypti.htm, acessado em 11/07/,2009.

HUGHES, A. L. & PIONTKIVSKA, H. (,2003). **Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18S rRNA & protein phulogenies**. Kinetoplatid Biol. Disease. 2: 1-10

HUPPERICH, K.; CAMARGO, E.P. & MILDER R. (,1992). **Ultrastructural study of the host-parasite relationship of trypanosomatids in the housefly**. Parasitol. Res. 78: 48-55.

IBRAHIM, M.; SULIMAN, A.; HASHIM, F.A.; KHALIL, T.A.G.; EVANS, D.A.; KHARAZMI, A. & EL HASSAN, A.M. (,1997). **Oronasal leishmaniasis caused by a parasite with an unusual isoenzyme profile**. Am. J. Trop. Med. Hyg. 56: 96-98.

ILG, T.; HARBECKE, D. & OVERATH, P. (,1993). **The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum**. FEBS Lett. 327: 103–107.

INVERSO, J.A.; MEDINA-ACOSTA, E.; O'CONNOR, J.; RUSSELL, D.G. & CROSS, G.A. (,1993). ***Crithida fasciculata* contains a transcribed leishmanial surface peptidase (gp63) gene homologue.** Mol. Biochem. Parasitol. 57: 47–54.

JAFFE, C.L. & DWYER, D.M. (,2003). **Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* & insect trypanosomatids.** Parasitol. Res. 91: 229–237.

JANSEN, A.M.; CARREIRA, J.C. & DEANE, M.P. (,1988**). Infection of a mammal by monogenetic insect trypanosomatids (Kinetoplastida, Trypanosomatidae).** Mem. Inst. Osw. Cruz. 83:271-272.

JIMÉNEZ, M.I.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MOLINA, R.; CAÑAVATE, C. & ALVAR, J. (,1996). **HIV co-infection with a currently non-pathogenic flagellate**. Lancet 347: 264-265.

JONES, B. L.; FONTANINI, D.; JARVINEN, M. & PEKKARINEN, A. (,1998). **Simplified endoproteinase assays using gelatin or azogelatin.** Anal. Biochem. 263: 214–2,20.

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. 1,20: 33–40.

KARRISON, K. (,1989). **Animal glycosphingolipids as membrane attchmen sites for bacteria**. Annu. Rev. Biochem. 58: 309-351.

KULKARNI, M.M.; MCMASTER, R.; KAMYSZ, E. KAMYSZ,W.; ENGMAN, D.M. & MCGWIRE, B.S. (,2006). **The major surface-metallopeptidase of the parasitic protozoan, Leishmania, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing.** Mol.Microb. 62(5):1484-1497.

LACOUNT, D.J.; GRUSNYNSKY, A.E.; GR&GENETT, P.M.; BANGS, J.D. & DONELSON, J.E. (,2003). **Expression & function of TbMSP (gp63) genes in African trypanosomes.** J. Biol. Chem. 278: 24658-64664.

LAEMMLI, U.K. (,1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 227: 680–685.

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

LAUGÉ, G. & NISHIOKA, R.S. (,1977). **Ultrastrucutural study of the relation between *Leptomonas oncopelti* (Nouguchi & Tilden), Protozoa Trypanosomatidae, & the rectal wall of adults of *Oncopeltus fasciatus* Datlas, Hemiptera Lygasidae.** J. Morphol. 154: 291-306.

LIEKE, T.; NYLÉN, S.; EIDSMO, L. MCMASTER, W.R.; MOHAMMADI, A.M.; KHAMESIPOUR, A.; BERG, L. & AKUFFO, H. (,2008). **Leishmania surface protein gp63 binds directly to the human natural killer cells & inhibits proliferation.** Clin.Exper. Imm.153:221-230.

LLOYD-SMITH, J.O.; POSS, M. & GRENFELL, B.T. (,2008). **HIV-1/parasite co-infction & the emergence of new parasites strains.** Parasitol. 135: 795-806.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & R&ALL, R.J. (,1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. ,193: 264–275.

LUSTIGMAN S.; BROTMAN, B.; HUMA T.; PRINCE A. M. & MCKERROW, J.H. (,1992). **Molecular cloning & characterization of onchocystatin, cysteine proteinases inhibitor of *Onchocerca volvulus*.** J. Biol. Chem. 267: 17339-17346.

MARÍN, C.; FABRE, S.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; DOLLET, M. (,2007). ***Herpetomonas* spp. Isolated from tomato fruits (*Lycopersion esculentum*) in southern Spain.** Exper. Parasitol. 116:88-90.

MASLOV, D.A. & SIMPSON, L. (,1995). **Evolution fo parasitism in kinetoplastid protozoa**. Parasitol. Today 1: 30-32.

MATTEOLI, F.P.; D´AVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, L.O.; BARBOSA, G.M.; HOL&INO, C.; BRANQUINHA, M.H. & SANTOS, A.L.S. (,2008). **Roles of the endosymbiont & leishmanolysin-like molecules expressed by *Crithidia deanei* in the interaction with mammalian fibroblasts.** Exp. Parasitol. 121: 246-253.

MCBRIDE, M.O.; FISHER, M.; SKINNER, C.J.; GOLDEN, R. & MAIN, J. (,1995). **An unusual gastrointestinal presentation of leishmaniasis.** Sc&. J. Infect. Dis. 27: 297-298.

MCCONVILLE, M.J. (,1995). **The surface glycoconjugates of parasitic protozoa: potencial targets for new drugs.** Aust. N. Z. J. Med. 25: 768-776.

MCDONALD, JK. (,1985). **An overview of protease specificity & catalytic mechanisms: Aspects related to nomenclature & classification**. Histochem. 17: 773-785.

MCGHEE, R.B. & COSGROVE, W.B. (,1980). **Biology & physiology of the lower trypanosomatids**. Microbiol. Rev. 44: 140-173.

MCGHEE, R.B.& HANSON, W.L. (,1962). **Growth & reproduction of *Leptomonas oncopelti* in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*.** J. Protozool. 9: 488-493.

MCGWIRE, B.S.; CHANG, K.P. & ENGEMAN, D.M. (,2003). **Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63.** Infect. Immun. 71: 1008–1010.

MCGWIRE, B.S.; O'CONNELL ,W.A.; CHANG, K.P. & ENGMAN, D.M. (,2002). **Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis**. J Biol Chem 277: 8802–8809.

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

MEDINA-ACOSTA, E.; BEVERLEY, S.M. & RUSSELL, D.G. (,1993). **Evolution & expression of the *Leishmania* surface proteinase (gp63) gene locus.** Infect. Agents Dis. 2: 25-84.

MEDINA-ACOSTA, E.; KARESS, R.E. & RUSSELL, D.G. (,1993). **Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated.** Mol. Biochem. Parasitol. 57: 31–46.

MEROPS database (http://merops.sanger.ac.uk), acessado em 14/07/,2009.

MICHELS, P.A.M.; HANNAERT, V. & BRINGAUD, F. (,2000). **Metabolic aspects of glycosomas in trypanosomatidae – new data & views**. Parasitol. Today 16: 482-489.

MILLER, R.F. (,2000). **Clinical presentation & significance of emerging opportunistic infections**. J. Eukaryot. Microbiol. 47: 21-23.

MOLYNEUX, D.H. (,1977). **Vector relationships in Trypanosomatidae.** Adv. Parasitol. 15: 1-82.

MOLYNEUX, D.H. & ASHFORD, R.W. (,1975). **Observations on a trypanosomatid flagellate in a flea, *Peromyscopsylla silvatica spectabilis*.** Ann. Parasitol. Hun. Comp. 50: 265-274.

MOLYNEUX, D.H; CROFT, S.L. & LAVIN, D.R. (,1981). **Studies on the host-parasite relationssships of *Leptomonas* species (Protozoa: Kinetoplastida) of Siphonaptera.** J. Nat. Hist. 15: 395-406.

MOMEM, H. (,2001). **Some current problems in the systematics of Trypanosomatids**. Int. J. Parasitol. 31: 640-642.

MONDAIN-MITON, V.; TOUSSAINT-GARI, M.; HOFMAN, P.; MARTY, P.; CARLES, M.; DE SALVADOR, F.; MITON, F.; LE FICHOUX, Y. & DELLAMONICA, P. (,1995). **Atypical leismaniasis in a patient infected with human immunodeficiency virus**. Clin. Infec. Dis. 21: 663-665.

MORIO, F.; REYNES, R.; DOLLET, M.; PRATLONG, F.; DEDET, J.P. & RAVEL, C. (,2008). **Isolation of a protozoan parasite genetically related to the insect trypanosomatid Herpetomonas samuelpessoai from a human immunodeficiency virus-positive patient.** J. Clin. Microb. 46: 3845-3847.

MOSOLOV. V.V. (,2008). **Proteinase inhibitors in plant biotechnology: a review.** Prikl Biokhim Mikrobiol. 44(3):261-9.

MOSSER, D. & EDELSON, P.J. (,1987). **The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*.** Nature 327: 329–331.

MOSSER, D.M. & ROBERTS, J.F. (,1992). ***Trypanosoma brucei*: recognition in vitro of two developmental forms by murine macrophages.** Exp. Parasitol. 51: 310-316.

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.

NAJIB, M.A.; EL-SAYED, N.M.A. & DONELSON, J.E. (,1997). **African trypanosomes have diferentially expressed genes enconding homologues of *Leishmania* GP63 surface protease**. J. Biol. Chem. 272: 26742-26748.

NAKATA, K.; ROM, W.; HONDA, Y.; CONDOS, R. KANEGASAKI, Y. CAO, M. WEIDEN. (,1997). ***Mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung.** Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 155: 996-1003.

NOGUEIRA DE MELO, A.C., GIOVANNI-DE-SIMMONE, S.; BRANQUINHA, M.H. & VERMELHO, A.B (,2001). ***Crithidia guilhermei*: purification & partial characterization of a 62-kDa extracellular metalloproteinase**. Exp. Parasitol. 97: 1–8.

NOGUEIRA DE MELO, A.C.; D´AVILA-LEVY, C.M.; DIAS, F.A.; ARMADA, J.L.; SILVA, H.D.; LOPES, A.H.; SANTOS, A.L.S.; BRANQUINHA, M.H. & VERMELHO, A.B. (,2006). **Peptidases & gp63-like proteins in *Herpetomonas megaseliae*: Possible involvement in the adhesion to the invertebrate host**. Int. J. Parasitol. Parasitol. 36: 415–422.

NOLAN, T.J. & FARRELL, J.P. (,1985). **Inhibition of in vivo & in vitro infectivity of *Leishmania donovani* by tunicamycin.** Mol. Biochem. Parasitol. 16: 127-135.

NORTH, M.J. (,1982). **Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms.** Microbiol. Rev. 46: 308-340.

ORESTEIN, J.; FOX, C. & WAHL, S. (,1997). **Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections.** Sience 276: 1857-1861.

PACHECO, R.S.; MARZOCHI, M.C.A.; PIRES, M.Q.; BRITO, C.M.M.; MADEIRA, M.F.; BARBOSA-SANTOS, E.G.O. (,1998). **Parasite genotypically related to a monoxenous trypanosomatid of dog's flea causing opportunistic infection in an HIV positive patient**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 93: 531-537.

PARSONS, M. & RUBEN, L. (,2000). **Pathways involved in environmental sensing in trypanosomatids.** Parasitol. 16:56-62.

PEREIRA, F.M.; BERNARDO, P.S.; DIAS-JUNIOR, P.F.F.; SILVA, B.A.; ROMANOS, M.T.V.; 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. 104: 347-353.

PIMENTA, P.E.; TURCO, S.J.; MCCONVILLE, M.J.; LAWYER, P.G.; PERKINS, P.V. & SACKS, D.L. (,1992). **Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the s& fly midgut.** Science 256: 1812-1815.

PIMENTA, P.F.P.; SARAIVA, E.M.B.; ROWTON, E.; MODI, G.B., GARRAWAY, L.A., BEVERLEY, S.M., TURCO, S.J. & SACKS, D.L. (,1994). **Evidance that vectorial competence of phlrbotomine s& flies for different**

species of *Leishmania* is cotrolled by structure polimorphism in the surface lipophosphoglycan. Proc. Natl. Sci. U.S.A. 91: 9155-9159.

PODLIPAEV, S.A. (,2000). **Insect trypanosomatids: the need to know more**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95: 517-522.

PODLIPAEV, S.A. (,2001). The more insect trypanosomatids under study – the more diverse Trypanosomatidae appears. Int. J. Parasitol. 31:648-652.

PODLIPAEV, S.A.; STRUM, N.R.; FIALA, I.; FERN&ES, O.; WESTENBERG, S.J.; DOLLET, M.; CAMPBELL, D.A. & LUKES, J. (,2004). **Diversity of insect trypanosomatids assesed from the splice leader RNA & 5S rRNA genes & intergenic region.** J. Eukaryot Microbiol. 51: 283-290.

PUENTES, F.; GUZMÁN, F.; MARÍN, V.; ALONSO, C.; PATARROYO, M.E. & MORENO A. (,1999**). *Leishmania*: fine mapping of the Leishmanolysin molecule´s conserved core domains involved binding & internalization.** Exp. Parasitol. 93 (1):7-22.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S. & DESHP&E, V.V. (,1998). **Molecular & 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: D160–D164.

RAWLINGS, N.D.; TOLLE, D.P. & BARRETT, A.J. (,2004b). Evolutionary families of peptidase inhibitors. Biochem. J. 378: 705–716.

ROBERTS, S.C.; SWIHART, K.G.; AGEY, M.W.; RAMAMOORTHY, R., WILSON, M.E. & DONELSON, J.E. (,1993). **Sequence diversuty & organization of the msp gene family enconding gp63 of *Leishmania chagasi*.** Mol. Biochem. Parasitol. 62: 157-171.

ROITMAN, C.; ROITMAN, I. & AZEVEDO, H.P. (,1972). **Growth of an insect trypanosomatid at 37ºC in a defined medium**. J. Protozool. ,19: 346-349.

ROMEIRO, A.; LEAL, L.H.M.; DE SOUZA, W. & ATTIAS, M. (,2003). **Interaction of *Leptomonas wallacei* with the intestinal tract of its natural host *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae).** J. Invert. Pathol. 82: 41-49.

ROWTON, E.D.; LUSHBAUGH, W.B. & MCGHEE, R.B. (,1981). **Ultrastructure of the flagellar apparatus & attachment of *Herpetomonas ampelophilae* in the gut ond Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*.** J. Protozool. 28: 297-301.

RUSSELL, D.G.; TALAMAS-ROHANA, P. & ZELECHOWSKI, J. (,1989). **Antibodies raised against synthetic peptides from the Arg-Gly-Asp-containing region of the *Leishmania* surface protein gp63 cross-react with human C3 & interfere with gp63-mediated binding to macrophages**. Infect. Immun. 57: 630–632.

SACKS, D.L.; PIMENTA, P.F.P.; MCCONVILLE, M.J.; SCHNEIDER, P. & TURCO, S.J. (,1995). **Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the s& fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan.** J. Exp. Med. 181: 685-697.

SAJID, M. & MCKERROW, J.H. (,2002). **Cysteine proteases of parasitic organisms**. Mol. Biochem. Parasitol. 1,20: 1–21.

SANTOS, A.L.S.; ABREU, C.M.; ALVIANO, C.S. & SOARES, R.M.A. (,2002a). **Activation of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteinases upon release from *Herpetomonas samuelpessoai* by phospholipase C.** Curr. Microbiol. 45: 293–298.

SANTOS, A.L.S.; ABREU, C.M.; 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.; ARAÚJO-SOARES, R.M.; ALVIANO, C.S. & SOARES, R.M.A. (,2000). **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.; BATISTA, L.M.; ABREU, C.M.; ALVIANO, C.S.; ANGLUSTER, J. & SOARES, R.M.A. (,2001). **Developmentally regulated protein expression mediated by dimethylsulfoxide in *Herpetomonas samuelpessoai***. Curr. Microbiol. 42: 111–116.

SANTOS, A.L.S.; BITTENCOURT, V.C.; PINTO, M.R.; SILVA, B.A. & BARRETO-BERGTER, E. (,2009). **Biochemical characterization of potencial virulence markers in the human fungal pathogen *Pseudallescheria boydii.*** Med. Mycol. 47: 375-386.

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 anglusteri* & *Herpetomonas roitmani*.** Curr. Microbiol. 39: 61–64.

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.

SANTOS, A.L.S.; SOARES, R.M.; ALVIANO, C.S. & KNEIPP, L.F. (,2009). **Heterogeneous production of metallo-type peptidases in parasites belonging to the family Trypanosomatidae.** Eur. J. Protistol. 44:103-113.

SANTOS, A.L.S.; SOUTO-PADRÓN, T.;ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H.C.S.; SOARES, R.M.A. & MEYER-FERN&ES, J.R. (,2002b). **Secreted phosphatase activity induced by dimethylsulfoxide in *Herpetomonas samuelpessoai*.** Arch. Biochem. Biophys. 405: ,191–,198.

SCHAUB, G.A. (,1992). **The effects of the Trypanosomatidae on insects**. Adv. Parasitol. 31: 255-3,19.

SCHAUB, G.A. & BOKER, C.A. (,1984). **Scanning electron microscope studies of *Blastocrithidia triatomae* (trypanosomatidae) in the rectum of *Triatoma infestans*.** J. Protozool. 33: 266-270.

SCHLAGENHAUF, E.; ETGES, R. & METCALF, P. (,1998). **The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63).** Structure 6: 1035-1046.

SCHLEIN, Y.; SCHNUR, L. F. & JACOBSON, R. L. (,1990). **Release glycoconjugate of indigenous *Leishmania major* enhances survival of a foreign *L. major* in *Phlebotomus papatasi*.** Transactions of the Royal Society of Tropical & Medicine Hygiene. 84: 241-251.

SCHNEIDER, P. & GLASER, T. A. (,1993). **Characterization of a surface metalloprotease from *Herpetomonas samuelpessoai* & comparison with *Leishmania major* promastigote surface protease.** Mol. Biochem. Parasitol. 58: 277–282.

SILVA, B.A; PEREIRA, F.M.; JESUS, J.B.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L.S. & D´AVILA-LEVY, C.M. (,2009). **Sialoglycoconjugates in Herpetoomonas megaseliae: role in the adhesion to insect host epithelial cells.** Fems Microb. Lett. 295:274-280.

SINDEN, R.E. & BILLINGSLEY, P.F. (,2001). ***Plasmodium* invasion of mosquito cells: hawk or dove?** Trends Parasitol. 17: ,209-211.

SOARES, R.M.A.; ALVIANO, C.S., ESTEVES, M.J.G.; ANGLUSTER, J.; SILVA-FILHO, F.C. & DE SOUZA, W. (,1988). **Changes in cell surface anionogenic groups during differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* mediate by dimethylsulfoxide.**Cell. Bioohys. 13:29-41.

SOARES, R.M.A.; ALVIANO, C.S., SILVA-FILHO, F.C.; ESTEVES, M.J.G.; ANGLUSTER, J. & DE SOUZA, W. (,1984). **Effect of dimethylsulfoxide on the cell surface of *Herpetomonas samuelpessoai*.** J. Submicrosc. Cytol. 16:735-739.

SOTERIADOU, K.P.; REMOUNDS, M.S.; KATSIKAS, M.C.; TZINIA, A.K.; TSIKARIS, V.; SAKARELLOS, C. & TZARTOS, S.J. (,1992). **The Ser-Arg-Tyr-Asp region of the major surface glycoprotein of *Leishmania* mimics the Arg-Gly-Asp-Ser cell attachment region of fibronectin**. J. Biol. Chem. 267: 13980–13985.

SOUSA, M.A. (,2000). **Tripanossomatídeos 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. Pós-graduação em biologia parasitária. FIOCRUZ.

SOUSA, M.A., PEREIRA, M.C.S. & CÔRTE-REAL, S. (,1997). ***Leishmania major*: parasite interactions suggesting sexuality**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92: 761-766.

SOUZA, E.T.; THOMAS, E.M.; ESTEVES, M.J.G.; ANGLUSTER, J. & DE SOUZA, W. (,1980). **Concanavalin A induced cell diferentiation in the protozoan *Herpetomonas samuelpessoai*.** J. Parasitol. 66:985-988.

SOUZA, M.C.M.; REIS, A.P.; SILVA, W.D. & BRENER, Z. (,1974). **Mechanism of acquired immunity induced by *Leptomonas pessoai* against *Trypanosoma cruzi* in mice.** J. Protozool. 21: 579–583.

STEINKRAUS, II. B.; GREER, J.M.; STEPHENSON, D.C. & LANGER, P.J. (,1993). **Sequence heterogencity & polymorphic gene arrangements of the *Leishmania guyanensis* gp63 genes**. Mol. Biochem. Parasitol. 62: 1-13

STRICKL&, C. & ROY, D.N. (,1925). **The infection of *Lucilae caesar* with *Herpetomonas***. Parasitology 17: 168-169.

SWAN, L.A. & PAPP, C.S. (,1972). **The Common Insects of North America**. Harper & Row. New York. pp. 593.

SZARFMAN, A.; LUQUETTI, A.; RASSI, A.; REZENDE, J.M. & SCMUNIS, G.A. (,1981). **Tissue-reacting immunoglobulins in patients with different clinical forms of Chagas' disease** Am. J. Trop. Med. Hyg. 30: 43-46.

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

THOMAS, E.M.; ESTEVES, M.J.G.; ANGLUSTER, J.; DE SOUZA, W. & JURKIEWICZ, A. (,1981a). **Changes in cell shape & induction of cell differentiation in the protozoa *Herpetomonas samuelpessoai* by cholinergic drugs. Res.** Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 34: 81-88.

THOMAS, E.M.; SOUZA, E.T.; ESTEVES, M.J.G.; ANGLUSTER, J. & DE SOUZA, W. (,1981b). ***Herpetomonas samuelpessoai*: changes in cell shape & induction of differentiation by local anesthetic.** Exp. Parasitol. 51:366-372.

TIESZEN, K.L. & MOLYNEUX D.H. (,1989). **Morphology & host-parasite relationship of *Crithidia flexonema* (Trypanosomatidae) in the hindgut & Malpighian tubules of *Gerris odontogaster* (Hemiptera: Gerridae)**. J. Parasitol. 75: 441-448.

TIESZEN, K.L.; HEYWOOD, P. & MOLYNEUX, D.H. (,1983). **Ultrastructure & host-parasite association of *Blastocrithidia gerridis* in the ventriculus of *Gerris odontogaster* (Hemiptera: Gerridae).** Can. J. Zool. 61: ,1900-,1909.

TIESZEN, K.L.; MOLYNEUX, D.H. & ABDEL-HAFEZ, S.K. (,1986). **Host-parasite relationship of *Blastocrithidia familiaris* in *Ligaeus p&uras* Scop. (Hemiptera: Lygaeidae).** Parasitology 98: 395-400.

TZINIA, A. K. & SOTERIADOU, K.P. (,1991). **Substrate-dependent pH optima of gp63 purified from seven strains of *Leishmania*.** Mol. Biochem. Parasitol. 47: 83–90.

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. (,1976). **The diversity of the kinetoplastida flagellates**. In: Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds. Biology of the kinetoplastida. Academic Press, New York, vol. I, pp. 1-30.

VICKERMAN, K. (,1990). **Phylum Zoomastigina – Class Kinetoplastida**. In: H&book of Protoctista. James & Barlett Publishers. Boston. p.215-238.

VICKERMAN, K. (,1994). **The evolutionary exp&ion of the trypanosomatid flagellates**. Int. J. Parasitol., 24: 1317-1331.

VICKERMAN, K. & PRESTON, T.M. (,1976). **Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates**. In: Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds. Biology of the kinetoplastida. Academic Press. New York. 1:35-130.

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

VILLALTA, F. & KIERSZEBAUM, F. (,1983). **Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.** Biochim. Biophys. Acta. 736: 39-44.

VILLALTA, F. & KIERSZEBAUM, F. (,1985). **Role of cell surface *N*-acetylglucosamine residues on host cell infection by *Trypanosoma cruzi*.** Biochim. Biophys. Acta. 845: 216-222.

VOTH, B.R.; KELLY, B.L.; JOSHI, P.B.; IVENS, A.C. & MCMASTER W.R. (,1998). **Differentially expressed *Leishmania major* gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment.** Mol. Biochem. Parasitol. 93: 31-41.

WAHL, S.; GREENWELL-WILD, T.; PENG, G.; HALE-DONZE, H.; DOHERTY, T.; MIZEL, D. & ORESTEIN, J. (,1998). **Mycobacterium avium complex augments macrophage HIV-1 production & increases CCR5 expression.** Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 12574-12579.

WALLACE, F.G. (,1966). **The trypanosomatid parasites of insects & arachnids**. Exp. Parasitol. 18: 124-,193.

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

WALLACE, F.G. (,1979). **Biology of the kinetoplastida of arthropods**. In: Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds. Biology of the kinetoplastida. Academic Press, London, vol. II, pp. 1-30.

WALLACE, F.G. & CLARK, T.B. (,1959). **Flagellate parasites of the fly *Phaenicia serricata* (Meigen).** J. Protozool. 6: 58-61.

WEBB, J.R.; BUTTON L.L. & MCMASTER, W.R. (,1991). **Heterogeneity of the genes enconding the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani*.** Mol. Biochem. Parasitol. 48: 173-184.

WEINMAN, D. & CHEONG, W.H. (,1978). ***Herpetomonas*, with Bacterium-like inclusions, in Malaysian *Aedes aegypti* & *Aedes albopictus*.** J. Protozool. 25: 167-169.

WROBLEWSKI, F. & LADUE, J.S. (,1955). **Lactic dehydrogenase activity in blood.** Proc. Soc. Biol Med. 90:210-213.

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

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: 1,19–28.

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: 1,19–28.

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

ZHAO, C.; PAPADOPOULOU, B. & TREMBLAY, M. (,2004). ***Leishmania infantum* enhances human immunodeficiency virus type-1 replication in primary human macrophages through a complex cytokine network.** Clin. Immunol. 113: 81-88.

ZIELER, H.; GARON, C.F.; FISCHER, E.R.; SHAHABUDDIN, M. (,1998). **Adhesion of *Plasmodium gallinaceum* ookinetes to the *Aedes aegypti* midgut: sites of parasite attachment & morphological changes in the ookinete.** J. Eukaryot. Microbiol. 45: 512.

ZIELER, H.; GARON, C.F.; FISCHER, E.R.; SHAHABUDDIN, M. (,2000). **A tubular network associated with the brush-border surface of the *Aedes aegypti* midgut: implications for pathogen transmission by mosquitoes.** J. Exp. Biol. ,203: 1599-1611.

Anexos

ARTIGOS RELACIONADOS À TESE

Parasitology (2006), **132**, 37–47. © 2005 Cambridge University Press

Leishmanolysin (gp63 metallopeptidase)-like activity extracellularly released by *Herpetomonas samuelpessoai*

C. G. R. ELIAS†, F. M. PEREIRA†, B. A. SILVA, C. S. ALVIANO, R. M. A. SOARES *and* A. L. S. SANTOS*

Cysteine peptidases in *Herpetomonas samuelpessoai* are modulated by temperature and dimethylsulfoxide-triggered differentiation

F. M. PEREIRA[1], C. G. R. ELIAS[1], C. M. D'AVILA-LEVY[2], M. H. BRANQUINHA[1] *and* A. L. S. SANTOS[1]*

Manuscrito submetido

Surface leishmanolysin-like of *Herpetomonas samuelpessoai*: implications on the interation with invertebrate host

Fernanda M. Pereira, Camila G.R. Elias, Felipe A. Dias, Angela H.C.S. Lopes, Claudia M. d'Avila-Levy, Marta H. Branquinha, André L.S. Santos

Manuscrito em preparo

Leishmanolysin-like molecules of *Herpetomonas samuelpessoai* are evolved in the interaction with mammalian macrophages

Fernanda M. Pereira, Marta H. Branquinha, André L.S. Santos

OUTROS ARTIGOS

RESEARCH LETTER

Sialoglycoconjugates in *Herpetomonas megaseliae*: role in the adhesion to insect host epithelial cells

Bianca A. Silva[1], Fernanda M. Pereira[1], José B. de Jesus[2,3], Marta H. Branquinha[1], André L.S. Santos[1] & Claudia M. d'Avila-Levy[2]

Parasitol Res (2009) 104:347–353
DOI 10.1007/s00436-008-1202-2

ORIGINAL PAPER

Differential influence of gp63-like molecules in three distinct *Leptomonas* species on the adhesion to insect cells

F. M. Pereira · P. S. Bernardo · P. F. F. Dias Junior · B. A. Silva · M. T. V. Romanos · C. M. d'Avila-Levy · M. H. Branquinha · A. L. S. Santos

Cysteine peptidases in the tomato trypanosomatid *Phytomonas serpens*: Influence of growth conditions, similarities with cruzipain and secretion to the extracellular environment

Camila G.R. Elias [a], Fernanda M. Pereira [a], Felipe A. Dias [b], Thiago L.A. Silva [b], Angela H.C.S. Lopes [b], Claudia M. d'Avila-Levy [c], Marta H. Branquinha [d], André L.S. Santos [a,*]

Experimental Parasitology 120 (2008) 343–352

International Journal for Parasitology 36 (2006) 47–56

Phytomonas serpens: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion

André L.S. Santos *, Claudia M. d'Avila-Levy, Felipe A. Dias, Rachel O. Ribeiro, Fernanda M. Pereira, Camila G.R. Elias, Thaïs Souto-Padrón, Angela H.C.S. Lopes, Celuta S. Alviano, Marta H. Branquinha, Rosangela M.A. Soares

Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Ilha do Fundão, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil

Received 12 July 2005; received in revised form 8 September 2005; accepted 9 September 2005

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