

**Fernanda de Aquino Marinho**

**Indução de morte celular e inibição da interação de *Leishmania amazonensis* com macrófagos pelo inibidor de calpaínas  
MDL28170**



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)

Orientadores: Marta Helena Branquinha de Sá e André Luis Souza dos Santos



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

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Marinho, Fernanda de Aquino

Indução de morte celular e inibição da interação de *Leishmania amazonensis* com macrófagos pelo inibidor de calpaínas MDL28170/ Fernanda de Aquino Marinho - Rio de Janeiro, 2009.

ix, 99 fls.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009.

Orientadores: Marta Helena Branquinha de Sá e André Luis Souza dos Santos

Referências bibliográficas: f 80

1. *Leishmania* 2. Macrófagos 3. Proteases 4. Calpaínas 5. Inibidor de Calpaínas 6. Apoptose I. Branquinha, Marta Helena de Sá. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas. III. Indução de morte celular e inibição da interação de *Leishmania amazonensis* com macrófagos pelo inibidor de calpaínas MDL28170.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**Fernanda de Aquino Marinho**

**Indução de morte celular e inibição da interação de *Leishmania amazonensis* com macrófagos pelo inibidor de calpaínas MDL28170**

Rio de Janeiro, 16 de Julho de 2009.

---

(Marta Helena Branquinha de Sá, Doutora, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes – Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

(Thaís Cristina Baeta Soares Souto Padrón, Doutora, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio de Janeiro)

---

(Luciana Barros Arruda Hinds, Doutora, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio do Janeiro)

---

(Patrícia Maria Lourenço Dutra, Doutora, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Patologia e Laboratórios - Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

---

(Alane Beatriz Vermelho, Doutora, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes-Universidade Federal do Rio do Janeiro)

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

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, me orientando a tomar as melhores decisões e me ajudando nos momentos difíceis.

A minha família e ao meu noivo, sempre presentes, pelo incentivo e apoio. Estes que estão sempre ao meu lado, dispostos a ajudar e com um sorriso no rosto dizendo calma, você vai conseguir! Pois eu consegui vencer mais uma etapa da vida. Obrigada por vocês existirem e fazerem parte dela.

Aos meus orientadores a professora Marta Helena Branquinha de Sá e o professor André Luis Souza dos Santos, pessoas muito queridas e valiosas, pela orientação, pela seriedade, pelo apoio, pela dedicação e pela paciência. Obrigada por dispensarem a nós sentimentos nobres de amizade e carinho, e por acreditar que somos capazes mesmo com todas as nossas limitações.

A Doutora Cláudia Masini D'Avila-Levy, pelos preciosos ensinamentos, por ter me orientado na iniciação científica, pelas valiosas idéias e por ter colaborado em várias etapas da minha formação acadêmica.

Aos colegas de laboratório (Keyla, Leandro, Pedro, Simone e Michel), pela ajuda preciosa nos experimentos e pela ótima convivência, tornando o ambiente de trabalho um lugar agradável. Obrigada pela amizade e pelo carinho de vocês!

A Denise, nossa ajudadora, fundamental para o bom andamento do trabalho. Uma pessoa que contagia a todos com a sua alegria e bom humor.

A Doutora Ana Carolina (Carol), por ter colaborado com grande parte desta dissertação, por ser uma pessoa excepcional e uma excelente profissional.

A Professora Alane Beatriz Vermelho e as meninas do seu Laboratório, A professora pela revisão e por nos permitir utilizar o espaço do seu laboratório, bem como alguns reagentes e equipamentos e as meninas pela amizade e carinho.

A Edilma, pela amizade e ajuda nos experimentos.

As meninas do Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana, a Fê, Camila, Ana Luiza, Bianca, Roberta, Érica e Karen, pela amizade e colaboração.

A Professora Maria Bellio, por ceder o seu laboratório para realizarmos os experimentos, utilizarmos reagentes e equipamentos. Pelas sugestões e ajuda nos experimentos.

A Professora Thaís Souto-Padrón pelos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão.

A Professora Selma, pelos experimentos com gel de agarose.

Ao veterinário Paulo e ao pessoal que trabalha no biotério, pela disponibilidade.

As minhas amigas Jarisa e Lívia, que contribuíram sempre com palavras de apoio e conforto e pela amizade e carinho.

A FAPERJ e ao CNPq pelo suporte financeiro.

## RESUMO

**Fernanda de Aquino Marinho**

### **Indução de morte celular e inibição da interação de *Leishmania amazonensis* com macrófagos pelo inibidor de calpaínas MDL28170**

Orientadores: Marta Helena Branquinha de Sá e André Luis Souza dos Santos

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.

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, e representam um grupo de doenças emergentes com alta morbidade e mortalidade em países tropicais e subtropicais. Desde a descoberta das primeiras drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses até os dias atuais, a pesquisa por compostos com atividade anti-*leishmania* sem efeitos tóxicos e capazes de superar a emergência de cepas resistentes permanece como um importante alvo. No presente trabalho, foram investigados os efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a indução de morte celular, sobre a ultraestrutura e a interação de *Leishmania amazonensis* com macrófagos. Além disso, foram avaliados os efeitos do inibidor sobre a proliferação de formas infectivas, bem como sobre a expressão de peptidases clássicas e de moléculas similares a calpaínas após diferentes passagens *in vitro*. Análises por microscopia eletrônica de transmissão revelaram que o tratamento com o inibidor de calpaínas induziu alterações ultraestruturais no parasito, como vacuolização do citoplasma e modificações no núcleo das células como a fragmentação e condensação da cromatina. Quanto à indução de morte celular, foi possível observar características bioquímicas relacionadas com apoptose, como a externalização de fosfatidilserina, suspensão do ciclo celular e fragmentação do DNA. O tratamento das formas promastigotas com o inibidor de calpaínas antes do processo de interação induziu uma redução significativa nos índices de associação dos parasitos com os macrófagos. No pós-tratamento, o inibidor foi capaz de reduzir de maneira dose-dependente o número de macrófagos infectados. A produção de óxido nítrico e de espécies reativas de oxigênio não foi alterada na presença das diferentes concentrações do inibidor, demonstrando que o mesmo aparentemente não participa da ativação de mecanismos mediados por macrófagos hospedeiros. As análises realizadas com formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis* recém-isoladas evidenciaram uma maior susceptibilidade destas formas à ação do inibidor quando comparadas a promastigotas mantidos em culturas axênicas. As formas infectivas demonstraram alterações na expressão de peptidases clássicas e um aumento na expressão de moléculas similares a calpaínas quando comparadas com formas não-infectivas. Estes dados sugerem uma possível associação de moléculas similares a calpaínas com a virulência do parasito. Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho podem contribuir para a adição de novos conhecimentos a respeito destas moléculas. Sendo assim, uma melhor caracterização destas enzimas poderá ajudar na determinação das funções

destas moléculas em protozoários, além de contribuir para o desenvolvimento de inibidores proteolíticos capazes de agir de maneira seletiva e eficaz contra as doenças causadas por estes parasitos.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, macrófagos, peptidases, calpaínas, inibidor de calpaínas, apoptose.

RIO DE JANEIRO  
JULHO 2009

## ABSTRACT

**Fernanda de Aquino Marinho**

### **Indução de morte celular e inibição da interação de *Leishmania amazonensis* com macrófagos pelo inibidor de calpaínas MDL28170**

Orientadores: Marta Helena Branquinha de Sá e André Luis Souza dos Santos

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.

Leishmaniasis are diseases caused by flagellated protozoa from the genus *Leishmania*, and represent a group of emerging diseases with high morbidity and mortality in tropical and subtropical countries. Since the discovery of the first drugs employed in the treatment of leishmaniasis, the research for compounds with anti-*leishmania* activity with no toxic effects and able to overcome the emergence of resistant strains stands as an important target. In the present work, the effects of the calpain inhibitor MDL28170 were investigated on the induction of cell death, the ultrastructure and the interaction of *Leishmania amazonensis* with macrophages. In addition, the effects of the inhibitor on the proliferation of infective forms as well as on the expression of classic peptidases and calpain-like molecules after different passages *in vitro* were also evaluated. Transmission electronic microscopy analyses revealed that the treatment with the calpain inhibitor led to ultrastructural alterations in the parasite, such as cytoplasm vacuolization and changes in the cells nucleus, including chromatin condensation and fragmentation. Regarding the induction of cell death, it was possible to detect apoptosis-related biochemical aspects, such as phosphatidylserine externalization, cell cycle disruption and DNA fragmentation. The treatment of promastigotes with the calpain inhibitor before the interaction process led to a significant reduction in the association indexes of the parasites with macrophages. In the post-treatment, the inhibitor was able to reduce the number of infected macrophages in a dose-dependent manner. The production of nitric oxide and reactive species of oxygen was not altered in the presence of different concentrations of the inhibitor, which showed that it does not apparently participate in the activation of mechanisms mediated by host macrophages. The analyses performed with recently isolated infective promastigotes from *L. amazonensis* evidenced a higher susceptibility of these forms to the inhibitor when compared to promastigotes kept in axenic cultures. The infective forms showed alterations in the expression of classic peptidases and an increase in the expression of calpain-related molecules when compared to non-infective forms. Altogether, these data suggest a possible association of calpain-like molecules to the parasite virulence. The results presented in this work may contribute to extend the knowledge of these molecules. So, a better characterisation of these enzymes may help in the determination of the functions of these molecules in protozoa, as well as may contribute to the development of proteolytic

inhibitors capable of acting in a selective and effective way against the diseases caused by these parasites.

Key words: *Leishmania amazonensis*, macrophages, peptidases, calpains, calpain inhibitor, apoptosis.

## ÍNDICE:

<b>I) Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1. A Família Trypanosomatidae.....</b>	<b>1</b>
<b>2. O gênero <i>Leishmania</i> e as leishmanioses.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Tratamento das Leishmanioses.....</b>	<b>10</b>
<b>4. Peptidases: um novo alvo para o desenvolvimento de quimioterápicos.....</b>	<b>11</b>
<b>5. Peptidases no gênero <i>Leishmania</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>5.1. Metalopeptidases.....</b>	<b>14</b>
<b>5.2. Serina-peptidases.....</b>	<b>16</b>
<b>5.3. Aspártico-peptidases.....</b>	<b>17</b>
<b>5.4. Cisteína- peptidases.....</b>	<b>18</b>
<b>6. Calpaínas.....</b>	<b>19</b>
<b>6.1. Calpaínas em tripanossomatídeos.....</b>	<b>21</b>
<b>7. Inibidores Proteolíticos.....</b>	<b>23</b>
<b>II. Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>III. Material e Métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>IV. Resultados.....</b>	<b>38</b>
<b>V. Discussão.....</b>	<b>68</b>
<b>VI. Conclusões.....</b>	<b>78</b>
<b>VII. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>80</b>

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS:**

BrdUTP- 5-bromo-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato

BSA- Soro Albumina Bovina

CDPs- Calcium Dependent Peptidases (Peptidases Dependentes de Cálcio)

DMEM- Dubelco's Modified Eagle Medium (Meio Eagle Modificado por Dubelco)

DMSO- Dimetilsulfóxido

DNA- Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucléico)

EC- Comitê de Nomenclatura Enzimática

EDTA- Ácido Etilenodiaminotetracético

EGTA- Ácido Etileno Glicol Tetracético

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

FITC- Fluorescein Isothiocyanate (Isotiocianato de Fluoresceína)

Gp63- Glicoproteína 63

H<sub>2</sub>DCFDA- 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína Diacetato

HEPES- Etanosulfônico 4-2 Hidroxietil Piperazina-1

HSP83- Heat Shock Protein (Proteína de Choque Térmico 83)

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

IgG- Imunoglobulina G

k-DNA- DNA do Cinetoplasto

LPS- Lipopolissacarídeo

MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão

MMP- Metalopeptidase de Matriz

MSP- Major Surface Peptidase (Principal Peptidase de Superfície)

MTT- Bromidrato de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

μM- Micromolar

NO- Óxido Nítrico

p/v- Peso por Volume

PBS- Tampão Fosfato Salina

pH- Potencial Hidrogeniônico

PI- Iodeto de Propídeo

PKDL- Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar

PSP- Promastigote Surface Peptidase (Peptidase de Superfície de Promastigotas)

RFLP- Restriction Fragment Length Polymorfism (Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição)

RNase A- Ribonuclease A

ROS- Espécies Reativas de Oxigênio

SDS- Sodium Dodecyl Sulfate (Lauril Sulfato de Sódio)

SFB- Soro Fetal Bovino

SKCRP-19- Small Kinetoplastid Calpain-Related Protein-19 (Proteína de Kinetoplastídeos Relacionada à Calpaínas - 19)

TdT- Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Deoxinucleotidil Transferase Terminal)

TUNEL- Transferase dUTP Nick End Labeling (Marcações de terminações dUTP pela Deoxinucleotidil Transferase Terminal)

v/v- Volume por Volume

## D) INTRODUÇÃO

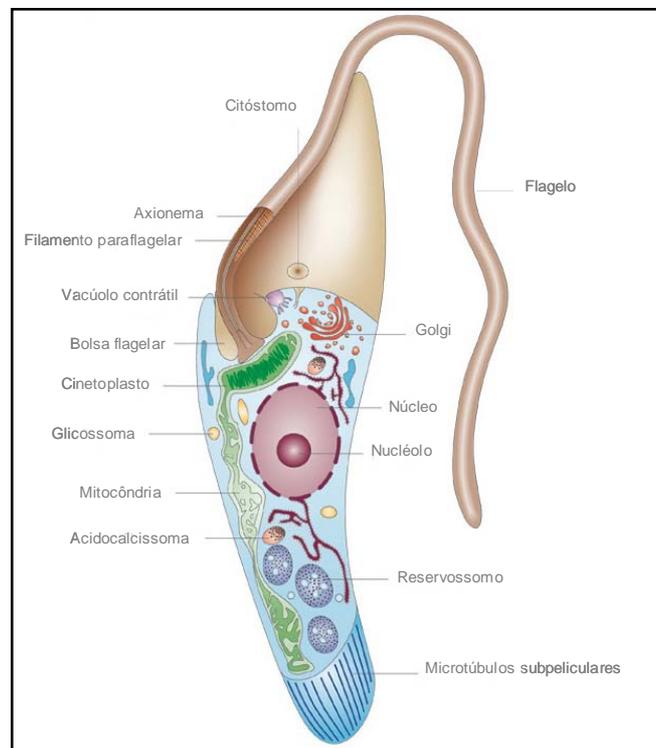
### 1. A Família Trypanosomatidae

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

O glicosoma 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 VICKERMANN, 1994), o glicosoma também possui outras funções relacionadas à biossíntese de pirimidinas, recuperação de purinas, síntese de éter-lipídios e  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (revisto por MICHELS, HANNAERT & BRINGAUD, 2000). Os tripanossomatídeos apresentam também citoesqueleto, estrutura formada por uma camada de microtúbulos subpeliculares, associados entre si e à membrana plasmática, garantindo a sustentação da célula (revisto por GULL, 1999). O citoesqueleto representa barreira importante ao transporte vesicular; logo, as funções endocíticas e exocíticas limitam-se a outras regiões onde os microtúbulos não estão presentes. A região da bolsa flagelar é desprovida destes microtúbulos, representando portanto o único sítio para endocitose/exocitose de macromoléculas na maioria destes parasitos (VICKERMANN & PRESTON, 1976; DE SOUZA, 1984; VICKERMANN, 1994). No entanto, existe uma estrutura presente em alguns membros do gênero *Trypanosoma*, denominada citóstomo, responsável por processos de endocitose/exocitose. O citóstomo se apresenta como uma invaginação da membrana plasmática que pode atingir até a região do núcleo celular. O citóstomo está presente nas formas epimastigotas e amastigotas, mas ausente na forma tripomastigota de *T. cruzi*. Essa

estrutura é responsável por cerca de 85% da atividade endocítica nas formas epimastigotas de *T. cruzi* (DE SOUZA, 2008).

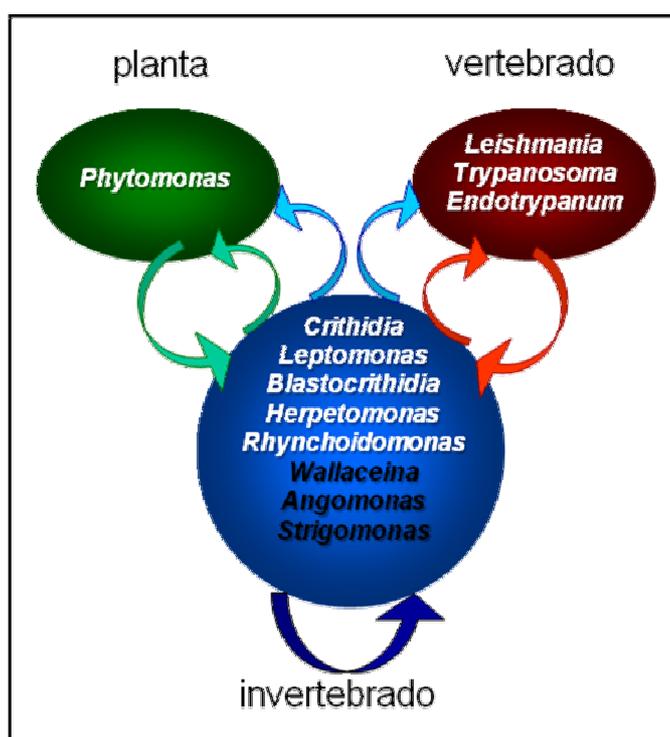
Outro componente dos tripanossomatídeos é o flagelo único, composto basicamente por um axonema e um corpo paraxial, que emerge da bolsa flagelar e se encontra ancorado à célula pelos corpos basais, os quais estão associados à mitocôndria (revisto por LANDFEAR & IGNATUSHCHENKO, 2001). O flagelo é fundamental na locomoção do microrganismo, podendo em algumas espécies participar na adesão a tecidos hospedeiros (VICKERMAN, 1990; VICKERMAN & TETLEY 1990). A representação esquemática da morfologia dos tripanossomatídeos pode ser observada na figura 1.



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

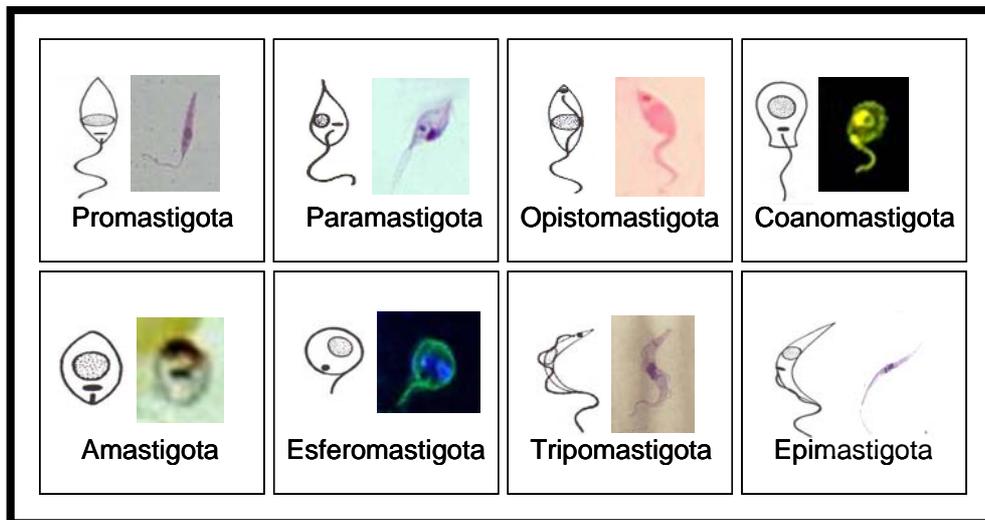
Tradicionalmente os tripanossomatídeos estão divididos em dez gêneros (*Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Rhynchoidomonas* e *Phytomonas*), com base em características morfológicas e quanto à especificidade do hospedeiro. Neste último caso, podem ser divididos em: monoxênicos, quando desenvolvem todo o seu ciclo de vida em apenas um hospedeiro (geralmente um

invertebrado), ou heteroxênicos, quando desenvolvem o seu ciclo de vida em hospedeiros diferentes (invertebrado e planta ou invertebrado e vertebrado). Porém, alguns estudos sugerem a criação de três novos gêneros (*Wallaceina*, *Strigomonas* e *Angomonas*) para reagrupar os tripanossomatídeos de acordo com a sua filogenia (PODLIPAEV & ROKITSKAYA, 1999; BRANDÃO *et al.*, 2000; D'AVILA-LEVY *et al.*, 2004), reforçando a necessidade de uma revisão taxonômica na família Trypanosomatidae (Figura 2).



**Figura 2:** Relação espécie-hospedeiro dos tripanossomatídeos. Tripanossomatídeos heteroxênicos alternam entre hospedeiros invertebrados e vertebrados (setas vermelhas) ou plantas (setas verdes). 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 (preto) representam os novos gêneros propostos (adaptado de SANTOS *et al.*, 2007).

Durante o seu ciclo de vida, devido a mudanças ambientais, os tripanossomatídeos podem sofrer modificações morfo-fisiológicas, apresentando-se sob diferentes formas evolutivas. Estas formas são caracterizadas pela morfologia do corpo celular, pela presença ou ausência de membrana ondulante e de flagelo extracelular, local de emergência do flagelo e pela posição do complexo formado pelo flagelo, bolsa flagelar, e cinetoplasto em relação ao núcleo (HOARE & WALLACE, 1966; JANOVY, LEE & BRUMBAUGH, 1974; JANOVY, VICKERMAN & PRESTON, 1976; WALLACE, 1977; YOSHIDA *et al.*, 1978; VICKERMAN, 1990, 1994; TEIXEIRA *et al.*, 1997). A figura 3 mostra as principais formas evolutivas dos tripanossomatídeos. Alguns tripanossomatídeos podem ainda apresentar outras formas como a metacoanomastigota (SOUSA *et al.*, 1996), forma similar à coanomastigota, porém apresentando o cinetoplasto posterior ao núcleo. A forma esferomastigota, que apresenta um corpo celular arredondado e flagelo curto e a forma escleromastigota (RANQUE *et al.*, 1973), que são cistos ou formas de resistência, é apresentada apenas por tripanossomatídeos monoxênicos.



**Figura 3:** Principais formas evolutivas observadas nos diferentes gêneros que compõem a família Trypanosomatidae (adaptado de SOUSA, 2000).

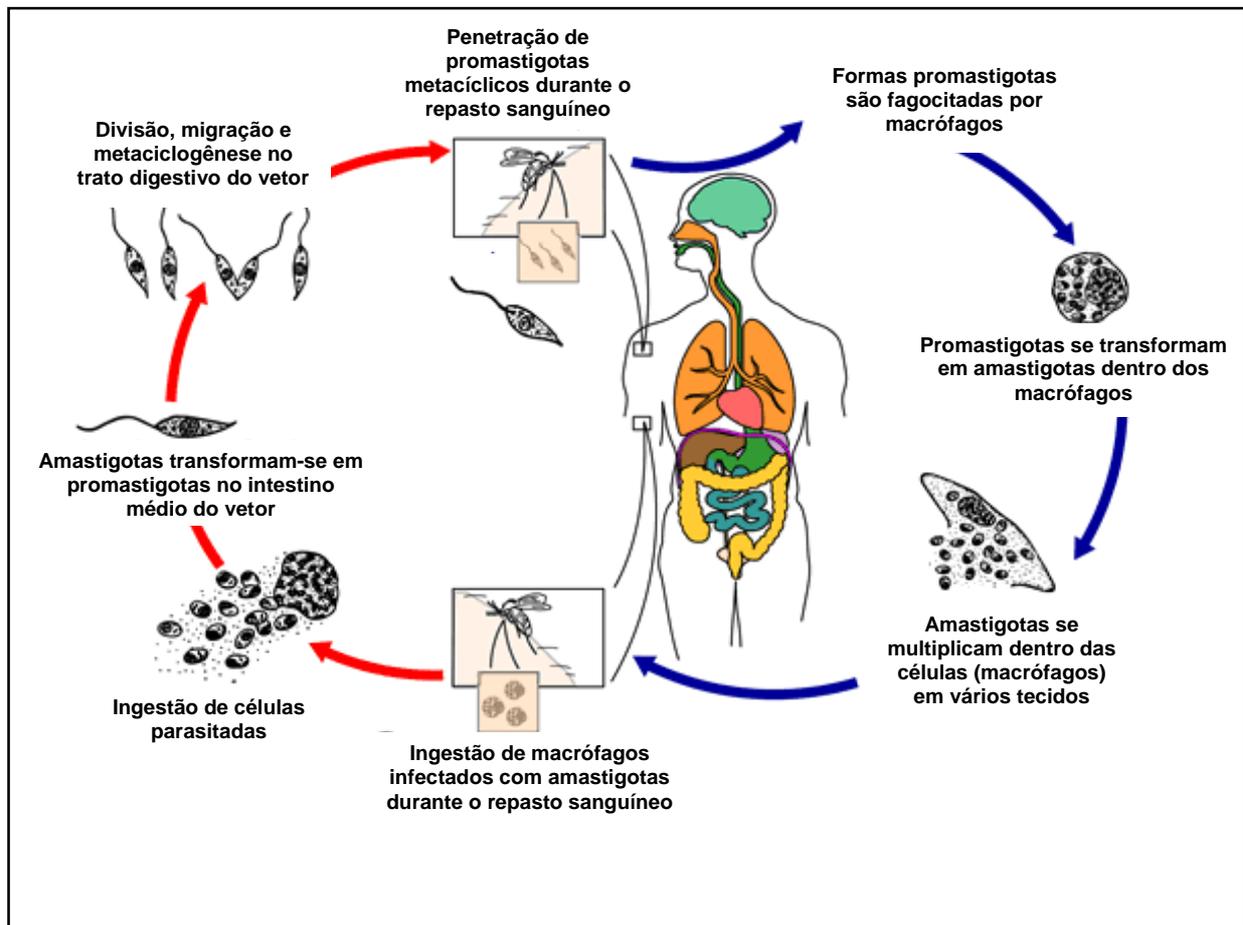
## 2. O gênero *Leishmania* e as leishmanioses

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. Estes parasitos são heteroxênicos, transmitidos para humanos e outros vertebrados através da picada do flebotomíneo infectado. As formas infectivas que são transmitidas para os mamíferos hospedeiros são denominadas promastigotas metacíclicas e as formas não-infectivas denominadas promastigotas procíclicas (DA SILVA & SACKS, 1987). Estas duas formas são encontradas em culturas axênicas, nos quais as formas procíclicas se multiplicam e se diferenciam em formas metacíclicas, que são mais abundantes na fase estacionária da cultura (SACKS *et al.*, 1985).

Nos mamíferos hospedeiros, estas formas se transformam em amastigotas no interior de células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas. Os parasitos intracelulares multiplicam-se por divisão binária e chegam a romper os macrófagos infectados. Ao romper a célula, tais formas são liberadas para infectar outros macrófagos e outros fagócitos, disseminando-se para outros sítios anatômicos como: pele, baço, fígado, medula óssea e linfonodos (AWASTHI *et al.*, 2004).

A transmissão das leishmanioses ocorre através da picada de vetores hematófagos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (WENIGER *et al.*, 2001), e o ciclo se fecha quando os vetores picam os reservatórios vertebrados e ingerem as formas amastigotas. Finalmente, os amastigotas atingem o tubo digestivo do inseto vetor, onde após passarem por várias etapas diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas e metacíclicas que são inoculadas no hospedeiro durante o repasto sanguíneo (AWASTHI *et al.*, 2004). O ciclo de vida de *Leishmania* sp. e suas formas evolutivas estão representadas na figura 4.

As formas clínicas das leishmanioses podem ser divididas em dois tipos principais: a forma tegumentar (cutânea simples, cutânea difusa, mucocutânea) e a forma visceral. As vastas manifestações clínicas da doença parecem resultar de uma combinação das propriedades do parasito, como infectividade e patogenicidade, e dos diversos fatores do hospedeiro vertebrado, como idade, predisposição genética, estado imunológico, entre outros (MURRAY *et al.*, 2005).



**Figura 4-** Representação esquemática do ciclo de *Leishmania* sp. no inseto vetor e no hospedeiro mamífero.

Adaptado (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx> [Acessado em 20/06/2008])

A leishmaniose tegumentar é caracterizada pelo aparecimento de lesões na pele que podem variar de simples a difusas, principalmente na face, causando mutilação e desfiguração do paciente. A doença pode regredir espontaneamente ou evoluir, necessitando, portanto, de tratamento (GRIMALDI *et al.*, 1991). A leishmaniose mucocutânea inicialmente causa úlceras na pele similares àquelas observadas na forma cutânea que, entretanto, cicatrizam e posteriormente reaparecem, principalmente nas mucosas do nariz, boca e faringe, podendo causar lesões desfigurantes e mutilações na face (HANDMAN, 2000; REY, 2002).

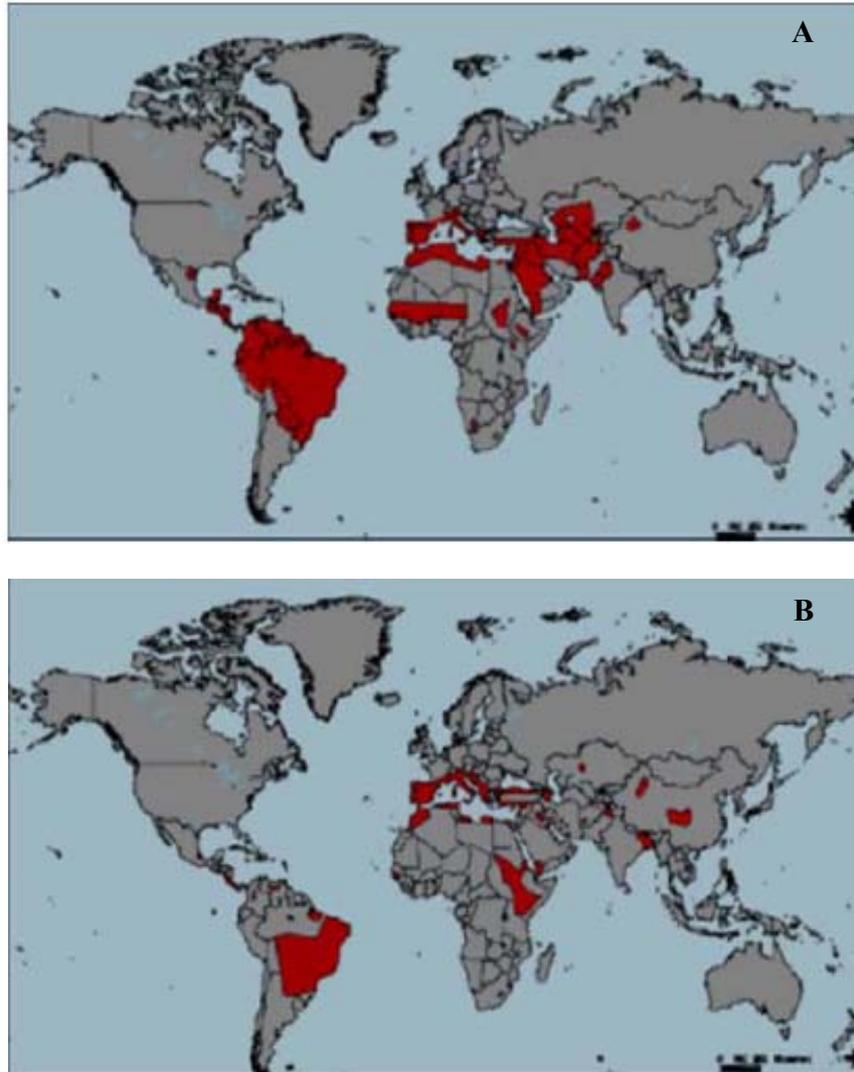
A leishmaniose visceral ou Calazar é a forma mais severa da doença. Este tipo de leishmaniose afeta em torno de 500 mil pessoas por ano, principalmente na Índia, Sudão e

países da América Latina (WENINGER *et al.*, 2001, GONTIJO & MELO, 2004). A leishmaniose visceral afeta principalmente fígado e o baço determinando, respectivamente, uma hepatomegalia e esplenomegalia que pode levar a perda das funções destes órgãos entre outras alterações severas. Este quadro clínico pode ser fatal se o tratamento estabelecido não for eficaz (CARVALHO *et al.*, 2000; CROFT *et al.*, 2006). As manifestações clínicas dos diferentes tipos de leishmaniose podem ser observadas na figura 5.



**Figura 5-** Manifestações clínicas dos diferentes tipos de leishmaniose. A partir da esquerda, forma cutânea simples ([www.cpnoticia.com.br](http://www.cpnoticia.com.br)), cutânea difusa ([www4.ensp.fiocruz.br](http://www4.ensp.fiocruz.br)), mucocutânea, ([www.adventurezone.com.br](http://www.adventurezone.com.br)) e visceral ([www.vet.uga.edu](http://www.vet.uga.edu)).

As leishmanioses são infecções prevalentes em quatro continentes, consideradas endêmicas em 88 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento. A distribuição das leishmanioses cutânea e visceral no mundo pode ser observada na figura 6. Mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru, e no caso da leishmaniose mucocutânea, 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru. Em se tratando de leishmaniose visceral, 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Nepal, Índia e Sudão (WHO, 2006).



**Figura 6.** Distribuição das leishmanioses cutânea (A) e visceral (B) no Velho e Novo Mundo. As áreas afetadas estão destacadas em vermelho de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (revisto por SANTOS *et al.*, 2008).

Em 1987, Lainson & Shaw propuseram a divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*. Estes dois subgêneros são classificados com base na localização do parasito no intestino do vetor. Os membros do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se nas regiões pilórica e do intestino médio (desenvolvimento suprapilário), enquanto as espécies do subgênero *Viannia* desenvolvem-se na região posterior do intestino (desenvolvimento peripilário) (LAINSON & SHAW, 1979, 1987; revisto por CORRÊA,

BRAZIL & SOARES, 2005). Além disso, análises de isoenzimas são utilizadas para definir os complexos de espécies dentro de cada subgênero.

A classificação das espécies no gênero *Leishmania* baseou-se inicialmente em critérios ecobiológicos, tais como vetores, distribuição geográfica, tropismo, propriedades antigênicas e manifestações clínicas. No entanto, análises bioquímicas e moleculares mostraram que a classificação das espécies baseada apenas nestes critérios era insuficiente para agrupar os flagelados de acordo com as suas similaridades genéticas. Portanto, outros critérios passaram a ser utilizados para auxiliar a classificação das espécies de *Leishmania*, tais como perfil de isoenzimas, sondas de DNA e anticorpos monoclonais espécie-específicos, análises de RFLP (“restriction fragment length polymorfism”) e perfil de polimorfismo exibido pelo k-DNA (CUPOLILLO *et al.*, 1998; revisto por BAÑULS, HIDE & PRUGNOLLE, 2007).

No subgênero *Viannia* são encontradas as espécies do complexo *braziliensis*, que causam leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo, como por exemplo, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis*. No subgênero *Leishmania* são encontradas as espécies do complexo *mexicana* causadoras de leishmaniose cutânea no Novo Mundo, como a *L.(L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*. No Velho Mundo, estão as espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea como *L.(L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*, que taxonomicamente, não se enquadram em nenhum dos complexos citados. Neste subgênero também se encontram as espécies do complexo *donovani* como, por exemplo, *Leishmania (L.) donovani* e *L.(L.) infantum*, responsáveis pela leishmaniose visceral no Velho Mundo, e *L. (L.) chagasi*, responsável pela leishmaniose visceral no Novo Mundo (GRIMALDI *et al.*, 1989; GRIMALDI & TESH, 1993; CUNNINGHAM, 2002; FUNASA, 2002; MELBY, 2002).

No Brasil, a leishmaniose visceral é causada por *Leishmania (L.) chagasi* (sinonímia *L. infantum*), já a leishmaniose tegumentar americana é causada por diferentes subgêneros e espécies de *Leishmania*, sendo as mais importantes no Brasil: *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* (Ministério da Saúde, 2008). O parasito *L. amazonensis* é um dos principais causadores de leishmaniose tegumentar americana em áreas endêmicas. A infecção causada por *L. amazonensis* pode ser caracterizada por lesões cutâneas múltiplas e progressivas, resistência à quimioterapia e

anergia de células T específicas (RANGEL & LAINSON, 2003). A área geográfica onde o flagelado *L. amazonensis* se encontra estende-se por toda Bacia Amazônica (compreendendo a parte brasileira, e possivelmente países vizinhos) bem como outros territórios, inclusive Maranhão, Ceará, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo, também existem relatos nas ilhas de Trinidad (Antilhas) (REY, 2008). Descobertas recentes relataram o primeiro caso de infecção humana causada por *L. amazonensis* no Estado do Rio de Janeiro, onde até então somente *L. braziliensis* era descrita como agente causador da leishmaniose cutânea. Ainda neste trabalho as observações indicam que este parasito está ampliando sua distribuição geográfica no Brasil, contribuindo para os quadros clínicos incomuns da doença em novas áreas de transmissão (AZEREDO-COUTINHO *et al.*, 2007).

### 3. Tratamento das Leishmanioses

O tratamento clássico da leishmaniose inclui a utilização de antimoniais pentavalentes como antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime) e estibogluconato de sódio (Pentostan), utilizados desde a década de 1940. Em outros casos, outras drogas como Anfotericina B, Pentamidina e Paromicina são usadas como uma segunda opção em casos de resistência, apesar da alta toxicidade apresentada ao hospedeiro. Como terapia alternativa, é possível encontrar a associação de algumas drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses com lipossomas, a fim de diminuir os efeitos indesejáveis e aumentar a concentração e a eficácia das drogas nos tecidos (revisto por SANTOS *et al.*, 2008).

Alguns grupos têm buscado alternativas de tratamento através da utilização de compostos naturais extraídos de diferentes espécies vegetais, devido à baixa toxicidade apresentada por estes compostos. DUTTA e colaboradores (2007a) demonstraram a atividade antileishmania de extratos das folhas de *Aloe vera* em promastigotas de *L. donovani*. Outro trabalho deste grupo demonstrou que Racemoside A, uma saponina esteroidal purificada de frutos de *Asparagus racemosus*, foi capaz de induzir a morte celular em promastigotas de *L. donovani* (DUTTA *et al.*, 2007b). Em *L. amazonensis*, foi demonstrado por SOARES e colaboradores (2007), a atividade anti-*leishmania* de um fluido extraído de *Tabernaemontana catharinensis*, um vegetal utilizado na medicina popular para tratamento de doenças parasitárias encontrada no Sul do Brasil. O óleo essencial de *Croton cajucara* apresentou alta eficácia contra formas promastigotas e

amastigotas de *L. amazonensis*, sendo capaz de induzir morte celular em 100% dos parasitos (ROSA *et al.*, 2003). O extrato de *Peschiera australis* também foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* (DELORENZI *et al.*, 2001).

Outros tipos de drogas classificadas como sintéticas têm sido testadas, como a nicotinamida (NAM), o inibidor de acotinase (TAA), derivados de quinolonas e compostos derivados de hidroxamato. A miltefosina (Hexadecilfosfocolina), originalmente desenvolvida como um agente anti-neoplásico, é amplamente estudada, e tem demonstrado ser um tratamento efetivo e seguro para leishmaniose visceral na Índia, apresentando taxas de cura de aproximadamente 98% (JHA *et al.*, 1999; SUNDAR *et al.*, 2000). Este composto tem apresentado sucesso no tratamento de pacientes com leishmaniose visceral antimonial-resistentes (SUNDAR *et al.*, 1998, 1999), leishmaniose visceral em crianças (PALUMBO, 2008) e leishmaniose cutânea (SOTO *et al.*, 2001, 2008). O mecanismo de ação desta droga tem sido amplamente estudado. ESCOBAR e colaboradores (2001) demonstraram que uma possível ação da miltefosina seria o estímulo do sistema imune e hematopoético, com ativação de células T e de macrófagos, além do aumento da produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Por outro lado, diferentes estudos demonstram que a miltefosina teria uma ação direta sobre o parasito por indução de apoptose (PARIS *et al.*, 2004; VERMA & DEY, 2004; VERMA *et al.*, 2007).

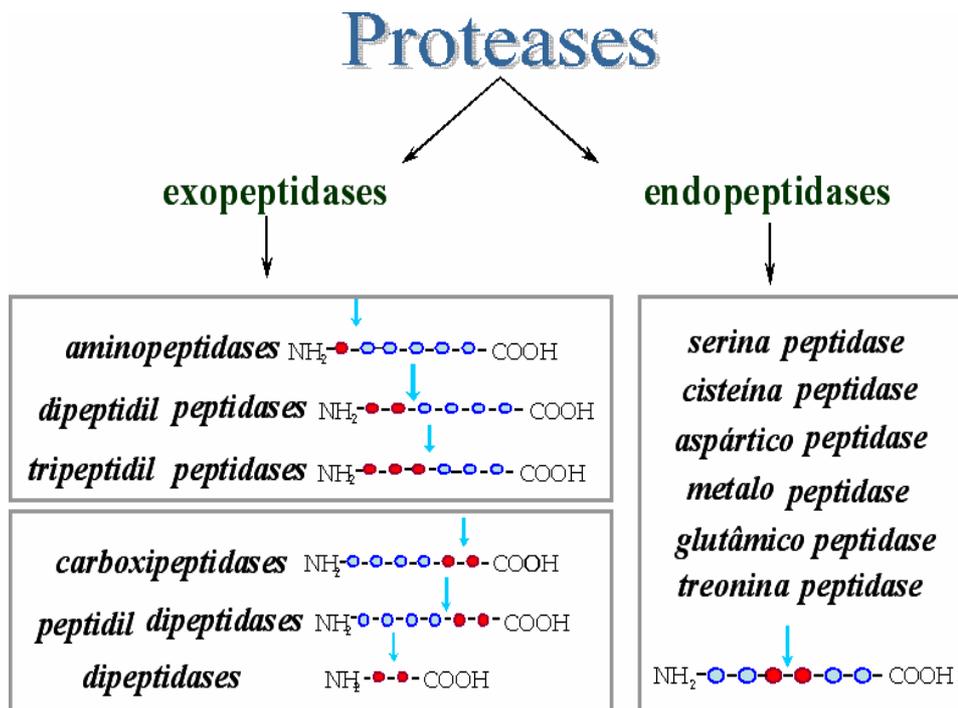
Em geral, as drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses apresentam sérios problemas, incluindo alta toxicidade e efeitos adversos, a necessidade da hospitalização dos pacientes, surgimento de cepas resistentes e alto custo dos compostos utilizados no tratamento. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de doenças causadas por estes protozoários.

#### **4. Peptidases: um novo alvo para o desenvolvimento de quimioterápicos**

As peptidases, peptídeo-hidrolases ou proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas nas proteínas e fragmentos de proteínas (BARRETT, 1994; BARRETT *et al.*, 2001). Elas têm presença universal entre os seres vivos e respondem por cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, em vias metabólicas e de sinalização celular. Adicionalmente, muitos microrganismos secretam peptidases para o

meio externo com a finalidade principal de degradar proteínas, cujos produtos de hidrólise são fontes de carbono e nitrogênio para o seu crescimento (VERMELHO *et al.*, 2007).

Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NCIUBMB, 1992), as peptidases pertencem à classe 3 (hidrolases) e subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). As enzimas da subclasse EC 3.4 são subseqüentemente classificadas como exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-99). Estes grupos referem-se à capacidade das enzimas em clivar ligações peptídicas nas extremidades ou no interior da cadeia polipeptídica, respectivamente. As exopeptidases podem ainda ser classificadas como aminopeptidases ou carboxipeptidases, de acordo com a sua atuação na região N- ou C-terminal da proteína, respectivamente. As endopeptidases agem sobre ligações peptídicas de regiões internas da cadeia polipeptídica. O esquema da classificação das peptidases pode ser observado na figura 7.



**Figura 7:** Esquema da classificação das peptidases quanto ao tipo de reação catalisada e a natureza química do sítio ativo (adaptado de BOND & BUTLER, 1987).

Em 1960, HARTLEY propôs um tipo de classificação baseado na estrutura química do centro ativo. Nesta classificação, as carboxipeptidases e as endopeptidases são divididas em subclasses de acordo com os grupos químicos do centro-ativo envolvidos no mecanismo catalítico. Neste sistema, as carboxipeptidases são subdivididas em serina (EC 3.4.16.), metalo (EC 3.4.17.) e cisteína (EC 3.4.18.). As endopeptidases são subdivididas em serina (EC 3.4.21.), cisteína (EC 3.4.22.), aspártico (EC 3.4.23.), metalo (EC 3.4.24) e treonina peptidases (E.C. 3.4.25.) (Figura 7). Assim, as serina, aspártico e cisteína endopeptidases têm esses aminoácidos no seu centro ativo, os quais são responsáveis pela ligação e clivagem do substrato protéico. Nas metalopeptidases, um ou dois íons metálicos estão envolvidos no mecanismo catalítico. Existe, atualmente, um sexto tipo catalítico, as glutâmico peptidases, que apresentam o ácido glutâmico em seu centro ativo. As enzimas cujos mecanismos de ação não estão suficientemente elucidados são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99.

Como as peptidases formam um grupo extenso e heterogêneo, os critérios disponíveis tornaram-se insuficientes para classificar e otimizar toda a informação oriunda dos estudos para a sua caracterização química e bioquímica. Visando acompanhar os avanços, foi criado o sistema MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), que agrupa as enzimas proteolíticas em famílias de acordo com a homologia na seqüência de aminoácidos. As famílias de mesma ancestralidade são, por sua vez, agrupadas em clãs, sendo este tipo de informação determinada pela estrutura terciária das peptidases (BARRETT *et al.*, 2003). Assim, as peptidases são agrupadas em famílias de acordo com a semelhança da seqüência de aminoácidos do seu sítio catalítico em relação à enzima representativa da família. As famílias, por sua vez, são agrupadas em clãs específicos, de acordo com as semelhanças na estrutura secundária, terciária e na ordem dos resíduos catalíticos ou seqüências *motifs* em torno destes resíduos. As famílias são representadas por uma letra, que indica o mecanismo catalítico e um número. 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), 'G' (glutâmico) ou 'U' (tipo desconhecido, do inglês, *unknown*) (BARRETT *et al.*, 2001).

## 5. Peptidases no gênero *Leishmania*

Nos tripanossomatídeos, as peptidases desempenham um papel fundamental na interação parasito-hospedeiro, uma vez que estão envolvidas com a invasão pela degradação de tecido conjuntivo; degradação de proteínas do citoesqueleto do hospedeiro durante invasão ou ruptura das células do hospedeiro; escape ou modulação do sistema imunológico por degradação ou ativação de moléculas do sistema imune; invasão de células hospedeiras; intervenção da coagulação sanguínea; a variabilidade antigênica do parasito e com o sistema fibrinolítico do hospedeiro, que dependem de reações em cascata catalisadas por peptidases (revisto por MCKERROW *et al.*, 2006).

Além da sua importância para a patogenicidade dos tripanossomatídeos, as peptidases também estão envolvidas em eventos cruciais do ciclo de vida destes microrganismos, tais como remodelação do parasito durante a transição de um estágio de vida para outro e ativação ou degradação de enzimas ou proteínas regulatórias do parasito, além de participarem no processamento de proteínas para fins nutricionais (revisto por MCKERROW *et al.*, 1993; SAJID & MCKERROW, 2002). Das seis classes de peptidases, as metalo e as cisteína peptidases são as mais amplamente detectadas nos tripanossomatídeos (BRANQUINHA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2005); porém, serina e aspártico peptidases também foram encontradas no gênero *Leishmania* (ALVES *et al.*, 2005; MORGADO-DIAZ *et al.*, 2005; VALDIVIESO *et al.*, 2007; CHOUDHURY *et al.*, 2008).

### 5.1. Metalopeptidases

A metalopeptidase mais estudada e melhor caracterizada na família Trypanosomatidae é uma glicoproteína de 60-65 kDa expressa em abundância na superfície celular das formas promastigotas das espécies de *Leishmania*. Denominações distintas têm sido usadas para esta enzima na literatura, como gp63, leishmanolisina, PSP (“promastigote surface peptidase”) ou MSP (“major surface peptidase”) (CLAYTON *et al.*, 1998). Todas MSPs estudadas em diferentes espécies de *Leishmania* compartilham de alta similaridade nas suas sequências, e diferentes espécies compartilham distintas classes de genes para MSP, os quais podem ser distinguidos por suas sequências e especificidade de estágio para sua expressão (YAO *et al.*, 2003). A MSP corresponde a mais abundante glicoproteína de

superfície em promastigotas, sendo ancorada via glicosilfosfatidilinositol (GPI), e uma significativa proporção de MSP é liberada no meio extracelular por autoproteólise (MCGWIRE *et al.*, 2002) ou por secreção via bolsa flagelar (ELLIS *et al.*, 2002).

Em amastigotas, a expressão de MSPs é reduzida e podem estar presentes na superfície celular ou no interior dos lisossomas dos parasitos. As MSPs podem contribuir para a virulência e patogenicidade de *Leishmania* sp., sendo altamente expressas em promastigotas metacíclicos. Nas formas virulentas a gp63 compreende 1% do total de proteínas (revisto por YAO, DONELSON & WILSON, 2003). Em trabalho recentemente publicado foi demonstrado que formas promastigotas virulentas de *L. braziliensis*, recém-isoladas de hamsters, produziram altos níveis de gp63, detectados tanto na superfície celular quanto em regiões do citoplasma, quando comparadas à cepa avirulenta mantida ao longo de vários anos apenas em culturas axênicas (LIMA *et al.*, 2009). Diversos relatos na literatura têm demonstrado a participação desta enzima na patogênese e virulência de *Leishmania* (JOSHI *et al.*, 2002). O papel da gp63 tem sido implicado na resistência à lise mediada pelo sistema complemento, adesão e invasão dos macrófagos, proteção da degradação dentro do fagolisossomo de macrófagos, inibição da quimiotaxia de monócitos e neutrófilos (revisto por YAO, DONELSON & WILSON, 2003) e colonização do epitélio intestinal do inseto vetor *Lutzomyia longipalpis* (HAJMOVÁ *et al.*, 2004). Além disso, esta metalopeptidase é capaz de hidrolisar diferentes substratos protéicos incluindo: proteínas do soro, tais como albumina, caseína, componentes do complemento, fibrinogênio, hemoglobina e imunoglobulinas (BOUVIER *et al.*, 1990). Esta enzima tem sido relacionada também com a degradação de componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo IV e fibronectina, o que pode facilitar a migração e disseminação do parasito através dos tecidos (McGWIRE *et al.*, 2003).

Em *L. chagasi*, foi demonstrado que em ambos os estágios, promastigotas e amastigotas, há a expressão de múltiplas isoformas de MSP, porém, estas podem diferir quanto à função bioquímica e à localização celular. Análises bioquímicas demonstraram que as MSPs nas formas amastigotas encontram-se solúveis no citosol, em vesículas ou organelas, enquanto em promastigotas estão associadas à membrana via âncora de GPI. Nos promastigotas de *L. chagasi* as MSPs são liberadas extracelularmente, enquanto que nas formas amastigotas este mecanismo não foi observado. Sendo assim, as MSPs podem estar

exercendo diferentes papéis quando presente no ambiente extracelular ou intracelular de *Leishmania* sp. (HSIAO *et al.*, 2008).

Proteínas apresentando reação cruzada com esta enzima têm sido detectadas em outros tripanossomatídeos (revisto por SANTOS *et al.*, 2006). Dentre os tripanossomatídeos estão aqueles que apresentam o ciclo de vida predominantemente em insetos, como *Blastocrithidia culicis* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2005), *Crithidia deanei* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2003a, D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006a), *Crithidia fasciculata* (INVERSO *et al.*, 1993, BRANQUINHA *et al.*, 1996), *Crithidia guilhermei* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006a), *Crithidia luciliae* (JAFFE & DWYER, 2003), *Leptomonas seymouri* (JAFFE & DWYER, 2003), *Leptomonas samueli*, *Leptomonas collosoma*, *Leptomonas wallacei* (PEREIRA *et al.*, 2009), *Herpetomonas megaseliae* (NOGUEIRA DE MELO *et al.*, 2006), *Phytomonas serpens* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006a) e *Phytomonas françai* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006b). Em *Herpetomonas samuelpessoai*, têm sido descrito que estas proteínas possivelmente estão envolvidas no processo de adesão com o hospedeiro invertebrado (ELIAS *et al.*, 2006). Em *Phytomonas serpens*, foi descrita a participação destas proteínas no processo de adesão a glândulas salivares do inseto fitófago *Oncopeltus fasciatus* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006b). A expressão diferenciada de genes que codificam moléculas similares a gp63 de *Leishmania* têm sido encontrados em *Trypanosoma brucei*, (EL-SAYED & DONELSON, 1997) e *T. cruzi* (GRANDGENETT *et al.*, 2000).

## 5.2. Serina peptidases

A presença de uma serina peptidase de 60 kDa foi identificada na superfície celular de *L. amazonensis*, assim como na membrana de compartimentos intracelulares do parasito (MORGADO-DIAZ *et al.*, 2005). Alguns estudos de inibição sugerem a presença de uma outra serina protease extracelular de 56 kDa, inibida por cálcio e manganês e ativada por zinco, que difere das outras peptidases já conhecidas e caracterizadas neste flagelado (SILVA-LOPEZ, COELHO & DE SIMONE, 2005). Recentemente, foi descrita a presença de uma serina peptidase em uma cepa de *L. donovani* (CHOUDHURY *et al.*, 2008) com as mesmas características bioquímicas daquelas identificadas em *L. amazonensis* (SILVA-LOPEZ, COELHO & DE SIMONE, 2005).

### 5.3. Aspártico peptidases

As aspártico peptidases ainda não estão bem caracterizadas na família Trypanosomatidae. Este grupo de peptidases está dividido em várias famílias e geralmente funcionam em condições ácidas. Este último aspecto limita a função das aspártico peptidases a alguns locais específicos nos diferentes organismos, o que faz com que a ocorrência desta classe proteolítica seja menos abundante do que a de outros grupos de peptidases (DASH *et al.*, 2003). Apesar disso, as aspártico peptidases têm sido isoladas e estudadas em uma ampla variedade de organismos, em vertebrados, fungos, plantas, vírus e até em bactérias (HILL & PHYLIP, 1997; JAMES, 1998; DASH *et al.*, 2003; TAKAHASHI *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2005; VALDIVIESO *et al.*, 2007; PINTI *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, as aspártico peptidases têm recebido atenção como alvos para a intervenção farmacêutica visto a sua participação em vários processos fisiológicos e patológicos importantes (EDER *et al.*, 2007). Os principais exemplos são: o envolvimento da renina na hipertensão, da catepsina D na metástase do câncer de mama e da peptidase do HIV na AIDS (DASH *et al.*, 2003). Em *L. amazonensis* foi reportado que a atividade de aspártico peptidase diminui durante a transformação de formas promastigotas a amastigotas; no entanto, esta atividade não foi caracterizada bioquimicamente (ALVES *et al.*, 2005). A primeira identificação e caracterização da atividade de uma aspártico peptidase no gênero *Leishmania* foi realizada em *L. mexicana*. A detecção da atividade desta enzima foi realizada através da utilização de um substrato sintético seletivo para aspártico peptidases tipo catepsina D. O inibidor clássico de aspártico peptidases, DAN (díaz-acetyl-norleucinemethylester), foi capaz de inibir a atividade proteolítica da enzima (VALDIVIESO, DAGGER & RASCÓN, 2007). As peptidases dos parasitos são de considerável interesse para a pesquisa porque proporcionam informações sobre a bioquímica e a biologia do parasito, bem como auxilia a esclarecer algumas facetas da interação parasito-hospedeiro. Uma vez que essas enzimas desempenham uma série de funções essenciais para os parasitos, as peptidases são alvo para a produção de agentes quimioterápicos (BARR *et al.*, 2005; revisto por MCKERROW *et al.*, 2006; VERMELHO *et al.*, 2007).

#### 5.4. Cisteína peptidases

As cisteína peptidases são detectadas em vários protozoários, com alta atividade enzimática em pelo menos um estágio dos seus ciclos de vida. Entre outras funções, as cisteína peptidases participam na nutrição do parasito, no processo de interação com o hospedeiro, no mecanismo de invasão de macrófagos e no escape da resposta imunológica do hospedeiro (revisto por MCKERROW *et al.*, 2006).

Espécies de *Leishmania* contêm múltiplas e ativas cisteína peptidases, e uma análise detalhada do genoma de *L. major* revelou a existência de genes que codificam um total de 65 cisteína peptidases, agrupadas em 4 clãs e 13 famílias. No entanto, a maioria dos estudos foi desenvolvido com as peptidases similares à catepsina L (denominadas de CPA e CPB), além das similares à catepsina B (CPC), todas estas pertencentes ao tipo papaína e alocadas no clã CA da família C1 (MOTTRAM, COOMBS & ALEXANDER, 2004).

Os genes responsáveis pela codificação destas cisteína peptidases que apresentam baixa massa molecular (*cpa*, *cpb*, *cpc*) já foram identificados em várias espécies de *Leishmania* (revisto por FRAME, MOTTRAM & COOMBS, 2000; MOTTRAM, COOMBS & ALEXANDER, 2004). Através da geração de mutantes nulos para cada um destes genes, foi demonstrado que o papel da CPB é facilitar a diferenciação de promastigota e/ou facilitar a evasão do ataque microbicida do macrófago (revisto por FRAME, MOTTRAM & COOMBS, 2000; MOTTRAM, COOMBS & ALEXANDER, 2004). Além disso, verificou-se que a CPA não é essencial para a replicação de *L. infantum*, mas é importante para a interação parasito-hospedeiro (DENISE *et al.*, 2006), e que a remoção dos genes ou a inibição das cisteína peptidases CPA e CPB em *L. mexicana* não somente interferiu na via de autofagia, que ocorre durante a diferenciação para promastigotas metacíclicos e amastigotas, como também impede a metaciclogênese e transformação para amastigotas, fortalecendo a hipótese de que a autofagia é requerida para a diferenciação celular (WILLIAMS *et al.*, 2006).

Outros estudos demonstram que as cisteína peptidases são preferencialmente expressas em promastigotas virulentos de *Leishmania* quando comparados com os parasitos avirulentos, em pelo menos *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (SOARES *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2009). Em *L. amazonensis*, através de técnicas como Western blotting, citometria de fluxo e microscopia de fluorescência, foi detectado pelo nosso grupo a presença de

proteínas com reatividade cruzada com a calpaína de *Drosophila melanogaster* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006c). Outros dados têm reforçado a presença destas proteínas em tripanossomatídeos, como descrito a seguir.

## 6. Calpaínas

As calpaínas compreendem um grupo heterogêneo de cisteína peptidases neutras dependentes de cálcio, também denominadas CDPs (“Calcium Dependent Peptidases”), com um amplo padrão de expressão que inclui múltiplas isoformas. Estas enzimas são proteínas heterodiméricas formadas por uma subunidade catalítica de 80 kDa e uma subunidade regulatória de 30 kDa. Existem duas isoformas homólogas desta enzima, denominadas de  $\mu$ - e m-calpaínas, que têm sido distinguidas com base nas diferenças de seus requerimentos *in vitro* por cálcio, respectivamente micro- e milimolar, que atua como co-fator essencial para obtenção da atividade hidrolítica máxima. Ambas as subunidades contêm um domínio de ligação para cálcio do tipo calmodulina. Nas células de animais, a subunidade menor nas isoenzimas é idêntica, enquanto que a subunidade de 80 kDa apresenta identidade de seqüência limitada (revisto por JOHNSON & GUTTMAN, 1997). A estrutura da m-calpaína é demonstrada na figura 8.

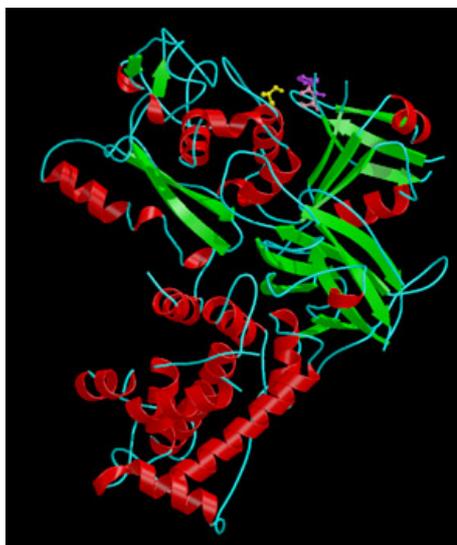


Figura 8. Representação da estrutura da m-calpaína (mili-calpaína)  
(MEROPS- The peptidase database)

Apesar de ser uma enzima tipicamente citosólica, essa enzima tem sido descrita no espaço extracelular de vários tecidos, e foi demonstrado que ela é ativamente secretada pelas células (revisto por NISHIARA *et al.*, 2001). Uma vez que as calpaínas requerem concentrações de cálcio altíssimas para ativação *in vitro*, o papel fisiológico das calpaínas em eventos mediados por cálcio tem sido amplamente discutido. A forma de ativação *in vivo* pode ser regulada por autoproteólise e outros fatores como ligação com fosfolipídeos, inibidores ou ativadores endógenos que diminuiriam a quantidade de cálcio requerida para ativação (revisto GOLL *et al.*, 2003).

A existência de calpaínas e proteínas relacionadas às calpaínas numa ampla variedade de organismos sugere uma função básica e essencial em eventos fisiológicos celulares, tais como remodelação do citoesqueleto, modificação proteolítica de moléculas em eventos de sinalização celular, regulação da expressão gênica e degradação de substratos em eventos apoptóticos e regulação do ciclo celular. As calpaínas desempenham um papel mais importante no processamento de substratos, ativando-os através da remoção de domínios auto-inibitórios, do que na degradação completa das proteínas (revisto por CARAFOLI & MOLINARI, 1998; GOLL *et al.*, 2003).

Algumas doenças estão intimamente relacionadas com a ação destas enzimas, como por exemplo, o mal de Alzheimer, que é uma doença com a qual as calpaínas clássicas têm sido associadas. Estas calpaínas estão envolvidas em eventos moleculares que conduzem a hiperfosforilação de tau, a principal proteína encontrada nos arranjos fibrilares (NFTs) em pacientes com Alzheimer (HIGUCHI *et al.*, 2005). Além disso, a atividade proteolítica das calpaínas sobre a tau e outras proteínas de neurofilamentos está relacionada com a morte celular por necrose observada em Alzheimer (PARK & FERREIRA, 2005). O aumento no nível de marcadores da atividade de calpaínas *in vivo*, como os gerados pela clivagem da  $\alpha$ II-espectrina, abundantes em neurônios, têm sido observado em condições de injúrias hipóxicas e isquêmicas do cérebro, coração e pulmões (VANDERKLISH, 2000). Na doença de Huntington, foi identificada a ação de calpaínas, além da participação de proteassomas e caspases. Neste caso, a ação das calpaínas gerou fragmentos protéicos tóxicos que levaram a danos neuronais (GAFNI & ELLERBY, 2002). Outras doenças também estão relacionadas com a atividade de calpaínas como o mal de Parkinson (MISHIZEN-EBERZ *et al.*, 2005), injúrias na medula espinhal (RAY *et al.*, 2003),

cataratas em humanos (BISWAS, 2005) e mal de Duchene (revisto por GOLL *et al.*, 2003). Sendo assim, a participação das calpaínas em diferentes eventos celulares, o envolvimento em diversas doenças humanas, as características moleculares e o mecanismo de ação destas enzimas fazem com que estas se tornem interessantes alvos para o desenvolvimento de drogas.

A descoberta de homólogos destas proteínas em outros organismos e a facilidade de determinação de suas funções por manipulações genéticas permitiu um avanço significativo no estudo das calpaínas. Através dessas análises, foi demonstrado que o gene *Tra-3* está envolvido na cascata de determinação do sexo em *Caenorhabditis elegans*. Em *Drosophila melanogaster*, a proteína Sol está envolvida com o desenvolvimento do sistema nervoso, uma vez que o gene *sol* defectivo leva a uma degeneração específica nos lobos óticos, resultando numa redução do tamanho dos lobos óticos e na ausência de certas classes de neurônios. A adaptação a ambientes alcalinos no fungo *Aspergillus nidulans* requer atividade da proteína PalB, que é homóloga à superfamília das calpaínas (revisto por SORIMACHI, ISHIURA & SUZUKI, 1997; revisto por SAEZ *et al.*, 2006). Nos parasitos *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii*, agentes causadores da malária e toxoplasmose, respectivamente, foi observada a utilização de calpaínas de células hospedeiras para facilitar o escape do vacúolo parasitóforo e/ou membrana plasmática hospedeira. A imunodepleção ou a inibição da calpaína-1 impediu o escape de *P. falciparum*, e uma evasão eficiente de *T. gondii* de fibroblastos de mamíferos foi bloqueada pela supressão ou deleção genética da atividade de calpaínas (CHANDRAMOHANADAS *et al.*, 2009).

### **6.1. Calpaínas em tripanossomatídeos**

O primeiro relato de atividade proteolítica relacionada com calpaínas em tripanossomatídeos ocorreu no gênero *Leishmania*, onde uma cisteína peptidase dependente de cálcio foi detectada nas formas promastigotas de *L. donovani*. A enzima foi denominada caldonopaina devido à sua similaridade com a família das calpaínas, embora a reação cruzada ou homologia com genes de outras calpaínas não tenha sido determinada (BHATTACHARYA, DEY & DATTA, 1993). Posteriormente foi demonstrado que a

atividade da caldonopaina facilitaria a invasão de macrófagos por *L. donovani* (DEY, BHATTACHARYA & DATTA, 2006).

No gênero *Trypanosoma*, através de seqüenciamento genético foi descoberta em *T. brucei*, uma proteína associada ao citoesqueleto (CAP 5.5) que apresentou similaridade com a região catalítica das calpaínas, entretanto, não foi verificado se a proteína apresentava atividade enzimática (HERTZ-FOWLER, ERSFELD & GULL, 2001). No grupo dos monoxênicos, foi descrita a purificação de uma cisteína peptidase extracelular de uma cepa apossimbiótica de *C. deanei* que apresentou uma banda de aproximadamente 80 kDa, que foi completamente inibida por E-64 e EGTA, apresentando assim características semelhantes à família das calpaínas (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2003b).

A análise da seqüência de seis clones genômicos demonstrou a existência de diferenças na expressão de genes em cepas de *L. donovani* isoladas de pacientes que haviam desenvolvido calazar e leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL). A expressão foi aproximadamente duas vezes maior de genes relacionados com moléculas importantes nos parasitos encontrados nos pacientes PKDL quando comparada com pacientes que apresentavam o quadro original de leishmaniose visceral. Dentre estas moléculas estão incluídas a gp63, gp46 e uma proteína tipo calpaína. A proteína tipo calpaína identificada neste estudo é um polipeptídeo curto de aproximadamente 14 kDa similar ao encontrado em *T. brucei* (CAB95480) (SALOTRA *et al.*, 2006). VERGNES e colaboradores (2007) demonstraram que em cepas de *L. donovani* resistentes a antimoniais pentavalentes ocorria uma expressão diferenciada de algumas proteínas e o mecanismo de apoptose apresentava-se modificado. Neste trabalho, foi reportado que duas proteínas, a HSP83 e uma proteína relacionada com as calpaínas (SKCRP-14.1) estavam intimamente relacionadas com o fenótipo de resistência à apoptose induzida pelos antimoniais. A proteína HSP83 aumentava a resistência às drogas utilizadas e reduzia a ativação do mecanismo de apoptose por interferência no potencial da membrana mitocondrial. Por outro lado, a proteína SKCRP-14.1 protegia contra o mecanismo de apoptose induzido pela miltefosina.

Em cepas de *T. cruzi* resistentes ao benzonidazol foi identificada a presença de proteínas tipo calpaínas (ANDRADE *et al.*, 2008). GIESE e colaboradores (2008) clonaram um gene pertencente à família das calpaínas em *T. cruzi*, denominado *TcCALPx11*, que correspondia a uma proteína hipotética de 80 kDa (XP\_816697.1) específica das formas

epimastigotas, submetidas ao estresse nutricional que precede a metaciclogênese. Nenhuma atividade proteolítica foi identificada para a proteína de 80 kDa em *T. cruzi*, e a sua expressão diferenciada sugeria que a proteína poderia exercer um papel na resposta ao estresse e/ou na transdução de sinal. Recentemente, PEREIRA e colaboradores (2009) demonstraram a presença de uma proteína similar à calpaína de *Drosophila melanogaster* em promastigotas de *Herpetomonas samuelpessoai*, a qual era modulada ao longo do processo de diferenciação celular neste tripanossomatídeo monoxênico. Em um trabalho publicado por nosso grupo (SANGENITO *et al.*, 2009) foi demonstrada a existência de moléculas similares às calpaínas em formas epimastigotas da cepa Dm28c de *T. cruzi*, localizadas majoritariamente em compartimentos intracelulares. Nesse trabalho, cepas de *T. cruzi* recém-isoladas de camundongos apresentaram maior expressão de proteínas similares à calpaínas quando comparada a uma cepa passada axenicamente ao longo de vários anos, sugerindo uma possível associação destas moléculas com a patogenicidade em *T. cruzi*. O inibidor III de calpaínas (MDL28170) foi capaz de reduzir significativamente a taxa de multiplicação das formas epimastigotas de *T. cruzi* após 48 h de incubação. Sendo assim, uma melhor caracterização das calpaínas em tripanossomatídeos monoxênicos e heteroxênicos poderá ajudar a determinar as funções destas moléculas na família Trypanosomatidae.

## **7. Inibidores Proteolíticos**

As peptidases estão envolvidas na regulação de uma grande variedade de processos fisiológicos essenciais nos seres humanos, por participarem de uma seqüência extremamente regulada e orquestrada de eventos denominados de cascata proteolítica. Como exemplos, as peptidases estão envolvidas em eventos como a coagulação sangüínea, a apoptose mediada por caspases, a cascata de reação das metalopeptidases de matriz (MMP) e a cascata do sistema complemento. Entretanto, a ativação desregulada das peptidases nestes eventos pode levar a graves patologias. Desta forma, as indústrias farmacêuticas e a comunidade científica têm estudado as peptidases visando o desenvolvimento de drogas efetivas para o tratamento destas patologias (revisto por AMOUR *et al.*, 2004).

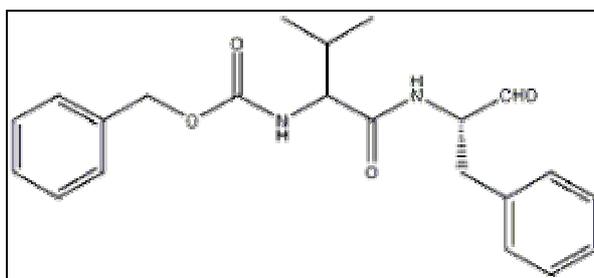
Além disso, as peptidases são fatores de virulência cruciais em um grande número de microrganismos, portanto, os inibidores proteolíticos têm sido explorados no controle e prevenção de infecções (MCKERROW *et al.*, 1993; ABAD-ZAPATERO *et al.*, 1996; PORTER & SCULLY, 1998; RAO *et al.*, 1998; MUNRO & HUBE, 2002; VERMELHO *et al.*, 2007). Nos tripanossomatídeos, as cisteína peptidases recebem maior atenção como alvo para o desenvolvimento de novos quimioterápicos. Particularmente, esta classe enzimática foi escolhida porque possui atividade proteolítica proeminente nos parasitos e possui atividade estágio-específica. Estudos com mutantes ou com inibidores de cisteína peptidases revelaram que estas enzimas estão envolvidas com a virulência dos parasitos, através da modulação da resposta imune do hospedeiro, diferenciação do parasito, invasão das células hospedeiras e sobrevivência (revisto por MOTTRAM, BROOKS & COOMBS, 1998; VERMELHO *et al.*, 2007).

Um inibidor de cisteína peptidase conhecido como K777, que é uma vinil sulfona, tem sido utilizado no tratamento da infecção causada por *T. cruzi* em culturas de células e em modelos de camundongos que apresentavam Doença de Chagas, com resultados promissores. Além disso, este inibidor pode ser administrado por via oral, e estudos toxicológicos mostraram que é significativamente seguro para uma terapia (ENGEL *et al.*, 1998). O inibidor K777 apresentou também uma alta eficácia no tratamento de Doença de Chagas em cachorros da raça Beagle (BARR *et al.*, 2005).

Os inibidores proteolíticos podem ter efeito terapêutico seletivo em doenças de origem microbiana (SELZER *et al.*, 1999). Apesar de existir uma relativa homologia entre as enzimas proteolíticas encontradas em tripanossomatídeos e em mamíferos (BARRETT *et al.*, 1999), as células do hospedeiro apresentam redundância de genes codificando atividade proteolítica, o que não ocorre nos parasitos, que aparentemente concentram o inibidor no seu citoplasma (SELZER *et al.*, 1999). Além disso, algumas das propriedades das peptidases dos tripanossomatídeos diferem significativamente das peptidases homólogas de mamíferos, o que facilita a busca por inibidores seletivos (revisto por SAJID & MCKERROW, 2002). Portanto, inibidores de atividade proteolítica podem ser uma alternativa à terapia tradicional em doenças causadas por protozoários.

Em calpaínas, o aumento desregulado de diversos membros desta família está associado a um amplo espectro de doenças e processos biológicos, razão pela qual este

grupo de peptidases apresenta importante potencial terapêutico. Um grande esforço tem sido realizado no campo da pesquisa, a fim de desenvolver meios para a identificação de inibidores de calpaínas que sejam potentes e seletivos, uma vez que muitos destes inibidores atuam também inibindo outras cisteínas peptidases, além de serina peptidases e proteassomas (revisto por SAEZ *et al.*, 2006). Os inibidores de calpaínas conhecidos como sintéticos podem ser divididos em dois grupos: os peptídicos e os não-peptídicos e, quanto ao mecanismo de ação, podem ser classificados como inibidores reversíveis ou irreversíveis (DONKOR, 2000; CARRAGHER, 2006). O inibidor de calpaínas MDL28170 (Z-Val-Phe-CHO), também conhecido como inibidor III de calpaínas, utilizado neste estudo apresenta um mecanismo de ação reversível e a sua estrutura química está representada na figura 9.



**Figura 9.** Estrutura química do inibidor de calpaínas MDL28170  
(MEROPS- The peptidase database)

As doenças neurodegenerativas compreendem um importante grupo onde os inibidores de calpaínas têm sido extensivamente estudados. Em modelos animais, alguns destes compostos têm impedido a morte neuronal, restabelecendo as funções neurológicas e melhorando os distúrbios motores causados por danos na medula espinhal (RAY, 2003). Além disso, tem sido descritos no tratamento de distrofia muscular (LESCOP *et al.*, 2005), mal de Alzheimer (HIGUCHI *et al.*, 2005), danos traumáticos no cérebro e degeneração do nervo óptico (SAATMAN *et al.*, 1996; ARAUJO COUTO *et al.*, 2004). Embora os efeitos neuroprotetores dos inibidores de calpaínas estarem bem estabelecidos, sua utilização em doenças humanas crônicas é limitado, devido a sua inabilidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Neste caso, é reportado que a fusão dos inibidores de calpaínas com

moléculas transportadoras específicas pode ajudar na transposição desta barreira e permitir o acesso ao sistema nervoso central (STRACHER *et al.*, 2006).

Além disso, esses inibidores são uma alternativa promissora para o tratamento da síndrome respiratória aguda associada ao coronavírus (SARSCoV) (BARNARD *et al.*, 2004), adenovírus (COTTEN & WEBER, 1995) e parecem ser efetivos na inibição da ativação do HIV em células latentes (TERANISHI *et al.*, 2003). Estas razões explicam a existência de numerosos grupos de pesquisa devotados ao estudo das calpaínas e ao desenvolvimento de inibidores proteolíticos com aplicação terapêutica. Portanto, a caracterização de calpaínas em tripanossomatídeos e a determinação de suas funções podem permitir o emprego de inibidores destas moléculas no tratamento das doenças causadas por estes parasitos.

## II) OBJETIVOS

### **Parte 1: Avaliação dos efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis***

- Avaliar a taxa de proliferação das formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Avaliar a morfologia e a ultraestrutura dos promastigotas de *L. amazonensis*;
- Detectar a externalização de fosfatidilserina;
- Analisar o ciclo celular de *L. amazonensis*;
- Verificar a existência de fragmentação do DNA;

### **Parte 2: Avaliação dos efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a interação de *L. amazonensis* com macrófagos peritoneais de camundongos**

- Analisar os efeitos do inibidor no processo de interação de *L. amazonensis* com macrófagos (Pré-tratamento);
- Analisar os efeitos do inibidor após o estabelecimento da infecção dos macrófagos por *L. amazonensis* (Pós-tratamento);
- Verificar a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS).

### **Parte 3: Avaliação dos efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre formas promastigotas infectivas, recém isoladas de camundongos, de *L. amazonensis***

- Verificar a ação do inibidor sobre a taxa de multiplicação;
- Avaliar os efeitos do inibidor sobre a expressão de peptidases;
- Avaliar as possíveis diferenças nos níveis de expressão de moléculas similares a calpaínas em formas promastigotas recém-isoladas após diferentes passagens *in vitro*.

### III) MATERIAL E MÉTODOS

#### Parte 1: Avaliação dos efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

##### 3.1. Microrganismos

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, cepa Josefa (WHOM/BR/75/Josefa), foram gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup> Elvira Saraiva (Departamento de Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ).

##### 3.2. Condições de Cultivo

Os parasitos foram mantidos através de repiques semanais em meio Schneider (Schneider Insect Medium – Sigma) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e acrescido de gentamicina (40 µg/ml) a temperatura de 26°C.

##### 3.3. Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a taxa de proliferação das formas promastigotas de *L. amazonensis*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram contadas utilizando a câmara de Neubauer e ressuspensas em meio Schneider fresco a uma concentração final de  $1,0 \times 10^6$  células viáveis/ml. O inibidor de calpaínas foi adicionado às culturas em concentrações finais de 15, 20, 25 e 30 µM (partindo de uma solução estoque a 5 mM em DMSO). A diluição de DMSO correspondente à utilizada para preparar a maior concentração do inibidor foi usada como controle. Após 24, 48, 72 e 96 h de incubação a 26°C, o número de parasitos viáveis foi quantificado por contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade foi verificada pela motilidade e exclusão do corante vital azul de tripan. Alternativamente, os parasitos crescidos por 72 h na ausência ou na presença do inibidor de calpaínas foram lavados 5 (cinco) vezes em PBS (NaCl 150 mM; Tampão Fosfato 20 mM, pH 7,2) e ressuspensos em meio Schneider fresco na ausência do inibidor. Após 72 h de incubação a 26°C, foi avaliado se o efeito induzido pelo inibidor foi leishmanicida ou leishmanistático. O IC<sub>50</sub>, que se refere à concentração da droga que causa uma redução em 50% da

sobrevivência dos parasitos em comparação à curva de crescimento controle, foi calculado através da regressão linear do número de promastigotas viáveis versus log da concentração da droga utilizando o software Origin Pro 7.5.

### **3.4. Efeitos do inibidor de calpaínas sobre a morfologia celular das formas promastigotas de *L. amazonensis***

Análises morfológicas foram realizadas nos parasitos não tratados e tratados com diferentes concentrações do inibidor de calpaínas (15, 20, 25 e 30  $\mu\text{M}$ ). Promastigotas de *L. amazonensis* ( $1,0 \times 10^7$  células) foram incubados na ausência ou na presença do inibidor de calpaínas por 48 h, sendo posteriormente lavados e fixados em paraformaldeído 0,4% em PBS (pH 7,2). Após 30 min de incubação à temperatura ambiente, as células foram extensivamente lavadas com PBS, aderidas em lamínulas de vidro cobertas com poli-L-lisina, montadas em N-propilgalacto, vedadas com esmalte e analisadas por microscopia óptica. Pelo menos dez campos foram observados para cada sistema.

### **3.5. Análise Ultraestrutural**

As formas promastigotas de *L. amazonensis* incubadas na presença ou na ausência do inibidor de calpaínas a 19  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) e 30  $\mu\text{M}$  (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006c) por 72 h foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão. As células foram fixadas em formaldeído 4%, glutaraldeído 2,5%, e  $\text{CaCl}_2$  5 mM em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) por 1 h à temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas por 1 h em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% em tampão cacodilato. Os promastigotas foram então desidratados em concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 90% e duas vezes 100%) e incluídos em resina Epon. Foram realizados cortes ultrafinos, que após serem acondicionados em grades de cobre de 300 mesh foram contrastados com acetato de uranila 5% por 30 min e citrato de chumbo por 5 min. A observação dos cortes foi realizada ao microscópio eletrônico de transmissão FEI Morgagni F 268 (SOUTO-PADRÓN *et al.*, 1990).

### 3.6. Detecção da externalização de fosfatidilserina

Promastigotas de *L. amazonensis* ( $5 \times 10^6$  células) foram incubados ou não na presença de 19  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) e 30  $\mu\text{M}$  do inibidor de calpaínas por 72 h. Posteriormente, os parasitos foram centrifugados (4500 g / 5 min) e lavados 3 $\times$  em PBS gelado. As células foram ressuspensas em 100  $\mu\text{l}$  de tampão (HEPES 10 mM; NaCl 140 mM;  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM; pH 7,3) contendo anexina V conjugada à Alexa-fluor na diluição de 1:200 e foram incubadas por 20 min à temperatura ambiente protegido da luz. O volume final (500  $\mu\text{l}$ ) foi completado com tampão de FACS (PBS; 1% BSA; 0,01% azida) contendo iodeto de propídio (PI) a uma concentração final de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . A intensidade da marcação com anexina V conjugada à Alexa-Fluor foi observada em citômetro de fluxo (EPICS ELITE flow cytometer - Coulter Eletronics, Hialeah, FL, USA) equipado com laser de argônio 15 mW com emissão a 488 nm e analisada através do software CellQuest. A porcentagem de células positivas foi calculada para cada histograma. A miltefosina, um conhecido indutor de apoptose em parasitos do gênero *Leishmania* (40  $\mu\text{M}$  por 24 h), foi utilizado como controle positivo (PARIS *et al.*, 2004).

### 3.7. Análise do ciclo celular

Promastigotas de *L. amazonensis* ( $10^7$  células) tratados ou não com o inibidor de calpaínas a 19  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) e 30  $\mu\text{M}$  por 72 h foram centrifugados (4500 g / 5 min) e lavados 2 $\times$  em PBS. Os sedimentos foram fixados em 1 ml de metanol 70% diluído em PBS e incubados overnight por 15 h a  $-20^\circ\text{C}$ . Após a incubação, as células foram lavadas 2 $\times$  em PBS e ressuspensas em 1 ml de PBS suplementado com PI (10  $\mu\text{g/ml}$ ) e RNase A (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Após 45 min de incubação à temperatura ambiente, a intensidade de fluorescência foi mensurada por citometria de fluxo e analisada através do software CellQuest (PARIS *et al.*, 2004; AMBIT *et al.*, 2008).

### 3.8. Análise de fragmentação do DNA por TUNEL (“Transferase dUTP Nick End Labeling”)

A análise da fragmentação do DNA em promastigotas de *L. amazonensis* foi realizada utilizando-se o kit APO-BrdUTM TUNEL Assay (Invitrogen) e o método de preparação das amostras foi realizado segundo as instruções do fabricante.

Promastigotas ( $2 \times 10^6$  células) incubados ou não por 72 h na presença do inibidor de calpaínas a 19  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) e 30  $\mu\text{M}$  foram lavados e ressuspensos em 100  $\mu\text{l}$  de PBS. Esta suspensão de células foi incubada com 1 ml de paraformaldeído 1% diluído em PBS e mantida no gelo por 15 min. Após este período, as células foram centrifugadas (4500 g / 5 min), lavadas e o sobrenadante foi descartado. Após, adicionou-se às células 1000  $\mu\text{l}$  de etanol 70% gelado e estas foram incubadas overnight por 15 h a  $-20^\circ\text{C}$ . Após o período de incubação, as células foram centrifugadas para a remoção do etanol e, em seguida, foram ressuspensas em 200  $\mu\text{l}$  de PBS e centrifugadas a 4500 g / 5 min Este procedimento foi repetido duas vezes. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 10  $\mu\text{l}$  de solução para marcação de DNA (2  $\mu\text{l}$  de tampão de reação; 0,15  $\mu\text{l}$  de TdT [deoxinucleotidil transferase terminal]; 1,6  $\mu\text{l}$  de BrdU [5-bromo-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato] e o volume final foi completado para 10  $\mu\text{l}$  com água deionizada). A incubação foi realizada por 1 h a  $37^\circ\text{C}$  em banho-maria. A cada intervalo de 15 min, as células foram agitadas para mantê-las em suspensão. Ao término da incubação, foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de tampão de enxágüe (Triton X-100 0,1% e BSA 5 mg/ml diluído em PBS) e as células foram centrifugadas (4500 g) por 5 min. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 20  $\mu\text{l}$  de uma solução contendo o anticorpo anti-BrdU. As células foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente e, posteriormente, analisadas por citometria de fluxo.

### **3.9. Análise de fragmentação do DNA por eletroforese em gel de agarose**

Promastigotas ( $10^8$  células) tratados ou não tratados com o inibidor de calpaínas a 19  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) e 30  $\mu\text{M}$  foram lisados em tampão (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5; EDTA 5 mM, SDS 0,5%; NaCl 200 mM; 100  $\mu\text{g/ml}$  pronase E), agitados e incubados por 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, foi adicionado ao lisado celular o dobro do volume de etanol absoluto e as amostras foram homogeneizadas. As amostras foram centrifugadas por 15 min a 14.000 g e os sobrenadantes foram descartados. O sedimento foi seco à temperatura ambiente e o DNA genômico foi ressuspensão em 200  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM (pH 7,5).

A corrida eletroforética foi realizada em gel de agarose preparado a uma concentração de 1,2% (p/v) em tampão TAE (Tris HCl 40 mM; EDTA 1 mM, pH 7,9 ajustado com ácido acético) por 2 h a 80 V. A quantidade de amostra aplicada no gel foi de 10  $\mu\text{L}$ , acrescida de 1/3 desse volume (aproximadamente 3,3  $\mu\text{l}$ ) de solução corante para

eletroforese (glicerol 50%; EDTA 20 mM; azul de bromofenol 0,05%; xileno cianol 0,05%, pH 7,5). Após a corrida, o gel foi incubado em solução de brometo de etídio (1 µg/ml) por 15 min e em água destilada pelo mesmo tempo. A visualização foi realizada utilizando luz ultravioleta.

➤ **Parte 2: Análise dos efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a interação de *L. amazonensis* com macrófagos peritoneais de camundongos**

**3.10. Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos**

Camundongos da linhagem BALB/c, com aproximadamente 3 meses de idade e fêmeas, foram previamente estimulados com injeção intraperitoneal de tioglicolato 3%. Após 4 dias, os macrófagos foram obtidos através da lavagem da cavidade peritoneal de utilizando-se PBS estéril (pH 7,2). Os macrófagos peritoneais ( $5 \times 10^5$  células) foram plaqueados em lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro em placa de 24 poços. Para aderência das células, as placas foram incubadas por 1 h a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e, posteriormente, os macrófagos foram lavados com PBS a 37°C para remoção das células não-aderidas.

**3.11. Efeitos do inibidor de calpaínas durante o processo de interação de *L. amazonensis* com macrófagos peritoneais (Pré-tratamento)**

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram pré-incubadas por 1 h à temperatura ambiente na presença de diferentes concentrações do inibidor de calpaínas (15, 19 e 30 µM). Após este período, a viabilidade das células foi determinada utilizando-se o ensaio de MTT, onde a conversão de (bromidrato de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) em formazan por enzimas mitocondriais serve como indicador de viabilidade celular e a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas (DUTTA *et al.*, 2005). As concentrações do inibidor de calpaínas capazes de manter 90% do número de parasitos viáveis, em relação ao controle, foram utilizadas no ensaio de interação. Os parasitos na fase estacionária de crescimento foram então pré-tratados por 1 h na presença do inibidor de calpaínas (15, 19 e 30 µM) e, após serem lavados, foram incubados com macrófagos peritoneais na proporção protozoário:

célula hospedeira de 5:1. A interação foi realizada por 1 h a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em meio DMEM suplementado com 2% de SFB. Após este período, os protozoários não-aderidos foram removidos por lavagens sucessivas em PBS. As células 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 aleatória 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 amastigotas por macrófagos infectados (SANTOS *et al.*, 2009).

### **3.12. Ensaio de viabilidade dos macrófagos**

O efeito do inibidor de calpaínas sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais foi avaliada por ensaio de exclusão do corante vital azul de tripan. Os macrófagos foram plaqueados na proporção de  $5 \times 10^5$  células/ poço e incubados na presença e na ausência de diferentes concentrações do inibidor de calpaínas e com DMSO (diluente do inibidor) referente à maior concentração utilizada no experimento. Após 24, 48 e 72 h, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer utilizando-se o corante vital azul de tripan. Foram quantificadas as células vivas e as células mortas.

### **3.13. Efeitos do inibidor de calpaínas após o estabelecimento da infecção por *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais (Pós-tratamento)**

Para verificar a ação do inibidor de calpaínas após o estabelecimento da infecção, os macrófagos peritoneais foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária de crescimento a uma proporção de 5:1 (parasitos/macrófago) e incubados por 1 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> em meio DMEM suplementado com 2% de SFB. Os parasitos livres foram removidos por lavagens sucessivas com PBS (pH 7,2) a 37°C e o inibidor de calpaínas foi adicionado às culturas nas concentrações de 15, 19 e 30 µM. Após 24, 48 e 72 h de incubação, as células foram lavadas com PBS 37°C, fixadas e coradas como descrito no item 3.8. O número de amastigotas e a porcentagem de macrófagos infectados foram determinados por contagem de pelo menos 200 células em duplicatas das culturas.

### 3.14. Produção de óxido nítrico

Os sobrenadantes das interações descritas nos itens 3.8 e 3.10 foram coletados após 48 h para determinação da produção de óxido nítrico pela reação de Griess (SOARES *et al.*, 2007). A reação foi lida a 540 nm e a concentração de  $\text{NO}_2^-$  determinada utilizando-se como referência a curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos em concentração micromolar de nitrito. Alternativamente, foram realizados sistemas controle onde os macrófagos peritoneais foram incubados apenas na presença do inibidor de calpaínas (15, 19 e 30  $\mu\text{M}$ ), na presença de DMSO (veículo do inibidor) ou na presença de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (20 ng/ml).

### 3.15. Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para verificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos peritoneais, foi utilizada uma sonda não-fluorescente ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ), que é convertida para fluorescente por radicais livres após a formação de diclorofluoresceína (DUTTA *et al.*, 2007b). Os macrófagos peritoneais foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária de crescimento a uma proporção de 5:1 (parasitos/macrófago) e incubados por 1 h a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  em meio DMEM suplementado com 2% de SFB. Os parasitos livres foram removidos por lavagens com PBS (pH 7,2) a 37°C e o inibidor de calpaínas foi adicionado às culturas nas concentrações de 15, 19 e 30  $\mu\text{M}$ . Após 24 h, as células foram lavadas 2× com PBS e tripsinizadas por 5 min a 37°C em atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$ . As células tripsinizadas foram adicionadas a 300  $\mu\text{l}$  de meio DMEM suplementado com SFB 10% e centrifugadas a 1800 g por 6 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS gelado e incubadas com 100  $\mu\text{l}$  da sonda ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) na proporção de 1:1000. Após 30 min de incubação a 37°C em banho-maria, o volume final foi aumentado para 500  $\mu\text{l}$  com adição de PBS e as células foram novamente centrifugadas e incubadas em banho-maria a 37°C em 300  $\mu\text{l}$  de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Em seguida, as células foram centrifugadas, os sobrenadantes descartados e o volume final foi elevado para 300  $\mu\text{l}$  com tampão de FACS (PBS, 1% BSA, 0,01% azida). Para detecção das espécies reativas de oxigênio, as células foram analisadas por citometria de fluxo.

### **Parte 3: Análise dos efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis***

#### **3.16. Manutenção e obtenção das formas infectivas**

As cepas de *L. amazonensis* foram mantidas através da inoculação em patas de fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c para manutenção da infectividade. Esta manutenção foi realizada através de injeções subcutâneas nas patas traseiras de cada fêmea contendo o inóculo de  $1 \times 10^7$  parasitos na fase estacionária, devidamente lavados e ressuspensos em PBS estéril. A cada 15 dias, com o auxílio de um paquímetro, o tamanho da pata foi aferido para o controle da infecção. Após estabelecimento da infecção (cerca de 3 meses), os animais foram sacrificados para retirada das patas infectadas. Os tecidos obtidos a partir das patas foram macerados em meio DMEM acrescido de 10% de SFB e antibióticos (estreptomicina, 40µg/ml, e ceftazidina, 35 µg/ml). Este macerado foi peneirado e adionado a garrafas de cultura contendo meio Schneider suplementado com 20% de SFB. Estas garrafas de cultura foram mantidas a 26°C durante 72 h para diferenciação e crescimento dos parasitos.

#### **3.17. Análise do efeito do inibidor de calpaínas sobre a taxa de multiplicação de formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis***

O efeito do inibidor de calpaínas foi analisado sobre a taxa de multiplicação de formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis*. Os promastigotas foram contados em câmara de Neubauer e ressuspensos em meio Schneider fresco a uma concentração final de  $10^6$  parasitos/ml. O inibidor de calpaínas foi adicionado à cultura em concentrações finais que variaram de 2,5 a 30 µM. DMSO (utilizado na maior diluição do inibidor) foi utilizado como controle. Após 24, 48, 72 e 96 h de incubação a 26°C, o número de promastigotas viáveis foi quantificado por contagem dos parasitos em câmara de Neubauer. A viabilidade foi avaliada através da motilidade e exclusão do corante vital azul de tripan (SANTOS *et al.*, 2009). O IC<sub>50</sub>, que se refere à concentração da droga que causa uma redução em 50% da sobrevivência dos parasitos em comparação à curva de crescimento controle, foi calculado através da regressão linear do número de promastigotas viáveis versus log da concentração da droga utilizando o software Origin Pro 7.5.

### **3.18. Efeitos do inibidor de calpaínas sobre a expressão de peptidases**

Promastigotas de *L. amazonensis* ( $5 \times 10^6$  células/ml) incubados na presença ou na ausência do inibidor de calpaínas a 19  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) e 30  $\mu\text{M}$  por 24 e 48 h foram lavados e fixados durante 30 min à temperatura ambiente em paraformaldeído 0,04% diluído em PBS. Após fixação, as células foram lavadas três vezes em PBS gelado. Os parasitos fixados foram analisados por microscopia óptica para observação da integridade morfológica. Os parasitos foram então incubados por 1 h com os anticorpos primários policlonais anti-Dm-calpaína (reativo contra a região C-terminal da calpaína de *Drosophila melanogaster* expressa em *E. coli* – cedido pelo Dr. Yasufumi Emori, Departamento de Biofísica e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Toquio, Japão) (Emori & Saigo, 1994), anti-cpb de *L. mexicana* (reativo contra cisteína peptidase b de *L. mexicana* – cedido pela Dra. Mary Wilson, Departamento de Medicina, Bioquímica, Microbiologia e Epidemiologia, Programa em Biologia Molecular, Universidade de Iowa, USA) e anti-gp63 (reativo contra gp63 recombinante de *L. mexicana* – cedido pelo Dr. Kwang-Poo Chang, Universidade de Ciências da Saúde, Chicago Medical School, USA), diluídos 1:500. Após este período, as células foram lavadas extensivamente em PBS e incubadas com o anticorpo secundário (IgG) conjugado à isotiocianato de fluoresceína (FITC) na diluição de 1:250. Finalmente, as células foram lavadas e examinadas por citometria de fluxo. Células não tratadas e tratadas somente com o anticorpo secundário foram utilizadas como controles negativos.

### **3.19. Análise da diferença na expressão de moléculas similares a calpaínas em formas promastigotas recém-isoladas e após diferentes passagens *in vitro***

A determinação da diferença nos níveis de expressão de moléculas similares às calpaínas foi verificada em promastigotas de *L. amazonensis* recém-isoladas dos tecidos das patas de fêmeas de camundongos infectadas e após sucessivas passagens *in vitro* (5 passagens). Os parasitos foram lavados e fixados durante 30 min à temperatura ambiente em paraformaldeído 0,04% diluído em PBS. Após fixação, as células foram lavadas três vezes em PBS gelado. Os parasitos foram então incubados por 1 h com o anticorpo primário anti-Dm-calpaína na diluição de 1:500 e por 1 h adicional na presença do anticorpo secundário conjugado à FITC na diluição de 1:250. As células foram lavadas e

analisadas por citometria de fluxo. O controle é representativo e refere-se à cepa recém-isolada e às cepas após as diferentes passagens (n=5).

### **3.20. Análises estatísticas**

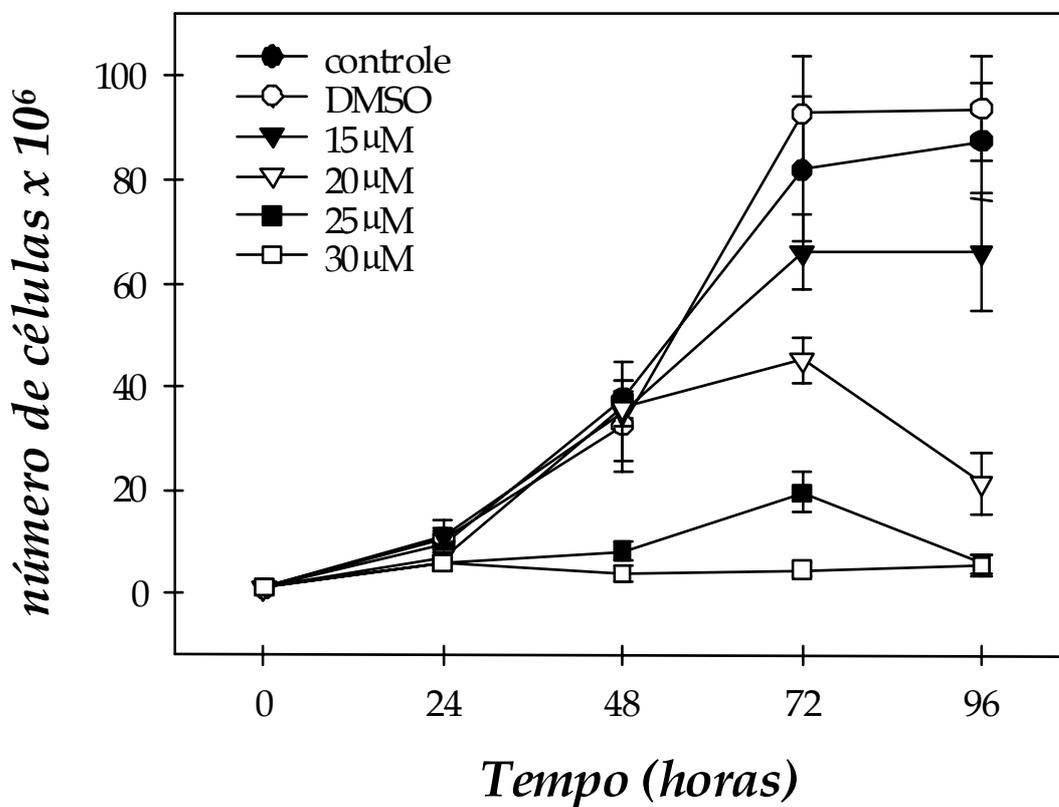
Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student usando o programa GraphPad Prism 3. Os valores de *P* menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

## IV) RESULTADOS

➤ **Parte 1: Avaliação dos efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.**

### **4.1. Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a taxa de proliferação de *L. amazonensis***

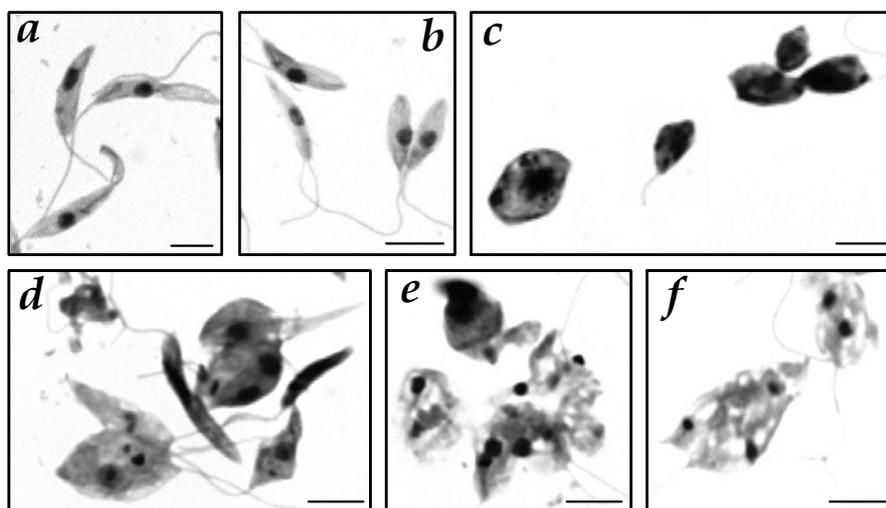
Com o objetivo de avaliar os efeitos do inibidor de calpaínas sobre a taxa de proliferação das formas promastigotas de *L. amazonensis*, o MDL28170 foi adicionado às culturas nas diferentes concentrações (variando de 15 a 30  $\mu\text{M}$ ) e o crescimento celular *in vitro* foi monitorado por 4 dias. Os resultados demonstraram que o inibidor de calpaínas foi capaz de reduzir o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* de maneira dose-dependente (Figura 10). O inibidor na concentração de 30  $\mu\text{M}$  induziu uma drástica redução na proliferação celular, com o decréscimo de 38%, 90%, 94% e 95% após 24, 48, 72 e 96 h, respectivamente. As menores concentrações do inibidor (15 e 20  $\mu\text{M}$ ) apresentaram efeitos inibitórios significativos somente após 72-96 h de crescimento (Figura 10). O DMSO (referente à maior concentração utilizada do inibidor) não apresentou nenhum efeito significativo sobre a taxa de crescimento dos parasitos. O  $\text{IC}_{50}$  após 72 h foi de 19  $\mu\text{M}$ . A atividade antileishmania observada nos experimentos de proliferação foi irreversível (dados não mostrados). Os promastigotas que foram cultivados por 72 h na presença do inibidor de calpaínas a 30  $\mu\text{M}$  não foram capazes de restabelecer o seu crescimento em meio Schneider fresco na ausência do inibidor.



**Figura 10. Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a taxa de proliferação de *L. amazonensis*.** A taxa de proliferação de *L. amazonensis* foi monitorada quando os parasitos foram cultivados a 26°C na ausência (controle), na presença de MDL28170 nas concentrações que variaram de 15 a 30 μM ou na presença do DMSO (solvente do inibidor). O inibidor de calpaínas foi adicionado às culturas no dia 0 (zero) e as células foram contadas diariamente em câmara de Neubauer utilizando o corante vital azul de tripan. Os resultados mostrados no gráfico representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. As barras representam o desvio padrão.

#### **4.2. Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a morfologia das formas promastigotas de *L. amazonensis***

Corroborando com os resultados observados nos ensaios de proliferação, as imagens de microscopia óptica das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o inibidor de calpaínas a 30  $\mu$ M por 72 h demonstraram intensa deterioração e lise dos parasitos (Figura 11, e-f). As células não-tratadas (Figura 11, a) ou tratadas apenas com DMSO (Figura 11, b) não apresentaram alterações na morfologia. Os parasitos tratados com as menores concentrações do inibidor de calpaínas apresentaram alteração na forma do corpo celular, apresentando-se arredondado, bem como alteração no volume celular (Figura 11 c-d). Durante o processo de apoptose, promastigotas apresentam uma forma celular arredondada com condensação nuclear, características estas que são acompanhadas de fragmentação nuclear (SEN *et al.*, 2004). As imagens de microscopia óptica (Figura 11, c-d) demonstraram a existência de características morfológicas que são similares às observadas como sinais de apoptose. Desta forma, com o objetivo de avaliar se o inibidor de calpaínas era capaz de induzir apoptose nos promastigotas de *L. amazonensis*, foi feita análise da ultraestrutura dos parasitos.

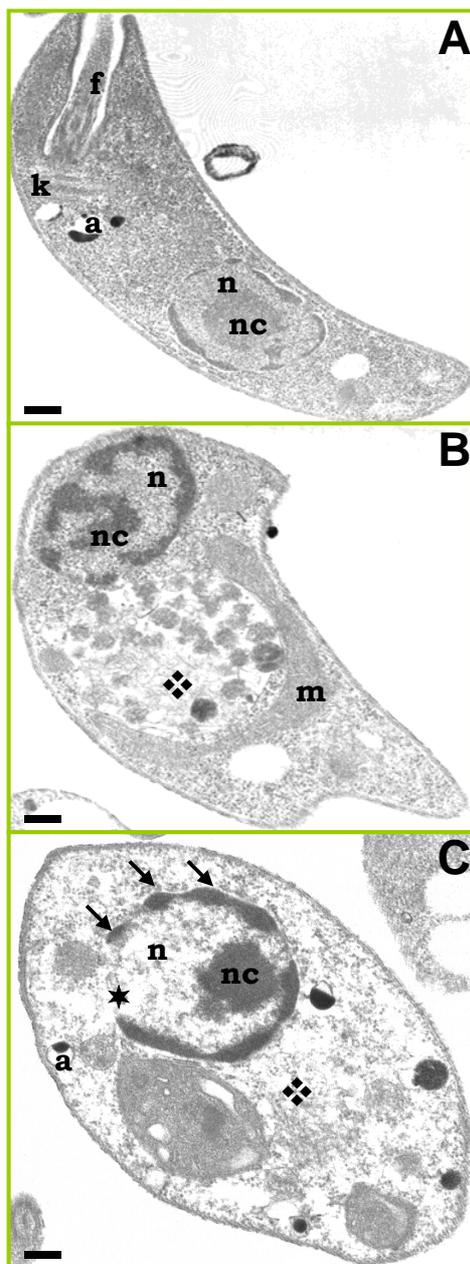


**Figura 11. Observações microscópicas da morfologia dos promastigotas de *L. amazonensis* incubados na ausência ou na presença do inibidor de calpaínas MDL28170.** Células controle foram cultivadas em meio Schneider (a), na presença de DMSO (solvente do inibidor) (b) ou na presença de 15 μM (c), 20 μM (d), 25 μM (e) ou 30 μM (f) de MDL28170. A alteração do volume celular pode ser observada (c-d) bem como a lise completa do parasito (e-f). As barras representam 1 μM.

#### **4.3. Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a ultraestrutura de promastigotas de *L. amazonensis***

Os efeitos do inibidor de calpaínas sobre a ultraestrutura de *L. amazonensis*, foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foi realizada uma comparação entre parasitos não-tratados ou tratados com o inibidor a 19  $\mu$ M (concentração referente ao IC<sub>50</sub> para promastigotas – D’AVILA-LEVY *et al.*, 2006c). As fotomicrografias das formas promastigotas mostradas na Figura 12 ilustram os parasitos com alterações ultraestruturais após 72 h de incubação com o inibidor MDL28170.

Em promastigotas não-tratados com o inibidor, não foram detectadas alterações ultraestruturais (Figura 12, A): os parasitos demonstraram uma morfologia normal, apresentando as suas estruturas celulares íntegras. No entanto, as células tratadas com o inibidor demonstraram uma intensa vacuolização no citoplasma (Figura 12, B). O inibidor foi capaz também de induzir danos no núcleo das células. Nesse contexto, o núcleo das células não-tratadas apresentou a cromatina íntegra (Figura 12, A), enquanto as células tratadas apresentaram um perfil de intensa condensação da cromatina na periferia da membrana nuclear, fragmentação da cromatina e perda da integridade nuclear (Figura 12, C). Estas alterações ultraestruturais são sugestivas de morte celular induzida por apoptose, corroborando com os resultados observados por microscopia óptica. Com intuito de confirmar se este mecanismo estava sendo induzido pelo inibidor de calpaínas foram analisados outros fenômenos bioquímicos associados à apoptose. O objetivo destas análises foi avaliar se outras características apresentadas por células em processo de apoptose como externalização de fosfatidilserina, alteração do ciclo celular e fragmentação do DNA nuclear seriam induzidas pelo inibidor de calpaínas.



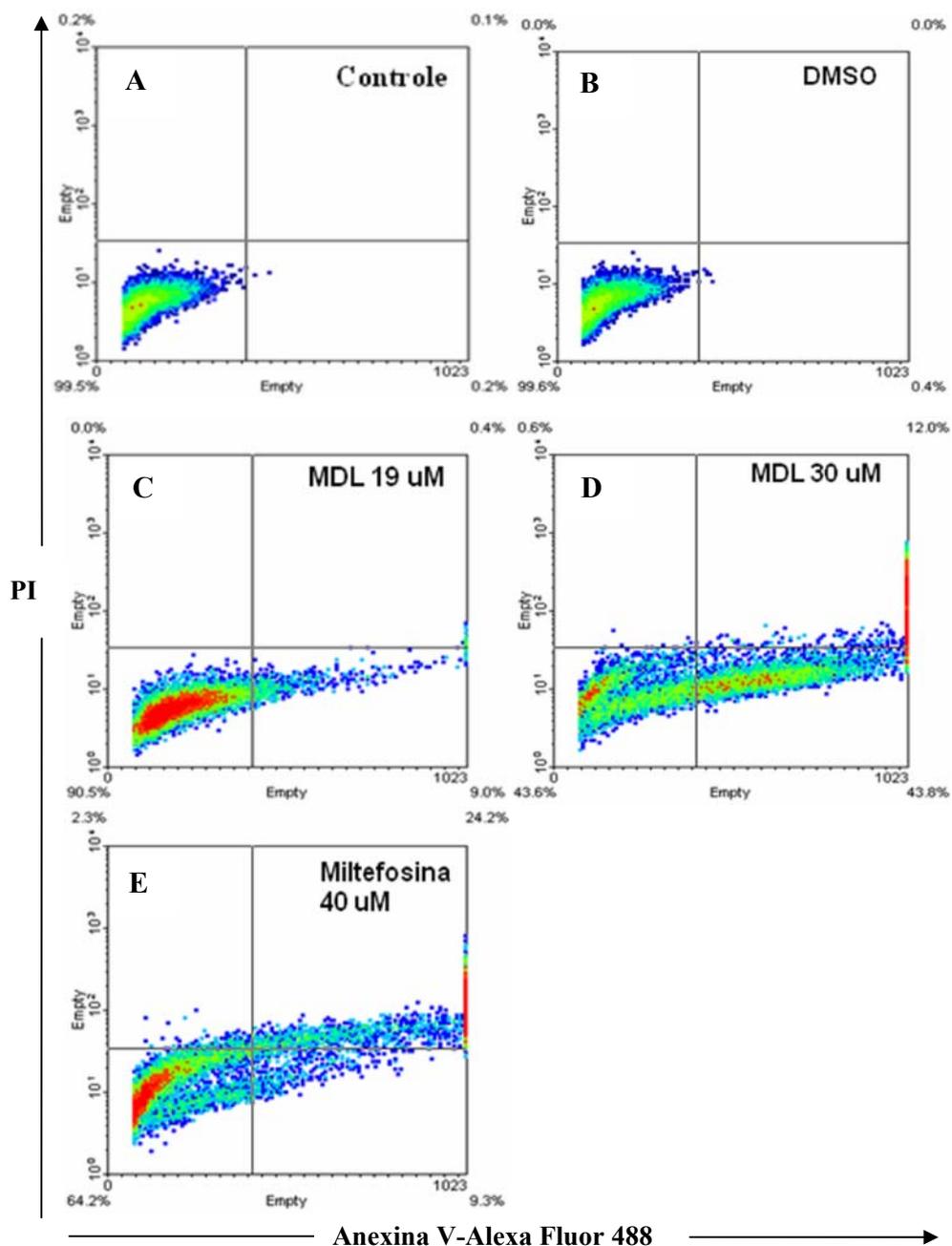
**Figura 12: Alterações ultraestruturais em *L. amazonensis* induzidas pelo tratamento com o inibidor de calpaínas MDL28170.** Os parasitos foram incubados na ausência (A) ou na presença (B e C) do inibidor de calpaínas MDL28170 (19  $\mu$ M - IC<sub>50</sub> para promastigotas) e a ultraestrutura celular foi observada através de microscopia eletrônica de transmissão. Os promastigotas não-tratados apresentaram a cromatina íntegra localizada no centro do núcleo (A). As células tratadas com o inibidor (B-C) apresentaram intensa vacuolização do citoplasma (❖), condensação e fragmentação da cromatina (setas) e perda da integridade da membrana nuclear (★). Observe: a, acidocalcisomo; k, cinetoplasto; f, flagelo; m, mitocôndria; n, núcleo; nc, nucléolo. As barras representam 300 nm.

#### 4.4. Efeito do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a externalização de fosfatidilserina em promastigotas de *L. amazonensis*

A externalização da fosfatidilserina da membrana plasmática das células eucarióticas, originalmente presente na face interna da membrana, é uma alteração comum durante o processo de morte celular por apoptose (METHA & SHAHA, 2004). A anexina V, uma proteína dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  que se liga a fosfolípidos de membrana, possui uma alta afinidade pela fosfatidilserina, sendo rotineiramente utilizada para detectar estes fosfolípidos em células apoptóticas. No entanto, a anexina V pode marcar também as células necróticas, uma vez que estas perdem o controle de seletividade da membrana citoplasmática. Sendo assim, faz-se necessário a adição simultânea do PI, que não é capaz de penetrar em células com a membrana plasmática intacta, permitindo a distinção entre células apoptóticas e necróticas. As células apoptóticas são anexina-positiva e PI-negativa, as células necróticas são anexina e PI-positivas e as células viáveis são anexina e PI-negativas.

Para verificar a externalização de fosfatidilserina em promastigotas tratadas com o inibidor a 19 e 30  $\mu\text{M}$ , estas foram co-marcadas com anexina V conjugada à Alexa Fluor 488 e PI, sendo posteriormente analisadas por citometria de fluxo. A porcentagem de promastigotas tratadas com 19 e 30  $\mu\text{M}$  do inibidor por 72 h, e que foram positivas somente para anexina V, foi de 9% e 43,8%, respectivamente (Figura 13, C e D), mostrando ser um processo dependente da concentração do inibidor. A porcentagem de células anexina- e PI-positivas nestes sistemas foi de 0,4% e 12%, respectivamente, corroborando com os resultados anteriores que demonstraram um aumento no percentual de células marcadas após o aumento da concentração do inibidor. Não foi observada uma diferença significativa no número de células apoptóticas e necróticas após o aumento do tempo de incubação para 96 h (dados não mostrados). O sistema controle (células não-tratadas) ou as células tratadas somente com DMSO (referente à maior concentração utilizada do inibidor) foram anexina- e PI-negativos (Figura 13, A e B). Parasitos tratados por 24 h com miltefosina a 40  $\mu\text{M}$ , um conhecido indutor de apoptose em *Leishmania* (PARIS *et al.*, 2004), foram utilizados como um controle positivo neste experimento. O resultado mostrou que 9,3% das células apresentavam-se como anexina-positivas e PI-negativas e 24,2% das células anexina-positiva e PI-positivas (Figura 13, E). Estes resultados demonstraram que o inibidor de

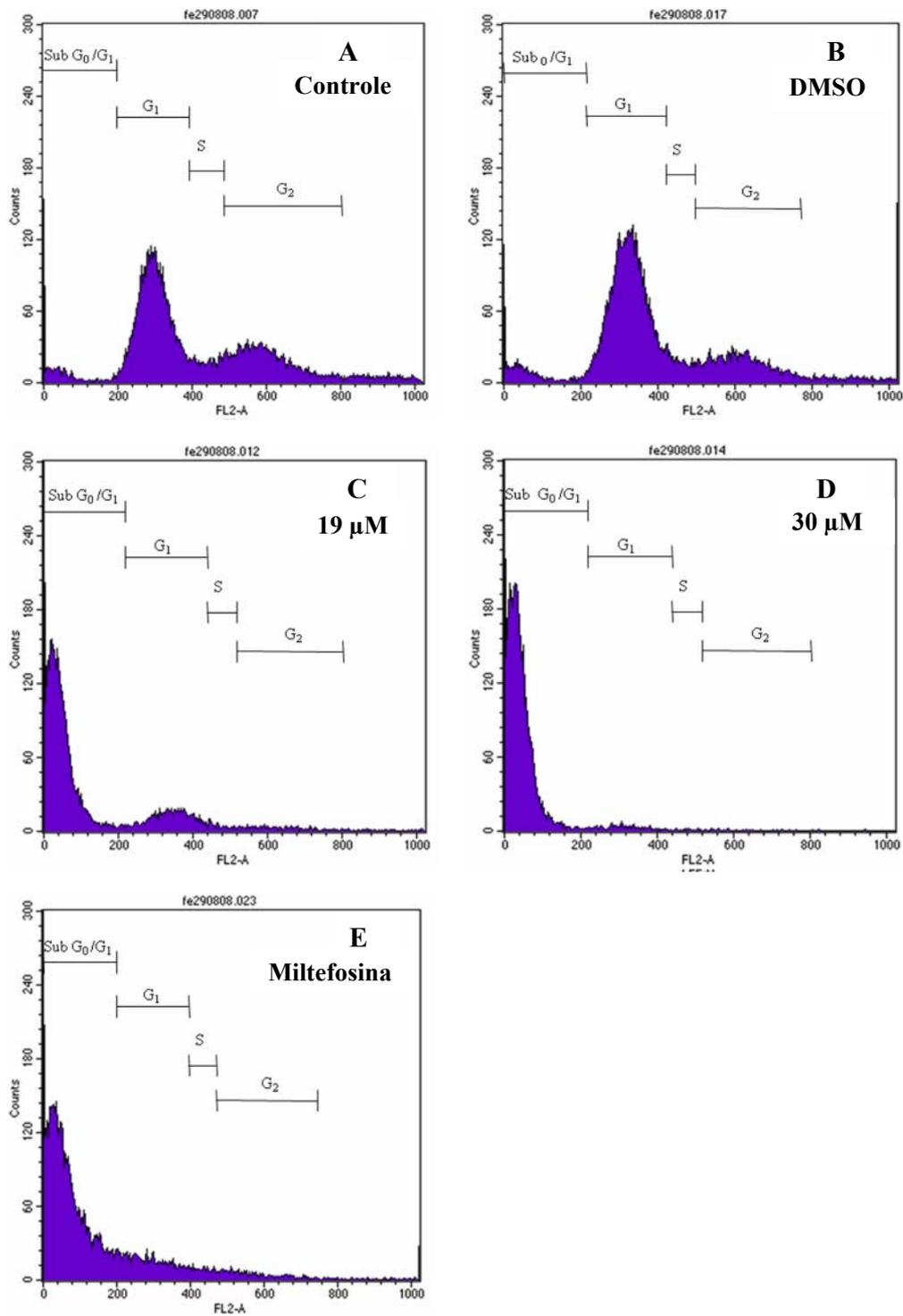
calpaínas foi capaz de diminuir a integridade da membrana celular, induzindo a externalização da fosfatidilserina, caracterizando eventos de apoptose neste tipo celular, corroborando os dados de microscopia eletrônica de transmissão.



**Figura 13: Externalização de fosfatidilserina em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o inibidor de calpaínas MDL28170.** As células foram incubadas na ausência (A) ou na presença do inibidor de calpaínas (C) e (D) por 72 h. Os promastigotas foram co-marcados com anexina V conjugada à Alexa Fluor 488 e PI, sendo posteriormente analisados por citometria de fluxo. Foram realizados controles utilizando DMSO (B), diluente do inibidor, e miltefosina (E), um conhecido indutor de apoptose em parasitos do gênero *Leishmania* (40  $\mu$ M / 24 h).

#### **4.5. Efeito do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre o ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis***

Visando determinar as alterações induzidas pelo inibidor de calpaínas sobre o ciclo celular de *L. amazonensis*, os parasitos foram tratados ou não com o inibidor e incubados na presença de PI, sendo posteriormente analisados por citometria de fluxo. A intensidade da marcação com PI é correlacionada com a quantidade de DNA e a fragmentação do DNA em células apoptóticas traduz uma baixa intensidade de fluorescência (células em fase sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>) quando comparadas com células na fase G<sub>1</sub> do ciclo celular (NICOLETTI *et al.*, 1991). O tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com o inibidor de calpaínas nas concentrações de 19 e 30 µM por 72 h foi capaz de induzir uma drástica alteração no ciclo celular dos parasitos (Figura 14, C e D). O inibidor induziu a um aumento significativo na proporção de células na fase sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, com conseqüente diminuição de células nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S (síntese) e G<sub>2</sub>/M, quando comparada às células controle que não foram expostas ao inibidor ou expostas somente ao DMSO (Figura 14, A e B). A miltefosina utilizada como controle positivo nos experimentos foi capaz de induzir a suspensão do ciclo celular, apresentando um grande número de células na fase sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (Figura 14, E). Estes resultados demonstraram que o inibidor de calpaínas foi capaz de interferir no ciclo celular dos promastigotas tratados induzindo a suspensão do mesmo. O perfil do ciclo celular apresentado nos experimentos pode significar eventos tardios de apoptose como a fragmentação internucleossomal do DNA e formação de corpos apoptóticos (DUTTA *et al.*, 2007b). Sendo assim, foram realizadas análises a fim de verificar se o inibidor de calpaínas era capaz de induzir a fragmentação do DNA em promastigotas de *L. amazonensis*. Estas análises foram realizadas através do ensaio de TUNEL e eletroforese em gel de agarose.



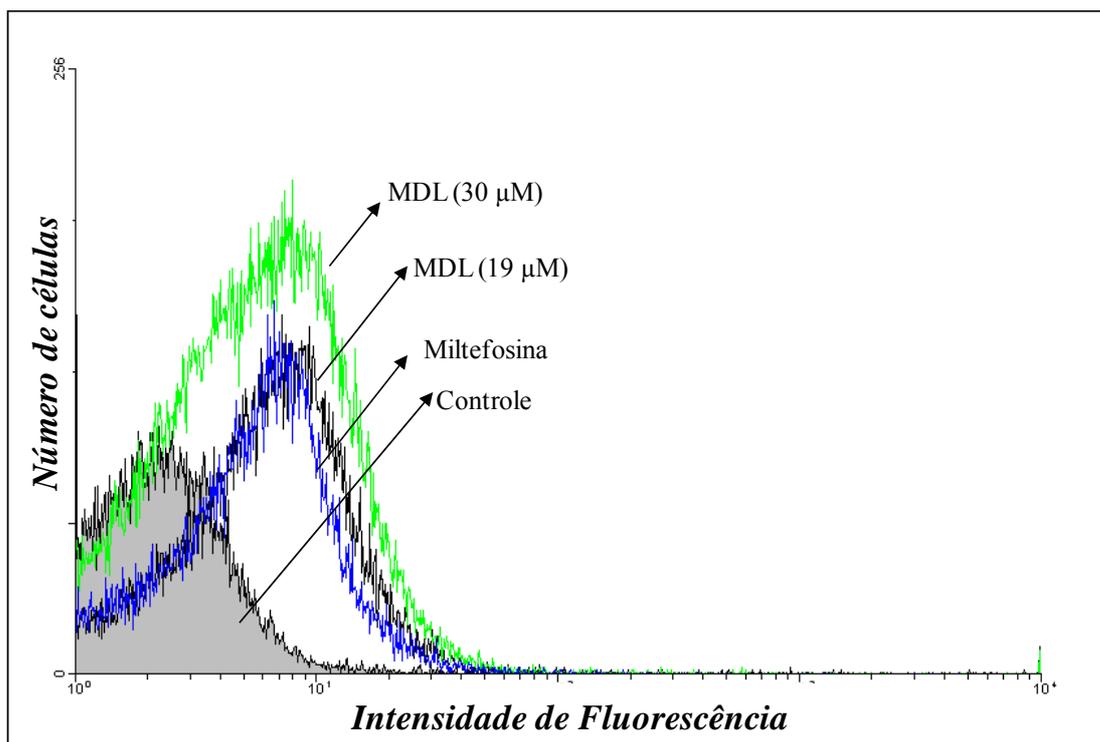
**Figura 14:** Análise do ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o inibidor de calpaínas MDL28170. Promastigotas foram incubados na ausência (A) ou na presença (C e D) do inibidor de calpaínas por 72 h, fixados em metanol, marcados com PI e analisados por citometria de fluxo. Foram realizados controles utilizando DMSO (B) e miltefosina (E) (40 µM/ 24 h).

#### **4.6. Efeito do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre o perfil de fragmentação de DNA em promastigotas de *L. amazonensis***

##### **4.6.1. Análise por ensaio de TUNEL (“Transferase dUTP Nick End Labeling”)**

A apoptose apresenta como uma de suas principais características a ativação de endonucleases, que degradam o DNA nuclear em fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases (ARENDS, MORRIS & WYLLIE, 1990). A detecção da clivagem internucleossomal do DNA está entre os fenômenos bioquímicos mais característicos e inerentes ao processo de apoptose (BORTNER, OLDENBURG & CIDLOWSKI, 1995). Com a técnica do TUNEL, é possível quantificar a proporção de fragmentos de DNA através da ligação de BrdU via TdT. Desta maneira, a quantidade de fragmentos de DNA é diretamente proporcional à fluorescência obtida através da incorporação de BrdU e marcação pelo anticorpo anti-BrdU conjugado à Alexa Fluor 488 (DUTTA *et al.*, 2007b).

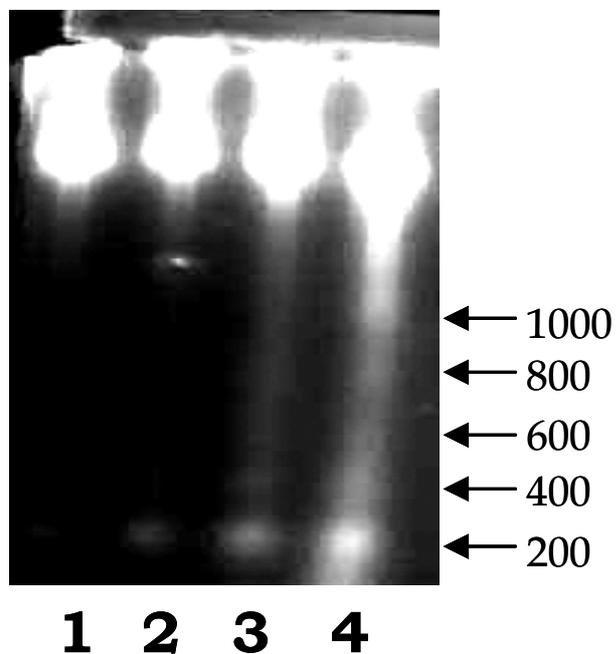
O tratamento dos promastigotas de *L. amazonensis* com o inibidor de calpaínas por 72 h nas concentrações de 19 e 30  $\mu\text{M}$  foi capaz de induzir a fragmentação do DNA. Este perfil pode ser observado na Figura 15, através da incorporação de BrdU e pelo aumento no número de células marcadas pelo anticorpo anti-BrdU. Os promastigotas tratados com miltefosina 40  $\mu\text{M}$  apresentaram uma intensa marcação pelo anticorpo anti-BrdU, como representado na Figura 15. O DMSO não foi capaz de induzir fragmentação do DNA (dados não mostrados).



**Figura 15:** Análise por ensaio de TUNEL da fragmentação de DNA em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o inibidor de calpaínas MDL28170. Os promastigotas foram incubados na ausência (controle) ou na presença do inibidor de calpaínas (MDL 19 μM) e (MDL 30 μM) por 72 h. As células foram fixadas, marcadas com BrdU na presença de TdT, incubadas com o anticorpo anti-BrdU conjugado à Alexa Fluor 488 e analisadas por citometria de fluxo. A miltefosina (40 μM/ 24 h) foi utilizada como controle positivo.

#### 4.6.2. Análise por eletroforese em gel de agarose

A fim de verificar o perfil de fragmentação do DNA, foram realizadas análises de eletroforese em gel de agarose utilizando o DNA total extraído de promastigotas tratados ou não-tratados com o inibidor de calpaínas. Através desta análise foi possível verificar a degradação do DNA em fragmentos oligonucleossomais (múltiplos de 200 pares de base). Este perfil é tipicamente observado em células apoptóticas de mamíferos (WYLLIE, KERR & CURRIE, 1980). Nas células tratadas com o inibidor 19  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ), não foi possível observar uma fragmentação oligonucleossomal típica (Figura 16, linha 2). Nas células tratadas com o inibidor de calpaínas a 30  $\mu\text{M}$  e miltefosina a 40  $\mu\text{M}$ , foi possível observar a fragmentação do DNA em múltiplos de 200 pares de bases, perfil característico de apoptose (Figura 16, linha 3 e linha 4). Nas células não-tratadas, utilizadas como controle, nenhuma fragmentação do material genético foi observada (Figura 16, linha 1), bem como o DMSO não foi capaz de induzir fragmentação do DNA (dados não mostrados). Os dados apresentados corroboram com os resultados anteriores na sustentação da hipótese de que o inibidor de calpaínas estaria induzindo a morte celular por apoptose em promastigotas de *L. amazonensis*.

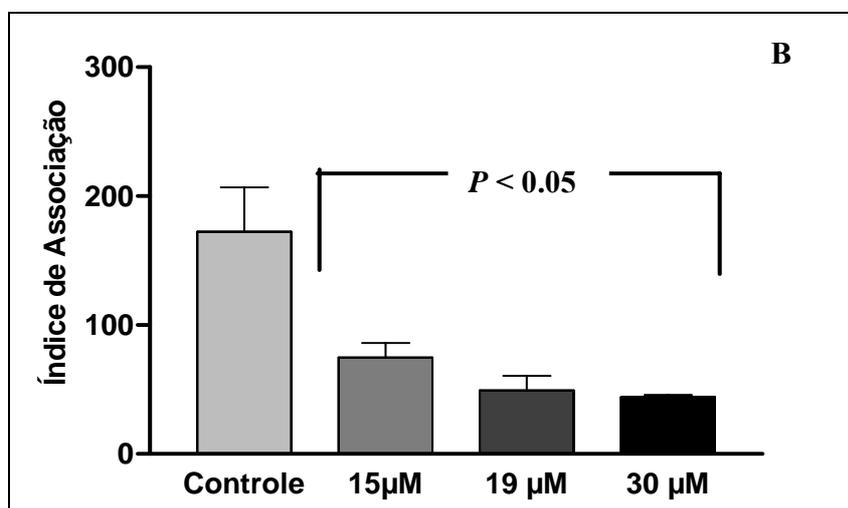
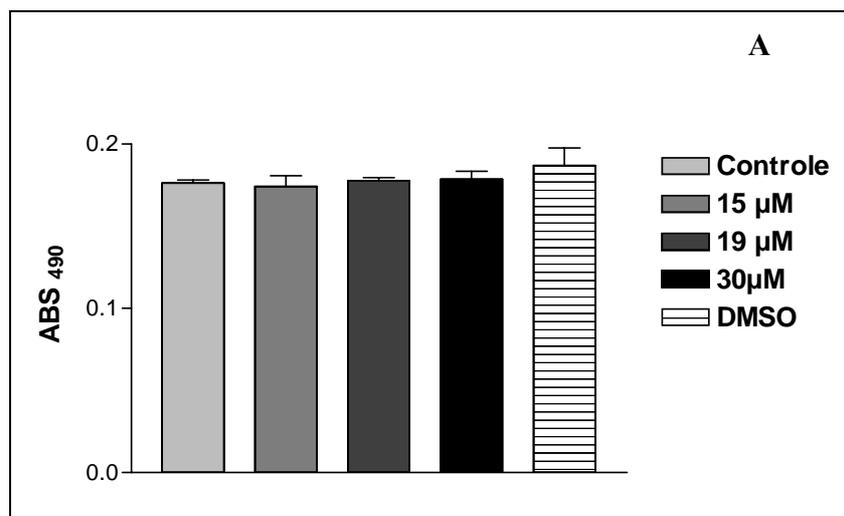


**Figura 16: Análise por eletroforese em gel de agarose da fragmentação de DNA em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o inibidor de calpaínas MDL28170.** O perfil de degradação do DNA dos promastigotas não tratados (linha 1) ou tratados com o inibidor de calpaínas a 19  $\mu$ M (linha 2) e 30  $\mu$ M (linha 3) por 72 h é demonstrado no gel. A miltefosina (40  $\mu$ M/ 24 h) foi utilizada como controle positivo (linha 4).

## **Parte 2: Avaliação dos efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a interação de *L. amazonensis* com macrófagos peritoneais de camundongos**

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

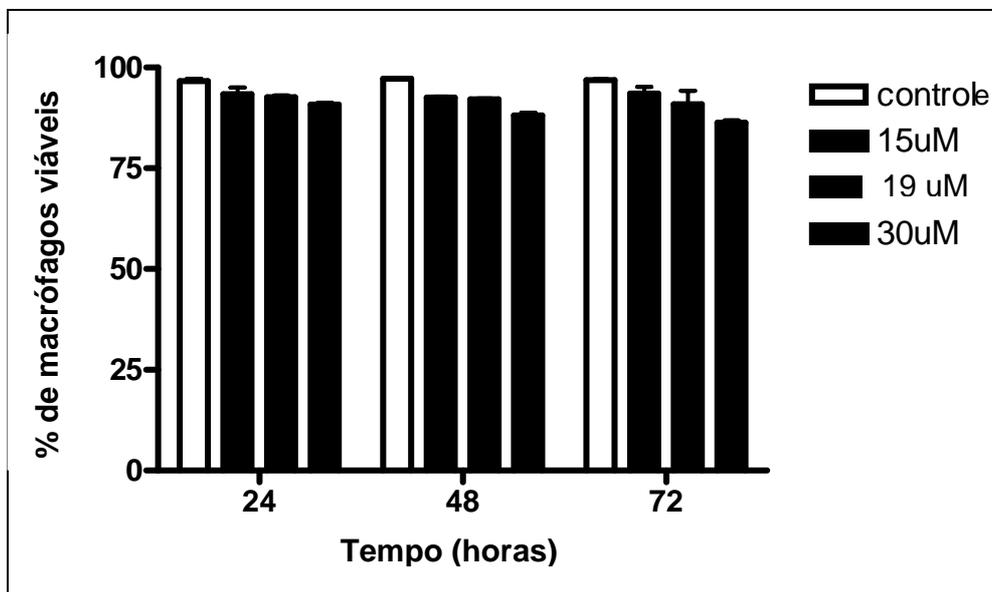
Com o objetivo de verificar a ação do inibidor de calpaínas sobre a interação de *L. amazonensis* com macrófagos peritoneais, os parasitos foram pré-tratados com o inibidor (15, 19 e 30  $\mu\text{M}$ ) por 1 h à temperatura ambiente. Após o teste de viabilidade utilizando-se o ensaio de MTT, foi possível observar que todas as concentrações testadas (15, 19 e 30  $\mu\text{M}$ ) foram capazes de manter 100% da viabilidade dos parasitos, como demonstrado na Figura 17, A. A partir deste ensaio, os parasitos foram incubados com as diferentes concentrações do inibidor por 1 h, em seguida, lavados e colocados para interagir com os macrófagos por mais 1 h a 37°C/5%CO<sub>2</sub>. Após este período, os parasitos não-aderidos foram removidos e as lamínulas foram fixadas e coradas com Giemsa. O porcentual do índice de associação dos parasitos com os macrófagos está representado na Figura 17, B. O inibidor de calpaínas foi capaz de reduzir o índice de associação dos parasitos em 63,79%, 76,13% e 78,67%, nas concentrações de 15, 19 e 30  $\mu\text{M}$  respectivamente, quando comparados ao controle não tratado. Estes resultados demonstraram, portanto, que o inibidor de calpaínas foi capaz de induzir uma redução dose-dependente no porcentual do índice de associação dos parasitos com os macrófagos (Figura 17, B).



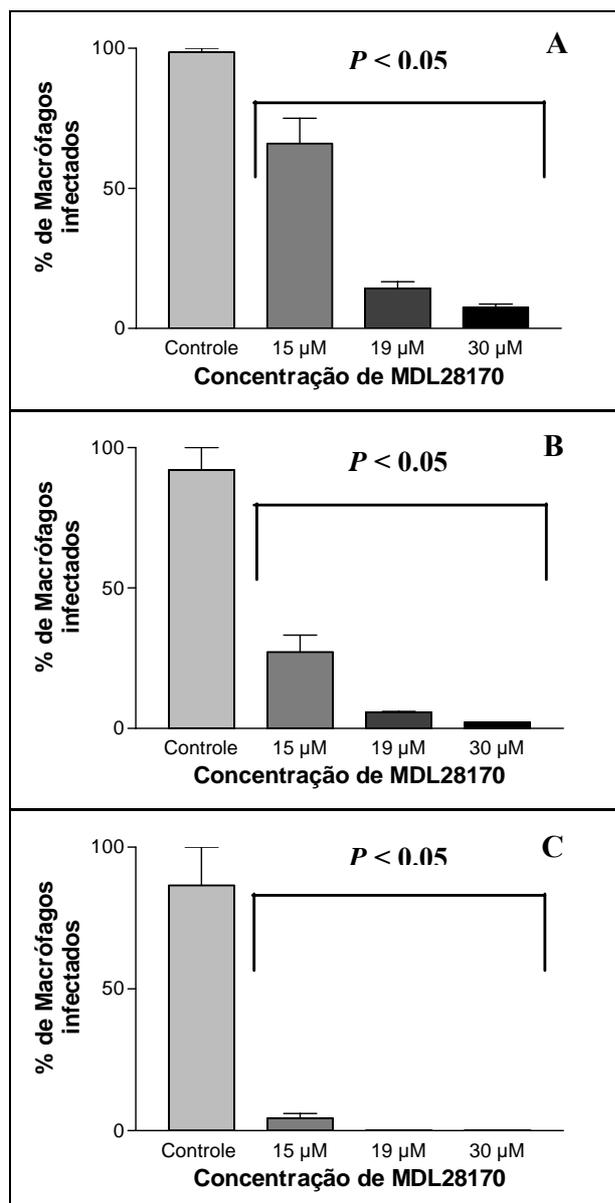
**Figura 17:** Efeitos do pré-tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com o inibidor de calpaínas MDL28170 durante o processo de interação com macrófagos peritoneais. (A) Teste de citotoxicidade do inibidor de calpaínas sobre promastigotas de *L. amazonensis*. Os parasitos ( $10^6$  células) foram incubados por 1 h à temperatura ambiente com diferentes concentrações do inibidor (15, 19 e 30  $\mu$ M) e posteriormente foram avaliados quanto a viabilidade através de ensaio utilizando o MTT. (B) Os macrófagos foram infectados com as formas promastigotas de *L. amazonensis* pré-tratadas por 1 h a 37°C, as monocamadas foram lavadas, fixadas e coradas com Giemsa. O índice de associação foi determinado pela contagem de pelo menos 200 células de cada duplicata. As barras representam o desvio padrão e os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os resultados foram considerados significativos ( $P < 0,05$ ).

#### **4.8. Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 após o estabelecimento da infecção dos macrófagos por *L. amazonensis* (Pós-tratamento)**

Inicialmente, foi testado o efeito isolado do inibidor de calpaínas sobre a viabilidade dos macrófagos peritoneais por ensaio de exclusão do corante vital azul de tripan. Como observado na Figura 18, todas as concentrações testadas (15, 19 e 30  $\mu\text{M}$ ) foram capazes de manter a viabilidade dos macrófagos em níveis similares ao controle não-tratado. O DMSO não apresentou nenhum efeito sobre a viabilidade dos macrófagos peritoneais (dados não mostrados). A partir deste experimento, então, as concentrações testadas no ensaio de viabilidade foram utilizadas nos ensaios de interação com macrófagos. Os macrófagos foram previamente infectados por 1 h com promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária de crescimento na proporção de 5:1 (parasitos/macrófagos). Após este período, os promastigotas não-aderidos foram removidos por sucessivas lavagens e foram adicionados às culturas meio DMEM novo acrescido do inibidor de calpaínas em diferentes concentrações. As culturas permaneceram incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 24, 48 e 72 h e, após este período, foram fixadas e coradas com Giemsa. Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 19 (A, B e C). Nas primeiras 24 h de tratamento, foi possível observar a redução do número de macrófagos infectados em 32,4, 84,15 e 90,95% nas concentrações de 15, 19 e 30  $\mu\text{M}$ , respectivamente, quando comparados ao sistema controle (Figura 19, A). Após 48 h de tratamento, a redução foi de 64,8, 86,2 e 90% quando comparada ao controle (Figura 19, B) e com 72 h de incubação com o inibidor, o resultado foi drástico, apresentando uma redução de 82,2% na concentração de 15  $\mu\text{M}$  e de 100% nas concentrações de 19 e 30  $\mu\text{M}$ , quando comparados ao controle (Figura 19, C). Os resultados demonstraram que o perfil de redução no número de macrófagos infectados ocorreu de maneira dose- e tempo-dependente (Figura 19, A, B e C).



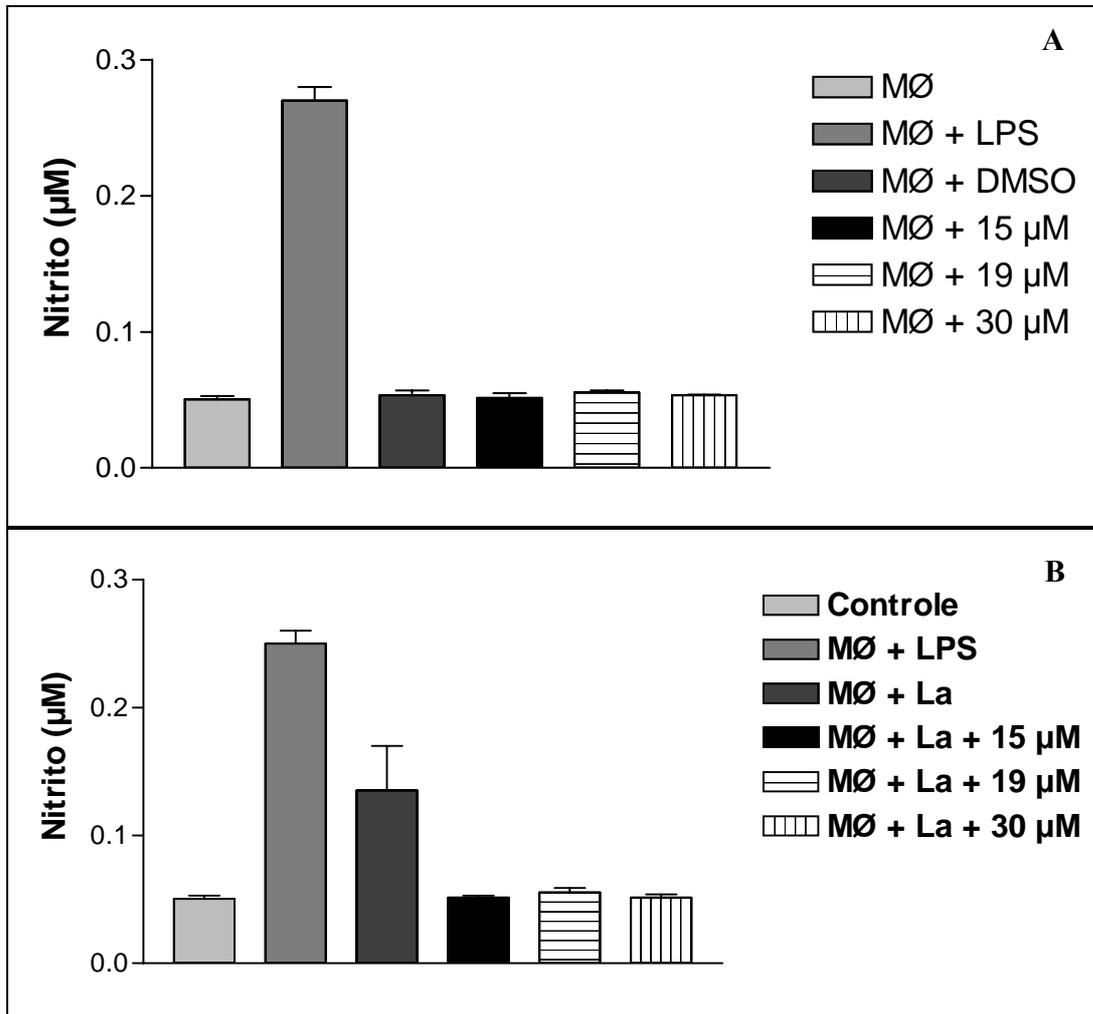
**Figura 18: Teste de citotoxicidade do inibidor de calpaínas MDL29170 sobre macrófagos peritoneais.** O efeito do inibidor sobre a viabilidade dos macrófagos peritoneais foi avaliado por ensaio de exclusão do corante vital azul de tripan. Os macrófagos foram incubados na ausência (controle) e na presença de diferentes concentrações do inibidor (15, 19 e 30  $\mu\text{M}$ ). Após 24, 48 e 72 h, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante vital azul de tripan. Foram contadas as células vivas e as células mortas. As barras representam o desvio padrão e os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em duplicata.



**Figura 19: Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre o processo de interação de *L. amazonensis* com macrófagos peritoneais.** Os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* por 1 h a 37°C. Posteriormente as monocamadas foram lavadas para a remoção dos parasitos não-aderidos e o inibidor de calpaínas foi adicionado às culturas nas concentrações de 15, 19 e 30 μM. Após 24 h (A), 48 h (B) e 72 h (C) de tratamento, as monocamadas foram fixadas e coradas com Giemsa. O percentual de macrófagos infectados foi determinado através da contagem de pelo menos 200 células de cada duplicata do experimento. As barras representam o desvio padrão e os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em duplicata. Os resultados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$  (Teste t de Student).

#### 4.9. Produção de Óxido Nítrico

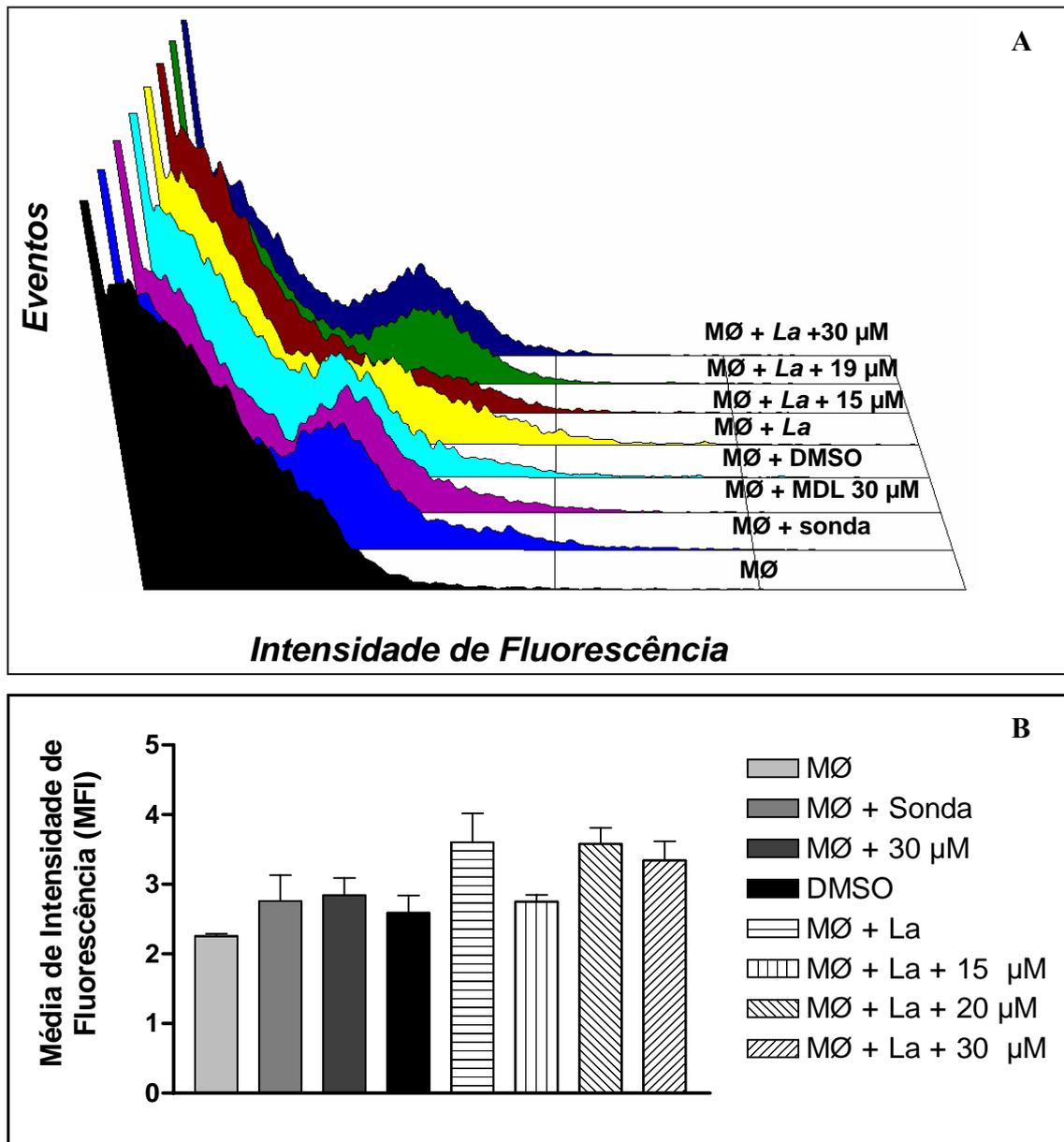
A produção de óxido nítrico (NO) é um importante mecanismo utilizado pelos macrófagos para o controle da infecção causada por parasitos do gênero *Leishmania* (SOARES *et al.*, 2007). Para verificar se a redução no porcentual de macrófagos infectados observada nos experimentos de pós-tratamento foi devido à ativação deste mecanismo, a produção de NO foi quantificada nos sobrenadantes de interação. Inicialmente, testamos se o inibidor de calpaínas seria capaz de induzir a produção de NO em macrófagos (Figura 20, A). Os resultados demonstraram que apenas a presença do inibidor não foi capaz de induzir a produção de NO, bem como a presença do DMSO, utilizado para diluir o inibidor (Figura 20, A). Nos sistemas infectados, os resultados demonstraram que após a incubação dos macrófagos com as diferentes concentrações do inibidor (15, 19 e 30  $\mu$ M), a produção de NO foi semelhante àquela observada nos macrófagos não-infectados (Figura 20, B). O LPS foi utilizado como controle positivo da produção de NO (Figura 20, A e B). Estes dados demonstraram que o inibidor de calpaínas não foi capaz de induzir um aumento na produção de NO, sugerindo que o efeito anti-*leishmania* observado na Figura 19 foi independente da produção de NO.



**Figura 20: Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais infectados ou não-infectados com *L. amazonensis*.** Os sobrenadantes de culturas de macrófagos não-infectados (A) ou infectados com promastigotas (B) foram coletados após 48 h de interação e a concentração de nitrito foi determinada pela reação de Griess, como descrito em material e métodos. As barras representam o desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

#### 4.10. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Os resultados apresentados na figura 20 demonstraram que a produção de NO, principal mecanismo apresentado por macrófagos no controle da infecção causada por parasitos do gênero *Leishmania*, não foi ativada pelo inibidor de calpaínas. A fim de investigar se outro mecanismo de morte celular estaria atuando na diminuição dos amastigotas intracelulares, foram realizadas medidas da produção de espécies reativas de oxigênio. Para esta análise foi utilizada uma sonda fluorescente (H<sub>2</sub>DCFDA) capaz de detectar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radicais hidroxil. A sonda fluoresce após a formação de diclorofluoresceína, sendo assim o aumento da intensidade de fluorescência detectada por citometria de fluxo indica o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (DUTTA *et al.*, 2007). Os resultados demonstraram que o inibidor de calpaínas não foi capaz de induzir um aumento na produção de ROS após 24 h de incubação, como observado na Figura 21. Quando o tempo de incubação foi aumentado para 48 h, o mesmo perfil de produção foi observado (dados não mostrados). Os níveis de ROS produzidos nos sistemas infectados tratados com o inibidor nas diferentes concentrações (15, 19 e 30  $\mu$ M) foram semelhantes aos observados nos sistemas controles (Figura 21). Estes dados demonstraram que o inibidor não foi capaz de ativar a produção de ROS pelos macrófagos infectados.

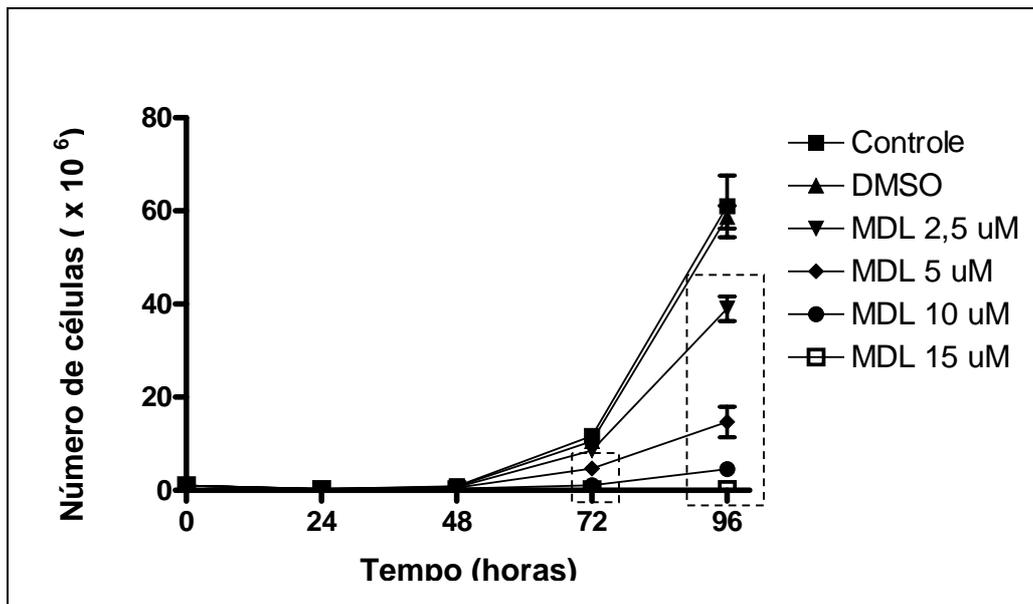


**Figura 21: Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos peritoneais infectados ou não-infectados com *L. amazonensis*.** (A) Os macrófagos infectados foram tratados ou não com o inibidor de calpaínas por 24 h. Após este período, as monocamadas foram tripsinizadas e as células foram incubadas com a sonda H<sub>2</sub>DCFDA na proporção de 1:1000. Após a incubação, as células foram centrifugadas, os sobrenadantes descartados e o volume final ajustado para 300 µl com tampão de FACS (PBS, 1% BSA, 0,01% azida). Para a detecção das ROS, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. (B) A média de intensidade de fluorescência foi calculada. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### **Parte 3: Avaliação dos efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre formas promastigotas infectivas, recém isoladas de camundongos, de *L. amazonensis***

#### **4.11. Efeitos do inibidor sobre a taxa de multiplicação de formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis***

Com o objetivo de avaliar a ação do inibidor de calpaínas sobre a proliferação de formas promastigotas de *L. amazonensis* recém-isoladas de camundongos infectados, o mesmo foi adicionado às culturas nas concentrações que variaram de 2,5 a 15  $\mu\text{M}$  e a taxa de multiplicação foi monitorada por 4 dias *in vitro*. Os ensaios de viabilidade dos parasitos foram realizados através de contagem em câmara de Neubauer utilizando o corante vital azul de tripan. Os resultados demonstraram que o inibidor foi capaz de reduzir o crescimento das formas infectivas de maneira dose-dependente (Figura 22). As maiores concentrações utilizadas, que corresponderam a 10 e 15  $\mu\text{M}$ , foram capazes de reduzir a proliferação celular com valores estatisticamente significativos ( $P < 0,05$ ). Os dados apresentados evidenciaram que concentrações menores do inibidor de calpaínas foram necessárias para reduzir a taxa de multiplicação das células infectivas, em comparação com formas promastigotas de *L. amazonensis* mantidas em laboratório através de culturas axênicas, para as quais foram necessárias doses bem maiores (superior a 20  $\mu\text{M}$ ) do mesmo inibidor. A comparação do  $\text{IC}_{50}$  entre as cepas infectiva e não-infectiva corrobora os dados anteriores: cepa infectiva,  $\text{IC}_{50}$  igual a 6,3  $\mu\text{M}$  e cepa não-infectiva,  $\text{IC}_{50}$  igual a 19  $\mu\text{M}$ . O DMSO não apresentou nenhum efeito sobre o crescimento dos promastigotas infectivos (Figura 22).

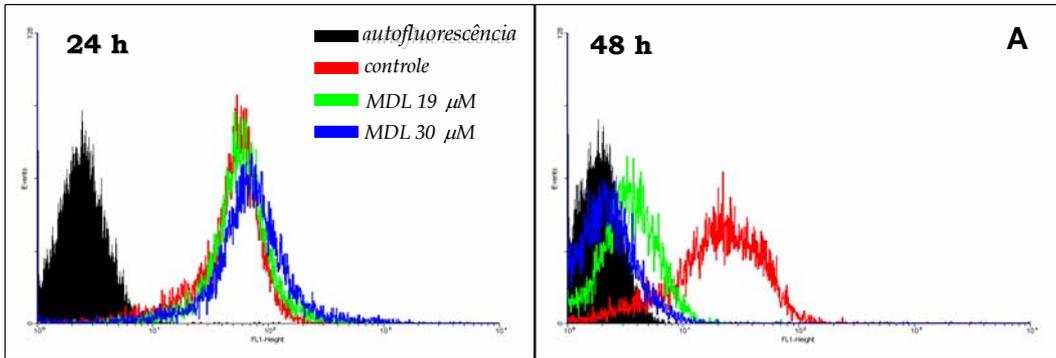


**Figura 22: Efeito do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a taxa de multiplicação de formas promastigotas de *L. amazonensis* recém-isoladas de camundongos BALB/c.** O crescimento dos parasitos foi realizado a 26°C na ausência (controle) ou na presença do inibidor de calpaínas em concentrações que variaram de 2,5 a 15 µM. O inibidor foi adicionado às culturas no tempo 0 h e as células foram estimadas diariamente utilizando o corante vital azul de tripan. O DMSO não apresentou efeitos sobre o crescimento dos promastigotas infectivos. Os dados mostrados representam a média de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. Os dados representados nos boxes apresentaram taxas de proliferação significativamente diferentes do controle ( $P \leq 0,05$ ).

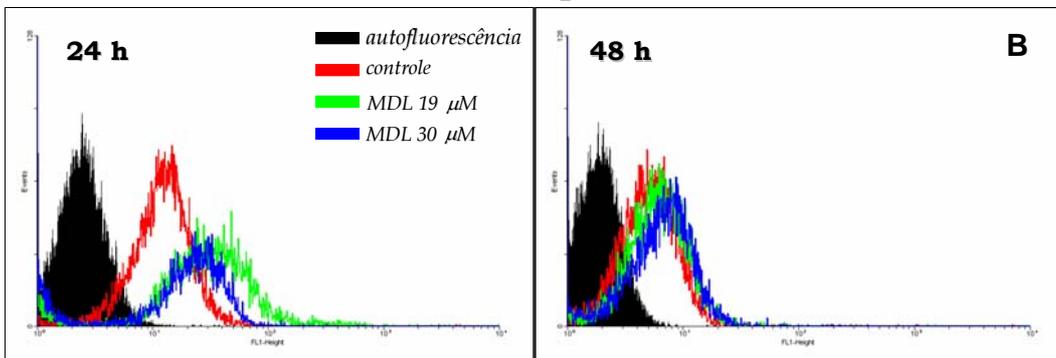
#### **4.12. Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a expressão de peptidases em formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis***

Visando determinar se o estresse induzido pelo inibidor de calpaínas era capaz de alterar o padrão de expressão de peptidases (conhecidos fatores de virulência em *Leishmania*) em formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis*, estas foram incubadas ou não na presença do inibidor de calpaínas (19 e 30  $\mu$ M) por 24 e 48 h. Posteriormente, os parasitos foram lavados, fixados em paraformaldeído e incubados na presença dos anticorpos anti-Dm-calpaína, anti-cpb e anti-gp63. O perfil de expressão das peptidases é mostrado na Figura 23. As autofluorescências apresentadas nos gráficos são representativas das células incubadas na ausência dos anticorpos ou incubadas apenas com o inibidor e posteriormente com o anticorpo secundário (Figura 23, A, B e C). Quando os parasitos foram tratados com o inibidor de calpaínas por 48 h e posteriormente tratados com o anticorpo anti-Dm-calpaína, foi possível observar uma redução dose-dependente na expressão de moléculas com similaridade às calpaínas quando comparados com o controle (Figura 23, A). A redução na expressão de peptidases do tipo cisteína peptidase B (cpb) também foi observada após 48 h de incubação dos promastigotas na presença do inibidor (Figura 23, B) em comparação ao controle; porém, neste caso, não foi observada uma redução dose-dependente. Em relação à expressão de moléculas similares à gp63, foi observado um aumento na expressão após 48 h de incubação com o inibidor de calpaínas, sendo o aumento de expressão dose-dependente (Figura 23, C).

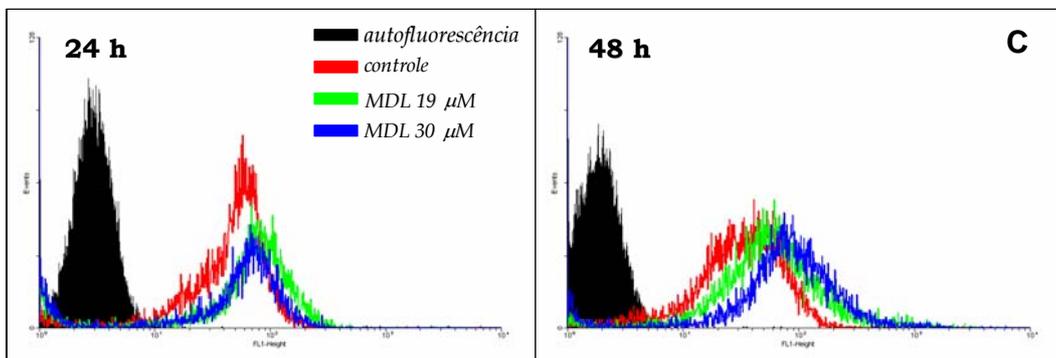
### anti-Dm calpaína



### anti-cpb



### anti-gp63



**Figura 23:** Efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a expressão de peptidases em formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis*. Os promastigotas infectivos de *L. amazonensis* foram fixados com paraformaldeído e incubados na ausência dos anticorpos (autofluorescência) ou na presença dos anticorpos anti-Dm-calpaína (A), anti-cpb (B) e anti-gp63 (C) na diluição de 1:500. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Os dados apresentados nos gráficos são representativos da análise de 10,000 células de experimentos realizados em duplicata.

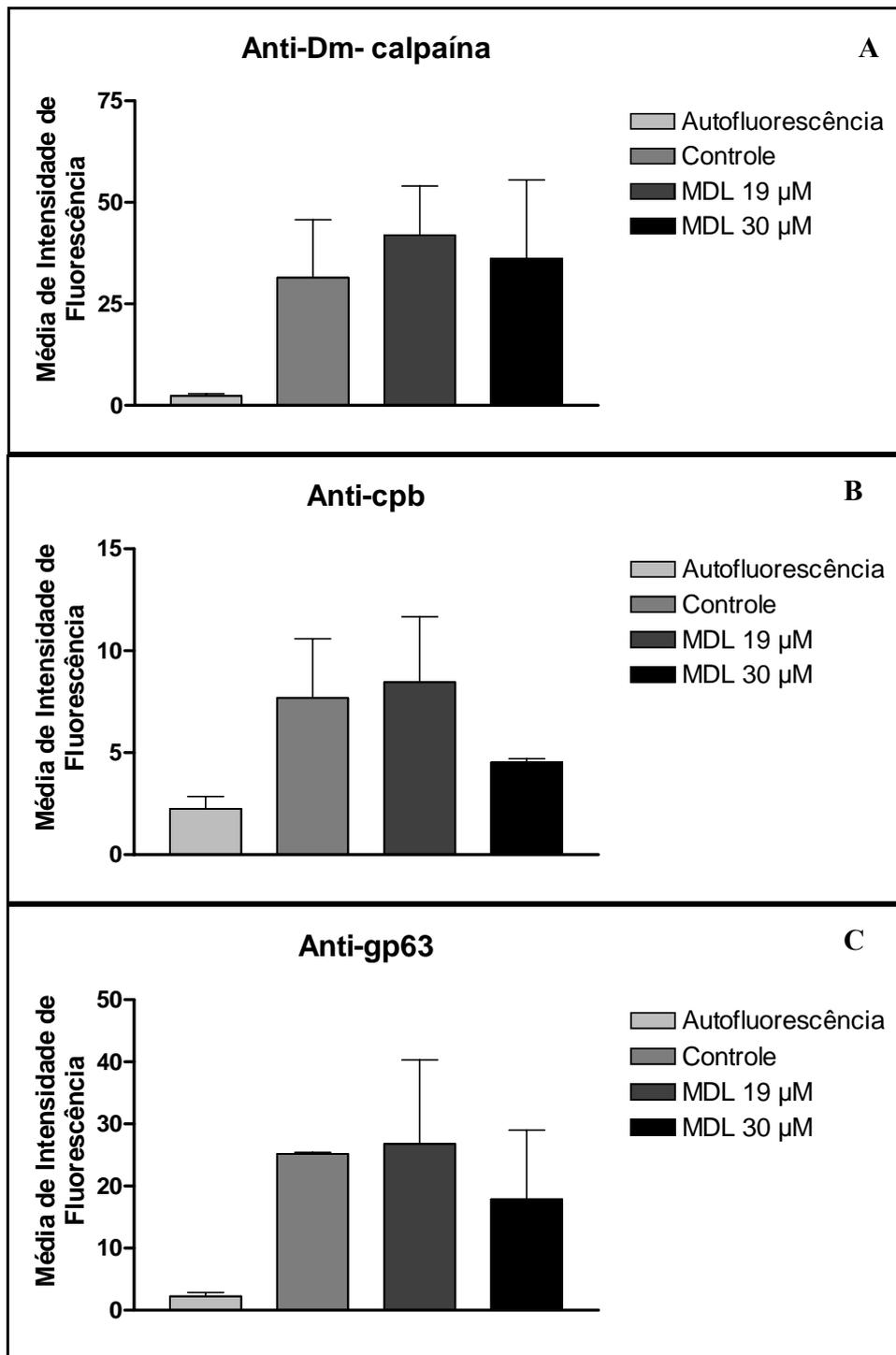
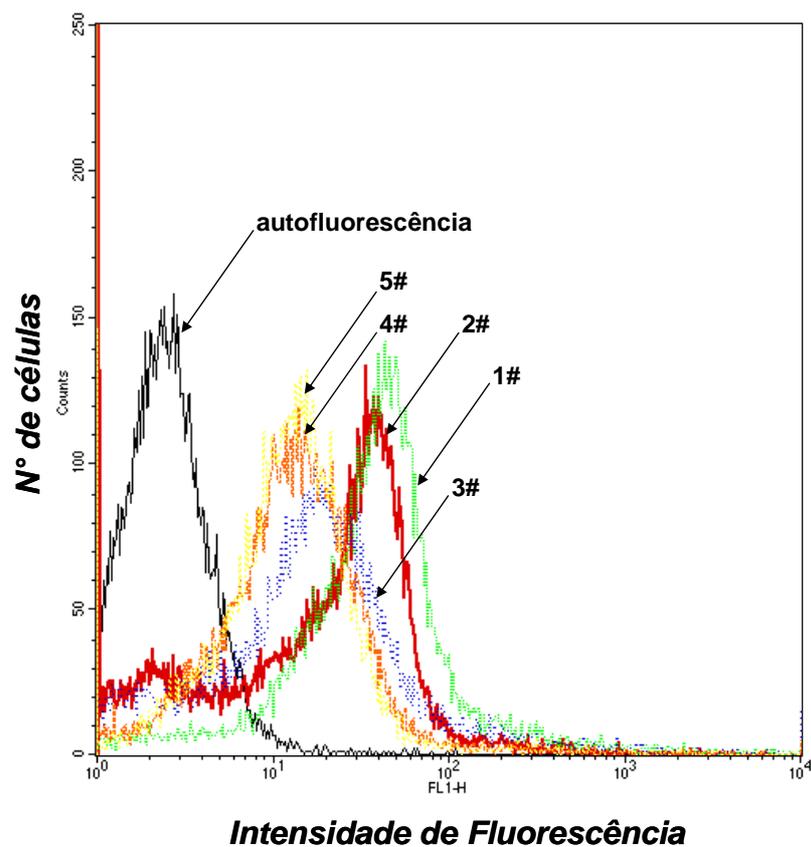


Figura 24: Média de Intensidade de Fluorescência da expressão de peptidases em formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis* tratadas com MDL28170 e incubadas com o anticorpo anti-Dm-calpaína (A), anti-cpb (B) e anti-gp63 (C). Os dados apresentados nos gráficos são representativos da análise de 10,000 células de experimentos realizados em duplicata.

#### **4.13. Avaliação das diferenças nos níveis de expressão de moléculas similares a calpaínas em formas promastigotas recém-isoladas e após diferentes passagens *in vitro***

O objetivo deste experimento foi verificar a influência da manutenção *in vitro* de formas promastigotas de *L. amazonensis* sobre a expressão de moléculas similares a calpaínas. Inicialmente, os parasitos foram isolados a partir de patas de fêmeas de camundongos BALB/c infectadas, e as formas promastigotas obtidas foram mantidas posteriormente através de passagens sucessivas em culturas axênicas. Os parasitos recém-isolados ou obtidos até no máximo cinco (5) passagens *in vitro* foram fixados com paraformaldeído e incubados na presença do anticorpo anti-DM-calpaína. Os resultados apresentados na Figura 25 demonstraram que a manutenção das formas promastigotas de *L. amazonensis* em culturas axênicas foi capaz de induzir o decréscimo na expressão de moléculas similares a calpaínas. A diminuição na expressão destas moléculas foi dependente do número de passagens, ou seja, quanto maior o número de passagens menor a expressão de moléculas similares a calpaínas.



**Figura 25:** Expressão de moléculas similares a calpaínas em formas promastigotas recém-isoladas de *L. amazonensis* após diferentes passagens *in vitro*. A expressão de moléculas similares às calpaínas foi verificada em promastigotas de *L. amazonensis* recém-isoladas dos tecidos das patas de fêmeas de camundongos infectadas e após sucessivas passagens *in vitro* (5 passagens). Os parasitos foram lavados, fixados em paraformaldeído e incubados com o anticorpo primário anti-Dm-calpaína na diluição de 1:500. O controle é representativo e refere-se à cepa recém-isolada e às cepas após as diferentes passagens (5#). O dados apresentados nos gráficos são representativos da análise de 10,000 células de experimentos realizados em duplicata.

## V) DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e apresentam um alto índice de morbidade e mortalidade. Esta doença afeta 12 milhões de pessoas no mundo inteiro e está presente em 88 países, principalmente nos países tropicais e subtropicais. A incidência anual de aproximadamente dois milhões de novos casos e a existência de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas revelam a importância dos estudos para o tratamento das leishmanioses (WHO, 1990, 1991, 2001; WENIGER *et al.*, 2001; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

As drogas tradicionalmente utilizadas nos tratamentos das leishmanioses apresentam diferentes problemas, incluindo alta toxicidade, efeitos adversos, necessidade de hospitalização dos pacientes para a administração dos medicamentos e o surgimento de cepas resistentes. Adicionalmente a estes problemas, o alto custo dos compostos utilizados faz com que muitos pacientes não tenham acesso a um tratamento adequado (YARDLEY *et al.*, 2002; SINGH & SIVAKUMAR, 2004). Os primeiros tratamentos contra as leishmanioses incluíam antimoniais pentavalentes utilizados desde a década de 1940 (BERMAN, 1988; OLLIARO & BRYCESON, 1993; RAHT *et al.*, 2003). Em outros casos, outras drogas, como a pentamidina, anfotericina B e paromicina são utilizadas como segunda opção devido aos casos de resistência, apesar da alta toxicidade destes compostos para o hospedeiro (RAMOS *et al.*, 1990; KUHLENCORD *et al.*, 1992; ESCOBAR *et al.*, 2001; BRAY *et al.*, 2003, ROSA *et al.*, 2003). Nos casos de co-infecção em pacientes imunodeprimidos, as drogas utilizadas nos tratamentos convencionais são menos eficientes, necessitando a utilização de altas doses e um longo período de tratamento (ESCOBAR *et al.*, 2001). Diante deste quadro, diferentes grupos de pesquisa têm se dedicado ao desenvolvimento de novos protocolos e quimioterapias para o tratamento das leishmanioses (MA *et al.*, 2004).

Neste contexto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos do MDL28170, um potente inibidor de calpaínas, sobre a taxa de multiplicação e morfologia das formas promastigotas de *L. amazonensis*, analisando a sua influência sobre a ultraestrutura, indução de morte celular e interação com macrófagos hospedeiros. Além disso, verificamos também a sua ação sobre formas promastigotas infectivas, bem como os

efeitos causados sobre a expressão de peptidases clássicas e de moléculas similares a calpaínas após diferentes passagens *in vitro*.

Os resultados deste trabalho demonstraram que o MDL28170 foi capaz de inibir a taxa de multiplicação dos parasitos de maneira dose-dependente e induzir alterações significantes na morfologia das células. A atividade anti-*leishmania* observada foi irreversível após o tratamento dos parasitos com o inibidor de calpaínas a 30  $\mu\text{M}$  por 72 h. Observações microscópicas semelhantes foram descritas em outros tripanossomatídeos quando tratados com inibidores de cisteína peptidases devido ao estresse osmótico causado pelos inibidores de peptidases (TROEBERG *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2006). Um trabalho recente do nosso grupo demonstrou que o MDL28170 foi capaz de inibir o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* de maneira dose-dependente e induzir alterações morfológicas nos parasitos. No entanto, foi observado que o valor referente ao  $\text{IC}_{50}$  para *T. cruzi* foi maior do que o observado para *L. amazonensis*, demonstrando que este parasito foi mais sensível à ação do inibidor (SANGENITO *et al.*, 2009).

Considerando que as alterações morfológicas observadas nos promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o inibidor de calpaínas, como apresentação de uma forma celular arredondada com condensação nuclear, foram similares às observadas em células com sinais de apoptose, foram realizadas análises a fim de detectar alterações ultraestruturais nos parasitos tratados com MDL28170 a 19  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$  para formas promastigotas). Os resultados obtidos demonstraram que o inibidor de calpaínas a 19  $\mu\text{M}$  foi capaz de induzir alterações ultraestruturais nas células, dentre elas a vacuolização do citoplasma. Além disso, alterações marcantes também foram detectadas no núcleo destas células. Nas células tratadas com o  $\text{IC}_{50}$  do inibidor de calpaínas, o núcleo apresentou alterações como condensação e fragmentação da cromatina. Estas características podem estar associadas com a indução de morte celular por apoptose. O mecanismo de morte celular programada foi demonstrado inicialmente por KERR, WYLLIE e CURRIE nos anos 70 (KERR, WYLLIE & CURRIE, 1972) e a sua descrição foi baseada nas características que as células apresentavam ao entrar em apoptose. Dentre as características morfológicas estão a formação de “blebbing” de membrana, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, arredondamento e diminuição do volume celular. Os aspectos bioquímicos relacionados com a apoptose incluem clivagem internucleossomal do DNA, gerando fragmentos

múltiplos de 200 pares de bases, exposição de fosfatidilserina no folheto externo na membrana plasmática, suspensão do ciclo celular e clivagem proteolítica de diferentes substratos intracelulares, como proteínas de citoesqueleto. Tais características bioquímicas resultam de uma orquestrada e complexa via de sinalização, que envolve diferentes grupos de proteínas (HENGARTNER, 2000).

A apoptose é uma forma morfológicamente distinta de morte celular, importante em mecanismos como embriogênese, homeostase de tecidos e controle de doenças em metazoários (VAUX & STRASSER, 1996). Apesar da apoptose ser descrita principalmente em eucariotos superiores, relatos têm demonstrado a ocorrência deste processo em plantas, fungos e bactérias (LEWIS, 2000; GOLSTEIN *et al.*, 2003; LU, 2006; RAMSDALE, 2006; ROBSON, 2006). O mecanismo de morte celular do tipo apoptose foi descrito há mais de dez anos atrás em *Saccharomyces cerevisiae*, porém em leveduras este processo apresenta controvérsias principalmente devido a sua questionável relevância fisiológica e a falta de dados moleculares e genômicos (FRÖHLICH & MADEO, 2000; FABRIZIO & LONGO, 2008). Estudos posteriores, incluindo a identificação e análises de homólogos de genes apoptóticos, confirmaram a existência deste tipo de morte celular em fungos. Além disso, estes estudos demonstraram uma possível relação entre a apoptose e processos de grande importância biológica como o desenvolvimento, envelhecimento, respostas a estresse e patogênese. A emergência do papel da apoptose como um agente regulador no desenvolvimento de fungos sugere a possibilidade da descoberta de novos meios de controle das infecções fúngicas através da manipulação deste processo. No entanto, a apoptose tem sido descrita e estudada em poucas espécies de fungos, embora homólogos de genes apoptóticos tenham sido identificados em todos os genomas de fungos (revisto por SHARON *et al.*, 2009). Condições adversas têm sido relatadas como capazes de induzir apoptose em fungos, como por exemplo: carência de nutrientes (JACOBSON *et al.*, 1998), estresse oxidativo (MADEO, 1999; PHILLIPS *et al.*, 2003, 2006), alterações osmóticas (SILVA *et al.*, 2005), e modulação de íons (LIANG & ZHOU, 2007; NARGUND *et al.*, 2008).

Em tripanossomatídeos, a apoptose tem sido descrita em parasitos pertencentes aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Neste grupo estão os protozoários *L. amazonensis* (HOLZMULLER *et al.*, 2002), *L. donovani* (SEN *et al.*, 2004), *L. major* (ARNOULT *et*

*al.*, 2002), *L. mexicana* (ZANGGER, MOTTRAM & FASEL, 2002), *L. infantum* (ALZATE, *et al.*, 2007), *T. brucei* (FIGARELLA *et al.*, 2006) e *T. cruzi* (PIACENZA *et al.*, 2007). A apoptose em tripanossomatídeos ainda é um processo sem uma função fisiológica definida, mas postula-se que seja um mecanismo adquirido através da evolução das células eucarióticas, sendo desencadeada em resposta a diversos estímulos e condições de estresse. Além disso, pode ser considerada como um mecanismo utilizado pelos tripanossomatídeos a fim de melhorar o seu desempenho biológico, um mecanismo altruísta de seleção de células (NGUEWA *et al.*, 2004). No gênero *Leishmania*, a apoptose é um mecanismo que pode contribuir para a sobrevivência do parasito durante o processo de infecção. As formas promastigotas procíclicas, que se dividem no intestino médio do inseto, utilizam um tipo de controle absoluto do número de células, para que o excesso de divisões celulares não comprometa a sobrevivência dos parasitos. Um mecanismo similar a este ocorre no interior de macrófagos, onde ao se dividirem os amastigotas podem gerar um número adicional de células, sendo necessário então a participação da apoptose no controle do número de células nestes processos (revisto por SHAHA, 2006). Ao mesmo tempo em que a apoptose pode ser considerada um mecanismo de controle de parasitos garantindo a sua sobrevivência e transmissão, este processo é considerado um importante alvo no desenvolvimento de quimioterápicos para o controle das doenças parasitárias (DEBRABANT *et al.*, 2003). Neste sentido, vários registros demonstram que a apoptose no gênero *Leishmania* pode ocorrer em resposta a drogas anti-*leishmania*, com a maioria dos estudos demonstrando a ação das drogas *in vitro* (SERENO *et al.*, 1998).

DUTTA e colaboradores (2007b) demonstraram que grande parte dos promastigotas de *L. donovani* tratados com concentrações crescentes de racemoside A, uma saponina esteroidal com atividade anti-*leishmania*, apresentaram a cromatina com aspecto condensado e irregular quando comparados com células controle não-tratadas. Através de outros experimentos, como análise da exposição de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática, interrupção do ciclo celular, alteração do potencial de membrana mitocondrial e fragmentação nuclear, foi demonstrado que o composto testado induziu a morte celular dos parasitos por apoptose (DUTTA *et al.*, 2007). A cisplatina, uma droga utilizada no tratamento de certos tipos de cânceres, apresentou atividade anti-*leishmania* sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum*, induzindo a externalização de

fosfatidilserina, suspensão do ciclo celular, além de modificações no potencial de membrana mitocondrial (TAVARES *et al.*, 2007). HOZMULLER e colaboradores (2002) demonstraram que amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* expostos a compostos doadores de NO ou LPS apresentaram fragmentação do DNA. O antibiótico anfotericina B, utilizado no tratamento das leishmanioses, foi capaz de induzir a atividade de enzimas tipo caspases em formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, resultando na fragmentação do DNA após duas horas de incubação *in vitro* (LEE *et al.*, 2002). Outros estudos utilizando antimoniais pentavalentes demonstraram a capacidade destes compostos em induzir a morte celular em amastigotas intracelulares de *L. donovani* que, por sua vez, apresentaram características peculiares de apoptose, como externalização de fosfatidilserina e fragmentação do DNA (SUDHANDIRAN & SHAHA, 2003). A miltefosina, uma droga oral utilizada no tratamento das leishmanioses, foi capaz também de induzir apoptose em promastigotas de *L. donovani*, que apresentaram condensação do DNA nuclear (VERMA & DEY, 2004), diminuição do volume celular e externalização de fosfatidilserina (PARIS *et al.*, 2004). Características semelhantes foram observadas no núcleo de promastigotas de *L. amazonensis* tratados por 24 h com 16,47  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) de lopinavir, um inibidor de aspártico peptidases utilizados na quimioterapia do HIV, no qual a presença de blocos de cromatina condensada próximos ao envelope nuclear foi considerada uma alteração sugestiva de apoptose (SANTOS *et al.*, 2009).

No nosso trabalho, algumas das características bioquímicas apresentadas por células em processo de apoptose foram observadas em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o inibidor de calpaínas. Um aumento gradual na exposição de fosfatidilserina foi observado quando os parasitos foram tratados com o inibidor nas concentrações de 19 e 30  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Além disso, foi observada também a suspensão do ciclo celular na fase sub- $G_0/G_1$  e a fragmentação do DNA nuclear. Portanto, estudos mais aprofundados sobre este mecanismo seriam de extrema relevância no desenvolvimento de novas drogas para tratamento das leishmanioses.

Nosso grupo havia anteriormente demonstrado, através de técnicas de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-Dm-calpaína, que moléculas similares a calpaínas estavam presentes na superfície celular de promastigotas de *L. amazonensis* (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006c). No presente estudo, resolvemos explorar a participação

destas moléculas na interação do parasito com células do hospedeiro vertebrado. Neste sentido, a infecção murina é considerada um dos melhores modelos experimentais caracterizados para o estudo da interação *Leishmania*-células hospedeiras de mamíferos (PEREIRA & ALVES, 2008). Nossos dados de infecção de macrófagos peritoneais por promastigotas de *L. amazonensis* evidenciaram uma redução significativa no índice de associação quando foram utilizados parasitos pré-tratados com o inibidor de calpaínas. Estes dados confirmam a existência de moléculas similares às calpaínas na superfície celular dos parasitos e que possivelmente estas moléculas poderiam estar sendo bloqueadas pelo inibidor, o que justificaria a redução no índice de associação dos parasitos tratados. É importante destacar que a redução no índice de associação ocorreu de fato pela presença do inibidor e não devido à diminuição da viabilidade dos parasitos. Este resultado foi comprovado experimentalmente por ensaio de MTT, onde 100% dos parasitos permaneceram viáveis durante o tempo de pré-incubação. No entanto, a identificação das moléculas que são afetadas pelo inibidor de calpaínas interferindo no processo de interação com as células hospedeiras ainda é uma questão em aberto. Além das moléculas similares às calpaínas, outras moléculas podem participar deste processo e, portanto, também podem ser afetadas pela presença do inibidor.

O efeito do inibidor de calpaínas contra *Leishmania* pode depender da fase de desenvolvimento do parasito. Por exemplo, amastigotas axênicos e intracelulares de *L. infantum* são mais sensíveis à cisplatina, uma droga que apresenta atividade anti-*leishmania*, do que as formas promastigotas (TAVARES *et al.*, 2007). Estes dados explicam a ação distinta das drogas sobre promastigotas isolados ou amastigotas no ambiente intracelular. A fim de avaliar os efeitos do inibidor de calpaínas sobre macrófagos infectados por *L. amazonensis*, o mesmo foi utilizado nas concentrações já descritas para formas promastigotas (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2006c). O inibidor não mostrou toxicidade direta sobre os macrófagos nas concentrações utilizadas e foi capaz de reduzir de maneira significativa o número de macrófagos infectados. Os inibidores de aspártico peptidases nelfinavir, amprenavir e lopinavir também foram capazes de reduzir o percentual de infecção por *L. amazonensis* após 24 h de tratamento (SANTOS *et al.*, 2009).

A habilidade do inibidor de calpaínas em estimular mecanismos de morte celular pelos macrófagos peritoneais foi testada através da produção de NO, que é um importante

mecanismo de controle das infecções causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. A medida dos níveis de NO produzidos por macrófagos infectados tratados com o inibidor é utilizada para verificar se a ação anti-*leishmania* observada é resultante da ativação deste mecanismo (SOARES *et al.*, 2007). A sobrevivência de *Leishmania* no interior de macrófagos e monócitos depende da sua capacidade de evasão dos mecanismos citotóxicos apresentados por estas células. A infecção de macrófagos murinos de camundongos da linhagem J774-G8 com *L. amazonensis* demonstrou que houve a inibição da atividade de iNOS e da produção de NO quando as células foram estimuladas com LPS. A inibição da produção de NO por macrófagos não é um mecanismo restrito apenas ao gênero *Leishmania*, este mecanismo tem sido descrito também para outros patógenos intracelulares (BALESTIERI *et al.*, 2002).

Os resultados evidenciaram que não houve aumento na produção de NO após o tratamento com o inibidor de calpaínas. Os níveis de NO produzidos por macrófagos infectados tratados com o inibidor de calpaínas foram semelhantes aos observados nos sistemas controle. Um perfil semelhante foi observado em macrófagos infectados com promastigotas de *L. amazonensis* tratados com extrato de *Tabernaemontana catharinensis*: após 48 h de incubação na presença de 100 µg/ml do extrato vegetal, os macrófagos produziram 4,6 µM de nitrito, enquanto que o controle não-tratado produziu 4,0 µM de nitrito, valores bastante similares (SOARES *et al.*, 2007). A produção de ROS também não foi alterada pela presença do inibidor. Os resultados apresentados sugerem fortemente que o mecanismo de morte celular apresentado pelos macrófagos foi independente da produção de NO e ROS. Uma vez que os principais mecanismos de morte celular exercidos pelos macrófagos não estão sendo ativados, é possível que o inibidor de calpaínas esteja atuando diretamente sobre as formas amastigotas intracelulares (DELORENZI *et al.*, 2002).

Os efeitos do inibidor de calpaínas sobre a proliferação de formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis* também foram avaliados. Os resultados obtidos demonstraram que estas formas foram mais sensíveis à ação do inibidor do que as formas mantidas através de culturas axênicas, uma vez que concentrações bem menores foram requeridas para a inibição do crescimento. O MDL28170 foi capaz de reduzir a proliferação de formas promastigotas mantidas através de culturas axênicas após 48 h de incubação, com concentrações variando de 15 a 30 µM. Enquanto isso, para as cepas recém-isoladas foram

utilizadas concentrações que variaram de 2,5 a 15  $\mu$ M, apresentando resultados bastante significativos quando comparados com o controle. No presente trabalho foi demonstrado ainda que a manutenção da cepa de *L. amazonensis* em culturas axênicas (5 passagens) foi capaz de reduzir a expressão de moléculas similares a calpaínas quando comparada com a cepa recém-isolada de camundongo. Estes dados sugerem uma possível relação destas moléculas com a virulência do parasito. A manutenção de células de *T. cruzi* em culturas axênicas pode selecionar populações menos virulentas e esta baixa virulência está associada com modificações nas propriedades biológicas deste parasito, podendo levar a alterações na expressão de algumas proteínas (CONTRERAS *et al.*, 1998). Recentemente, foi reportada uma relativa redução na expressão de moléculas similares a calpaínas em formas epimastigotas de *T. cruzi* mantidas *in vitro* quando comparadas com cepas infectivas recém-isoladas (SANGENITO *et al.*, 2009). Em um estudo comparativo de enzimas proteolíticas e proteínas de superfície celular em promastigotas virulentos e avirulentos de *L. amazonensis*, SOARES *et al.* (2003) demonstraram a existência de diferenças na expressão destas moléculas. A relação direta entre a expressão de moléculas similares a calpaínas e a virulência de promastigotas de *L. amazonensis* não pode ser estabelecida, mas os resultados obtidos neste estudo sugerem que tal relação possa ocorrer.

A membrana plasmática dos parasitos exerce um papel importante no processo de infecção. As proteínas de superfície celular e/ou glicoproteínas podem exercer um papel estrutural ou estarem envolvidas em diferentes processos como adsorção, transporte de nutrientes, reconhecimento celular e escape (DE SOUZA, 1995). Neste contexto, um dos nossos objetivos foi avaliar se o inibidor de calpaínas seria capaz de induzir alterações na expressão de peptidases clássicas na superfície celular de promastigotas infectivos de *L. amazonensis*. As espécies de *Leishmania* contêm múltiplas atividade de cisteína peptidases intracelulares altamente ativas e uma metalopeptidase abundantemente expressa na superfície do parasito, denominada gp63 ou leishmanolisina (YAO *et al.*, 2003; MOTTRAM, COOMBS & ALEXANDER, 2004; VERMELHO *et al.*, 2007). Grande parte dos estudos realizados até agora têm sido feitos com três tipos de cisteína peptidases (CPA, CPB e CPC). A geração de mutantes nulos para os genes *cpa*, *cpb* e *cpc* em *L. mexicana* forneceu o primeiro suporte genético para o papel das cisteína peptidases de *Leishmania* na virulência do parasito, e conseqüentemente sua validade como alvo para drogas

(MOTTRAM, COOMBS & ALEXANDER, 2004). A gp63 está envolvida na virulência de *Leishmania*, e a expressão aumentada desta enzima em promastigotas metacíclicos sugere a participação desta enzima no processo de interação com sistemas de defesa do hospedeiro, incluindo componentes do sistema complemento e da superfície de macrófagos (YAO, DONELSON & WILSON, 2003).

Estudos com inibidores de peptidases do HIV demonstraram que estes compostos foram capazes de induzir a redução dos níveis de peptidases, descritas como fatores de virulência em fungos como *Cryptococcus neoformans* (MONARI *et al.*, 2005), *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans* (revisto por POZIO & MORALES, 2005) e *Fonsecaea pedrosoi* (PALMEIRA *et al.*, 2008). O presente estudo revelou a diminuição na expressão de moléculas similares a calpaínas e moléculas similares à cisteína peptidase (cpb) quando os parasitos foram tratados com o inibidor de calpaínas. No entanto, um aumento significativo na expressão de moléculas similares à gp63 foi observado. Em células de *L. amazonensis* tratadas com inibidores de peptidases do HIV, foi observado um aumento significativo na expressão de cisteína peptidases e da metalopeptidase de 63 kDa (SANTOS *et al.*, 2009). Em *T. cruzi*, foram observadas oscilações nos níveis de expressão de moléculas similares a calpaínas quando as células foram tratadas por 24 h com MDL28170, na concentração referente ao IC<sub>50</sub> (SANGENITO *et al.*, 2009). Simultaneamente, foi verificado o aumento da expressão de cruzipaina, a principal cisteína peptidase de *T. cruzi*, envolvida em processos de interação com a célula hospedeira, escape do sistema imune e processo de diferenciação (CAZZULO *et al.*, 2001). Estas alterações podem demonstrar uma correlação entre a expressão dos níveis de cisteína peptidases e, como proposto em *T. cruzi* por YONG e colaboradores (2000), a superexpressão de algumas cisteína peptidases pode ser necessária para compensar os níveis tóxicos de um inibidor que é ativo contra diferentes peptidases da mesma classe.

As funções específicas das calpaínas ou de moléculas similares a calpaínas ainda não foram totalmente descritas nos tripanossomatídeos. A investigação de alterações na expressão de genes em parasitos sensíveis ou resistentes a drogas e a super regulação de genes relacionados com virulência em formas infectivas têm demonstrado o envolvimento de proteínas similares a calpaínas em diferentes processos nos tripanossomatídeos (SALOTRA *et al.*, 2006; VERGNES *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2008). A expressão

diferenciada em etapas específicas do ciclo de vida de alguns parasitos pode auxiliar na pesquisa das funções específicas de moléculas similares a calpaínas (SAXENA *et al.*, 2003; GIESE *et al.*, 2008). De maneira geral, os resultados apresentados neste trabalho podem contribuir na investigação da existência e das funções das moléculas similares a calpaínas nos tripanossomatídeos. A análise das funções gerais destas moléculas pode fornecer novos conhecimentos sobre esta família de proteínas nos tripanossomatídeos e permitir o emprego de inibidores proteolíticos destas moléculas no tratamento de doenças causadas por estes parasitos.

## VI) CONCLUSÕES

### ➤ **Parte 1: Avaliação dos efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis***

- O tratamento das formas promastigotas de *L. amazonensis* com o inibidor de calpaínas promoveu a queda da proliferação celular, especialmente quando concentrações mais elevadas foram utilizadas;
- O inibidor de calpaínas foi capaz de induzir alterações morfológicas, alterações ultraestruturais, a externalização de fosfatidilserina, a suspensão do ciclo celular e a fragmentação internucleossomal do DNA em promastigotas de *L. amazonensis*, estas evidências indicam que o inibidor de calpaínas foi capaz de induzir a morte celular por apoptose em promastigotas de *L. amazonensis*.

### ➤ **Parte 2: Avaliação dos efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre a interação de *L. amazonensis* com macrófagos peritoneais de camundongos**

- Nos ensaios de interação com macrófagos, o inibidor foi capaz de reduzir o índice de associação dos parasitos com a célula hospedeira de maneira dose-dependente;
- O inibidor de calpaínas foi capaz de reduzir o número de macrófagos infectados de maneira dose-dependente, após diferentes tempos de incubação;
- O inibidor de calpaínas não foi capaz de induzir um aumento na produção de nitrito, sugerindo que o efeito anti-*leishmania* observado foi independente da produção de NO;
- O inibidor de calpaínas não foi capaz de ativar a produção de ROS pelos macrófagos;
- Estes dados sugerem fortemente que o inibidor de calpaínas pode estar atuando diretamente sobre as formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e não sobre a ativação de mecanismos de morte celular mediados por macrófagos hospedeiros.

➤ **Parte 3: Avaliação dos efeitos do inibidor de calpaínas MDL28170 sobre formas promastigotas infectivas, recém isoladas de camundongos, de *L. amazonensis***

- As formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis* foram mais sensíveis a ação do inibidor quando comparadas com as formas promastigotas axênicas não-infectivas;
- O inibidor de calpaínas foi capaz de alterar a expressão de peptidases clássicas de *L. amazonensis*, sugerindo que a superexpressão de algumas peptidases pode ser necessária para compensar a inibição das calpaínas;
- A expressão de moléculas similares a calpaínas foi reduzida em promastigotas de *L. amazonensis* após diferentes passagens *in vitro*, sugerindo uma possível relação destas moléculas com a virulência do parasito;
- Estes resultados contribuem na adição de novos conhecimentos sobre a produção de moléculas similares às calpaínas em *Leishmania*, auxiliando na caracterização destas enzimas, o que poderá ajudar na determinação das funções destas moléculas nos protozoários. Desta forma, estes resultados podem também contribuir para o desenvolvimento de inibidores proteolíticos capazes de agir de maneira seletiva e eficaz contra as doenças causadas por estes parasitos.

## VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD-ZAPATERO, C.; GOLDMAN, R.; MUCHMORE, S.W.; HUTCHINS, C.; STEWART, K.; NAVAZA, J.; PAYNE, C.D. & RAY, T.L. **Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: implications for the design of antifungal agents.**, Protein Sci., 5, 640-652, 1996.
- ALVES, C.R.; CORTE-REAL, S.; BOURGUIGNON, S.C.; CHAVES, C.S. & SARAIVA, E.M. ***Leishmania amazonensis*: early proteinase activities during promastigote-amastigote differentiation *in vitro*.** Exp. Parasitology., 109 (1), 38-48, 2005.
- ALZATE, J.F.; ARIAS, A.A.; MORENO-MATEOS, D.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A. & JIMÉNEZ-RUIZ, A. **Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*.** Mol Biochem Parasitol., 152(2), 192-202, 2007.
- AMBIT, A.; FASEL, N.; COOMBS G.H. & MOTTRAM, J.C. **An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression.** Cell Death and Differentiation, 15, 113-122, 2008.
- AMOUR, A.; BIRD, M.; CHAUDRY, L.; DEADMAN, J.; HAYES, D. & KAY, C. **General considerations for proteolytic cascades.** Biochem. Soc. Trans., 32, 15-16, 2004.
- ANDRADE, H.M.; MURTA, S.M.F.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; NIRDÉ, P. & ROMANHA, A. **Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole.** Journal of Proteome Research, 7, 2357–2367, 2008.
- ARAUJO COUTO, L.; SAMPAIO NARCISO, M.; HOKOÇ, J.N. & BLANCO MARTINEZ, A.M. **Calpain inhibitor 2 prevents axonal degeneration of opossum optic nerve fibers.** J. Neurosci. Res., 77, 410-419, 2004.

- ARENDS, M.J.; MORRIS, R.G. & WYLLIE, A.H. **Apoptosis. The role of the endonuclease.** Am J Pathol., 136(3), 593-608, 1990.
- ARNOULT, D.; AKARID, K.; GRODET, A.; PETIT, P. X.; ESTAQUIER, J. & AMIESEN, J. C. **On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine protease activation and mitochondrion permeabilization.** Cell Death Differ., 9, 65–81, 2002.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R.K. & SAHA, B. **Imune response to *Leishmania* infection.** Indian J. Mes. Res., 119, 238-258, 2004.
- AZEREDO-COUTINHO, R.B.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A.; CUPOLILLO, E.; QUINTELLA, L.P. & MADEIRA, M.F. **First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil.** Trans R Soc Trop Med Hyg., 101(7), 735-7, 2007.
- BALESTIERI, F.M.P.; QUEIROZ, A.R.P.; SCAVONE, C.; COSTA, V.M.A.; BARRALNETO, M. & ABRAHAMSOHN, I.A. ***Leishmania (L.) amazonensis* - induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages.** Microbes and Infection, 23-29, 2002.
- BAÑULS, A.L.; HIDE, M. & PRUGNOLLE, F. ***Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans.** Review. Adv Parasitol., 64: 1-109, 2007.
- BARNARD, D.L.; HUBBARD, V.D.; BURTON, J.; SMEE, D.F.; MORREY, J.D.; OTTO, M.J. & SIDWELL, R.W. **Inhibition of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARSCoV) by calpain inhibitors and  $\beta$ -D-N4-hydroxycytidine.** Antivir. Chem. Chemother., 15, 15-21, 2004.

- BARR, S.C.; WARNER, K.L.; KORNREIC, B.G.; PISCITELLI, J.; WOLFE, A.; BENET, L. & MCKERROW, J.H. **A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy., 49, 5160-5161, 2005.
- BARRET, A.J. **Classification of Peptidases.** In: Meth. Enzymol. Academic Press, Inc., California, 244, 1-15, 1994.
- BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D. & O'BRIEN, E.A. **The *MEROPS* database as a protease information system.** J. Struct. Biol., 134, 95-102, 2001.
- BARRETT, A.J; TOLLE, D.P. & RAWLINGS, N.D. **Managing peptidases in the genomic era.** Biol Chem., 384, 873-82, 2003.
- BERMAN, J.D. **Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies.** Rev Infect Dis 10, 560-586, 1988.
- BHATTACHARYA, J.; DEY, R. & DATTA, S.C. **Calcium dependent thiol protease caldonopain and its specific endogenous inhibitor in *Leishmania donovani*** Mol. Biochem. Parasitol., 126, 9-16, 1993.
- BISWAS, S.; HARRIS F.; DENNISON S.; SINGH J.P. & PHOENIX D. **Calpains: enzymes of vision?** Med. Sci. Monit., 11, RA301-RA310, 2005.
- BON, E. P. S.; CORVO, M.L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C.L.A.; FERRARA, M.A.; COELHO, R.R.C. & ALENCASTRO, R.B. **Enzimas Proteolíticas: aplicações biotecnológicas.** In: Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. Editado por Vermelho A.B., Nogueira de Melo A.C., Branquinha, M.H., Santos A.L.S, d'Avila-Levy C.M., Couri S., Bon E.P.S., Rio de Janeiro, INTERCIÊNCIA, 2008.

- BOND, J.S. & BUTLER, P.E. **Intracellular proteases.** Annu. Rev. Biochem., 56, 333-364, 1987.
- BORTNER, C.D.; OLDENBURG, N.B. & CIDLOWSKI, J.A. **The role of DNA fragmentation in apoptosis.** Trends Cell Biol., 5(1), 21-6, 1995.
- BOUVIER, J.; SCHNEIDER, P.; ETGES, R. & BORDIER, C. **Peptide substrate specificity of the membrane bound metalloprotease of *Leishmania*.** Biochemistry, 29, 10113–10119, 1990.
- BRANDÃO, A.A.; MIRANDA, A.; DEGRAVE, W.M. & SOUSA, M.A. **The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implicaitons.** Parasitol Res., 86 (10), 809-12, 2000.
- BRANQUINHA, M.H.; VERMELHO, A.B.; GOLDENBERG, S. & BONALDO, M.C. **Ubiquity of cysteine- and metalloproteinase activities in a wide range of trypanosomatids.** J. Eukaryot. Microbiol., 43, 131-135, 1996.
- BRAY, P.G.; BARRETT, M.P.; WARD, S.A. & KONING, H.P. **Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future.** Trends Parasitol., 19, 232–239, 2003.
- CARAFOLI, E. & MOLINARI, M. **Calpain: a protease in search of a function?** Biochem. Biophys. Res. Comm., 247, 193-203, 1998.
- CARRAGHER, N.O. **Calpain inhibition: a therapeutic strategy targeting multiple disease states.** Curr. Pharm. Des., 12, 615-638, 2006.
- CARVALHO, P.B.; ARRIBAS, M.A.G. & FERREIRA, E.L. **Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy?** Braz J Pharm Sci., 36, 69– 96, 2000.

- CAZULLO, J.J.; STOKA, V. & TURK, V. **The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease.** *Curr Pharm Des.*, 7(12), 1143-56, 2001.
- CHANDRAMOHANADAS, R.; DAVIS, P.H.; BEITING, D.P.; HARBUT, M.B.; DARLING, C.; VELMOUROUGANE, G.; LEE, M.Y.; GREER, P.A.; ROOS, D.S. & GREENBAUM, D.C. **Apicomplexan parasites co-opt host calpains to facilitate their escape from infected cells.** *Science*, 324, 794, 2009.
- CHOUDHRURY, R.; BHAUMIK, S.K. & DE CHAKRABORTI, T. **Identification, purification and characterization of a secretory serine protease in an Indian strain of *Leishmania donovani*.** *Mol Cell Biochem.*, 320 (1-2), 2009.
- CLAYTON, C.; ADAMS, M.; ALMEIDA, R.; BALTZ, T.; BARRET, M.; BASTIEN, P.; BELLI, S.; BEVERLEY, S.; BITEAU, N.; BLACKWELL, J.; BLAINEAU, C.; BOSHART, M.; BRINGAUD, F.; CROSS, C.; CRUZ, A.; DEGRAVEL, W.; DONELSON, J.; EL-SAYED, N.; FU, F.; ERSFELD, K.; GIBSON, W.; GULL, K.; IVENS, A.; KELLY, J.; LAWSON, D.; LEBOWITZ, J.; MAJIWA, P.; KEITH, M.K.; MELVILLE, S.; MICHELS, P.; MYLER, P.; NORRISH, A.; OPPERDOES, F.; PAPADOPOULOU, B.; PARSONS, M.; SEEBECK, T.; SMITH D.; STUART, K.; TURNER, M.; ULLU, E. & VANHAMME, L. **Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*.** *Mol. Biochem. Parasitol.*, 97, 221-224, 1998.
- CONTRERAS, V. T.; LIMA, A. R. & ZORRILLA, G. ***Trypanosoma cruzi*: maintenance in culture modify gene and antigenic expression of metacyclic trypomastigotes.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93, 753–760, 1998.
- CORRÊA, J.R.; BRAZIL, R.P. & SOARES, M.J. ***Leishmania (Viannia) lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus a mini review.** *Mem Int Oswaldo Cruz*, 100(6), 587-92, 2005.

- COTTEN, M. & WEBER, J.M. **The adenovirus protease is required for Virus entry into host cells.** *Virology*, 213, 494-502, 1995.
- CROFT, S.L.; SEIFERT, K. & YARDLEY, V. **Current scenario of drug development for leishmaniasis.** *Indian J. Med. Res.*, 123 (3), 399–410, 2006.
- CUNNINGHAM, A.C. **Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*.** In *Exp. Mol. Path.*, 72, 132-141, 2002.
- CUPOLILLO, E.; MOMEN, H. & GRIMALDI, G. JR. **Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*.** *Mem Int Oswaldo Cruz*, 93 (5), 663-8, 1998.
- D'AVILA-LEVY, C.M.; SOUZA, R.F.; GOMES, R.C.; VERMELHO, A.B. & BRANQUINHA, M.H. **A metalloproteinase extracellularly released from *Crithidia deanei*.** *Can J. Microbiol.*, 49, 625-632, 2003a.
- D'AVILA-LEVY, C.M.; SOUZA, R.F.; GOMES, R.C.; VERMELHO, A.B. & BRANQUINHA, M.H. **A novel extracellular calcium-dependent cysteine proteinase from *Crithidia deanei*.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 420, 1-8, 2003b.
- D'AVILA-LEVY, C.M.; ARAÚJO F.M.; VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H.; ALVIANO, C.S.; SOARES, R.M. & DOS SANTOS, A.L. **Differential lectin recognition of glycoproteins in choanomastigote-shaped trypanosomatids: taxonomic implications.** *FEMS Microbiol Lett.*, 16, 231(2),171-6, 2004.
- D'AVILA-LEVY, C.M.; ARAÚJO, F.M.; VERMELHO, A.B.; SOARES, R.M.A.; SANTOS, A.L.S. & BRANQUINHA, M.H. **Proteolytic expression in *Blastocrithidia culicis*: influence of the endosymbiont and similarities with virulence factors of pathogenic trypanosomatids.** *Parasitology*, 130, 413–420, 2005.
- 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.

- Insights on the role of gp63-like proteins in insect trypanosomatids.** FEMS Microbiol. Lett., 254, 149–156, 2006a.
- 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. **Gp63-like molecules in *Phytomonas serpens*: possible role on the insect interaction.** Curr. Microbiol., 52, 439-444, 2006b.
- D'AVILA-LEVY, C.M.; MARINHO, F.A.; SANTOS, L.O.; MARTINS, J.L.; SANTOS, A.L.S. & BRANQUINHA, M.H. **Antileishmanial activity of MDL28170, a potent calpain inhibitor.** Int. J. Parasitol., 28, 138-142, 2006c.
- DA SILVA, R. & SACKS, D.L. **Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation.** Infection and Immunity, 55, 2802-2806, 1987.
- DASH, C.; KULKARNI, A.; DUNN, B. & RAO, M. **Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development-Review.** Crit Ver Biochem Mol Biol., 38(2), 89-119, 2003.
- DE SOUZA, W. **Cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** Int. Rev. Cytol., 86, 197-283, 1984.
- DE SOUZA, W. **Structural organization of the cell surface of pathogenic protozoa.** Micron 26, 405-430, 1995.
- DE SOUZA, W. **Electron microscopy of trypanosomes - A historical view.** Mem Inst Oswaldo Cruz, 103(4), 313-325, 2008.
- DEBRANT, A.; LEE, N.; BERTHOLET, S.; DUNCAN, R. & NAKHASI, H.L. **Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms.** Int J Parasitol., 33, 257-67, 2003.

- DELORENZI, J.C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; PINTO, A.C.; HENRIQUES, A.T.; BOU-HABIB, D.C. & SARAIVA, E.M. **Antileishmanial activity of na indole alkaloid from *Peschiera australis***. Antimicrob. Agents Chemother., 45(5), 1349–1354, 2001.
- DELORENZI, J.C.; FREIRE-DE-LIMA, L.; GATTAS, C.R.; DE ANDRADE COSTA, D.; HE, L. & KUEHNE, M.E. ***In vitro* activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis***. Antimicrobial Agents Chemotherapy., 46, 2111-5, 2002.
- DENISE, H.; POOT, J.; JIMENEZ, M.; AMBIT, A.; HERRMANN D.C.; VERMEULEN A.N.; COOMBS G.H & MOTTRAM J.C. **Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5**. BMC Mol Biol., 7, 42-55, 2006.
- DEY, R.; BHATTACHARYA, J. & DATTA, S.C. **Calcium-dependent proteolytic activity of a cysteine protease caldonopain is detected during *Leishmania* infection**. Mol Cell Biochem., 281(1-2), 27-33, 2006.
- DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P. & MORENO, S.N.J. **Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man**. Nat. Rev. Microbiol., 3, 251-261, 2005.
- DONKOR, I.O. **A survey of calpain inhibitors**. Curr. Med.Chem., 7, 1171-1188, 2000.
- DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C. & CHATTERJEE, M. **Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis**. Parasitol. Int., 54, 19-122, 2005.
- DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C. & CHATTERJEE, M. ***Aloe vera* leaf exudate induces a caspase independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes**. Journal of Medical Microbiology, 56, 629–636, 2007a.

- DUTTA, A.; GHOSHAL, A.; MANDAL, D.; MONDAL, N.B.; BANERJEE, S.; SAHU, N.P. & MANDAL, C. **Racemoside A, na anti-leishmanial, water-soluble, natural steroidal saponin, induces programmed cell death in *Leishmania donovani*.** Journal of Medical Microbiology, 56, 1196-1204, 2007b.
- EDER, J.; HOMMEL, U.; CUMIN, F. ; MARTOGLIO, B. & GERHARTZ B. **Aspartic proteases in drug discovery.** Curr Pharm Des., 13(3), 271-85, 2007.
- ELIAS, C.G.R.; PEREIRA, F.M.; SILVA, B.A.; ALVIANO, C.S.; SOARES, R.M.A. & SANTOS, A.L.S. **Leishmanolysin (gp63 metallopeptidase)-like activity extracellularly released by *Herpetomonas samuelpessoai*.** Parasitology, 132, 37-47, 2006.
- ELLIS, M.; SHARMA, D.K.; HILLEY, J.D.; COOMBS, G.H. & MOTTRAM, J.C. **Processing and trafficking of *Leishmania mexicana* GP63. Analysis using GP18 mutants deficient in glycosylphosphatidylinositol protein anchoring.** J. Biol. Chem., 277, 27968-27974, 2002.
- EL-SAYED, N.M. & DONELSON, J.E. **African trypanosomes have differentially expressed genes encoding homologues of the *Leishmania* GP63 surface protease.** J Biol Chem., 272(42), 26742-8, 1997.
- EMORI, Y. & SAIGO, K. **Calpain localization changes in coordination with actin-related cytoskeletal changes during early embryonic development of *Drosophila*.** J Biol Chem., 269(40), 25137-42, 1994.
- ESCOBAR, P.; YARDLEY, V. & CROFT, S.L. **Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), ambisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice.** Antimicrob Agents Chemother., 45(6), 1872–1875, 2001.

- FABRIZIO, P. & LONGO, V.D. **Chronological aging-induced apoptosis in yeast.** Biochem Biophys Acta, 1783, 1280–1285, 2008.
- FIGARELLA, K.; UZCATEGUI, N.L.; BECK, A.; SCHOENFELD, C.; KUBATA, B.K.; LANG, F. & DUSZENKO, M. **Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress.** Cell Death Differ., 13(10), 1802-14, 2006.
- FRAME, M.J.; MOTTRAM, J.C. & COOMBS, G.H. **Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction.** Parasitology, 121(Pt4), 367-377, 2000.
- FRÖHLICH, K.U. & MADEO, F. **Apoptosis in yeast – a monocellular organism exhibits altruistic behavior.** FEBS Lett., 473, 6–9, 2000.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). **Guia de Vigilância epidemiológica.** Brasília: FUNASA. 5 ed., 2002.
- GAFNI, J. & ELLERBY, L.M. **Calpain activation in Huntington´disease.** J. Neurosci., 22, 4842-4849, 2002.
- GIESE, V.; DALLAGIOVANNA, B.; MARCHINI, F.K.; PAVONI, D.P.; KRIEGER, M. A. & GOLDENBERG, S. ***Trypanosoma cruzi*: a stage-specific calpain-like protein is induced after various kinds of stress.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 103, 598–601, 2008.
- GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; LI, H. ; WEI, W. & CONG, J. **The calpain system.** Physiol. Ver., 83, 731-801, 2003.
- GOLSTEIN, P.; AUBRY, L. & LEVRAUD, J.P. **Cell-death alternative model organisms: why and which?** Nat Rev Mol Cell Bio., 4, 798–807, 2003.

- GONTIJO, B. & CARVALHO, M.L.R. **Leishmaniose Tegumentar Americana**. Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 36 (1), 71–80, 2003.
- GONTIJO, C.M.F. & MELO, M.N. **Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, Desafios e Perspectivas**. Rev Bras Epidemiol., 7(3), 338–349, 2004.
- GRANDGENETT, P.M.; COUGHLIN, B.C.; KIRCHHOFF, L.V. & DONELSON, J.E. **Differential expression of GP63 genes in *Trypanosoma cruzi***. Short communication. Molecular and Biochemical Parasitology, 110 (2000), 409–415, 2000.
- GRIMALDI J.R.G.; TESH, R.B. & MCMAHON-PRATT, D. **A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World**. Am. J. Tropical Medicine and Hygiene, 41, 687-725, 1989.
- GRIMALDI, G. JR.; MC-MAHON-PRATT, D. & SUN, T. **Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview**. Prog Clin Parasitol., 2, 73–118, 1991.
- GRIMALDI, J.R. G. & TESH, R.B. **Leishmaniasis of the New World current concepts and implications for future research**. Clinical Microbiol., 6, 230-250, 1993.
- GULL, K. **The cytoskeleton of trypanosomatid parasites**. Annu. Rev. Microbiol., 53, 629-55, 1999.
- HAJMOVÁ, M.; CHANG, K.P.; KOLLI, B. & VOLF, P. **Down-regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis***. Microb. Infect., 6, 646–649, 2004.
- HANDMAN, E. **Cell biology of *Leishmania***. Advances in Parasitology, 44, 1-39, 2000.
- HARTLEY, B.S. **Proteolytic enzymes**. Annu Rev Biochem., 29, 45-72, 1960.

- HENGARTNER, M.O. **The biochemistry of apoptosis**. Nature, 407, 770-6, 2000.
- HERTZ-FOWLER, C.; ERSFELD, K. & GULL, K. **CAP5.5, a life-cycle-regulated, cytoskeleton-associated protein is a member of a novel family of calpain-related proteins in *Trypanosoma brucei***. Mol. Biochem. Parasitol., 116, 25-34, 2001.
- HIGUCHI, M.; IWATA, N. & SAIDO, T. C. **Understanding molecular mechanisms of proteolysis in Alzheimer's disease: progress toward therapeutic interventions**. Biochem. Biophys. Acta, 1751, 60-67, 2005.
- HOARE, C.A. & WALLACE, F.G. **Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology**. Nature, 212, 1385-1386, 1966.
- HOLZMULLER, P.; SERENO D.; CAVALEYRA, M.; MANGOT, I.; DAULOUEDE, S.; VINCENDEAU, P. & LEMESRE, J.L. **Nitric Oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes**. Infect Immunol., 70, 3727-35, 2002.
- HSIAO, C.H.C.; YAO, C.; STORLIE, P.; DONELSON, J.E. & WILSON, M.E. **The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi***. Mol. & Biochem. Parasitol., 157, 148-159, 2008.
- INVERSO, J.A.; MEDINA- ACOSTA, E.; O' CONNOR, J.; RUSSEL, D.G. & CROSS, G.A. ***Crithidia fasciculata* contains a transcribed leishmanial surface proteinase (gp63) gene homologue**. Mol. Biochem Parasitol., 57, 47-54, 1993.
- JACOBSON, D.J., BEURKENS, K. & KLOMPARENS, K.L. **Microscopic and ultrastructural examination of vegetative incompatibility in partial diploids heterozygous at het loci in *Neurospora crassa***. Fungal Genet Biol., 23, 45-56, 1998.

- JAFFE, C.L. & DWYER, D.M. **Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from Leishmania and insect trypanosomatids.** Parasitol. Research, 91, 229-237, 2003.
- JAMES, M. **Structure and function of aspartic protease: retroviral and cellular enzymes.** Plenum Press. New York, 1998.
- JANOVY, JR.; LEE, K.W. & BRUMBAUGH, J.A. The **differentiation of *Herpetomonas megaseliae*: ultrastructural observations.** J. Protozool., 21, 53-59, 1974.
- JHA, T. K.; S. SUNDAR, C. P.; THAKUR, P.; BACHMANN, J.; KARBWANG, C.; FISCHER, A. & J. BERMAN. **Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis.** N. Engl. J. Med., 341, 1795–1800, 1999.
- JOHNSON, G.V.W. & GUTTMAN, R.P. **Calpains: inact and active?** BioEssays, 19, 1011-1018, 1997.
- JOSHI, P. B.; KELLY, B. L.; KAMHAWI, S.; SACKS, D. L. & MCMASTER, W. R. **Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor.** Molecular and Biochemical Parasitology, 120, 33–40, 2002.
- KAWASAKI, H.; EMORI Y.; IMAJOH-OHMI S.; MINAMI Y. & SUZUKI, K. **Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease.** J. Biochem. (Tokyo), 106, 274-281, 1989.
- KERR, J.F.; WYLLIE, A.H. & CURRIE, A.R. **Apoptosis: a basic biological phenomenon wit wide-ranging implications in tissue kinectis.** BR J Cancer, 26, 239-6, 1972.

- KUHLENCORD, A., MANIERA, T., EIBL, H. & UNGER, C. **Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice.** *Antimicrob Agents Chemother.*, 36(8), 1630–1634, 1992.
- LAINSON, R., SHAW, J.J. **The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis.** In: *Biology of the Kinetoplastida*, 1-116. Edited by Lumsden, W.H.R., Evans, D.A., London and New York, Academic Press, 1979.
- LAINSON R. & SHAW J.J. **Evolution, classification and geographical distribution.** In: *The leishmaniasis in Biology and Medicine*, 1-120. Edited by Killick-Kendric, R., Peters, W., London, Academic Press, 1987.
- LANDFEAR, S.M. & IGNATUSCHCHENKO, M. **The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids.** *Mol. Biochem. Parasitol.*, 115, 1-17, 2001.
- LEE, N.; BERTHOLET, S.; DEBRABANT, A.; MULLER, J.; DUNCAN, R. & NAKHASI, H.L. **Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania infantum* amastigotes.** *Antimicrob Agents Chemother.*, 45, 2064-9, 2001.
- LESCOP, C.; HERZNER, H.; SIENDT, H. BOLLIGER, R. HENNEBÖHLE, M.; WEYERMANN, P. BRIGUET, A. COURDIER-FRUH, I.; ERB, M.; FOSTER, M.; MEIER, T.; MAGYAR, J.P. & VON SPRECHER, A. **Novel cell-penetrating alpha-keto-amide calpain inhibitors as potential treatment for muscular dystrophy.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 5176-5181, 2005.
- LEWIS, K. **Programmed death in bacteria.** *Microbiol Mol Biol.*, R 65, 503–514, 2000.
- LIANG, Q. & ZHOU, B. **Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways.** *Mol Biol Cell.*, 18, 4741–4749, 2007.

- LIMA, A.K.C.; ELIAS, C.G.R.; SOUZA, J.E.O.; SANTOS, A.L.S. & DUTRA, P. M. L. **Dissimilar peptidase production by avirulent and virulent promastigotes of *Leishmania braziliensis*: inference on the parasite proliferation and interaction with macrophages.** Parasitology, 136, 1–13, 2009.
- LU, B.C.K. **Programmed Cell Death in Fungi.** In: The Mycota I Growth, Differentiation and Sexuality, 167-187. Edited by Kues, U. & Fischer, R., Berlin, Springer, 2006.
- MA, G.; KHAN, S.I.; JACOB, M.R.; TEKWANI, B.L.; LI Z.; PASCO, D.S.; WALKER, L.A.; KHAN, I.A. **Antimicrobial and antileishmanial activities of hipocrellins A and B.** Antimicrob Agents Chemother., 8(11), 4450–4452, 2004.
- MADEO, F., FROHLICH, E., LIGR, M., GREY, M., SIGRIST, S.J., WOLF, D.H. & FROHLIC, K.U. **Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast.** J Cell Biol., 145, 757–767, 1999.
- MASLOV, D.A. & SIMPSON, L. **Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa.** Parasitol. Today, 1, 30-32, 1995.
- MCGWIRE, B.S.; O' CONNELL, W.A.; CHANG, K.P. & ENGMAN, D. J. **Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence.** Biol. Chem., 277, 8802-8809, 2002.
- MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P. & ENGMAN, D. M. **Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63.** Infection and Immunity, 71, 1008–1010, 2003.
- MCKERROW, J.H.; SUN, E.; ROSENTHAL, P.J. & BOUVIER, J. **The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa.** Annu. Rev. Microbiol., 47, 821-853, 1993.

- MCKERROW, J.H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P. & SAJID, M. **Proteases in Parasitic Diseases**. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 1, 497-536, 2006.
- MELBY, P.C. **Recent developments in leishmaniasis**. Curr. Opin. Infect. Dis., 15, 485-490, 2002.
- MEHTA, A. & SHAHA, C. **Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity**. J Biol Chem., 279, 11798–11813, 2004.
- MICHELS, P.A.M.; HANNAERT, V. & BRINGAUND, F. **Metabolic aspects of glycosomas in trypanosomatidae – new data and views**. Parasitol. Today, 16, 482-89, 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. [homepage na Internet]. Brasília D.F.: Serviço de Vigilância em Saúde; 2007 [acesso em 2008 Dez 16]. Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana [aproximadamente 3 tela]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_lta\\_2ed.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf).
- MISHIZEN-EBERRZ, A.J.; NORRIS, E.H.; GIASSON, B. I.; HODARA, R.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q. & LYNCH, D.R. **Cleavage of alpha-synuclein by calpain: potential role in degradation of fibrillized and nitrated species of alpha-synuclein**. Biochemistry, 44, 7818-7829, 2005.
- MONARI, C.; PERICOLINI, E.; BISTONI, G.; CENCI, E.; BISTONI, F. & VECCHIRELLI, A. **Influence of indinavir on virulence and growth of *Cryptococcus neoformans***. J Infect Dis., 191(2), 307-11, 2005.
- MORGADO-DIAZ, J.A.; SILVA-LOPEZ, R.E.; ALVES, C.R.; SOARES, M.J.; CORTE-REAL, S. & DE SIMONE, S.G. **Subcellular localization of an intracellular serine protease of 68 kda in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes**. Mem Inst Oswaldo Cruz, 100 (4), 377-83, 2005.

- MOTTRAM, J.C.; BROOKS, D.R. & COOMBS, G.H. **Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions.** Curr. Opin. Microbiol., 1, 455-460, 1998.
- MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H. & ALEXANDER, J. **Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*.** Curr Opin Microbiol., 7(4), 375-381, 2004.
- MUNDODI, V.; SOMANNA, A.; FARRELL, P.J. & GEDAMU, L. **Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex.** Gene, 282, 257-265, 2002.
- MUNRO, C.A. & HUBE, B. **Anti-fungal therapy at the HAART of viral therapy.** Trends Microbiol., 4, 173-177, 2002.
- MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D; DAVIES, C.R. & SARAIVA, N.G. **Advances in leishmaniasis.** Lancet, 366, 1561-77, 2005.
- NARGUND, A.M.; AVERY, S.V. & HOUGHTON, J.E. **Cadmium induces a heterogeneous and caspase-dependent apoptotic response in *Saccharomyces cerevisiae*.** Apoptosis, 13, 811–821, 2008.
- NGUEWA, P.A.; FUERTES, M.A.; VALLADARES, B.; ALONSO, C. & PEREZ, J.M. **Programmed cell death in trypanosomatides: a way to maximize their biological fitness?** Trends Parasitol., 33, 257-67, 2004.
- NICOLLETI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F. & RICCARDI, C. **A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.** J Immunol Methods, 139(2), 271-9, 1991.
- NISHIARA, H.; NAKAGAWA, Y.; ISHIKAWA, H.; OHBA, M.; SHIMIZU, K. & NAKAMURA, T. **Matrix vesicles and media vesicles as nonclassical pathways for**

- the secretion of m-calpain from MC3T3-E1 cells.** Biochem. Biophys. Res. Comm., 285, 845-853, 2001.
- 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.; BRANQUINHA, M.H. & VERMELHO, A.B. **Peptidases and gp63-like proteins in *Herpetomonas megaseliae*: possible involvement in the adhesion to the invertebrate host.** Int. J. Parasitol., 36, 415–422, 2006.
- OLLIARO, P.L. & BRYCESON, A.D.M. 1993. **Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis.** Parasitol Today, 9, 323–328.
- PALMEIRA, V.F.; KNEIPP, L.F.; ROZENTAL, S.; ALVIANO, C.S. & SANTOS, A.L. **Beneficial affects of HIV peptidase inhibitors on *Fonsecaea pedrosoi*: promising compounds to arrest key fungal biological processes and virulence.** PLOS ONE, 3(10), 3382, 2008.
- PALUMBO, E. **Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review.** The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 12 (1), 2-4, 2008.
- PARIS, C.; LOISEAU, P.M.; BORIES, C. & BREARD, J. **Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes.** Antimicrob Agents Chemother., 48, 852–859, 2004.
- PARK, S.Y. & FERREIRA, A. **The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: na alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration.** J. Neurosci., 25, 5365-5375, 2005.
- PEREIRA, B.A. & ALVES, C.R. **Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.** Vet. Parasitol., 19(2), 239-55, 2008.

- PEREIRA, F.M.; ELIAS, C. G. R.; D'AVILA-LEVY, C. M.; BRANQUINHA, M. H. & SANTOS, A.L.S. **Cysteine peptidases in *Herpetomonas samuelpessoai* are modulated by temperature and dimethylsulfoxide-triggered differentiation.** *Parasitology*, 136, 45–54, 2009.
- PHILLIPS, A.J.; SUDBERY, I. & RAMSDALE, M. **Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*.** *P Natl Acad Sci USA*, 100, 14327–14332, 2003.
- PHILLIPS, A.J.; CROWE, D.J. & RAMSDALE, M. **Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*.** *P Natl Acad Sci USA*, 103, 726–731, 2006.
- PIACENZA, L.; IRIGOÍN, F.; ALVAREZ, M.N.; PELUFFO, G.; TAYLOR, M.C.; KELLY, J.M.; WILKINSON, S.R. & RADI, R. **Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression.** *Biochem J.*, 403(2), 323–34, 2007.
- PINTI, M.; ORSI, C.F.; GIBELLINI, L.; ESPOSITO, R.; COSSARIZZA, A.; BLASI, E.; PEPPOLONI, S. & MUSSINI, C. **Identification and characterization of a aspartyl protease from *Cryptococcus neoformans*.** *FEBS Lett.*, 581 (20), 3882–6, 2007.
- PODLIPLAEV, S.A. & ROTISKAYA, T.A. **Classification of isolates of insect's trypanosomatids: isoenzymes analysis.** *Parasitology*, 25, 250–256, 1999.
- PORTER, S.R. & SCULLY, C. **HIV topic update: protease inhibitor therapy and oral health care.** *Oral Dis.*, 4, 159–163, 1998.

- POZIO, E. & MORALES, M.A. **The impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites.** Trends Parasitol., 21(2), 58-63, 2005.
- RAHT, S.; TRIVELLIN, A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.; JUNIOR, H.F.A. & TEMPONE, A.G. **Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado de Arte.** Quim Nova, 26, 550–557, 2003.
- RAMOS, H.; MILHAUD, J.; COHEN, B.E. & BOLARD, J. **Enhanced action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* resulting from heat transformation.** Antimicrob Agents Chemother., 34(8), 1584–1589, 1990.
- RAMSDALE, M. **Programmed cell death and apoptosis in fungi.** In: The Mycota XIII Fungal Genomics, 113–145. Edited by Brown, A.J.P., Berlin, Springer, 2006.
- RANGEL, E.F. & LAINSON, R. **Ecologia das leishmanioses.** In: Flebotomíneos do Brasil, 291-305. Edited by Rangel E.F., Lainson R., Rio de Janeiro, Fiocruz, Brasil, 2003.
- RANQUE, P.H.; NOURRIT, J. & NICOLI, R.M. **Recherches systématiques sur les trypanosomides. Les stades évolutifs chez les trypanosomides.** Bull. Soc. Path. Éxot., 67, 377-387, 1973.
- RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S. & DESHPANDE, V.V. **Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases.** Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 597-635, 1998.
- RAY, S.K.; HOGAN, E.L. & BANIK, N.L. **Calpain in the pathophysiology of spinal Cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors.** Brain Res. Ver., 42, 169-185, 2003.
- REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

- REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 2ª Ed. Guanabara Koogan, RJ, 379 p. 2002.
- ROBSON, G.D.P. **Programmed cell death in the *Aspergillus* and other filamentous fungi**. *Med Mycol.*, 44, 109–114, 2006.
- ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; BIZZO, H.R.; RODRIGUES, I.A.; SOARES, R.M.; PADRÓN, T.S.; ALVIANO, C.S. & LOPES, A.H.C.S. **Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara***. *Antimicrob Agents Chemother.*, 47(6), 1895–1901, 2003.
- SAATMAN, K.E.; MURAI, H.; BARTUS, R.T.; SMITH, D.H.; HAYWARD, N.J.; PERRI, B.R. & MCINTOSH, T.K. **Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 3428-3433, 1996.
- SACKS, D.L.; HIENY, S. & SHER, A. **Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes**. *Journal of Immunology*, 135, 564-569, 1985.
- SAJID, M. & MCKERROW, J.H. **Cysteine proteases of parasitic organisms**. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 120, 1-21, 2002.
- SAEZ, M.E.; RAMIREZ-LORCA, R. ; MORON, F.J. & RUIZ, A. **The therapeutic potential of the calpain family: new aspects (Review)**. *Drug Discov Today*, 11(19-20), 917-23, 2006.
- SALOTRA, P.; DUNCAN, R.C.; SINGH, R.; RAJU, B.V.S.; SREENIVAS, G. & NAKHASI, H.L. **Upregulation of surface proteins in *Leishmania donovani* isolated from patients of post kala-azar dermal leishmaniasis**. *Microbes and Infection.*, 8, 637-644, 2006.

- SANGENITO, L.S.; ENNES-VIDAL, V.; MARINHO, F.A.; DA MOTA, F.F.; SANTOS, A.L.S.; D'AVILA-LEVY, C.M. & BRANQUINHA, M.H. **Arrested growth of *Trypanosoma cruzi* by the calpain homologues in epimastigotes forms.** Parasitology, 1-9, 2009.
- SANTOS, A.L.S.; ABREU, C.M.; ALVIANO, C.S. & SOARES, R.M.A. **Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification.** Parasitology, 130, 79-88, 2005.
- SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C.M.; DIAS, F.A.; RIBEIRO, R.O.; PEREIRA, F.M.; ELIAS, C.G.; SOUTO-PADRÓN N.T.; LOPES, A.H.; ALVIANO, C.S.; BRANQUINHA, M.H. & SOARES, R.M.A. ***Phytomonas serpens*: cysteine peptidase inhibitors interfere with growth, ultrastructure and host adhesion.** International Journal for Parasitology, 36, 47–56, 2006.
- SANTOS, A.L.S.; D'AVILA-LEVY, C.M.; ELIAS, C.G.R.; VERMELHO, A.B. & BRANQUINHA, M.H. ***Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens.** Microb. Infect., 9, 15-921, 2007.
- SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.R.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO C.G.; VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO A.; BOURGUIGNON, S.C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R.T.; RODRIGUES, C.R. & CASTRO, H.C. **Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review.** Parasitology Research, 103(1), 1-10, 2008.
- SANTOS, L.O.; MARINHO, F.A.; ALTOÉ, E.F.; VITÓRIO, B.S.; ALVES, C.R.; BRITO, C., MOTTA, M.C.M.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L.S. & D'AVILA-LEVY, C.M. **HIV Aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*.** Plos One, 4:(3), e4918, 2009.

- SAXENA, A.; WORTHEY, E.A.; YAN, S.; LELAND, A.; STUART, K.D. & MYLER, P.J. **Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis.** Molecular and Biochemical Parasitology, 129, 103–114, 2003.
- SELZER, P.M.; PINGEL, S.; HSIEH, I.; UGELE, B.; CHAN, V.J.; ENGEL, J.C.; BOGYO, M.; RUSSELL, D.G.; SAKANARI, J.A. & MCKERROW, J.H. **Cysteine protease inhibitors as chemotherapy: lessons from a parasite target.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 11015-11022, 1999.
- SEN, N.; DAS, B. B.; GANGULY, A.; MUKHERJEE, T.; TRIPATHI, G.; BANDYOPADHYAY, S.; RAKSHIT, S.; SEN, T. & MAJUMDER, H. K. **Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*.** Cell Death Differ., 11, 924–936, 2004.
- SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; ZENZOUMI, K.; MAQUEIRE, S.; OUAISSI, A. & LENESRE, J.L. **Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action.** Antimicrob Agents Chemother., 42, 3097-102, 1998.
- SHAHA, C. **Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis.** Indian J Med Res., 123, 233-244, 2006.
- SHARON, A.; FINKELSTEIN, A.; SHLEZINGER N. & HATAM, I. **Fungal apoptosis: function, genes and gene function (Review).** FEMS Microbiol., (Epub ahead of print), 1–22, 2009.
- SILVA, R.D.; SOTOCA, R.; JOHANSSON, B.; LUDOVICO, P.; SANSONETTY, F.; SILVA, M.T.; PEINADO, J.M. & CORTE-REAL, M. **Hyperosmotic stress induces**

- metacaspase- and mitochondria-dependent apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*.** Mol Microbiol., 58, 824–834, 2005.
- SILVA-LOPEZ, R.E.; COELHO, M.G. & DE SIMONE, S.G. **Characterization of an extracellular serine protease of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.** Parasitology., 131 (1), 85-96, 2005.
- SINGH, S. & SIVAKUMAR, R. **Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis.** J Infect Chemother., 10(6), 307–315, 2004.
- SOARES, D.C.; PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. & SARAIVA, E.M. **Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*.** Parasitology International, 56, 135-139, 2007.
- SOARES, R.M.A.; SANTOS, A.L.S.; BONALDO, M.C.; ANDRADE, A.F.B.; ALVIANO, C.S.; ANGLUSTER, J. & GOLDENBERG, S. ***Leishmania (Leishmania) amazonensis*: differential expression of proteinases and cell-surface polypeptides in avirulent and virulent promastigotes.** Experimental Parasitology, 104, 104-112, 2003.
- SORIMACHI, H.; ISHIURA, S. & SUZUKI, K. **Structure and physiological function of calpains.** Biochem. J., 328, 721-732, 1997.
- SOTO, J.; TOLEDO, P.; GUTIEREZ, R. S.; NICHOLLS, J.; PADILA, J.; ENGEL, C.; FISCHER, A.; VOSS J. & BERMAN J.D. **Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent.** Clin. Infect. Dis., 33, E57-E61, 2001.
- SOTO, J.; REA, J.; BALDERRAMA, M.; TOLEDO, J.; SOTO, P.; VALDA, L. & BERMAN, J.D. **Short Report: Efficacy of miltefosine for bolivian cutaneous leishmaniasis,** Am. J. Trop. Med. Hyg., 78 (2), 210-211, 2008.

SOUSA, M.A.; CAMARGO, A.C.; CAMPELO, A.G.S.; ABRANTES, J.; SÁ-XAVIER, C.; BRASIL, R.P. & TAVARES, C. C. **Molecular kariotipe analisys of lower tripanosomatids**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 91 (suppl. I), 102, 1996.

SOUSA, M.A. **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, 2000.

SOUTO-PADRÓN, T.; CAMPETELLA, O.E.; CAZZULO, J.J. & DE SOUZA, W. **Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction**. J. Cell Sci., 96, 485-490, 1990.

STRACHER, A.; KESNER, L.; CARVER, T.; BARTON, N.W. Ceptor Corporation. **Treatment of traumatic or degenerative neurologic, otologic or ophthalmologic diseases with targeted protease inhibitors**. World patent WO2005/108353, 2006.

SUDHANDIRAN, G. & SHAHA, C. **Antimonial Induced increase in intracellular  $Ca^{2+}$  through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular leishmania donovani amastigotes**. Infect Immunol., 70, 3727-35, 2002.

SUNDAR, S.F.; ROSENKAIMER, M.K.; MAKHARIA, A.K.; GOYAL, A.K.; MANDAL, A.; VOSS, P.; HILGARD, H. & MURRAY, W. **Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis**. Lancet, 352, 1821-1823, 1998.

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

- SUNDAR, S. A.; MAKHARIA, D.K.; MORE, G.; AGRAWAL, A.; VOSS, C.; FISCHER, P.; BACHMANN H.W. & MURRAY W. **Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral leishmaniasis.** Clin. Infect. Dis., 31, 1110–1113, 2000.
- TAKAHASHI, S.; OGASAWARA, H.; HIWATASHI, K.; HORI, K.; HATA, K.; TACHIBANA, T.; ITOH, Y. & SUGIYAMA, T. **A novel D-aspartyl endopeptidase from *Paenibacillus* sp. B38: purification and substrate specificity.** J. Biochem., 139 (2), 197-202, 2006.
- TAVARES, J.; OUAISSI, M.; OUAISSI, A. & CORDEIRO-DA-SILVA, A. **Characterization of the anti-*Leishmania* effect induced by cisplatin, an anticancer drug.** Acta Tropica, 103, 133-141, 2007.
- TEIXEIRA, M.M.G.; TAKATA, C.S.A.; CONCHON, I; CAMPANER, M. & CAMARGO, E.P. **Ribosomal and kDNA markers distinguish two subgroups of *Herpetomonas* among old species and new trypanosomatids isolated from flies.** J. Parasitol., 83, 58-65, 1997.
- TERANISHI, F.; LIU, Z.Q.; KUNIMATSU, M.; IMAI, K.; TAKEYAMA, H.; MANABE, T.; SASAKI, M. & OKAMOTO, T. **Calpain is involved in the HIV replication from the latently infected OM10.1 cells.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 303, 940-946, 2003.
- TROEBERG, L.; MORTY, R. E.; PIKE, R. N.; LONSDALE- ECCLES, J. D.; PALMER, J. T.; MCKERROW, J. H. & COETZER, T. H. **Cysteine proteinase inhibitors kill cultured bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*.** Experimental Parasitology, 91, 349–355, 1999.
- VALDIVIESO, E.; DAGGER, F. & RASCÓN, A. ***Leishmania mexicana*: identification and characterization of na aspartyl proteinase activity.** Exp. Parasitol., 116 (1), 77-82, 2007.

- VANDERKLISH, P.W. & Bahr, B.A. **The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states.** Int. J. Exp. Pathol., 81, 323-339, 2000.
- VAUX, D.L. & STRASSER, A. **The molecular biology of apoptosis.** Proc Natl Acad Sci USA., 93, 2239-44, 1996.
- VERGNES, B.; GOURBAL, B.; GORARD, I.; SUNDAR, S.; DRUMMELSMITH, J. & OUELLETTE, M. **A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death.** Molecular Cell Proteomics, 6, 88–101, 2007.
- VERMA N.K. & DEY C.S. **Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*.** Antimicrobi Agents Chemoter., 48, 3010-5, 2004.
- VERMA, N.K.; SINGH, G. & DEY, C.S. **Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction.** Experimental Parasitology, 116, 1–13, 2007.
- VERMELHO, A.B.; DE SIMONE, G.; D'AVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, A.L.S; MELO, A.C.N.; SILVA, JR. F.P.; BON, E.P.S. & BRANQUINHA, M.H. **Trypanosomatidae Peptidases: A Target for Drugs Development.** Current Enzyme Inhibition, 3, 19-48, 2007.
- VICKERMAN, K. & PRESTON, T.M. **Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates.** In: Biology of the kinetoplastida. Academic Press, New York, 1, 35-130, 1976.

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

VICKERMAN, K. **Phylum Zoomastigina – Class Kinetoplastida. In: Handbook of Protoctista.** James and Barlett Publishers. Boston. 215-238, 1990.

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

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

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G.J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A. & ANTON, R. **Antiprotozoal activities of Colombian plants.** J Ethnopharmacol, 78(2–3), 193–200, 2001.

WHO (1990) **Tropical disease research progress. AIDS, leishmaniasis dangers of clash highlighted.** TDR News. 36:1–11. World Health Organization.

WHO (1991) **Tropical disease research progress. Antimonials largescale failure in Leishmaniasis “alarming”.** TDR News. 34:17. World Health Organization.

WHO (2001) **Tropical disease research: progress 1999–2000.** World Health Organization, Geneva.

WHO/Leishmaniasis. **Leishmaniasis: background information.** 2006. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acessado em 20/06/2008.

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

- WYLLIE, A.H.; KERR, J.F. & CURRIE, A.R. **Cell death: the significance of apoptosis.** Int Rev Cytol., 68, 251-306, 1980.
- YAO C.; DONELSON J.E. & WILSON M.E. **The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function.** Mol Biochem Parasitol., 132(1), 1-16, 2003.
- YARDLEY V.; KHAN A.A.; MARTIN M.B.; SLIFER T.R.; ARAUJO F.G.; MORENO S.N.J.; DOCAMPO R.; CROFT S.L. & OLDFIELD E. ***In vivo* activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*.** Antimicrob Agents Chemother., 46(3), 929–931, 2002.
- YONG, V.; SCHMITZ, V.; VANNIER-SANTOS, M.A.; LIMA, A.P.C.A.; LALMANACH, G.; JULIANO, L.; GAUTHIER, F. & SCHARFSTEIN, J. **Altered expression of cruzipain and a cathepsin B-like target in a *Trypanosoma cruzi* cell line displaying resistance to synthetic inhibitors of cysteine-proteinases.** Molecular and Biochemical Parasitology, 109, 47–59, 2000.
- YOSHIDA, N.; JANKEVICIUS, J.V.; ROITMAN, I. & CAMARGO, E.P. **Enzymes of the ornithine-arginine metabolism of trypanosomatids of the genus *Herpetomonas*.** J. Protozool., 25, 550-555, 1978.
- ZANGGER, H.; MOTTRAN, J.C. & FASEL, N. **Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: Programmed cell death or necrosis?** Cell Death Differ.; 9, 1126-39, 2002.

# 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](#)