

Universidade de Brasília – UnB-FCE  
Programa de Pós-Graduação em Ciências e  
Tecnologia em Saúde  
Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro

Caracterização bioquímica da Prolil Oligopeptidase  
de *Leishmania chagasi*, um potencial alvo  
quimioterápico para as Leishmanioses

Dissertação de Mestrado

**Camila Lasse Silva**

Brasília-DF

2014

Camila Lasse Silva

Caracterização bioquímica da Prolil Oligopeptidase  
de *Leishmania chagasi*, um potencial alvo  
quimioterápico para as Leishmanioses

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Nader Motta

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia em Saúde da Universidade de Brasília – Faculdade Ceilândia para obtenção do título de Mestre em Ciências e Tecnologia em Saúde.

Brasília-DF

2014

Silva , Camila Lasse.

**Caracterização bioquímica da Prolil Oligopeptidase de *Leishmania chagasi*, um potencial alvo quimioterápico para as Leishmanioses.**

Brasília, 2014

79 p. : il.

Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia em Saúde.  
Universidade de Brasília-FCe, Brasília.

1.Leishmaniose. 2.Prolil oligopeptidase. 3.Caracterização bioquímica.

Universidade de Brasília-FCe

Programa de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia em Saúde

**Caracterização bioquímica da Prolil Oligopeptidase de *Leishmania chagasi*, um potencial alvo quimioterápico para as Leishmanioses.**

Camila Lasse Silva

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de pós-graduação em Ciências e Tecnologia em Saúde da Universidade de Brasília-FCe, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências e Tecnologia em Saúde, área de concentração Mecanismos Básicos e Processos Biológicos em Saúde.

Aprovado por:

---

Izabela Marques Dourado Bastos, Doutora (UnB)  
Orientadora

---

Carla Nunes de Araújo, Doutora (UnB)

---

Hugo de Almeida, Doutor (UnB)

Brasília-DF, 23 de janeiro de 2014.

*Dedico este trabalho a toda a minha família, que sempre me apoiou e me incentivou a lutar pelos meus sonhos e ideais. Amo vocês!*

## AGRADECIMENTOS

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos, pela excelente orientação e por toda sua dedicação na realização deste projeto. Sua presença e pulso firme me mostrou o que eu era capaz de fazer e que sempre podemos ir mais longe. Você foi mais que uma orientadora, foi como um anjo da guarda que nos mostra o caminho a ser seguido. Obrigada!

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Nader Motta, por sua orientação e constante ajuda, pois sem ela não teria conseguido realizar tudo o que realizamos. Você foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Sua dedicação é admirável.

Ao Prof. Dr. Jaime Santana, por sua experiência e conhecimentos compartilhados. Sua exigência me fez querer ser melhor.

Ao Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau, pela colaboração dada a este projeto.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Carla Araújo, por sua paciência e prestatividade ao longo do trabalho, ajudando no que precisasse.

A todos os colegas de laboratório que me ajudaram, apoiaram e incentivaram, seja com palavras e atitudes. Paula, Tatiana, Brina, Marta, Raquel, obrigada por tudo!

As minha amigas Graziella Figueiredo, que esteve sempre presente e disposta ajudar da maneira que fosse. A Cissé Sow, por me ensinar tantas coisas e por ser sempre uma boa amiga. Nossos almoços e conversas tão prazerosos que me proporcionaram momentos de alegria e diversão.

A Rauciane Gomes e Jhonata Lima, pela colaboração e companhia constante.

A Iracyara Sampaio, que foi fundamental para este trabalho. Sua dedicação e disposição foram de grande ajuda. Obrigada por estar presente sempre que precisei, por seu companheirismo e amizade.

A Clênia, que me ensinou muitas das coisas que sei. Obrigada pela acolhida carinhosa quando entrei para o laboratório e pela ajuda nos momentos finais do mestrado.

As minhas amigas da escola Karoline, Danielle, Roseane, Michelle, Evelyn, Karen e Maria Eliane, pelo apoio, carinho e compreensão.

A um amigo especial, Wander, que nos momentos de desânimo me aconselhou e me fez ver as coisas com clareza me mostrando a melhor decisão a tomar.

Aos meus pais, Iara e Antônio, pela confiança depositada em mim e por sempre me incentivarem a não desistir. Obrigada pelo amor, carinho e atenção que é dado a mim, aos meus irmãos e às netinhas. Sem vocês nada disso seria possível. A presença e dedicação de vocês são o que me move. Amo vocês!

Aos meus queridos irmãos, Sandro e June, por estarem presentes e pela amizade que nos une. Obrigada por me ajudarem a concluir esse sonho. Obrigada! Amo vocês.

As minhas cunhadas Rita, Alessandra e Adriana por me ajudarem e apoiarem.

A minha sogra, Maria, por me receber em sua casa e cuidar da Sophia com tanto carinho e dedicação para que eu pudesse me dedicar ao mestrado.

As minhas sobrinhas, Laura, Lívia, Lorena e Mayara e ao sobrinho Gabriel, por fazerem parte da minha vida e alegrarem os meus dias.

Ao meu esposo, Alexandre, pelo apoio e incentivo constante. Por me compreender e entender minha falta de tempo e meus estresses nesses momentos finais da pós-graduação. Obrigada por cuidar da Sophia e pelo seu companheirismo. Amo você!

A minha filha Sophia, por aceitar minha ausência e entender que eu precisava estar ausente, pois isso é para o nosso crescimento. Obrigada por

seu amor imenso, pelo seu carinho e por alegrar os meus dias. Amo você mais que tudo!

A toda a minha família, tios, primos, avós por acreditarem em mim e me incentivarem.

Ao CNPq, CAPES, FAPDF, FINATEC e DPP por financiarem este trabalho permitindo possível sua realização.

A Deus, por estar presente na minha vida e pela vida que tenho. Obrigada pela missão que me foi concedida e pelas pessoas que colocou no meu caminho. Obrigada pela Sua benção e por iluminar o meu caminho. Por me mostrar que o sofrimento e as dificuldades é que nos conduz para uma vida melhor, pois são eles que nos tornam melhores e que permitem nossa superação.



*“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”.*

**Mahatma Gandhi**

## LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Angstrom
AESBF	4-(2-aminoetil) benzenossulfonilo cloridrato de fluoreto
AMC	7-amino-4-metil-cumarina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
DAKO	Fluorescence Mounting Medium
DAPI	4'6-diamidino-2-phenilyndole
DTT	Ditiotreitol
E-64	L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HAT	Tripanossomíase africana humana
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido (2-hidroxietil)-piperazina-etanosulfônico
IC50	Concentração inibitória de 50%
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilodalton
Ki	Constante de inibição
Km	Constante de Michaelis- Menten
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
MES	2-(N-morfolino) etanosulfônico
NaCl	Cloreto de sódio
NBT	Nitro-azul-tetrazólico
NTD	Doença Tropical Negligenciada
PBS	Phosphate Buffered Saline
rPOPLc	Prolil oligopeptidase recombinante de <i>Leishmania chagasi</i>
Sb <sup>+5</sup>	Dodecil sulfato de sódio
SDS/PAGE	Eletoforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TLCK	1-cloro-3-tosilamido-7-amino-2-heptanona
TPCK	Tosil fenilalanil-clorometilcetona
WHO/OMS	Organização Mundial de Saúde

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Subgêneros *Leishmania* e *Viannia*.

Figura 2. *Leishmania* nas formas promastigota e amastigota.

Figura 3. Ciclo de vida do parasito *Leishmania*.

Figura 4. Distribuição global da leishmaniose.

Figura 5. Estrutura da POPTc80.

Figura 6. Inibidor de POPTc80 inibe a entrada de *T. cruzi* na célula hospedeira.

Figura 7. Expressão da rPOPLc.

Figura 8. Análise da purificação da rPOPLc.

Figura 9. Análise dos três soros anti-rPOPLc.

Figura 10. Análise do soro anti-rPOPLc.

Figura 11. Imunocitocalização rPOPLc.

Figura 12. Dependência do pH na atividade da rPOPLc.

Figura 13. Dependência da temperatura na atividade da POPLc.

Figura 14. Plot Hanes-Wolff da atividade de POPLc com Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC.

Figura 15. Teste de inibição com inibidor Z-Pro-Prolinal específico de POPs.

Figura 16. Atividade de POPLc com diferentes substratos.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Casos de LTA no DF de 2007 a 2011.

Tabela 2. Teste para determinação de tampão ótimo.

Tabela 3. Teste com os inibidores clássicos de proteases.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	XV
ABSTRACT .....	XVI
INTRODUÇÃO .....	18
LEISHMANIOSES.....	18
CICLO DE VIDA .....	20
LEISHMANIOSE VISCERAL.....	23
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA .....	24
LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA .....	25
LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA .....	25
DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	26
LEISHMANIOSE NO DISTRITO FEDERAL.....	27
TRATAMENTO .....	28
PROTEASES .....	30
PROLIL OLIGOPEPTIDASE.....	31
PROLIL OLIGOPEPTIDASE DE TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	33
JUSTIFICATIVA.....	37
OBJETIVOS .....	39
METODOLOGIA .....	41
CULTURA E PREPARO DE EXTRATO PROTÉICO DE <i>LEISHMANIA CHAGASI</i> .....	41
CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO.....	41
PRODUÇÃO DO SORO RPOPLC.....	43
WESTERN BLOT.....	43
IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	44
TESTES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	45
<i>Estabelecimento da quantidade de enzima</i> .....	45
<i>Tampão ótimo para atividade enzimática</i> .....	45
<i>Dependência do pH</i> .....	46
<i>Determinação de parâmetros enzimáticos</i> .....	46
<i>Teste de inibição</i> .....	46
<i>Especificidade de substratos</i> .....	46
<i>Dependência da temperatura</i> .....	47
RESULTADOS .....	49
CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PROLYL OLIGOPEPTIDASE DE <i>LEISHMANIA CHAGASI</i> (RPOPLC).....	49
IMMUNOBLOTTING.....	51
CITOLocalização .....	53
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	54
DETERMINAÇÃO DE TAMPÃO E PH ÓTIMO.....	55
DEPENDÊNCIA DA TEMPERATURA .....	56
PARÂMETROS CINÉTICOS.....	57
INIBIÇÃO DA POPLC .....	58

<b>ATIVIDADE COM DIFERENTES SUBSTRATOS.....</b>	<b>60</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>

## RESUMO

As leishmanioses representam um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e é endêmica em 98 países atingindo mais de 12 milhões de pessoas no mundo. O tratamento disponível para esta doença pode levar a sérios efeitos colaterais e, por se tratar de uma doença negligenciada, os incentivos para o desenvolvimento de novos medicamentos são insuficientes. Este cenário revela a necessidade de estudar a biologia do parasito focalizando na busca de fatores de virulência como alvos potenciais para novos fármacos. As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, bem como na patogenia de doenças infecciosas e crônicas. Neste contexto, este trabalho de mestrado se concentrou nos estudos iniciais da prolil oligopeptidase de *Leishmania chagasi*, uma serino protease, por meio da sua caracterização bioquímica. Primeiramente, para expressar a proteína recombinante, o gene POPLc foi clonado no vetor pET15b e a proteína foi expressa em *E. coli* BL21-AI sob indução com 0,5 mM de IPTG e 0,2% de L-arabinose a 20 °C por 4 h. A rPOPLc foi expressa de forma solúvel e foi purificada por afinidade da sua cauda de 6 x His em coluna de Ni- Agarose. A partir da enzima purificada foram realizados testes cinéticos, onde a melhor atividade foi encontrada em tampão HEPES 25 mM, DTT 5 mM e NaCl 150 mM, pH 7,5, sendo estabelecido como o tampão ótimo para a atividade enzimática. A enzima apresentou Km de 58,56744 e Vmáx de 4.651,16 mFU/min a partir da hidrólise de Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC, substrato que apresentou maior atividade dentre todos testados neste estudo. A rPOPLc foi inibida por TLCK e TPCK, mas não por ABESF, um inibidor de serino protease. Além do mais, a rPOPLc foi inibida por Z-Pro-Prolinal, um inibidor específico de POPs, com IC<sub>50</sub> de 5,2 nM. De acordo com a imunocitocalização, foi observado que a rPOPLc está presente na região citoplasmática do parasito. Este trabalho permitiu realizar uma primeira caracterização da POP de *Leishmania chagasi* e o entendimento do seu papel na biologia do parasito poderá contribuir para a busca de novos medicamentos alternativos para as leishmanioses.

Palavras-chave: Leishmania, protease, prolil oligopeptidase, bioquímica.

## ABSTRACT

Leishmaniasis represents a group of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* and is endemic in 98 countries reaching more than 12 million people worldwide. The available treatment for this disease can lead to serious side effects and, since it is a neglected disease, the incentives for the development of new drugs are insufficient. This scenario shows the need to study the biology of the parasite focusing on the search for virulence factors as potential targets for new drugs. Proteases are enzymes that catalyze the hydrolysis of peptide bonds and are involved in many physiological processes, as well as in the pathogenesis of infectious and chronic diseases. In this context, this work focused on the initial studies of *Leishmania chagasi* prolyl oligopeptidase a serine protease, through its biochemical characterization. First, to express the recombinant protein, POPLc gene was cloned into pET15b vector and the protein was expressed in *Escherichia coli* BL21 -AI upon induction with 0.5 mM IPTG and 0.2 % L- arabinose at 20 ° C for 4 h. The rPOPLc was expressed soluble and purified by affinity chromatography in Ni - Agarose column. The kinetic tests show that POPLc the best activity was found in HEPES 25 mM, DTT 5 mM and NaCl 150 mM, pH 7.5, buffer set as the optimum one for all enzyme activity test. N-Suc - Gly - Pro - Leu - Gly - Pro - AMC substrate showed the highest activity among all tested in this study and rPOPLc presented a Km and Vmx values of 58,56744 and 4.651,16 mFU/min, respectively, using this substrate. The rPOPLc was inhibited by TPCK and TLCK, although it was insensible to AEBSF. Furthermore, the rPOPLc was inhibited by Z- Pro- prolinol, a specific inhibitor of POPs with IC50 of 5.2 nM. According to immunocytolocalization, it was observed that rPOPLc is present in the cytoplasmic region of the parasite. This work allowed for an initial characterization of *Leishmania chagasi* POP and the understanding of POPLc role in the biology of the parasite may contribute to the search of new alternative drugs for leishmaniasis.

Keywords: Leishmania, protease, prolyl oligopeptidase, biochemistry.



# INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

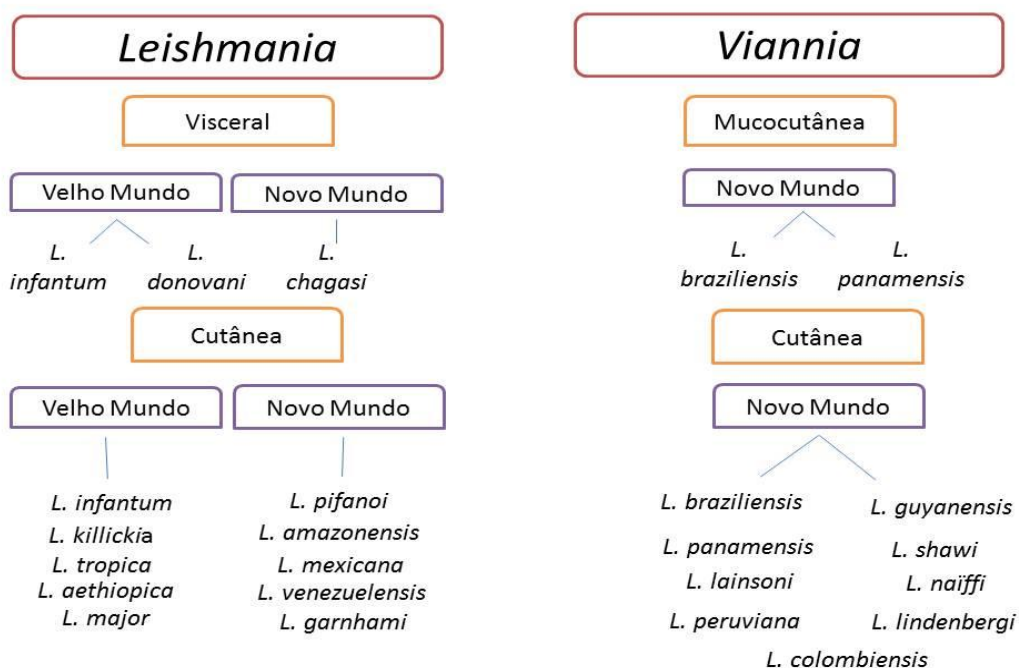
### LEISHMANIOSES

As leishmanioses representam um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que ocorrem em diversas partes do mundo, sendo endêmica em 98 países dos continentes americanos, europeu, asiático e africano. A leishmaniose é considerada uma doença tropical negligenciada (NTD) e, de acordo com Bonney (2013), este termo refere-se a doenças infecciosas que atingem principalmente populações carentes de regiões tropicais e frequentemente são generalizadas, crônicas e debilitantes (Bonney, 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), anualmente surgem mais de 1,3 milhão de casos da doença com uma estimativa de 20.000 a 30.000 mortes, atingindo mais de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo (WHO, 2013). Em 2007, foi aprovada pela *World Health Assembly* a Resolução 60.13 para o controle das leishmanioses que cria condições para a OMS iniciar, manter e expandir os programas de controle das leishmanioses (WHO, 2010). Mais de 20 espécies de *Leishmania* são infectivas ao ser humano e são transmitidas pela picada do flebotomíneo fêmea, da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, que no momento do repasto transmite o parasito para a corrente sanguínea do hospedeiro (WHO, 2013).

O gênero *Leishmania* pertence à família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida, que é assim classificada devido à presença de uma estrutura denominada cinetoplasto, uma mitocôndria única rica em DNA mitocondrial (Lu e Hu, 1990). As *Leishmanias* são classificadas em dois subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. Os subgêneros diferem conforme o desenvolvimento no trato digestivo do inseto vetor, onde espécies *Viannia* crescem no intestino grosso e

espécies *Leishmania* se desenvolvem no intestino médio (Corrêa, Brazil e Soares, 2005).

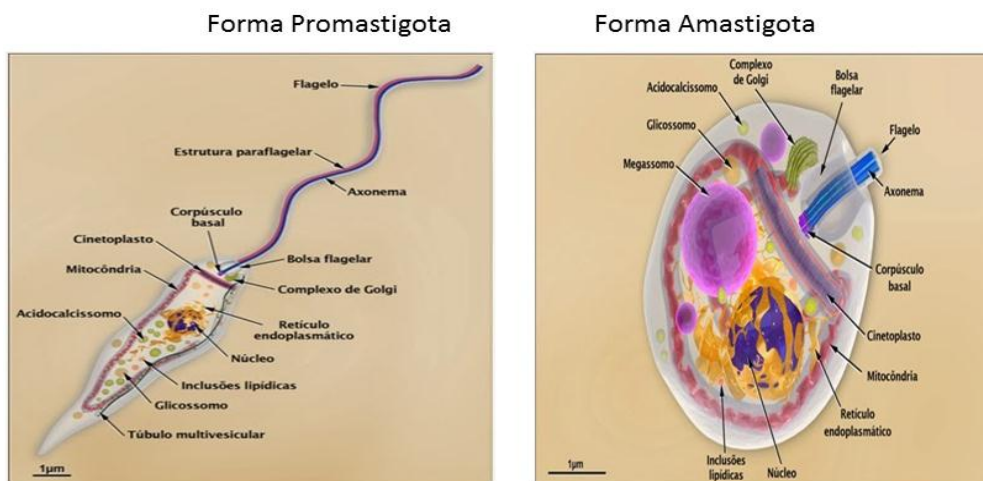
Segundo (WHO), no subgênero *Viannia* temos, no Novo Mundo, a *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. shawi*, *L. naïffi*, *L. lainsoni*, *L. lindenbergi*, *L. peruviana*, *L. colombiensis*, e muitas das espécies do subgênero *Viannia* são capazes de produzir um largo espectro da doença com diferentes graus de severidade que pode evoluir da Leishmaniose cutânea para uma severa Leishmaniose mucocutânea (Oddone *et al.*, 2009). Enquanto no subgênero *Leishmania* encontramos, no Novo Mundo, as espécies *L. chagasi*, *L. mexicana*, *L. pifanoia*, *L. venezuelensis*, *L. garnhamia*, *L. amazonensise* no Velho Mundo *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica*, *L. killickia*, *L. aethiopica* e cada espécie pode induzir uma ou mais formas da doença (Fig. 1) (WHO, 2010).



**Figura 1. Subgêneros *Leishmania* e *Viannia*.** Esquema representando as espécies e as manifestações clínicas acarretadas por elas. Adaptado: WHO, 2010.

## CICLO DE VIDA

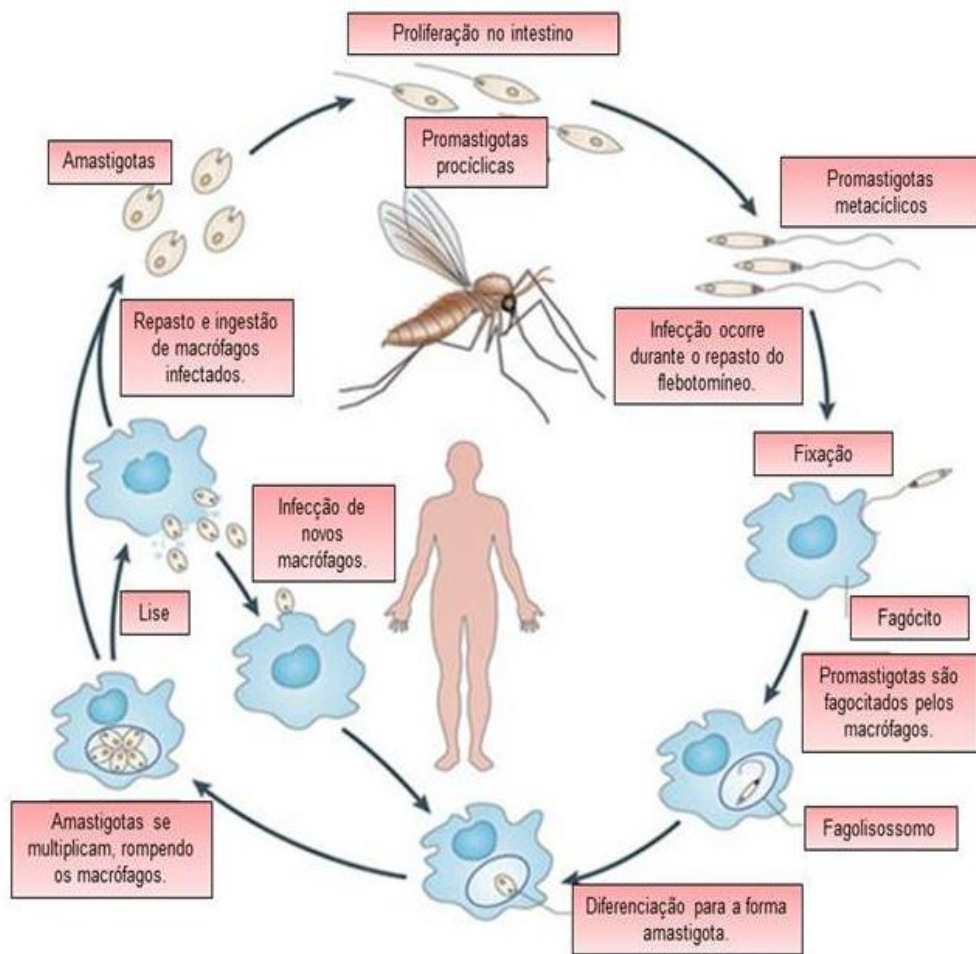
Durante seu ciclo de vida, as leishmanias, possuem duas formas principais: promastigota que é uma forma flagelada, encontrada do tubo digestivo do inseto vetor e a forma amastigota que é arredondada com flagelo atrofiado, e está presente nos tecidos do hospedeiro vertebrado (Fig. 2).



**Figura 2. *Leishmania* nas formas amastigota e promastigota.** Fonte: Paulo Crepaldi, 2014.

Os vetores flebotomíneos podem estar aptos ou não a suportar o crescimento dos parasitos e um dos fatores que influencia essa capacidade é a presença, no intestino, de receptores de ligação ao lipofosfoglicanos presentes na superfície dos parasitos (Dobson *et al.*, 2010). Outro fator importante é o completo desenvolvimento dos parasitos da forma promastigota procíclica para a forma promastigota metacíclica dentro do vetor, pois somente esta forma é capaz de sobreviver no hospedeiro vertebrado (WHO, 2010). Esta última forma é transmitida ao hospedeiro pelo vetor no momento do repasto pela regurgitação do sangue, que causa vasodilatação prevenindo a coagulação sanguínea (Oliveira, De Carvalho e De Oliveira, 2013). Ao adentrarem na corrente sanguínea as linhas de defesa do sistema imunológico são ativadas e

o patógeno é capturado por macrófagos e neutrófilos e, uma vez, no fagolisossomo dos macrófagos, irão se diferenciar em amastigotas. Os neutrófilos são as primeiras células a agirem no local da infecção capturando os parasitos, porém por terem vida curta são comparados a cavalos de Tróia pelo fato de medirem à invasão dos parasitos nos macrófagos de forma silenciosa, que são as células hospedeiras finais para a disseminação do parasito (Silveira *et al.*, 2009; Liu e Uzonna, 2012). As condições encontradas nos fagolisossomos dos macrófagos são propícias para que as leishmanias se multipliquem por fissão binária (Lamour *et al.*, 2012) até que os macrófagos não suportem mais e acabam rompendo-se e liberando-as novamente na corrente sanguínea. Assim, estes parasitos podem ser fagocitados por novos macrófagos, infectando desta forma o hospedeiro (Miles *et al.*, 2005). Quando ocorre novo repasto do vetor, estes ingerem macrófagos contendo parasitos na forma amastigotas e se diferenciam para a forma promastigota procíclica no intestino médio do inseto vetor. A forma procíclica diferencia-se para metacíclica, estando assim apta a infectar novos hospedeiros vertebrados e encerrando o ciclo de vida (Lamour *et al.*, 2012). Os principais reservatórios do parasito antes de serem transmitidos ao homem são animais selvagens e domésticos como felídeos, equídeos e canídeos, com destaque aos cães (Verçosa *et al.*, 2012) (Fig.3).



**Figura 3. Ciclo de vida do parasito *Leishmania*.** A representação mostra o momento do repasto do flebotomíneo, onde formas promastigotas metacíclicas são transmitidas para a corrente sanguínea e assim são fagocitadas pelos macrófagos. Na célula hospedeira, se diferenciam para a forma amastigota e se multiplicam até os macrófagos romperem liberando os parasitos para a corrente sanguínea, onde infectam outros macrófagos. Por fim, quando ocorre novo repasto são ingeridos pelo flebotomíneo, encerrando o ciclo. Fonte: Adaptado de Paul Kaye e Phillip Scott, 2011.

A infecção por este protozoário pode induzir diferentes manifestações clínicas que vão de lesões na pele e na mucosa a uma forma mais grave que

atinge os órgãos vitais (Katara *et al.*, 2013) e cada uma destas manifestações é classificada em três principais formas da doença, a saber: cutânea, mucocutânea e visceral. Existe ainda leishmaniose cutânea difusa que pode ou não ser disseminada atingindo indivíduos anérgicos ou que já tiveram leishmaniose calazar (visceral) (Ordaz-Farias *et al.*, 2013).

### **LEISHMANIOSE VISCERAL**

A leishmaniose visceral ou calazar (LV) era considerada uma doença rural, porém com as modificações ambientais causadas pelo homem, como o desflorestamento e o crescimento desordenado das cidades, houve um aumento da presença de flebotomíneos nas áreas urbanas e, conseqüentemente, maiores índices da doença (Barata *et al.*, 2013). Ela é caracterizada por febre crônica associada com a má nutrição e hepatoesplenomegalia (M Nail e M Imam, 2013). Em pacientes com o sistema imune competente o tratamento tem sido eficiente na supressão do crescimento do parasito. Entretanto, pacientes com AIDS, por terem imunidade deficiente, apresentam recaídas da LV (Burza, Sinha, Mahajan, Lima, *et al.*, 2014) sendo esta considerada uma doença oportunista para pacientes soropositivos, uma vez que os parasitos invadem órgãos vitais como o baço e a medula óssea (Ministério da Saúde, 2011). Pacientes com LV apresentam febre alta, astenia, adinamia e anemia, diarreia que pode ser decorrente da parasitemia ou ulceração intestinal. Com a progressão da doença, os rins podem parar de funcionar devido um decréscimo na produção da pós-trombina que gera uma outra manifestação clínica conhecida como trombocitopenia. Nesta, a perda de trombócitos resulta em hemorragias na mucosa que podem facilitar a sepse (Kumar e Nylén, 2012), e os sintomas podem aparecer de 10

dias a 1ano após a infecção. Em áreas endêmicas, a leishmaniose visceral crônica, atinge em sua maior parte crianças de 1 a 4 anos (WHO, 2010) e os casos não tratados podem resultar em óbito.

### **LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

A principal manifestação dessa forma da doença é pela leishmaniose cutânea que é caracterizada pelo aparecimento de lesões na pele e no Brasil é causada, principalmente, pela *Leishmania Viannia braziliensis* (Giudice *et al.*, 2012). A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) também pode se manifestar nas formas de leishmaniose mucocutânea e cutânea difusa que é a mais severa forma de LTA (Silveira *et al.*, 2009).

As lesões podem ocorrer em qualquer parte do corpo, mas geralmente inicia no local da inoculação e expande para pequenas úlceras. Essas lesões podem levar de semanas a anos para começar a surgir e varia de acordo com a espécie que causou a lesão (WHO, 2010).

De acordo com o Ministério da Saúde, nas últimas décadas tem havido mudanças na forma de transmissão da LTA existindo assim três perfis epidemiológicos diferentes, que são: 1 – silvestre, onde a transmissão ocorre em área de vegetação primária; 2 – ocupacional ou lazer que acontece devido à ocupação desordenada e derrubada de florestas e matas para atividades agropecuárias, ecoturismo, entre outras e 3 – o rural ou periurbano, onde a área foi colonizada havendo assim, a adaptação do vetor ao peridomicílio (Ministério da Saúde do Brasil, 2007).



## **Leishmaniose mucocutânea**

A leishmaniose mucocutânea é um termo usado no Novo Mundo e é causada, principalmente, pelas *L. braziliensis* e *L. amazonensis* e ocorre com mais frequência na Bolívia, Brasil e Peru. Essas espécies fazem metástase nos tecidos da mucosa da boca e no trato respiratório superior por disseminação linfática ou hematogênica. Estudos no Brasil tem mostrado que a está forma clínica da doença pode aparecer depois de anos da infecção cutânea (WHO, 2010). Lesões nasais são frequentes, atingem o septo cartilaginoso que no estágio final apresenta severas mutilações, com obstruções e destruição do nariz, laringe e faringe. Como o sistema respiratório fica comprometido é comum surgir infecções secundárias, sendo a pneumonia a causa mais frequente de morte (WHO, 2010).

### **LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA**

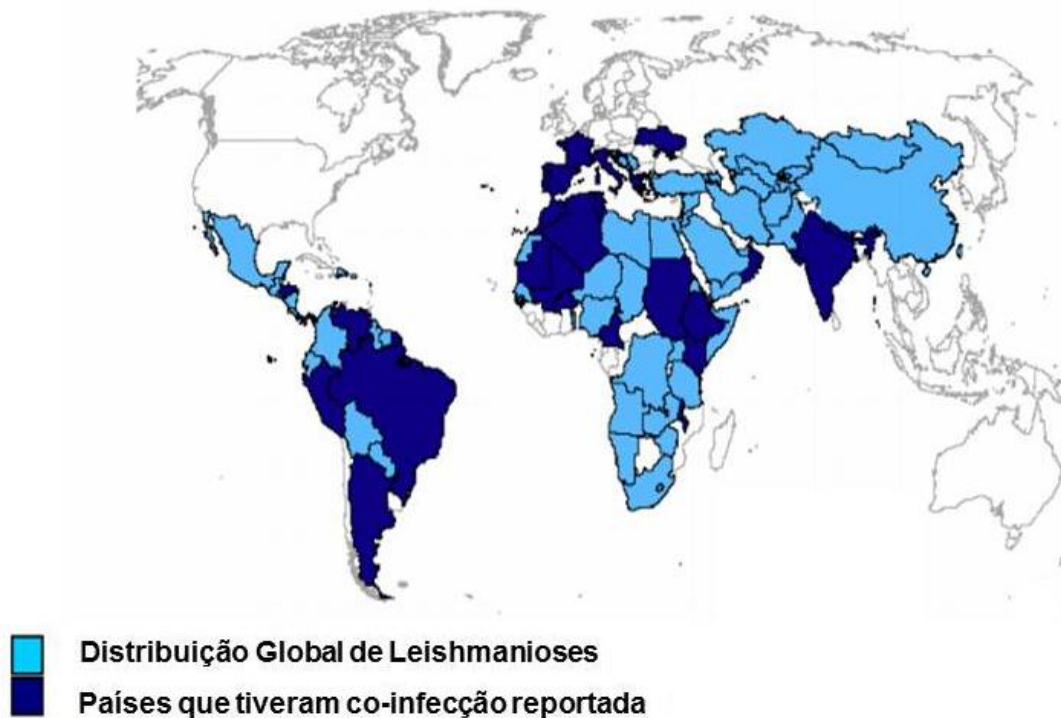
A leishmaniose difusa é uma variante rara da doença e geralmente começa na infância (Ordaz-Farias *et al.*, 2013). É caracterizada por extensivos e numerosos nódulos ou lesões ulceradas que pode estar presente nas mucosas (WHO, 2010). Ela também está presente em pessoas anérgicas ou que já tiveram a doença na forma calazar (WHO, 2013). Esta ocorre tempos depois do tratamento da leishmaniose visceral, porém casos da doença têm sido descritos em pacientes que não foram diagnosticados ou tratados para leishmaniose visceral (Burza, Sinha, Mahajan, Sanz, *et al.*, 2014). Ela está presente em todas as regiões endêmicas para *L. donovani*, sendo mais frequente no oeste da África e na Índia. Suas lesões podem ser confundidas com as doenças vitiligo e lepra e pode atingir as mucosas bucal, genital e conjuntiva (WHO, 2010).

## DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

O número de casos de leishmaniose tem aumentado significativamente o redor do mundo, passando de 88 para 98 países, com estimativa de um aumento anual de leishmaniose cutânea que varia de 700 mil a 1,2 milhão e para leishmaniose visceral os números variam de 200 a 400 mil (CDC, 2013) (Fig. 4). Segundo a Organização Mundial da Saúde, mais de 90% dos casos globais de leishmaniose visceral ocorre em seis países, sendo eles Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2013). Em relação à leishmaniose cutânea (LC), ela é mais bem distribuída com ocorrência de um terço em cada uma dessas três regiões: Américas, Bacia do Mediterrâneo e Ásia ocidental do Oriente médio para Ásia Central e dessas regiões, 10 países tem um elevado índice de casos da LC e são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Síria e Sudão e juntos somam de 70 a 75% dos casos globais (WHO, 2013). A leishmaniose pós-calazar ocorre nas áreas endêmicas para *L. donovani*, mas os maiores índices de casos estão no Sudão e Bangladesh.

No Brasil, a distribuição dos casos de leishmanioses ocorre, principalmente, em pequenas áreas geográficas. Em 1996, os casos de leishmaniose cutânea chegaram a 30.030 e entre 1990 e 2007 foram registrados 560.000 novos casos da doença (Karagiannis-Voules *et al.*, 2013). Segundo a WHO, de 2005 a 2012, os números de novos casos não variaram drasticamente, sendo que para LC os casos foram em média de 25.000 e LV se mantiveram em cerca de 3000 casos (WHO, 2013). Algumas localidades do Brasil possuem maior incidência de novos casos da doença e, uma área de intensa transmissão de LV, é o município de Governador Valadares, localizado

no estado de Minas Gerais (MG), onde foram registrados 86 casos da doença entre 2008 e 2011.



**Figura 4. Distribuição global da leishmaniose** Fonte: World Health Organization (WHO), 2011

#### LEISHMANIOSE NO DISTRITO FEDERAL

No ano de 2012 foram registrados 48 casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no Distrito Federal e 36 casos confirmados de Leishmaniose Visceral. O DF continua sendo considerado como área endêmica e busca uma forma de evitar a expansão das áreas de transmissão.

Neste mesmo ano, houve 4 mortes por LV, sendo um caso contraído no Lago norte e os outros três vieram de outras unidades federativas. O percentual de letalidade de 2012 teve um aumento de 11,1% em relação aos

anos anteriores e é o maior desde 2005. Já em relação à LTA, de 2008 a 2011 o percentual de cura foi de 100% e em 2012 de apenas 75%, visto que ainda há pacientes em tratamento. Os dados de LTA de 2007 a 2011 no DF estão descritos na tabela 1, bem como a origem dos casos da doença (Secretária do Estado de Saúde, 2013).

**Tabela 1.** Casos de LTA no DF de 2007 a 2011.

Ano	Confirmados	Autóctones	Importados	Ignorados
2007	74	10	59	5
2008	38	3	33	2
2009	48	5	41	2
2010	88	12	62	14
2011	47	5	40	2

Fonte: SINANNET/NCE/GEDCAT/DIVEP/SVS/SES-DF.  
Dados compilados por ano de diagnóstico.

## TRATAMENTO

Para o tratamento da LTA são usados antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ), que são drogas consideradas leishmanicidas uma vez que interferem na bioenergética das formas amastigotas e isso acontece porque a glicólise e a oxidação dos ácidos graxos são inibidos reduzindo assim a produção de ATP e GTP. Com o uso do medicamento, alguns substratos dependentes de  $CO_2$  diminuem e há também uma queda nos níveis de  $CO_2$  ocasionando a destruição do parasito (Ministério da Saúde, 2007). O medicamento deve ser administrado via parenteral e seu uso pode resultar em vários efeitos colaterais, tais como: anorexia, mialgia, vômitos, pancreatite, prurido, choque pirogênico, insuficiência renal aguda e problemas cardíacos (Ministério da Saúde, 2007).

Outro tratamento utilizado no combate da leishmaniose é o antifúngico Anfotericina B que é administrado por infusão (WHO, 2010). Este medicamento é tóxico para as leishmanias visto que agem nos ésteres precursores do ergosterol, influenciando assim na formação da membrana citoplasmática do parasito. Seus efeitos adversos vão de febre, náuseas, hipopotassemia, leucopenia, anemia, alterações cardíacas e outros (Ministério da Saúde, 2007).

Com o intuito de produzir uma droga menos agressiva, foi criada outra formulação com a Anfotericina B como a lipossomal, complexo lipídio e de dispersão coloidal que são igualmente eficientes, porém com menos toxicidade e, conseqüentemente, menos efeitos colaterais. Seu uso é por infusão intravenosa e, às vezes, pode ocorrer nefrotoxicidade ou trombocitopenia (WHO, 2010). No Brasil, este medicamento é utilizado no tratamento da leishmaniose visceral, uma vez que os níveis plasmáticos são mais elevados que da Anfotericina B desoxicolato e por apresentar altos níveis, são capturados rapidamente pelos macrófagos do fígado e baço (Ministério da Saúde, 2007). No entanto, estes medicamentos apresentam altos custos o que não permitem seu uso rotineiro pelos pacientes acometidos com a doença.

Outro medicamento usado no tratamento é a paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo administrado intramuscularmente. A toxicidade reversível ocorre em aproximadamente 2% dos pacientes, em alguns casos pode haver hepatotoxicidade e são quase nulos os casos de toxicidade renal (WHO, 2010). Por fim, o tratamento pode ser por meio de pentamidinas que são comercializadas nas formulações Isotionato e Mesilato nas regiões endêmicas de ATL dos continentes americano, asiático e africano (Ministério da Saúde, 2007). A aplicação do Isotionato é via intramuscular ou infusão

intravenosa e apresenta sérias reações adversas como, diabete *mellitus*, choque, miocardite, hipoglicemia e toxicidade renal (WHO, 2010). Quanto ao Mesilato, ele foi desenvolvido como medicamento de combate ao câncer, no entanto apresentou atividade leishmanicida. Seu uso é via oral e tem como efeitos colaterais vômitos, diarreia, anorexia, náusea, e raramente alergia na pele e insuficiência renal (WHO, 2010).

Este panorama mostra a necessidade do desenvolvimento de fármacos eficientes, com o mínimo de efeitos secundários e acessíveis à população de baixa renda, a principal acometida pela doença. Como estratégia de busca de alvos potenciais para novos fármacos, nosso grupo de pesquisa concentra-se no estudo do papel de proteases no desenvolvimento e virulência de patógenos, principalmente os tripanossomatídeos *Leishmania spp.*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*.

## **PROTEASES**

As proteases são uma classe de enzimas que tem grande importância fisiológica e comercial (Rao *et al.*, 1998). São enzimas proteolíticas que possuem como principal função a clivagem de ligações peptídicas e têm importante papel nas modificações pós-transducionais estando envolvidas na síntese de vários neuropeptídeos bioativos (García-Horsman, Männistö e Venäläinen, 2007). Devido a sua grande participação em diversos processos biológicos como metabolismo, nutrição, resposta inflamatória, sinalização celular, escape de patógenos do sistema imune e por consequência importante papel em várias doenças, as proteases têm sido consideradas alvos quimioterápicos de grande relevância.

As peptidases e seus inibidores podem ser classificados pelo sistema MEROPS, que existe desde 1996, e estão organizadas de acordo com uma classificação hierárquica com base nos domínios conhecidos pela importância da sua atividade proteolítica (Rawlings *et al.*, 2008). Cada peptidase tem uma identificação que começa por uma letra que indica o tipo catalítico deste grupo, estas são: aspártico (A), cisteína (C), metalo (M), serina (S), treonina (T) e tipo desconhecido (U) (Rawlings, Tolle e Barrett, 2004). De acordo com o sistema MEROPS, as peptidases se encaixam em famílias e clãs, que também está de acordo com sua ação onde, por exemplo, a tripsina pertence à família S1 e clã PA, as carboxipeptidases são da família S9 e clã SC e as subtilisina pertencem à família S8 e clã SB (Rawlings, Morton e Barrett, 2006). As enzimas proteolíticas podem ser exopeptidases ou endopeptidases de acordo com o local de clivagem. As exopeptidases clivam ligações peptídicas terminais e podem ser aminopeptidases quando clivam no lado N-terminal ou carboxipeptidase clivando do lado C-terminal (Hooper, 2002).

As serinas peptidases são caracterizadas por possuírem a tríade catalítica serina, histidina e ácido aspártico (Borges-Veloso *et al.*, 2012) e são na maioria endopeptidases, ou seja, a hidrólise da ligação peptídica ocorre na porção interna da cadeia polipeptídica. As serino proteases têm habilidade de hidrolisar via um resíduo nucleofílico de serina no sítio ativo e está envolvida em vários processos fisiológicos e patofisiológicos, como por exemplo em vias de sinalização intracelular (Lerchenberger *et al.*, 2013).

### **PROLIL OLIGOPEPTIDASE**

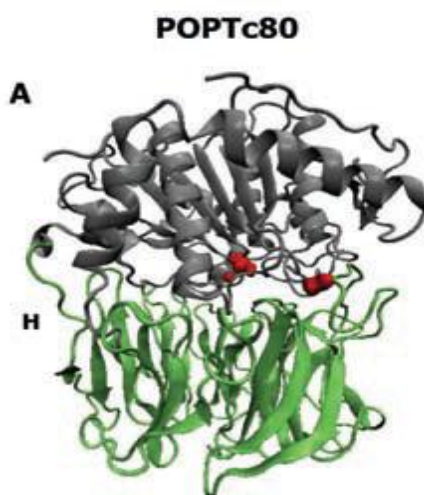
A prolil oligopeptidase (POP) é uma serino protease, classificada como S9 do clã SC (García-Horsman, Männistö e Venäläinen, 2007) e cliva

pequenos peptídeos de até 30 aminoácidos no lado carboxil de uma prolina e de forma menos eficiente após alanina. A POP é encontrada em todos os tecidos e está localizada em tipos específicos de células do cérebro, rins e fígado (Tenorio-Laranga *et al.*, 2012). Esta especificidade catalítica de POP é importante para vários processos fisiológicos, sendo sua atividade encontrada na regulação de peptídeos hormonais e neuropeptídios (Lee *et al.*, 2007; Bastos *et al.*, 2013; Szeltner *et al.*, 2013). Níveis anormais de atividade nos tecidos neurais ou no plasma têm sido observado em indivíduos que sofrem de amnésia, depressão, Alzheimer e transtorno bipolar. Por esta razão, as POPs são alvos de estudo na busca de novos tratamentos para diversas doenças como desordens do sistema nervoso, tripanossomíases, entre outras (Kaushik e Sowdhamini, 2011; Tenorio-Laranga *et al.*, 2012). A POP tem sido considerada um potencial alvo quimioterápico num estudo da análise peptidômica da inibição da POP, o que foi possível sugerir que ela está envolvida na degradação de peptídeos ativos intracelulares e proteínas (Tenorio-Laranga *et al.*, 2012).

A estrutura cristalizada da enzima mostra que ela apresenta dimensões de aproximadamente 60 Å com diâmetro de 50 Å (Szeltner e Polgár, 2008). É composta por um domínio catalítico  $\alpha/\beta$  hidrolase e um domínio  $\beta$ -propeller com sete folhas  $\beta$  não usual (Fig. 5), uma vez que a primeira e a última folha  $\beta$  não estão ligadas entre si (Kaushik e Sowdhamini, 2011; Tenorio-Laranga *et al.*, 2012; Szeltner *et al.*, 2013). POP possui uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos Ser554, Asp641 e His680 (POP suína) e está localizada em uma grande cavidade na interface dos dois domínios e o grupo OH da serina é bem exposto e acessível para o grupo catalítico imidazol de um lado e para o



substrato do outro (Szeltner e Polgár, 2008). Este domínio propeller, que é ausente em outras  $\alpha/\beta$  hidrolases, age como uma tampa para esconder o sítio ativo e também como um gatilho seletivo permitindo que somente peptídeos pequenos alcancem o sítio ativo (Kaushik e Sowdhamini, 2011; Tenorio-Laranga *et al.*, 2012; Szeltner *et al.*, 2013). Uma ponte dissulfeto construída entre os dois domínios por mutação sítio dirigida mantendo-os juntos num estado fechado impediu a atividade catalítica, reforçando a ideia de que existe uma flexibilidade entre os dois domínios com envolvimento de mudança conformacional (Kaszuba *et al.*, 2012).

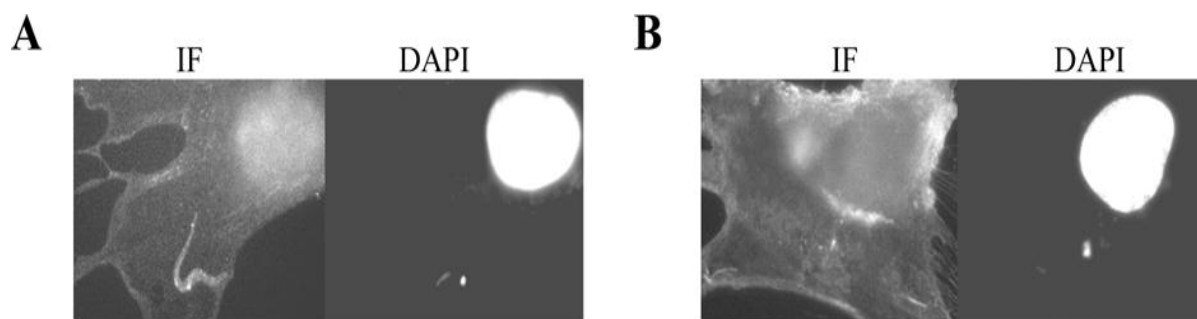


**Figura 5. Estrutura da POPTc80.** Domínio catalítico  $\alpha/\beta$  hidrolase (cinza) e domínio não catalítico  $\beta$ -propeller (verde). Fonte: Bastos, I.M.D et al. (2013).

#### PROLIL OLIGOPEPTIDASE DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

A prolil oligopeptidase vem sendo estudada em nosso grupo de pesquisa há alguns anos, sendo o primeiro estudo realizado em 1997 onde uma protease de 80 kDa (Tc80) do parasito *T. cruzi* foi purificada usando o substrato *N*-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC, que representa uma sequência conservada

de colágeno. Em uma análise mais profunda, verificou-se que a proteinase Tc80 hidrolisa, *in vitro*, proteínas da matriz extracelular como colágeno humano tipo I e IV (Santana *et al.*, 1997) e fibronectina (Grellier *et al.*, 2001a). Além destas proteínas purificadas, a Tc80 cliva fibras de colágeno em seu estado nativo, num teste de hidrólise *in situ* em mesentério de rato. Estudos posteriores tiveram como foco a busca de inibidores específicos e seletivos, por meio de *screening* de moléculas e modificação por química combinatória. Com isso foi possível desenvolver inibidores com  $K_i$  na ordem de  $\sim 3$ nM e foi observado que os mesmos inibem a entrada de formas tripomastigotas em células de mamíferos não fagocíticas (Fig. 6). Assim, foi sugerido que a Tc80 se tratava de uma POP (POPTc80) e pode estar envolvida na invasão do parasito na célula hospedeira (Grellier *et al.*, 2001a; Bastos *et al.*, 2005).



**Figura 6. Inibidor de POPTc80 inibe a entrada de *T. cruzi* na célula hospedeira.** Tripomastigotas pré-incubados com inibidor e ensaio de imunofluorescência indicando parasitos atados a célula hospedeira, porém perde a capacidade de invadir (A). O controle (B) mostra a invasão do parasito não tratado com o inibidor. Fonte: Grellier, 2001.

Após isso nosso grupo deu continuidade ao estudo da POPTc80 realizando um primeiro estudo estrutural com a modelagem da sua estrutura

tridimensional e proposição de um modelo de hidrólise do colágeno. Neste caso, foi realizado um *docking* que indica que o colágeno se posiciona face ao sítio ativo da POPTc80 encaixado entre os dois domínios da enzima. A prolil oligopeptidase de *T. brucei* (POPTb), apresenta resultados semelhantes aos da POPTc80 visto que cliva colágeno e essa atividade poderia ajudar o parasito a penetrar o endotélio capilar, permitindo a multiplicação e propagação do parasito no hospedeiro. Neste estudo foi mostrado que a POPTb é liberada no plasma de camundongos infectados onde permanece ativa e medeia a degradação da  $\beta$ -endorfina, bradicinina e neurotensina, as quais têm importante funções regulatórias nos sintomas da doença do sono (Bastos *et al.*, 2010).

Diante dos resultados obtidos com o estudo da POP de tripanossomos e seu potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, consideramos que é de grande o interesse estudar o papel realizado pela POP no protozoário *Leishmania*.



# Justificativa

## JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são consideradas um problema de saúde pública em grande parte do mundo e estão na lista de doenças negligenciadas, visto que é considerada uma enfermidade que atinge indivíduos de baixa renda e o tratamento é ainda muito tóxico. A escassez de tratamentos eficazes para tais doenças é devido à falta de interesse das indústrias farmacêuticas em investir na pesquisa e desenvolvimento de drogas voltadas a pacientes de baixa renda financeira. Os últimos avanços no desenvolvimento de medicamentos para as leishmanioses consistiram de associações de drogas já usadas no tratamento ou novas formulações de drogas também já existentes, como foi o caso da anfotericina lipossomal (Burza, Sinha, Mahajan, Sanz, *et al.*, 2014). Este quadro mostra a necessidade da pesquisa científica voltada para descoberta de novas moléculas com eficiente efeito terapêutico, porém com o mínimo de efeitos colaterais.

Em estudos prévios realizados com POP de tripanossomatídeos, envolvendo o uso de inibidores específicos, o nosso grupo mostrou que esta enzima representa um alvo potencial de drogas para a doença de Chagas e a tripanossomíase africana (doença do sono). Desta forma, consideramos que seria promissor estudar a POP de *Leishmania chagasi* e assim verificar seu papel na patogenia da leishmaniose. O conjunto dos resultados obtidos para estes três tripanossomatídeos poderão ser de grande valia no aprimoramento de inibidores específicos de POPs e assim contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos alternativos para as doenças causadas por estes parasitos.



# Objetivos

## OBJETIVOS

Visando a busca de alvos potenciais para novas drogas contra leishmanioses, este trabalho teve como objetivo geral iniciar o estudo da prolil oligopeptidase de *L. chagasi* por meio da sua caracterização bioquímica. Para alcançar este objetivo, as seguintes etapas foram propostas:

- Clonagem e expressão da rPOPLc;
- Purificação da enzima recombinante;
- Determinação de tampão e pH ótimos;
- Determinação de parâmetros cinéticos;
- Ensaio enzimáticos com diferentes substratos;
- Realização de testes de inibição da enzima;
- Produção de soro murino anti-rPOPLc e
- Imunocitocalização da enzima em formas promastigotas.



# Metodologia



## METODOLOGIA

### **CULTURA E PREPARO DE EXTRATO PROTÉICO DE *LEISHMANIA CHAGASI***

Formas promastigotas (CEPA 10CL2906) de *Leishmania chagasi* foram cultivadas em meio Schneider suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) inativado e 100- $\mu$ g/ml de gentamicina. A cultura era mantida em estufa a 28 °C.

Para a realização de testes, amostras foram preparadas a partir da cultura de *Leishmania*, onde os parasitos foram contados em câmara de Neubauer para, em seguida, preparar as amostras que tinham  $1,0 \times 10^8$  parasitos por ml. O preparo da amostra consistiu de 3 lavagens com PBS 1x e centrifugações a 2000 x g entre as lavagens por 10 min cada uma e, em seguida, o parasito foi congelado e descongelado três vezes para ser lisado.

### **CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO**

O gene completo da POPLc foi sintetizado, clonado no vetor pUC57 e subclonado no vetor pET15b nos sítios de clonagem 5' NdeI e 3' BamHI (pET15bPOPLc), pela empresa GenScript, USA. Este último plasmídeo permite a expressão da proteína recombinante fusionada com uma cauda de 6 Histidinas na porção N-terminal. Para a expressão da enzima recombinante, o plasmídeo pET15bPOPLc foi primeiramente usado para transformar a bactéria de expressão BL21- AI, uma cepa da bactéria *E. coli* que contém o gene T7RNA polimerase sendo este controlado pelo promotor *araBAD*. A transformação foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Innoué no Molecular Cloning: A Laboratory Manual (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As colônias bacterianas oriundas do processo de transformação foram

cultivadas em meio LB com ampicilina e a expressão da proteína recombinante foi induzida com arabinose 0,2% e IPTG 0,5 mM durante 4h a 20 °C sob agitação de 150 rpm. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas a 2000 x g durante 10 min e o pellet foi ressuspendido em BugBuster™ (3 mL/g de bactérias), reagente usado para lisar as bactérias.

No primeiro ensaio de purificação foram testados diferentes tampões com diferentes concentrações de imidazol, reagente que compete com o grupo imidazol das histidinas pela ligação a resina de níquel-agarose. Primeiramente, o extrato de bactérias preparado com BugBuster™ foi submetido a uma coluna com matriz de agarose-níquel previamente equilibrada com tampão de ligação (Tris 50 mM e NaCl 500 mM, pH 8,0). Após passagem do extrato, a coluna foi lavada com 30 volumes (da matriz) de tampão de ligação, seguido de lavagens de 3 volumes do mesmo tampão com diversas concentrações de Imidazol (tampão de lavagem), sendo elas: 5, 10, 20, 30, 40 e 60 mM. Por fim, a eluição foi realizada com o tampão contendo 250 mM de imidazol (tampão de eluição). Na segunda purificação realizada, o tampão de ligação era constituído de Tris 50mM, NaCl 500mM e imidazol 5 mM, pH 8,0. O tampão de lavagem diferiu na quantidade de imidazol, contendo 15 mM e o tampão de eluição com 80 mM de imidazol, sendo estas condições utilizadas como padrão para purificação da POPLc.

Após a purificação, a enzima foi dialisada e concentrada com Centricon® 50, sendo que para a diálise foi usado tampão Tris 50 mM pH 8.0 e este procedimento foi realizado através de centrifugação. Após a etapa de concentração, foi adicionado à enzima igual volume de glicerol e estocada no -

20 °C para preservar sua atividade. O rendimento estimado da enzima foi de 600 µg em 400 mL de cultura de bactéria.

### **PRODUÇÃO DO SORO RPOPLc**

Para obter o soro anti-rPOPLc foram usados 3 camundongos BALB/c machos que receberam quatro imunizações intradérmicas contendo cada uma 5 µg de proteína solúvel purificada, sendo que antes da primeira imunização foi retirado sangue dos camundongos para preparo do soro pré-imune. O sangue foi incubado a 37 °C por 30 min para retração do coágulo, centrifugado por 5 min a 3.000 x g e assim o soro obtido foi estocado a -20 °C. Na primeira imunização foi usado o adjuvante completo de Freund e nas subsequentes foi o adjuvante incompleto. O intervalo entre as imunizações foi de 15 dias e o soro total foi obtido após 7 dias da última imunização e testado por Western blot.

### **WESTERN BLOT**

As amostras testadas por Western Blot foram: rPOPLc purificada, extrato de BL21-AI transformada com vetor pET15b ou pET15bPOPLc, ou extrato de  $1,0 \times 10^8$  *L. chagasi*. A amostra foi fervida por 5 minutos em tampão Laemmli (2% de SDS, 10% de glicerol, 5% de 2-mercaptoetanol, 0,002% de azul de bromofenol, 125 mM de Tris HCl, pH 6,8, (Laemmli, 1970) e submetido a SDS-PAGE 10%. Em seguida as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham) em tampão de transferência 1X (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol; 0,1% SDS) durante uma hora com a amperagem constante em 200 mA. A membrana foi bloqueada em solução PBS/leite desnatado 5% por 30 min e em seguida incubada com o anticorpo anti-His-Tag, soro de camundongo pré-imune ou soro anti- rPOPLc em PBS/leite 1% por 1:30 h. Após 3 lavagens com PBS a

membrana foi incubada com anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina, também em PBS/leite 1% por 1 h. Para detecção do complexo antígeno anticorpo a membrana previamente lavada com PBS foi incubada em tampão fosfatase alcalina contendo o substrato, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-1-fosfato/ Nitro Blue Tetrazolina - NBT/BCIP (Promega) por 15 min.

### **IMUNOFLUORESCÊNCIA**

Para a realização do experimento, os parasitos foram fixados a partir de uma cultura de  $1,0 \times 10^7$  parasito/mL de *L. chagasi* dividida em dois tubos de 1,5 ml para centrifugação na minicentrífuga durante 5 min para retirada do sobrenadante. Em seguida foram realizadas três lavagens com PBS estéril e gelado, onde entre cada centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado. Após a última lavagem o pellet foi ressuspensionado em uma solução contendo 90  $\mu$ L de PBS e 10  $\mu$ L de formaldeído (37%). Os parasitos foram colocados em poços desenhados (com a caneta DakoPen - dakocytomation pen) nas lâminas que já continham poly-L-lisina para que aderissem. Após 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e acrescentado Triton X 0,5% por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e a lâmina foi bloqueada com PBS leite 5% por 30 minutos e, em seguida, o PBS foi retirado para colocar o soro anti-POPLc e o soro pré-imune, ambos diluídos 1:100 em PBS leite 1%, submetidos a incubação em câmara úmida por no mínimo 1 h. O controle consistiu da incubação da lâmina com apenas o PBS leite 1%. As lâminas foram lavadas três vezes por 10 minutos cada lavagem com PBS gelado em uma cuba apropriada para o procedimento. Os próximos passos ocorreram em um local escuro devido à sensibilidade do 2º anticorpo. O 2º anticorpo utilizado foi o Alexa flúor 488 anti-igG de camundongo na

concentração de 1:200 por 1 hora. Foram realizadas mais três lavagens como a citada anteriormente e adicionou-se DAPI na concentração de 5 µg/ml por 10 min. O sobrenadante foi descartado e a lâmina foi lavada com PBS por 5 minutos. Por fim, foi utilizado uma gota de meio de montagem (DAKO, *Fluorescent Mounting Medium*) para fixar a lamínula à lâmina e preservar a fluorescência.

## **TESTES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA**

### ***ESTABELECIMENTO DA QUANTIDADE DE ENZIMA***

Para determinar qual seria a melhor quantidade de enzima a ser utilizada nos testes enzimáticos, foi realizada uma diluição seriada a partir de 1 µg da rPOPLc em 90 µL tampão HEPES 25 mM pH 7,5. Por fim, foi usado 20 mM do substrato SUC-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC para medir a atividade da enzima através da fluorescência emitida pela liberação do fluoróforo 7-amino-4-metilcoumarina (AMC), visto que a POP cliva após o aminoácido prolina. A leitura da atividade foi realizada no espectrômetro aferindo a fluorescência sob excitação de 360 nm e emissão de 460 nm.

### ***TAMPÃO ÓTIMO PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA***

Buscando identificar o tampão e aditivos ideais para a atividade da enzima foram testados os tampões Tris (50 mM) e HEPES (25 mM) pH 7,5. Primeiramente foi testado o efeito do NaCl na reação por meio de uma diluição seriada a partir de 18,75 até 300 mM do reagente tanto na presença de Tris quanto de HEPES. De forma similar, o DTT foi testado em concentrações variando de 2,5 a 20 mM. Depois de verificar quais seriam as melhores concentrações de DTT e NaCl, foi realizado outro teste em triplicata com os dois reagentes juntos e em ambos os tampões, para assim determinar o tampão ótimo para a atividade da POPLc.

### **DEPENDÊNCIA DO pH**

O tampão utilizado para determinar o pH ótimo da enzima era composto de ácido acético 25 mM, glicina 25 mM, MES 50 mM, Tris 75 mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM nos pHs 5; 6; 7; 7,5; 8; 8,5; 9 e 10 que foram ajustados usando HCl. A atividade da POPLc foi medida através do substrato Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC em temperatura ambiente.

### **DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS ENZIMÁTICOS**

Para a realização do  $K_m$  foram testadas diferentes concentrações do substrato Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC no tampão HEPES 25 mM pH 7,5. O teste foi realizado em diluição seriada a partir de 150  $\mu$ M seguido de 75, 37,5, 18,75 e 9,37  $\mu$ M do referido substrato. A medida da fluorescência liberada foi realizada numa cinética de 30 min com leitura a cada 1 min. Os dados foram analisados em um gráfico com representação de Hanes- Woolf ( $[S]/V \times [S]$ ) e o  $K_m$  foi determinado pela equação  $[S]/v = 1/V_{max} * [S] + (K_m/V_{max})$ .

### **TESTE DE INIBIÇÃO**

O teste de inibição da POPLc foi realizado com os inibidores AEBSF 100  $\mu$ M, EDTA 1 mM, TPCK 100  $\mu$ M, E-64 1 mM, TLCK 100  $\mu$ M, Leupeptina 100  $\mu$ M ou Pesptatina 100  $\mu$ M. O controle positivo continha a enzima, tampão ótimo e 20 mM de Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC. O controle negativo não apresentava a enzima na reação. Posteriormente, foi realizado outro teste com o inibidor Z-Pro-Prolinal, que é um inibidor específico de POPs nas concentrações de 10, 5, 2,5, 1,25 e 0,6 nM. Em ambos os teste de inibição, a enzima foi incubada com o inibidor por 15 min, seguido da adição substrato e leitura da cinética. O experimento foi repetido duas vezes com resultados similares.

### **ESPECIFICIDADE DE SUBSTRATOS**

Diferentes substratos foram usados para testar a atividade enzimática da rPOPLc. Os substratos estavam na concentração de 25  $\mu\text{M}$  e as mesmas condições foram mantidas para todos. O teste foi realizado em triplicata e com tampão HEPES 25 mM NaCl 150 mM e DTT 5 mM. Os substratos escolhidos foram Pro-AMC, N-Ile-Ala-AMC, Suc-Gly-Pro-AMC, Ala-Ala-Phe-AMC, Arg-Arg-AMC, Gly-Pro-AMC e Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC.

#### **DEPENDÊNCIA DA TEMPERATURA**

O teste foi realizado no termociclador em seis temperaturas diferentes: 20, 28, 37, 40, 45 e 50°C. Os testes foram realizados em triplicata e a enzima foi incubada durante 2 minutos na temperatura desejada e após esse tempo foi acrescentado o substrato e a reação foi ainda incubada por mais 20 min. No final de cada incubação, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de Etanol absoluto e a fluorescência acumulada foi mensurada na forma de *endpoint*. Para verificar se 50% de Etanol é suficiente para parar a reação, foi realizada uma cinética controle para confirmar que a enzima não tinha mais atividade.



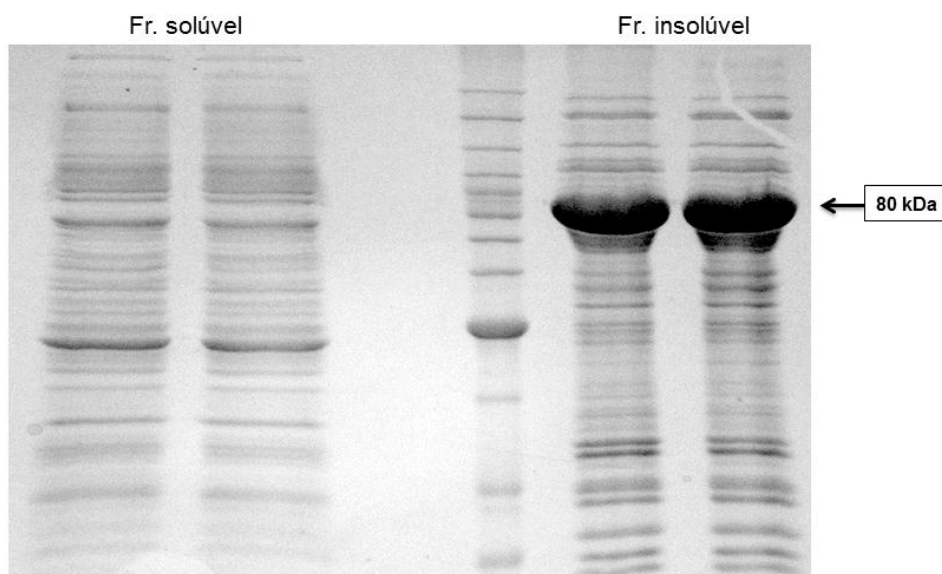
# Resultados



## RESULTADOS

### CLONAGEM E EXPRESSÃO DA PROLYL OLIGOPEPTIDASE DE *LEISHMANIA CHAGASI* (RPOPLc)

O gene que codifica a POPLc, após ser sintetizado e clonado no vetor pUC57 foi subclonado no vetor de expressão pET15b, pela empresa GenScript (USA). Para expressar a proteína recombinante o plasmídeo foi introduzido, por transformação, na bactéria BL21-AI e a indução da expressão foi realizada com IPTG 1 M e L-arabinose 0,2% a uma temperatura de 37 °C durante 3h. Para confirmar a expressão da proteína, os extratos solúveis e insolúveis, preparados por lise da bactéria com BugBuster™, foram submetidos à eletroforese em SDS-PAGE 10% (Fig. 7).



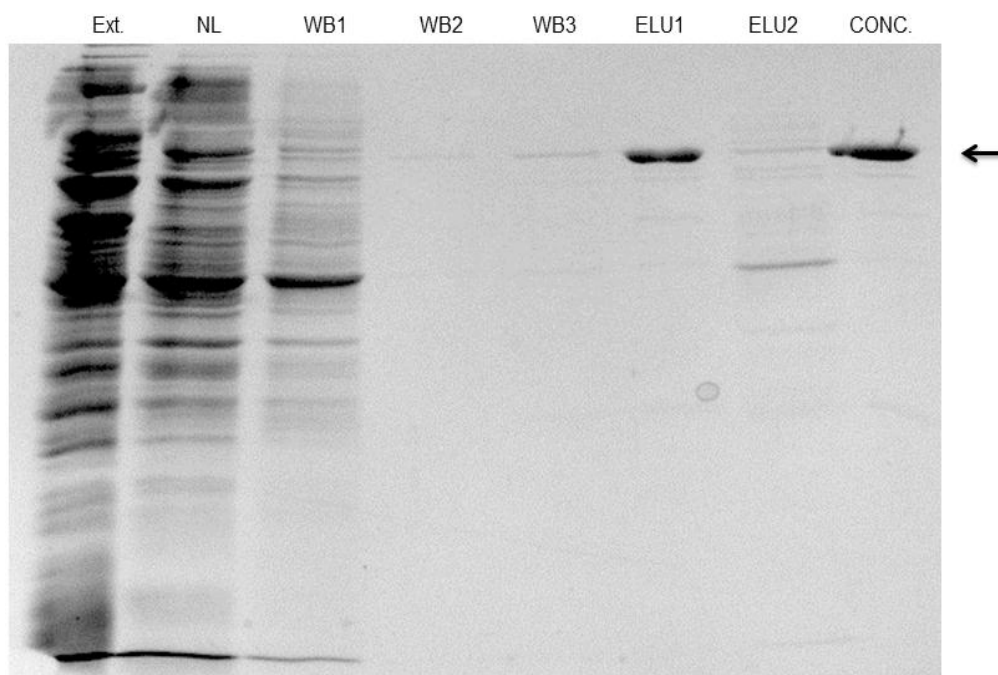
**Figura 7. Expressão da rPOPLc.** SDS-PAGE 10% indicando a fração solúvel e insolúvel da proteína recombinante induzida a 37°C durante 3 horas e lisada com BugBuster.

Foi verificado que o extrato insolúvel apresenta uma abundante quantidade de proteína com aproximadamente 80 kDa (Fig. 7), massa molecular estimada da POPLc (78 kDa) somado ~3kDa da cauda de His. Este

primeiro ensaio sugere que a rPOPLc foi prontamente expressa na forma insolúvel na bactéria nas condições acima descritas.

Para obter a rPOPLc em sua forma similar à nativa, ou seja no extrato solúvel, as condições da indução foram modificadas diminuindo a temperatura para 20 °C, reduzindo a concentração de IPTG de 1 M para 0,5 M e aumentando o tempo de expressão para 4 h. Ao término da indução, a amostra foi lisada com BugBuster™ e centrifugada para em seguida ser purificada na coluna de resina níquel-agarose. A amostra foi aplicada na coluna e lavada com tampões de lavagem contendo diferentes concentrações de imidazol, molécula que compete com o grupo imidazol das histidinas ligado ao níquel da resina. Em seguida, foi usado o tampão de eluição com 250 mM de imidazol e as amostras foram submetidas a SDS-PAGE 10% para verificar o resultado da purificação. Foi observado que a proteína estava presente no extrato solúvel e foi liberada da coluna antes de ser adicionado o tampão de eluição, nesta primeira purificação, a rPOPLc apresentava ainda com muitos contaminantes. A proteína começou a ser liberada da coluna no processo de lavagem com tampão contendo 20 e 30 mM de imidazol (dados não mostrados).

Com o intuito de melhorar o processo de purificação, a concentração de imidazol no tampão de eluição foi alterada para 80 mM e no tampão de lavagem para 5 mM e, por meio de SDS-PAGE 10%, foi possível observar a rPOPLc mais pura e em maior quantidade (Fig. 8). Este último protocolo foi tido como o melhor para a purificação da proteína.

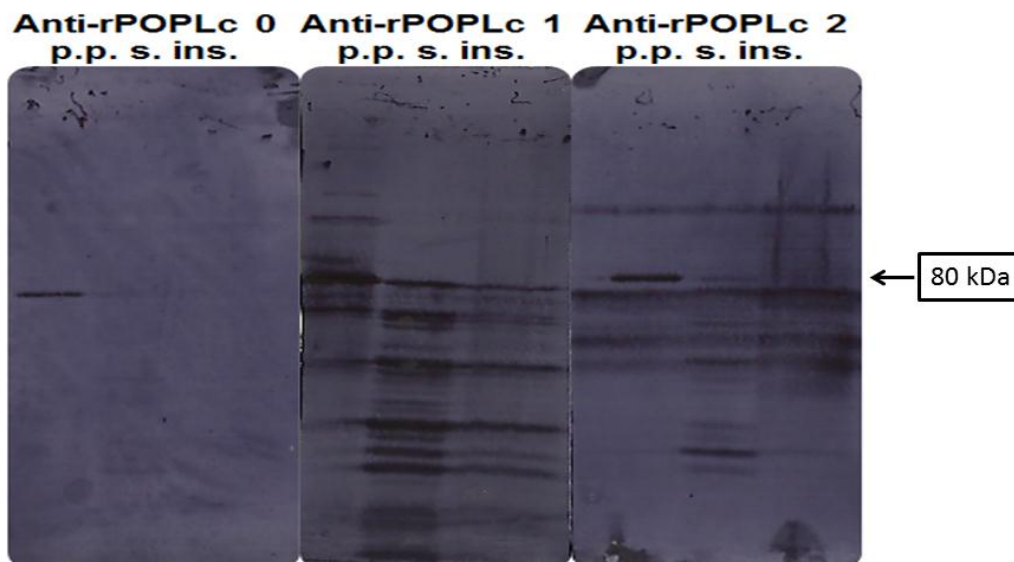


**Figura 8. Análise da purificação da rPOPLc.** Extrato total (ext), fração não-ligada (NL), frações das lavagens (WB1, WB2 e WB3), eluições (ELU1 e ELU2) e proteína dialisada com Tris 50mM e concentrada com Centricon 50 (CONC.).

Para estocar a proteína sem que a mesma perdesse a atividade, foi realizado um procedimento de diálise usando tampão Tris 50 mM pH 8.0 seguida da concentração da rPOPLc com o Centricon® 50. No final, foi adicionado 50% (v/v) de glicerol e a proteína foi armazenada a -20 °C. O rendimento obtido foi de 600 µg em 400 mL de cultura de bactéria.

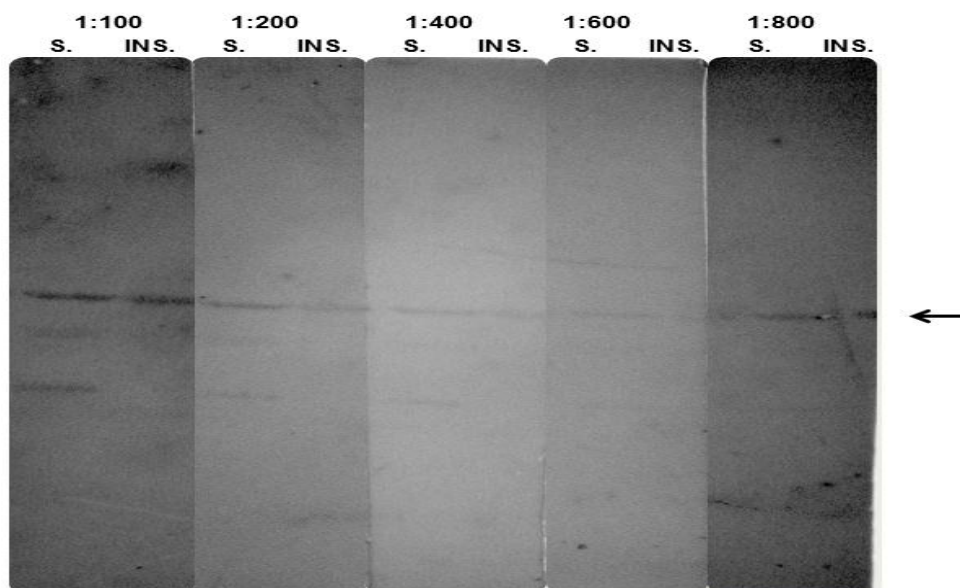
### **IMMUNOBLOTTING**

A rPOPLc purificada foi utilizada para imunizar camundongos a fim de se produzir soros anti-rPOPLc. Os soros obtidos neste processo foram analisados por *immunoblot* contendo extrato solúvel e insolúvel de *L. chagasi*. Os soros diluídos inicialmente de 1:100 reconheceram uma banda com massa de ~80 kDa (Fig. 9).



**Figura 9. Análise dos três soros anti-rPOPLc.** *Immunoblotting* com extrato de *L. chagasi* indicando a produção dos soros anti-rPOPLc após as quatro imunizações em camundongos BABL/C. O blot mostra a proteína pura (p.p.), a proteína na fração solúvel (s.) e na fração insolúvel (ins.) nos três soros obtidos, na diluição de 1:100.

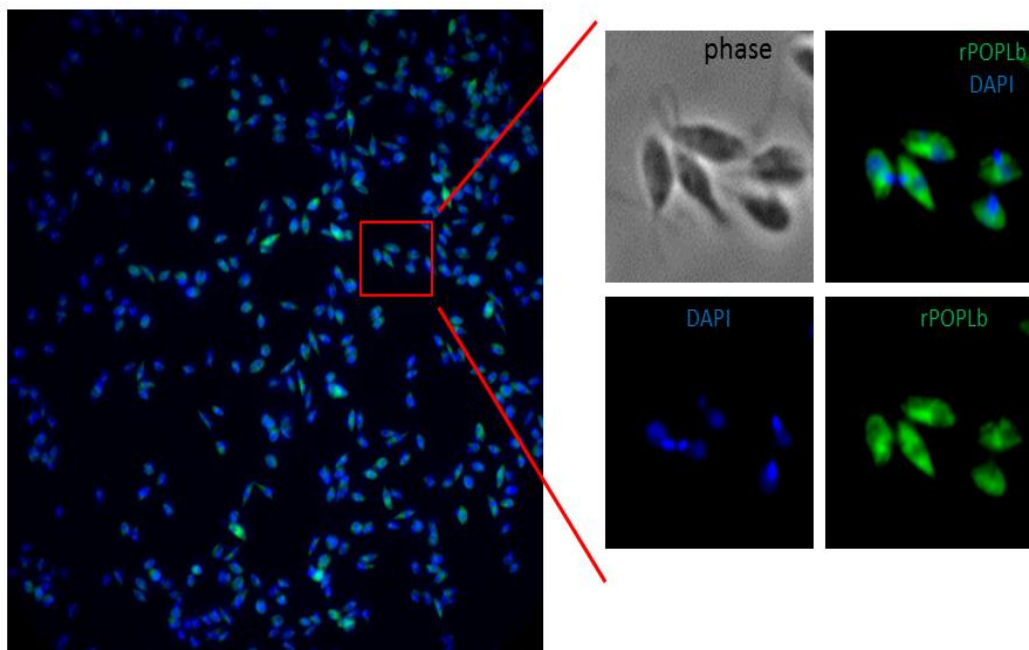
A fim de determinar o limite da diluição do soro, o teste foi repetido, porém com diluição seriada do soro. Como indicado na membrana de nitrocelulose (Fig.10), o soro foi reagente mesmo à diluição de 1:800. Algumas bandas de massa inferior a 80 kDa foram observadas como soro em menores diluições o que pode indicar proteólise da POPLc.



**Figura 10. Análise do soro anti-rPOPLc.** *Immunoblot* indicando reação do soro anti-rPOPLc em diluições de 1:100, 1:200, 1:400, 1:600 e 1:800 usado contra os extratos solúveis e insolúveis de *L. chagasi* respectivamente. O extrato foi preparado com adição de inibidores de proteases.

### CITOLocalização

Para determinar a localização da prolil oligopeptidase em *L. chagasi*, foi usado o soro específico contra a proteína recombinante POPLc no ensaio de iminofluorescência. Como controle, foi usado o soro pré-imune retirado antes da primeira imunização e as imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência. A rPOPLc foi marcada nos parasitos em pequenas vesículas citoplasmáticas (Fig. 11).



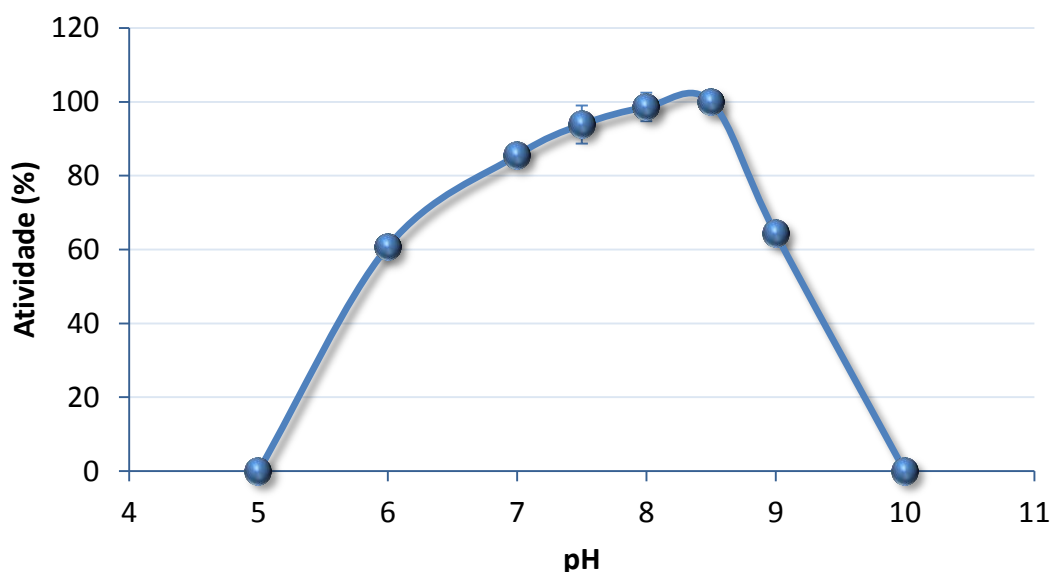
**Figura 11. Imunocitocalização rPOPLc.** Parasitos na forma promastigotas fixados com formaldeído e marcados com DAPI. Foi usado o soro imune contra rPOPLc a marcação está localizada em pequenas vesículas no citoplasma.

#### CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Para realização dos testes de atividade, primeiro fez-se necessário determinar qual das três enzimas purificadas em ensaios independentes tinha a melhor atividade e qual seria a melhor concentração para realizar os experimentos posteriores. Em forma de diluição seriada, foram realizadas triplicatas de cada enzima a partir de 0,3  $\mu\text{g}$  e em seguida 0,15, 0,075, 0,037, 0,018 e 0,009  $\mu\text{g}$  da rPOPLc. Para medir sua atividade foi usado o substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly Pro-AMC que libera o fluoróforo AMC quando a enzima cliva pós-prolina. O espectrômetro afere a fluorescência sob excitação de 360 nm e emissão em 460 nm. Desta forma foi possível medir a atividade enzimática da POPLc e estabelecemos que a reação com 300 ng rPOPLc/100 $\mu\text{l}$  (volume final do teste), apresentou significativa liberação do fluoróforo de forma linear em 20 min de cinética. Dados não mostrados.

## DETERMINAÇÃO DE TAMPÃO E PH ÓTIMO

A rPOPLc varia sua atividade dependendo do tampão e pH em que está, por este motivo foram realizados testes que visavam identificar as condições ideais para seu rendimento catalítico. Primeiramente os teste foram realizados com o pH variando de 5 a 10 no tampão composto de ácido acético 25 mM, glicina 25 mM, MES 50 mM, tris 75 mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM (Szeltner *et al.*, 2013). Novamente os testes foram realizados em duplicata e como é possível observar na Fig. 12 o melhor pH neste tampão foi 8,5, entretanto os pHs 7,5 e 8,0 tiveram resultados próximos do pH ótimo. Em seguida, foram testados somente os pHs 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5, mas em tampões Tris 50 mM e HEPES 50 mM, e foi observado que a atividade enzimática obtida em tampão Tris pH 8,0 e HEPES pH 7,5 foram similares (dados não mostrados).



**Figura 12. Dependência do pH na atividade da rPOPLc.** O tampão utilizado no teste é composto de ácido acético 25 mM, glicina 25 mM, MES 50 mM, Tris 75 mM, EDTA 1 mM e DTT 1 mM, ajustado nos diferentes pHs.

Com base nestes dados, ambos os tampões (Tris e HEPES) foram testados com diferentes concentrações de NaCl e DTT para determinar qual

seria o tampão ótimo para a rPOPLc. Primeiro foi testado separadamente NaCl ou DTT onde foi possível verificar que o NaCl não alterava a atividade da enzima de forma dose dependente enquanto o DTT produzia um aumento na mesma (dados não mostrados). O passo seguinte foi testar as duas condições juntas, então para isto foi realizado outro teste na presença de 300 e 150 mM NaCl e 10 e 5 mM DTT e observou-se que para o tampão Tris 50 mM com NaCl e DTT a atividade foi similar em todas as variações da molaridade. No entanto, para o HEPES 25 mM com NaCl 150 mM e DTT 5 mM houve um grande aumento da atividade, sendo este considerado o melhor tampão para a rPOPLc dentre as condições testadas (Tabela 2).

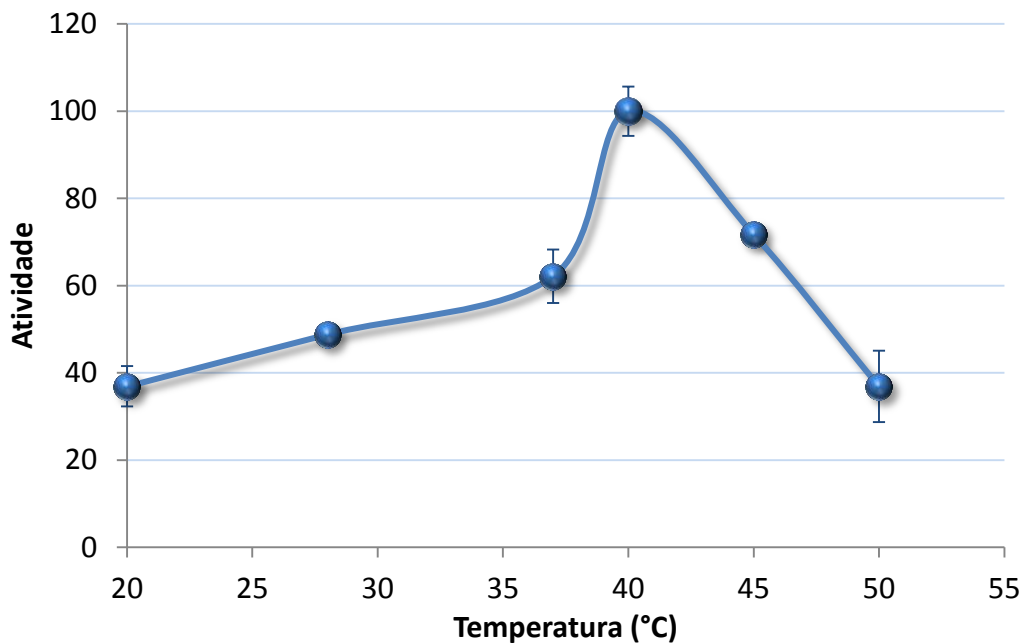
**Tabela 2.** Teste para determinação de tampão ótimo.

<b>Tampão</b>	<b>Atividade (UAF)</b>
Tris 50 mM+DTT 10 mM+NaCl 300 mM	4.442
Tris 50 mM+DTT 10 mM+NaCl 150 mM	4.792
Tris 50 mM+DTT5mM+NaCl 300 mM	4.821
Tris 50 mM+DTT5mM+NaCl 150 mM	4.920
HEPES 25 mM pH 7,5+DTT 5 mM+NaCl 150 mM	6.121

#### **DEPENDÊNCIA DA TEMPERATURA**

Os testes de temperatura ótima indicaram que a melhor temperatura para a atividade da POPLc foi 40 °C. Essa temperatura foi seguida por 45 °C com 71% e 37 °C com aproximadamente 63% de atividade (Fig.13).

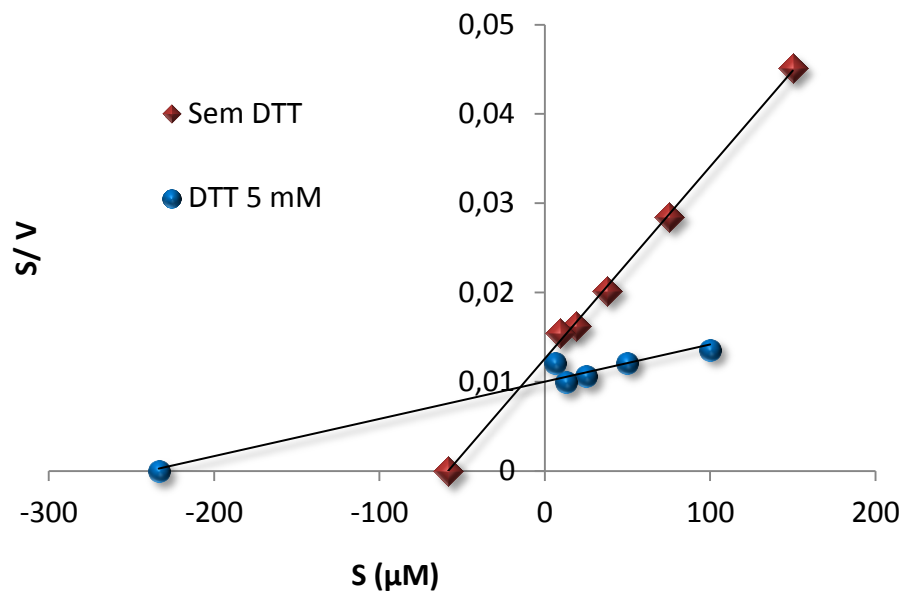




**Figura 13. Dependência da temperatura na atividade da POPLc.**

#### PARÂMETROS CINÉTICOS

Para avaliar o comportamento da enzima ao longo de uma cinética e assim determinar suas constantes catalíticas, foi realizado um ensaio de  $K_m$  onde foram testadas diferentes concentrações do substrato Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC. Os testes foram realizados em tampão HEPES 25 mM pH 7,5 unicamente ou na presença de NaCl 150 mM e DTT 5mM. Assim, foi possível determinar, de acordo com a regressão de Hanes-Wolff, o  $K_m$  de 58,56  $\mu\text{M}$  e o  $V_{max}$  de 4.651,16 mFU/min usando somente HEPES 25 mM pH 7,5 e  $K_m$  de 233,58  $\mu\text{M}$  com  $V_{max}$  de 23.809,52 mFU/min na presença de NaCl e DTT (Fig. 14).



**Figura 14. Plot Hanes-Wolff da atividade de POPLc com Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC.** O teste foi realizado usando o substrato Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC em tampão HEPES 25 mM pH 7,5 com ou sem 5 mM de DTT.

#### INIBIÇÃO DA POPLc

Com intuito de investigar quais inibidores seriam capazes de alterar a atividade da enzima, foi realizado um teste com os inibidores clássicos de proteases AEBSF - 4 - (2 - aminoetil) benzenossulfonilo cloridrato de fluoreto (serino protease), EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (metalo protease), TPCK- L-1- tosylamido - 2 - feniletil-clorometilcetona (cisteíno e serino protease), E-64 - N-(L-3-trans-carboxyoxiran-2-carbonyl)-L-leucyl]-amido(4-guanidino)butane (cisteíno protease), TLCK – tosil-lisina clorometil cetona (cisteíno e serino protease), Leupeptina (serino, cisteíno e treonino protease) e Pepstatina (aspártico protease). Após 15 min de incubação da enzima com o respectivo inibidor, a atividade foi mensurada com o substrato Suc-Gly-Pro-

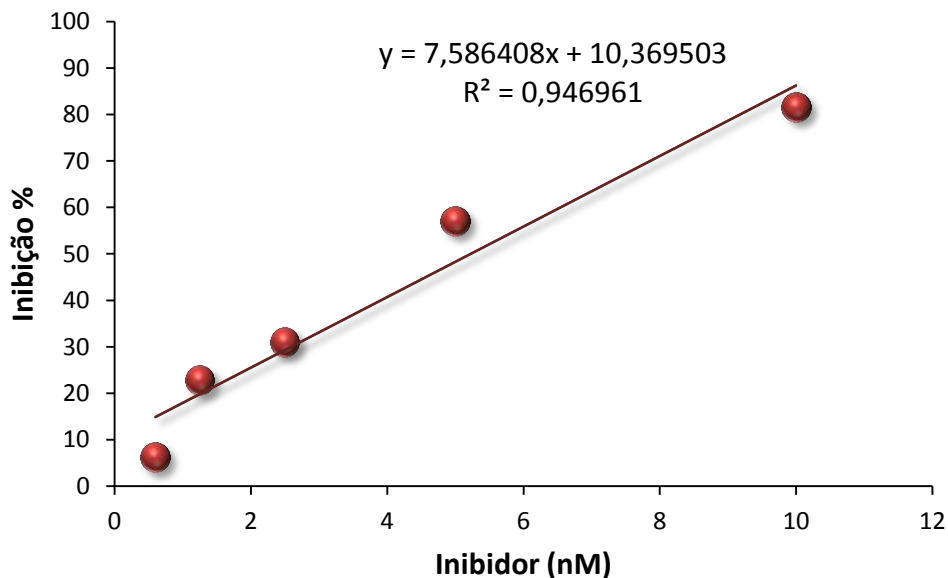
Leu-Gly-Pro-AMC e a taxa de inibição foi calculada em termos de porcentagem comparado a reação controle sem inibidor.

Como resultado foi possível verificar que três inibidores de proteases foram capazes de reduzir a atividade da enzima de maneira significativa e estes foram TPCK 92,3%, TLCK 96,8% e Pepstatina 70,2%, como podemos observar na Tabela 3.

**Tabela 3.** Teste com os inibidores clássicos de proteases.

Inibidor	Concentração	Inibição %
AEBSF	10 mM	19,2
EDTA	1mM	10,5
TPCK	100 µM	92,3
E-64	100 µM	3,8
TLCK	100 µM	96,8
LEUPEPTINA	100 µM	7,6
PEPSTATINA	100 µM	70,2

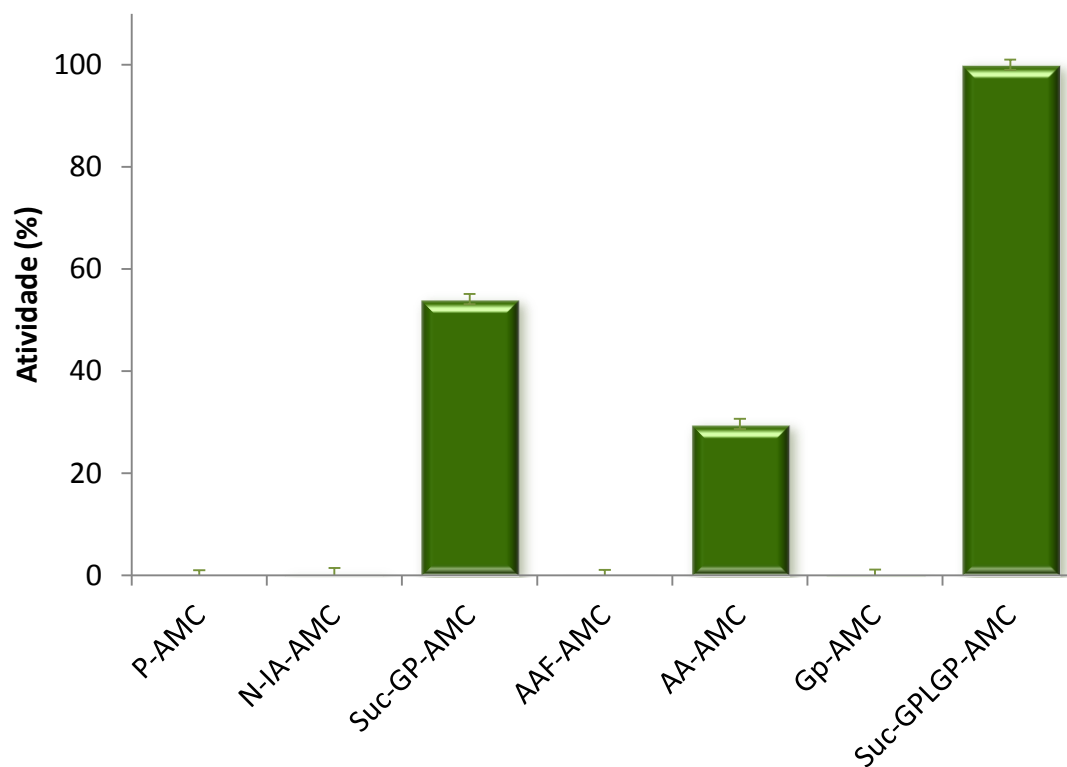
Usando o inibidor Z-Pro-Prolinal (Szeltner *et al.*, 2002) que possui grande especificidade para POPs, foi realizado um teste de inibição com diluição seriada do inibidor com 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,6 nM. Foi observado uma inibição 81% usando a concentração de 10 nM do inibidor (Fig. 15). Com perfil de inibição foi possível determinar a IC<sub>50</sub> de 5,22 nM.



**Figura 15. Teste de inibição com inibidor Z-Pro-Prolinal específico de POPs.** O inibidor foi utilizado nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25 ou 0,6 nM e incubado por 15 min com a POPLc e, em seguida, adicionado o substrato e realizada a medida da atividade remanescente. O procedimento ocorreu em triplicatas.

#### ATIVIDADE COM DIFERENTES SUBSTRATOS

A POP é uma enzima que cliva na região C- terminal pós-prolina e pós-alanina (Bastos *et al.*, 2010), então para verificar com quais substratos a POPLc é capaz de hidrolisar, um teste de atividade foi realizado na presença de diversos substratos todos nas mesmas condições e concentrações. Como pode-se observar na Fig. 16, o substrato Suc-Gly-Pro-AMC apresentou aproximadamente 60% de atividade em relação ao Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC que apresentou a maior atividade (100%). Arg-Arg-AMC teve quase 30% de atividade enquanto que os outros substratos não apresentaram atividade significativa.



**Figura 16. Atividade de POPLc com diferentes substratos.** Os substratos foram: P-AMC, N-IA-AMC, Suc-GP-AMC, AAF-AMC, AA-AMC, GP-AMC e N-Suc-GPLGP-AMC testados nas mesmas condições, incluindo mesma concentração e tempo de leitura. O teste foi realizado em triplicata.



# Discussão

## DISCUSSÃO

A prolil oligopeptidase (POP) é uma enzima proteolítica que age em diversos processos biológicos e está presente de forma ubíqua entre os organismos, sendo uma enzima com importante papel na saúde e doença dos seres humanos (Shan, Mathews e Khosla, 2005; Page e Di Cera, 2008). A POP é classificada como uma serino protease do clã SC e família S9 que cliva em após resíduos de prolina pequenos peptídeos de até 30 aminoácidos e está envolvida na hidrólise de peptídeos hormonais e neuropeptídios (Szeltner *et al.*, 2013). Diferenças nos níveis de atividade de POP foram encontradas em diferentes estágios de depressão e o aumento da atividade de POP também foi descrito em indivíduos com mania e esquizofrenia (Rea e Fülöp, 2006). Por estes e outros achados como um possível envolvimento da POP na patogénia de Alzheimer, o desenvolvimento inibidores para esta enzima é foco de muitas pesquisas científicas (Lambeir, 2011; López, Tarragó e Giralt, 2011).

Neste trabalho de mestrado, o objetivo principal foi de iniciar o estudo da POP de *L. chagasi*, considerada um alvo potencial de drogas, com base nos estudos realizados pelo nosso grupo para a POP de *T. brucei* e *T. cruzi* (Santana *et al.*, 1997; Grellier *et al.*, 2001b; Bastos *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2010). A primeira etapa do projeto foi a de clonar o gene *poplc*, para isso primers foram desenhados com base na respectiva sequência e várias tentativas de se amplificar o gene por PCR foram realizadas. No entanto, apesar de testar diversas condições de temperatura de anelamento, concentrações de cloreto de magnésio, número de ciclos de amplificação dentre outras, o resultado era sempre o da amplificação de vários fragmentos de DNA. Isso sugeria que o primer estava ligando de forma inespecífica em

vários locais do genoma do parasito. Como esta etapa estava consumindo muito do tempo disponível para a realização dos experimentos propostos para o mestrado, optamos por sintetizar o gene e cloná-lo por uma empresa especializada (GenScript, USA). Assim, o gene foi clonado no pET15b e a proteína foi expressa na bactéria BL21 AI para, em seguida ser realizada sua purificação. A primeira expressão foi realizada na temperatura de 37 °C onde foi obtida a proteína na fração insolúvel, isso provavelmente foi devido à alta atividade metabólica das bactérias nesta temperatura. Neste caso, as células bacterianas apresentam altas taxas de transcrição e tradução o que pode interferir no enovelamento correto da enzima formando corpos de inclusão. Como a indução em baixas temperaturas melhora o rendimento da enzima solúvel (Ehren *et al.*, 2008), optamos por reduzi-la para 20 °C onde foi obtida uma grande quantidade de enzima solúvel (Fig. 7). A POPLc apresenta uma massa molecular de 78 kDa, todavia essa massa pode variar entre os diferentes organismos, provavelmente devido à pressão seletiva sofrida durante o processo evolutivo. Na arquea *Thermococcus sp.*, que é um termófilo que vivem em altas temperaturas, a massa molecular da POP é de 70,380 kDa e no fungo *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* JEC21, seu peso molecular é de 84 (Lee *et al.*, 2007).

Para caracterizar a enzima foram realizados testes para determinar suas condições ótimas de atividade. O primeiro teste realizado foi para determinar qual seria o melhor pH para a atividade da enzima (Fig. 12). Esse teste indicou que o pH ótimo varia de acordo com o tampão utilizado, pois foram testados diferentes tampões com diferentes pHs e cada um apresentou um pH ótimo. O tampão composto de ácido acético 25 mM, glicina 25 mM, MES 50 mM, tris 75



mM, EDTA 1mM e DTT 1 mM apresentou melhor atividade em pH 8,0 e 8,5. Já no tampão Tris 50 mM teve sua atividade ótima em pH 8,0. O menor pH ótimo foi obtido em tampão HEPES pH 7,5 que coincidiu com o estudo realizado por Bastos *et al*, 2010, onde a POP recombinante de *T. brucei* indicou que o pH ótimo e o tampão ideal para a atividade de POP foi HEPES 25 mM em pH 7,5 (Bastos *et al.*, 2010). Resultados semelhante foram relatados em outros estudos, como é o caso da proteína recombinante do termófilo *Thermococcus sp.* que também apresenta melhor atividade em pH 7,5 (Lee *et al.*, 2007), corroborando assim os resultados aqui obtidos. Nos testes para verificar o melhor tampão, a adição de DTT 5mM no tampão HEPES aumentou a atividade da enzima quando comparado com o tampão sem DTT. Isso é possivelmente devido à propriedade do DTT de evitar a oxidação da Cys<sup>255</sup> que se encontra próxima ao sítio catalítico de POPs (Bastos *et al.*, 2005; Szeltner *et al.*, 2013) e a POPLc apresenta este resíduo conservado na referida posição. Portanto, o tampão estabelecido para determinar os parâmetros cinéticos foi o HEPES 25 mM com DTT 5mM, conforme os resultados indicados na Tabela 2.

Teste com inibidores clássicos de proteases foram realizados para avaliar seus efeitos sobre a POPLc (Tabela 3). Como resultado, observou-se que o inibidor AEBSF apresentou inibição reduzida o que já foi relatado para outros estudos com POPs (Bastos *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2010). Os inibidores TPCK e TLCK na concentração de 100 µM reduziram em mais de 90% a atividade da rPOPLc e este resultado corrobora com outros já descritos, pois ele inibe um amplo espectro de serino peptidase (King, Halicka e Darzynkiewicz, 2004). Um resultado inesperado, foi a inibição da rPOPLc pelo inibidor pepstatina A, uma vez que ele é um inibidor específico de aspártico

protease (Kritis *et al.*, 2011). Isto pode ser explicado pela natureza peptídica deste inibidor (Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta) (Umezawa *et al.*, 1970) cujos resíduos poderiam interagir com resíduos da enzima cruciais para atividade da POPLc.

O inibidor Z-Pro-Prolinal, na concentração de 10 nM, inibiu a atividade da enzima em 81%, com um IC<sub>50</sub> de 5,22 nM e, podemos comparar com a POP do cérebro bovino que também apresentou um IC<sub>50</sub> de 5 nM (López, Tarragó e Giralt, 2011)(Fig. 15). Esta comparação indica que estas enzimas apresentam alta similaridade estrutural na região da bolsa catalítica onde o inibidor se liga. Estudos apontam que os inibidores aldeídos tendem a tornar as ligações de hidrogênio mais rígidas, e estas têm sido mostradas como uma contribuição das baixas barreiras de ligações de hidrogênio nas reações de catálise enzimática, que levariam a uma estabilização do estado de transição (Kahyaoglu *et al.*, 1997). A função do aldeído é requerida para a correta ligação do inibidor Z-Pro-Prolinal ao sítio ativo da POP, permitindo sua ação como um estado de transição análogo na catálise enzimática, tendo assim grande eficiência inibitória na reação enzimática da prolil oligopeptidase (López, Tarragó e Giralt, 2011).

O estudo da especificidade de uma enzima por substratos é fundamental para o entendimento do seu papel biológico nos diferentes organismos. Os substratos selecionados para avaliar a atividade da rPOPLc possuíam diferenças na composição de seus aminoácidos e entre eles, dois substratos se destacaram com relação a sua atividade hidrolítica (Fig. 16). Os substratos Arg-Arg-AMC e Suc-Gly-Pro apresentaram aproximadamente 30% e 55% de hidrólise por rPOPLc, respectivamente. Embora a hidrólise do substrato Arg-Arg-AMC não seja comum para a POP, outro membro da família

das POPs, a oligopeptidase B, que possui estrutura semelhante a da POP (propriamente dita) é capaz de clivar substratos contendo Arg no lado C-terminal (Motta *et al.*, 2012). A maior eficiência catalítica foi observada na hidrólise do substrato N- Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC. Resultado similar foi primeiramente observado no trabalho que descreve a caracterização da POPTc80 (Santana *et al.*, 1997) onde também foi mostrado preferência pelos substratos contendo prolina situada na região C-terminal, porém esta atividade é insignificante quando a porção N terminal é livre, como é o caso do Gly-Pro-AMC.

Para determinar as constantes cinéticas, foram realizados dois testes com diferentes tampões para verificar se o uso de DTT e NaCl alterava o resultado do *K<sub>m</sub>*. Apesar do DTT aumentar a atividade da enzima, a reação realizada no tampão HEPES 25 mM, NaCl 150 mM e DTT 5 mM apresentou um valor de *K<sub>m</sub>* 4 vezes maior (233,58  $\mu$ M) comparado com o teste realizado somente com o tampão HEPES (58,57  $\mu$ M, Fig. 14). Em estudos com as POPs de *T. cruzi* e *T. brucei*, o *K<sub>m</sub>* encontrado foi menor (~14  $\mu$ M) o que indica, provavelmente, que a rPOPLc possui menor afinidade pelo substrato (Bastos *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2010). O aumento do *K<sub>m</sub>* na presença de DTT também foi observado nestas enzimas. Não foi possível calcular a eficiência catalítica (*K<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>*), pois para o cálculo do *K<sub>cat</sub>* real é preciso conhecer a quantidade da enzima ativa e não houve tempo hábil de estimá-la com o uso do inibidor Z-Pro-Prolinal.

Estudos mostram que a temperatura é um passo determinante para a catálise enzimática (Rea e Fülöp, 2006) e, a temperatura ótima de 40 °C encontrada para a rPOPLc (Fig. 13) difere dos outros tripanossomatídeos,

porém como podemos constatar em Szeltner *et al.* (2002) a POP do cérebro do porco teve atividade ótima em uma temperatura de 42 °C. Serão realizados testes de estabilidade térmica para confirmar os resultados aqui obtidos.

Através do *immunoblot* que continha extrato de parasito e POP recombinante, o soro anti-rPOPLc permitiu observar a proteína marcada na membrana de transferência com o tamanho de ~ 80 kDa, nas frações solúveis e insolúveis do extrato, indicando que as imunizações realizadas produziram o soro imune contra a POP de *L. chagasi* reconhecendo assim a proteína (Fig. 9). Entretanto, a membrana mostra a presença de outras bandas indicando degradação da rPOPLc que pode ter ocorrido durante a preparação do extrato. O outro blot realizado foi preparado na presença inibidores de proteases (Fig. 10), porém observamos que não foi suficiente para inibir totalmente a degradação da enzima e, isto pode ser devido a sensibilidade da POPLc à proteólise. O experimento acima será repetido para que resultados melhores sejam obtidos. Na citolocalização (Fig. 11), a marcação no parasito se apresentam em pequenas vesículas citoplasmáticas com uma maior concentração próximas ao cinetoplasto, numa região que parece ter um grande troca de vesícula com o meio externo, através da bolsa flagelar. Uma marcação similar é observada em *T. cruzi* no estudo da POPTc80 (Grellier *et al.*, 2001b). O soro produzido será utilizado em novos testes para que assim o conhecimento em torno da POPLc possa ser aprofundado e, desta maneira elucidar seu papel na biologia do parasito e no processo de invasão e persistência nas células do hospedeiro.



# Conclusão

## CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pelos experimentos realizados e aqui descritos é possível concluir que:

- A prolil oligopeptidase de *L. chagasi* foi clonada e expressa na sua forma recombinante e ativa;
- As condições ótimas de atividade foram determinadas e estão em concordância com resultados encontrados para POPs de outros organismos;
- Ensaio enzimáticos com diferentes substratos mostraram atividade com Suc-GP-AMC, Suc-GPLGP-AMC de forma inesperada com RR-AMC;
- O inibidor Z-Pro-Prolinal inibiu a atividade da rPOPLc em 81% com  $IC_{50}$  de 5,22 nM. TPCK e TLCK indicaram alta inibição da enzima com 92,3%, e 96,8% respectivamente e
- As imunizações para produção de soro murino anti-rPOPLc foram bem sucedidas e a imunocitocalização mostrou que a enzima está localizada em vesículas no citoplasma de formas promastigotas do parasito.



# Perspectivas

## PERSPECTIVAS

Como perspectivas de continuidade deste trabalho, pretende-se :

- Determinar a quantidade de POPLc ativa na amostra purificada da enzima para cálculo do  $K_{cat}$  e assim da eficiência catalítica da enzima;
- Testar o efeito do inibidor específico de POP Z-Pro-Prolinal sobre os parasitos e avaliar a taxa de sobrevivência dos mesmos bem como o efeito na infecção em células hospedeiras;
- Verificar a habilidade da rPOPLc na degradação do colágeno;
- Realizar um ensaio de secreção da POPLc por promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* e
- Realizar o interactoma de POPLc afim de identificar suas possíveis proteínas parceiras presentes no parasito.





# Referências Bibliográficas

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARATA, R. A. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 405083, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24000322> >.
- BASTOS, I. M. et al. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. **Biochem J**, v. 388, n. Pt 1, p. 29-38, May 2005. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15581422> >.
- BASTOS, I. M. et al. Prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma brucei* hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice. **Microbes Infect**, v. 12, n. 6, p. 457-66, Jun 2010. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188209> >.
- BASTOS, I. M. et al. Parasite prolyl oligopeptidases and the challenge of designing chemotherapeutics for Chagas disease, leishmaniasis and African trypanosomiasis. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 25, p. 3103-15, 2013. ISSN 1875-533X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23514419> >.
- BONNEY, K. M. An argument and plan for promoting the teaching and learning of neglected tropical diseases. **J Microbiol Biol Educ**, v. 14, n. 2, p. 183-8, 2013. ISSN 1935-7877. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24358381> >.
- BORGES-VELOSO, A. et al. Proteolytic profiling and comparative analyses of active trypsin-like serine peptidases in preimaginal stages of *Culex quinquefasciatus*. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 123, 2012. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22892097> >.
- BURZA, S. et al. Risk Factors for Visceral Leishmaniasis Relapse in Immunocompetent Patients following Treatment with 20 mg/kg Liposomal Amphotericin B (Ambisome) in Bihar, India. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 1, p. e2536, 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24392166> >.
- BURZA, S. et al. Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis following Treatment with 20 mg/kg Liposomal Amphotericin B (Ambisome) for Primary Visceral Leishmaniasis in Bihar, India. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 1, p. e2611, 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24392171> >.
- 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 Inst Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 587-92, Oct 2005. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16302071> >.

DOBSON, D. E. et al. Leishmania major survival in selective Phlebotomus papatasi sand fly vector requires a specific SCG-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 11, p. e1001185, 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085609> >.

EHREN, J. et al. Protein engineering of improved prolyl endopeptidases for celiac sprue therapy. **Protein Eng Des Sel**, v. 21, n. 12, p. 699-707, Dec 2008. ISSN 1741-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18836204> >.

GARCÍA-HORSMAN, J. A.; MÄNNISTÖ, P. T.; VENÄLÄINEN, J. I. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. **Neuropeptides**, v. 41, n. 1, p. 1-24, Feb 2007. ISSN 0143-4179. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196652> >.

GIUDICE, A. et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with Leishmania braziliensis infection. **BMC Infect Dis**, v. 12, p. 75, 2012. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22458474> >.

GRELLIER, P. et al. Trypanosoma cruzi prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 50, p. 47078-86, Dec 2001a. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598112> >.

GRELLIER, P. et al. Trypanosoma cruzi prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **J Biol Chem**, v. 276, n. 50, p. 47078-86, Dec 2001b. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598112> >.

HOOPER, N. M. Proteases: a primer. **Essays Biochem**, v. 38, p. 1-8, 2002. ISSN 0071-1365. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12463157> >.

KAHYAOGLU, A. et al. Low barrier hydrogen bond is absent in the catalytic triads in the ground state but is present in a transition-state complex in the prolyl oligopeptidase family of serine proteases. **J Biol Chem**, v. 272, n. 41, p. 25547-54, Oct 1997. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9325271> >.

KARAGIANNIS-VOULES, D. A. et al. Bayesian geostatistical modeling of leishmaniasis incidence in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 5, p. e2213, 2013. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675545> >.

KASZUBA, K. et al. Molecular dynamics, crystallography and mutagenesis studies on the substrate gating mechanism of prolyl oligopeptidase. **Biochimie**, v. 94, n. 6, p. 1398-411, Jun 2012. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484394> >.

KATARA, G. K. et al. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to Leishmania tropica. **BMC Immunol**, v. 14, n. 1, p. 52,

Nov 2013. ISSN 1471-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24267152> >.

KAUSHIK, S.; SOWDHAMINI, R. Structural analysis of prolyl oligopeptidases using molecular docking and dynamics: insights into conformational changes and ligand binding. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e26251, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22132071> >.

KING, M. A.; HALICKA, H. D.; DARZYNKIEWICZ, Z. Pro- and anti-apoptotic effects of an inhibitor of chymotrypsin-like serine proteases. **Cell Cycle**, v. 3, n. 12, p. 1566-71, Dec 2004. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15539954> >.

KRITIS, A. et al. Proteases inhibition assessment on PC12 and NGF treated cells after oxygen and glucose deprivation reveals a distinct role for aspartyl proteases. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25950, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22028798> >.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Front Immunol**, v. 3, p. 251, 2012. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22912637> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LAMBEIR, A. M. Translational research on prolyl oligopeptidase inhibitors: the long road ahead. **Expert Opin Ther Pat**, v. 21, n. 7, p. 977-81, Jul 2011. ISSN 1744-7674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21679099> >.

LAMOUR, S. D. et al. Metabolic characterization of Leishmania major infection in activated and nonactivated macrophages. **J Proteome Res**, v. 11, n. 8, p. 4211-22, Aug 2012. ISSN 1535-3907. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22724526> >.

LEE, H. S. et al. Characterization of prolyl oligopeptidase from hyperthermophilic archaeon Thermococcus sp. NA1. **J Biosci Bioeng**, v. 103, n. 3, p. 221-8, Mar 2007. ISSN 1389-1723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17434424> >.

LERCHENBERGER, M. et al. Matrix metalloproteinases modulate ameboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue. **Blood**, v. 122, n. 5, p. 770-80, Aug 2013. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23757732> >.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 83, 2012. ISSN 2235-2988. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919674> >.

LU, H. G.; HU, X. S. Identification of leishmania by kinetoplast DNA minicircle and cloning of minicircle. **Chin Med J (Engl)**, v. 103, n. 5, p. 418-23, May 1990. ISSN 0366-6999. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2167824> >.

LÓPEZ, A.; TARRAGÓ, T.; GIRALT, E. Low molecular weight inhibitors of Prolyl Oligopeptidase: a review of compounds patented from 2003 to 2010. **Expert Opin Ther Pat**, v. 21, n. 7, p. 1023-44, Jul 2011. ISSN 1744-7674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21539473> >.

M NAIL, A.; M IMAM, A. Visceral leishmaniasis: Clinical and demographic features in an African population. **Pak J Med Sci**, v. 29, n. 2, p. 485-9, Apr 2013. ISSN 1682-024X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24353561> >.

MILES, S. A. et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania. **J Exp Med**, v. 201, n. 5, p. 747-54, Mar 2005. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753208> >.

MOTTA, F. N. et al. The Trypanosoma cruzi virulence factor oligopeptidase B (OPBtC) assembles into an active and stable dimer. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30431, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22276197> >.

ODDONE, R. et al. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of Leishmania (Viannia) species. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 9, p. 2818-25, Sep 2009. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587302> >.

OLIVEIRA, F.; DE CARVALHO, A. M.; DE OLIVEIRA, C. I. Sand-Fly Saliva-Leishmania-Man: The Trigger Trio. **Front Immunol**, v. 4, p. 375, 2013. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24312093> >.

ORDAZ-FARIAS, A. et al. Case report: Transient success using prolonged treatment with miltefosine for a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis infected with Leishmania mexicana mexicana. **Am J Trop Med Hyg**, v. 88, n. 1, p. 153-6, Jan 2013. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23243111> >.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 7-8, p. 1220-36, Apr 2008. ISSN 1420-682X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18259688> >.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sep 1998. ISSN 1092-2172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729602> >.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res**, v. 34, n. Database issue, p. D270-2, Jan 2006. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16381862> >.

RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res**, v. 36, n. Database issue, p. D320-5, Jan 2008. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17991683> >.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. Database issue, p. D160-4, Jan 2004. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681384> >.

REA, D.; FÜLÖP, V. Structure-function properties of prolyl oligopeptidase family enzymes. **Cell Biochem Biophys**, v. 44, n. 3, p. 349-65, 2006. ISSN 1085-9195. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679522> >.

SANTANA, J. M. et al. A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **Biochem J**, v. 325 ( Pt 1), p. 129-37, Jul 1997. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9224638> >.

SHAN, L.; MATHEWS, I. I.; KHOSLA, C. Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: role of interdomain dynamics in catalysis and specificity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 10, p. 3599-604, Mar 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738423> >.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 8, p. 423-31, Aug 2009. ISSN 1365-3024. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646206> >.

SZELTNER, Z. et al. The loops facing the active site of prolyl oligopeptidase are crucial components in substrate gating and specificity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, n. 1, p. 98-111, Jan 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940581> >.

SZELTNER, Z.; POLGÁR, L. Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. **Curr Protein Pept Sci**, v. 9, n. 1, p. 96-107, Feb 2008. ISSN 1389-2037. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336325> >.

SZELTNER, Z. et al. Electrostatic effects and binding determinants in the catalysis of prolyl oligopeptidase. Site specific mutagenesis at the oxyanion binding site. **J Biol Chem**, v. 277, n. 45, p. 42613-22, Nov 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202494> >.

TENORIO-LARANGA, J. et al. Four day inhibition of prolyl oligopeptidase causes significant changes in the peptidome of rat brain, liver and kidney. **Biochimie**, v. 94, n. 9, p. 1849-59, Sep 2012. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546504> >.

UMEZAWA, H. et al. Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by Actinomycetes. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 23, n. 5, p. 259-62, May 1970. ISSN 0021-8820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4912600> >.

VERÇOSA, B. L. et al. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of Leishmania (Leishmania) chagasi naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. **Vet Parasitol**, v. 189, n. 2-4, p. 162-70, Oct 2012. ISSN 1873-2550. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22694833> >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global Health Observatory Data Repository, Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHVNUM?lang=en>>. Acesso em: 2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis - Situation and trends. 2013. Disponível em: [http://www.who.int/gho/neglected\\_diseases/leishmaniasis/en/index.html](http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/index.html)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, 2010.