



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
E BIOLOGIA CELULAR

**“ATIVIDADE E EXPRESSÃO DA METALOPROTEASE GP63 NAS ESPÉCIES
LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS E *LEISHMANIA (VIANNIA)*
BRAZILIENSIS”**

DARA DA COSTA SOARES

BELÉM – PA

2021

**ATIVIDADE E EXPRESSÃO DA METALOPROTEASE GP63 NAS ESPÉCIES
LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS E *LEISHMANIA (VIANNIA)
BRAZILIENSIS***

DARA DA COSTA SOARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito Parcial para obtenção de grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Prof^ª. Dr^ª. Edilene Oliveira da Silva - Orientadora

BELÉM – PA

2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da
Universidade Federal do Pará**

**Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados
fornecidos pelo(a) autor(a)**

D111a Soares, Dara da Costa.

Atividade e expressão da metaloprotease Gp63 nas
espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis* / Dara Da Costa Soares. — 2021.
60 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Edilene Oliveira
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Neurociências e Biologia celular, Belém,
2021.

1. Leishmaniose tegumentar americana.
2. Gp63. 3. *Leishmania (Leishmania)*
Amazonensis. 4. *Leishmania (Viannia)*
Braziliensis. I. Título.

CDD 571.6

**ATIVIDADE E EXPRESSÃO DA METALOPROTEASE GP63 NAS ESPÉCIES
LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS E *LEISHMANIA (VIANNIA)
BRAZILIENSIS***

Por

DARA DA COSTA SOARES

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Edilene Oliveira da Silva

Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito Parcial para obtenção de grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Banca examinadora: Membro: **Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia**

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Membro: **Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento**

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Suplente: **Prof. Dr. Edivaldo Herculano Corrêa Oliveira**

Instituto de Ciências Exatas e Naturais – UFPA

Belém – PA, 29 de Junho de 2021.

-Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família pelo incentivo, apoio e oportunidade. À minha mãe, Lidia, meu padrasto, Walter, minhas irmãs, Alynne, Abigail e Pollyanna, ao meu pai, David por todo apoio, suporte, amor que me foi dado e por vibrarem de felicidade junto comigo a cada conquista realizada.

Ao meu namorado e parceiro pra tudo, Lucas, que não mede esforços para me ajudar em qualquer circunstância e me apoia em todos os meus objetivos. Obrigada por todo carinho, amor, apoio e incentivo que tu me dás diariamente. Obrigada pela vida que a gente divide. À minha amada sogra, Nazaré, por todo incentivo, interesse e apoio na finalização desse trabalho.

À minha orientadora, Edilene, pela oportunidade de desenvolver pesquisa sob sua orientação e por me acolher no laboratório desde o estágio supervisionado no início da graduação até a finalização do mestrado. Muito obrigada pela oportunidade de conhecer e me encantar pelo mundo da pesquisa.

Ao professor e amigo, Alejandro, que foi e é um anjo na minha vida acadêmica e fora dela também. Obrigada por toda paciência, ensinamentos, apoio, tutoriais no GraphPad e ombro amigo em todos os momentos. Obrigada também por todos os chopps, idas ao IEC e momentos felizes que dividimos juntos. És um professor incrível! Fico feliz que tive a oportunidade de conviver contigo nesse período tão importante.

À Jade, que conheci no início do mestrado e esteve lado a lado comigo em todo esse processo. Obrigada por todo apoio, ajuda e incentivo. Aqui finalizamos uma etapa que começamos juntas, com muitos aprendizados, choros, risadas e um pouco de gin tônica.

À minha amiga, Amanda, que sempre me ajudou em tudo desde a graduação, sempre muito paciente e disposta a me ajudar. Obrigada por todas as teorias que já inventamos em longas conversas, pelas madrugadas acordadas tagarelando e por todos os lanches que comemos juntas (não fora poucos hahah).

Ao meu amigo, Marcus, sempre com os melhores adjetivos e palavras de apoio para todos os momentos, sejam eles de alegria, tristeza ou desespero. Teu apoio e compreensão tornou tudo um pouco mais leve. Muito obrigada pela amizade e por todos os momentos bons.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Júlia, Adan, Leslye, Carol, muito obrigada por todas as conversas, ajuda e, principalmente, apoio. Vocês são ótimos! E a todos aqueles que passaram pelo laboratório nesse período de seis anos em que participei do grupo de pesquisa. Foram muitos momentos juntos, agradeço por cada um deles.

Agradeço também ao Rodrigo, por ser sempre muito solícito, disposto e por todo apoio.

Ao IEC por todas as amostras de leishmania cedidas, que permitiram a realização desse trabalho. Ao laboratório de Neuroquímica molecular, pelo espaço para fazer todos os blots.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante a realização desse trabalho. À UFPA, por ser uma instituição tão incrível e capaz de formar pessoas e excelência.

Aos membros dessa banca avaliadora, prof. Marcelo Bahia e prof. José Luiz, pela disponibilidade e contribuir com esse trabalho.

E a todos que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES	12
1.2. TAXONOMIA DO GÊNERO <i>LEISHMANIA</i>	15
1.3. O PARASITO	16
1.3.1. Morfologia	16
1.3.2. Ciclo biológico	17
1.4. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA).....	19
1.4.1. Leishmanioses causadas por <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	21
1.4.2. Leishmanioses causadas por <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	22
1.5. INTERAÇÃO PARASITO - CÉLULA HOSPEDEIRA	24
1.7. GLICOPROTEÍNA 63 (GP63).....	27
2. OBJETIVOS	32
2.1. OBJETIVO GERAL.....	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO.....	34
3.4. EXPRESSÃO DA GP63 POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	35
3.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	36
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4. RESULTADOS	38
4.1. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA GP63 POR FLUORIMETRIA.....	38
4.1.2. Atividade proteolítica por zimografia em gel.....	40
4.2. EXPRESSÃO DA GP63 POR <i>WESTERN BLOT</i>	42
4.3. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	44
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Mapa do mundo com número de casos de leishmaniose por país no ano de 2019...	13
Figura 2: Mapa do Brasil com número de casos de leishmaniose tegumentar por estado no ano de 2019	14
Figura 3: Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i>	15
Figura 4: Principais formas evolutivas do protozoário do gênero <i>Leishmania</i>	17
Figura 5: Figura esquemática do ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> no hospedeiro vertebrado (mamífero) e invertebrado (flebotomíneo)	19
Figura 6: Esquema da representação do espectro clínico e imunológico da LTA.....	20
Figura 7: Figura esquemática da estrutura geral da ADAMs	27
Figura 8: Esquema representativo da estrutura da molécula de GP63	28
Figura 9: Fluxograma do Delineamento Experimental.	33
Figura 10: Atividade proteolítica da metaloprotease GP63 nas espécies <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i> : Análise da atividade proteolítica da GP63 por fluorimetria	39
Figura 11: Atividade da metaloprotease GP63 nas espécies <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	41
Figura 12: Expressão da metaloprotease GP63 nas espécies <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (V.) braziliensis</i>	43
Figura 13: Ensaio de imunofluorescência indireta para marcação da proteína GP63	45
Tabela 1: Aspectos clínicos, histopatológico e imunopatológico da leishmaniose cutânea causada por <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> e <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> no Brasil.....	23
Tabela 2: Conclusão de artigos sobre a GP63 em <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> e <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	30

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADAMs – Sigla inglesa para metaloproteinases desintegrinas
BSA – Soro albumina bovina
DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilindol
DNA – Sigla inglesa para ácido desoxirribonucleico
GP63 – Glicoproteína 63
GPI – Glicosilfosfatidilinositol
GPPS – Glutamina, ácido pirúvico, penicilina e estreptomicina
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL-4 – Interleucina 4
INF- γ – Interferon γ
kDa- Unidade de medida kilodalton
LCAD – Leishmaniose cutânea anérgica difusa
LCBD – Leishmaniose cutânea disseminada borderline
LCL – Leishmaniose cutânea localizada
LMC – Leishmaniose mucocutânea
LMC – Leishmaniose mucosa
LPG – Lipofosfoglicano
LT- Leishmaniose tegumentar
LTA – Leishmaniose tegumentar americana
LV- Leishmaniose visceral
MAC – Complexo de ataque à membrana
mL- Mililitro
mM – Milimolar
MMPs – Metaloproteinases
Ng – Nanograma
NNN – Neal, Novy, Nicolle
NO – Sigla inglesa para óxido nítrico
OMS – Organização mundial da saúde
PBS- Sigla inglesa para tampão fosfato alcalino
pH – Potencial hidrogeniônico
PHEM – PIPES, HEPES, EGTA e Magnésio
PTP – Sigla inglesa para Proteína tirosina fosfatase
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
SBF – Soro bovino fetal
SDS- PAGE – Sigla inglesa para eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
SFM – Sistema fagocítico mononuclear
TCD4+ - Sigla inglesa para linfócito T auxiliar
TGF- β – Sigla inglesa para fator de crescimento transformante beta
TNF – Fator de necrose tumoral
TNF- α – Sigla inglesa para fator de necrose tumoral alfa
UF – Unidade federativa
ug – Micrograma
 μ L. – Microlitro

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença tropical negligenciada de caráter infeccioso causada por protozoários do gênero *Leishmania* sp. No Brasil, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* são as principais espécies patogênicas. As diferentes cepas e espécies, bem como a resposta imunológica do hospedeiro vertebrado, são pontos-chave no desenvolvimento da doença e, conseqüentemente, nas diferentes manifestações clínicas causadas por esses protozoários como a leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC). Parasitos do gênero *Leishmania* possuem aprimorados mecanismos com a capacidade de silenciar a resposta microbicida de macrófagos infectados através da ação de fatores de virulência como a glicoproteína 63 (GP63). Esta glicoproteína, que possui um sítio catalítico zinco-dependente, é a principal metaloprotease de superfície da *Leishmania* e é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro vertebrado ao clivar um conjunto amplo de substratos citosólicos. Contudo, devido à necessidade de compreensão da atuação e envolvimento da GP63 nos processos de infecção e diferentes manifestações clínicas, é importante analisar que de que forma esta molécula está presente durante esses processos. Tendo isso em vista, a pergunta experimental deste estudo é se existe diferença na expressão do fator de virulência GP63 entre duas espécies causadoras de LTA, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* que causam diferentes manifestações clínicas com a hipótese de que existe diferença na expressão deste fator de virulência nas espécies analisadas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a expressão e atividade da GP63 nas espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*, que possuem maior relevância para o acometimento da LTA. A atividade da GP63 foi analisada utilizando formas promastigotas na fase estacionária (7 dias de cultivo) e foram submetidas à análise do perfil proteolítico através da DQ-gelatin (10µg/ml) em fluorímetro (VICTOR Multilabel Plate Reader X) com comprimento de onda de 480-520 nm e por zimografia em gel contendo 0,1% de gelatina como substrato. A expressão da GP63 foi analisada por *Western blot* utilizando anticorpo anti-GP63. A imunomarcagem e quantificação da proteína GP63 foram analisadas por imunofluorescência indireta. Este trabalho mostrou pela primeira vez que a espécie *Leishmania (L.) amazonensis* apresenta maior expressão da glicoproteína 63 kDa em comparação com a espécie *Leishmania (V.) braziliensis*. A maior expressão desta protease também foi acompanhada do aumento da atividade gelatinolítica nas espécies analisadas. Esses resultados permitem sugerir uma correlação no envolvimento desse fator de virulência entre as manifestações clínicas que são causadas por essas duas espécies analisadas neste trabalho.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar americana, GP63, *Leishmania (Leishmania.) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*

ABSTRACT

The american cutaneous leishmaniasis (ATL) is a neglected tropical disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* sp. In Brazil, *Leishmania (L.) amazonensis* and *Leishmania (V.) braziliensis* are the main pathogenic species. The different strains and species, as well as the immune response of the vertebrate host, are key points in the development of the disease and, consequently, in the different clinical manifestations caused by these protozoa such as localized cutaneous leishmaniasis (LCL), diffuse cutaneous leishmaniasis (LCD) and mucocutaneous leishmaniasis (CML). *Leishmania* parasites have improved mechanisms with the ability to silence the microbicidal response of infected macrophages through the action of virulence factors such as glycoprotein 63 (GP63). This glycoprotein, which has a zinc-dependent catalytic site, is the main surface metalloprotease of *Leishmania* and is able to modulate the vertebrate host's immune response by cleaving a wide set of cytosolic substrates. However, due to the need to understand the role and involvement of GP63 in infection processes and different clinical manifestations, it is important to analyze how this molecule is present during these processes. In view of this, the hypothesis of this study is whether there is a difference in the expression of the virulence factor GP63 between two ATL-causing species, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*, which cause different clinical manifestations. Therefore, the objective of this work was to analyze the expression and activity of GP63 in the species *Leishmania (L.) amazonensis* and *Leishmania (V.) braziliensis*, which are more relevant to the involvement of ATL. The activity of GP63 was analyzed using promastigote forms in the stationary phase (7 days of culture) and they were submitted to analysis of the proteolytic profile through DQ-gelatin (10µg / ml) in fluorimeter (VICTOR Multilabel Plate Reader X) with wavelength of 480-520 nm and by zymography gel containing 0.1% gelatin as substrate. The expression of GP63 was analyzed by Western blot using anti-GP63 antibody. The immunostaining and quantification of the GP63 protein were analyzed by indirect immunofluorescence. This work showed for the first time that the species *Leishmania (L.) amazonensis* shows greater expression of the glycoprotein 63 kDa compared to the species *Leishmania (V.) braziliensis*. The greater expression of this protease was also accompanied by an increase in gelatinolytic activity in the analyzed species. These results allow suggesting a correlation in the involvement of this virulence factor between the clinical manifestations that are caused by these two species analyzed in this work.

Key-words: american cutaneous leishmaniasis, GP63, *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses constituem um grupo de doenças de caráter negligenciado e antroponozoonótico. Esse complexo de doenças é causado por espécies de protozoários intracelulares obrigatórios flagelados do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae (Ameen et al., 2010). As leishmanioses podem se apresentar sob diferentes formas clínicas dependendo da espécie do protozoário e da resposta imunológica do indivíduo acometido, podendo abranger uma ampla variedade de sinais, sintomas e diferentes níveis de severidade, das quais três formas principais são: cutânea, mucocutânea e visceral (Grimaldi Jr & Tesh, 1993). As leishmanioses apresentam duas formas clínicas distintas, a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV). A LT é a forma clínica que acomete a pele e as mucosas, apresentando diferentes formas clínicas que vão variar de acordo com as espécies causadoras e a resposta imunológica estabelecida pelo hospedeiro (David & Craft, 2009; De Oliveira et al., 2009). No Brasil, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* são as principais espécies patogênicas causadoras de LT, sendo a primeira espécie responsável por causar a forma mais grave da LT, a leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) e a segunda espécie por causar a leishmaniose mucosa (LMC) (Silveira et al., 2008).

A leishmaniose é considerada como um grave problema de saúde pública. Dos 200 países que reportaram casos novos de leishmaniose para a Organização mundial da Saúde (OMS) em 2018, 98 são considerados como área endêmica para a doença. Dentre os países afetados por esta doença, a maior parte está localizada em zonas tropicais do globo, como nas regiões da África, Ásia, e América Latina, além dos países da Europa mediterrânea. A doença é relacionada à fatores socioeconômicos. Dados recentes demonstram que a leishmaniose está relacionada com má nutrição, deslocamento populacional, baixa imunidade, moradia precária e falta de recursos (Savoia et al., 2015; Bates et al., 2015; WHO, 2018).

Status de endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2019

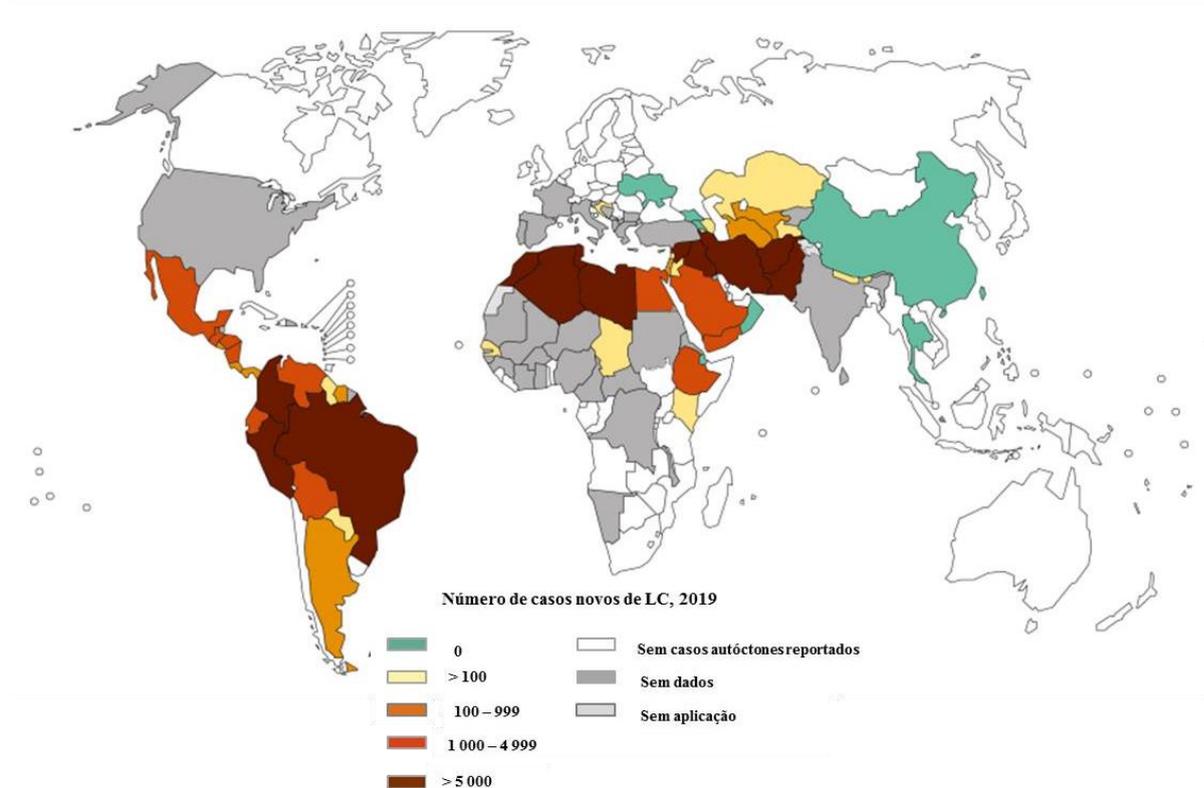


Figura 1: Mapa do mundo com número de casos de leishmaniose por país no ano de 2019. FONTE: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019 (modificada).

Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas que são consideradas endêmicas, o que caracteriza um grande fator de risco. Estima-se que, anualmente, sejam reportados mais de 1 milhão de casos novos de leishmaniose cutânea em todo o mundo (WHO, 2019)

De acordo com dados epidemiológicos foram registrados 15.484 novos casos no ano de 2019 no Brasil, com destaque para as regiões Norte, com 6.620 novos casos, e a região Nordeste, com 3.070 novos casos registrados de LC (Brasil, 2019). O Brasil está entre os países com maior incidência da doença e a maioria dos casos notificados está presente na região Amazônica, o que confirma o caráter endêmico nacional da parasitose (Pires et al., 2015).

Casos de leishmaniose tegumentar por UF de infecção. Brasil, 2019

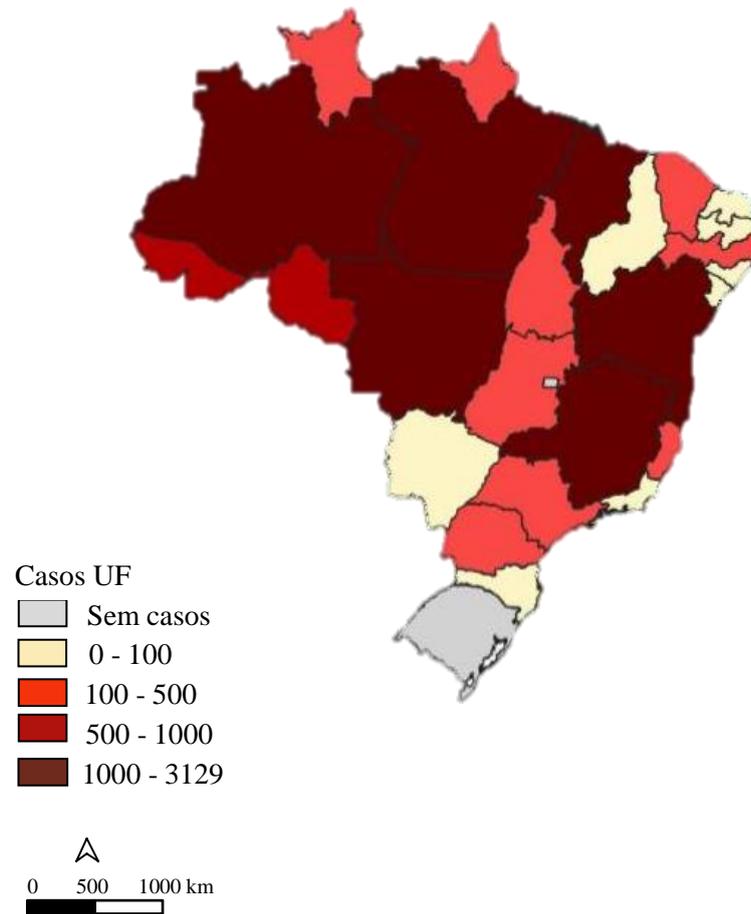


Figura 2: Mapa do Brasil com número de casos de leishmaniose tegumentar por estado no ano de 2019. O gráfico mostra representação por cores do número de casos de leishmaniose nos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal. Dentre as regiões com maior número de casos, destacam-se, as regiões Norte e Nordeste. FONTE: Sinan/SVS/Ms (modificada).

1.2. TAXONOMIA DO GÊNERO *LEISHMANIA*

Os parasitos do gênero *Leishmania* pertencem à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida, e desde sua descoberta muitas classificações foram criadas para dividir o gênero de acordo com suas características intrínsecas e extrínsecas (Grimaldi jr & Tesh, 1993).

Existe uma variedade de espécies de *Leishmania* distribuídas pelo mundo e cada uma delas apresenta características relacionadas às manifestações clínicas, vetores, reservatórios, padrões epidemiológicos e distribuição geográfica (Vale & Furtado, 2005; Brasil, 2007).

Segundo Lainson e Shaw (1987), os protozoários podem ser subdivididos em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. No Brasil foram identificadas sete espécies causadoras da leishmaniose cutânea (LC), sendo que seis espécies pertencem ao subgênero *Viannia*: *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *L.* (*Viannia*) *guyanensis*, *L.* (*Viannia*) *naiffi*, *L.* (*Viannia*) *lindenbergi*, *L.* (*Viannia*) *shawi* e *L.* (*Viannia*) *lainsoni*; Uma pertence ao subgênero *Leishmania*: *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, (Brasil, 2010; Lainson, 2010).

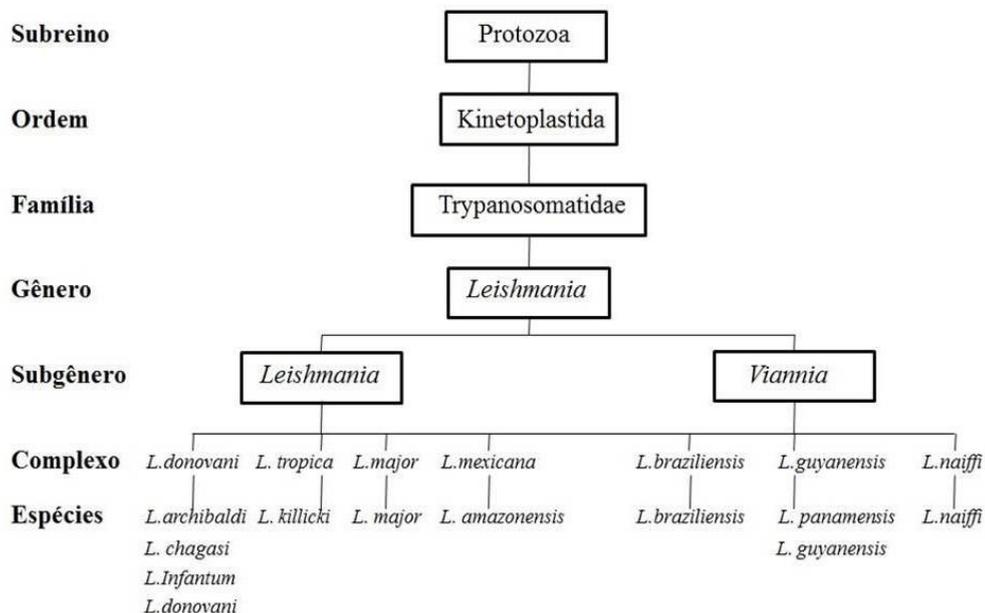


Figura 3: Taxonomia do gênero *Leishmania*. Fonte: BAÑUS et al., 2007 (modificada).

1.3. O PARASITO

1.3.1. Morfologia

O protozoário do gênero *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear (SFM) e apresenta-se sob duas formas evolutivas principais: amastigota (Fig. 4A e C4) e promastigota (Fig. 4B e D) (Vannier-Santos et al., 2002.)

As formas promastigostas apresentam um corpo celular fusiforme e alongado com flagelo externalizado na porção anterior do parasito, o que confere a esse protozoário grande mobilidade. Essas formas evolutivas são encontradas no trato digestivo do hospedeiro invertebrado (Michalick & Ribeiro, 2011).

As amastigotas são as formas intracelulares obrigatórias e possuem um corpo arredondado, pequeno, além de não apresentarem mobilidade. Essas formas evolutivas possuem um flagelo internalizado, que pode ser encontrado no interior da bolsa flagelar o parasito. Além do flagelo, outras organelas estão presentes no corpo do protozoário como aparelho de Golgi, núcleo grande, retículo endoplasmático, vacúolos, ribossomos, inclusões lipídicas, entre outros (Michalick & Ribeiro, 2011). São formas encontradas, principalmente, no interior de vacúolos das células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), como macrófagos e neutrófilos. No interior dessas células são capazes de desenvolver mecanismos como fatores de virulência capazes de evadir da resposta imunológica do indivíduo infectado, promovendo a sobrevivência do parasito e o estabelecimento da doença (Thi *et al.*, 2012).

As duas formas evolutivas apresentam o flagelo emergindo da bolsa flagelar, localizada na porção anterior do protozoário. Possuem também uma única mitocôndria que se estende ao longo de todo o corpo celular, além de apresentarem uma organela especializada denominada cinetoplasto, que apresenta DNA mitocondrial altamente condensado e está sempre situado próximo ao corpúsculo basal e, conseqüentemente, ao flagelo (Teixeira et al., 2013; Souza et al., 1997)

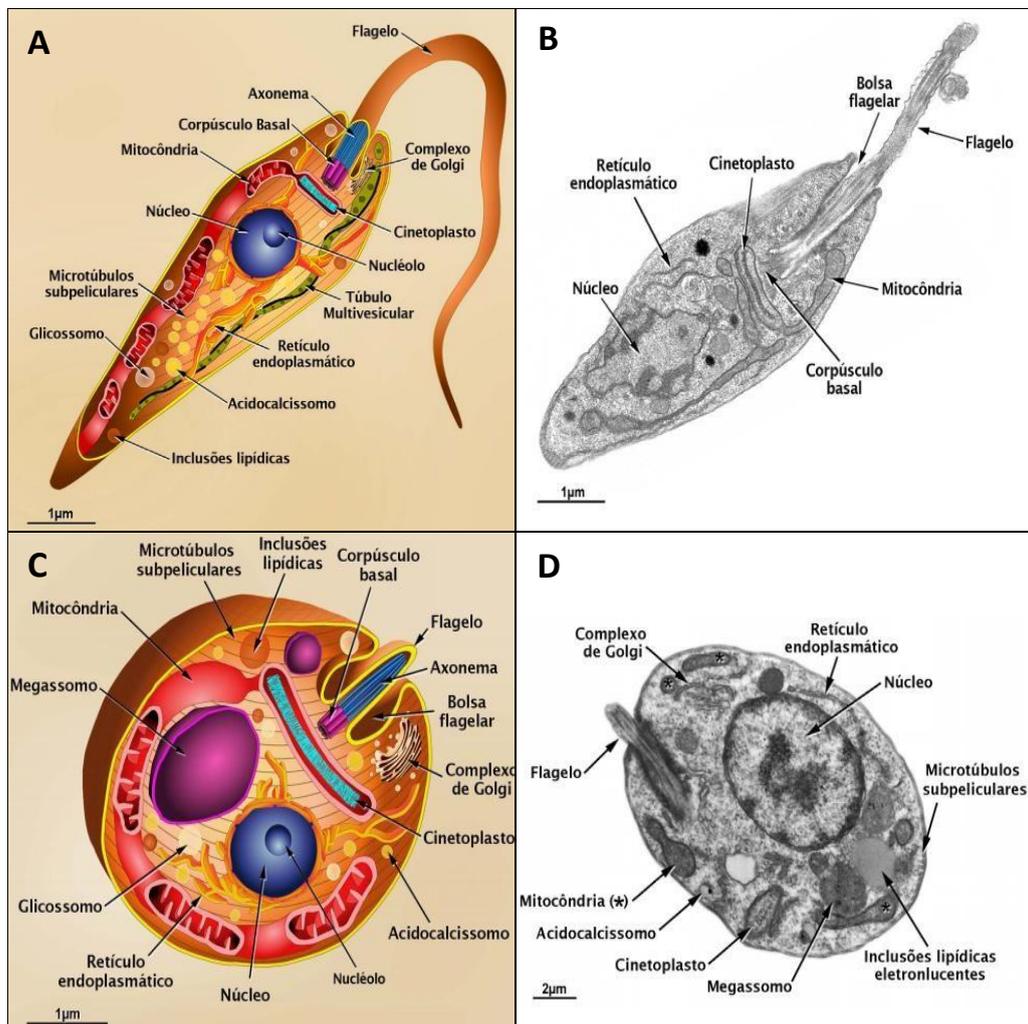


Figura 4: Principais formas evolutivas do protozoário do gênero *Leishmania*. Desenho esquemático e micrografia das formas promastigota (A e B, respectivamente) e amastigota (C e D, respectivamente). Fonte: TEIXEIRA et al., 2013 (com modificações).

1.3.2. Ciclo biológico

O protozoário *Leishmania* possui ciclo biológico heteroxênico, apresentando um hospedeiro invertebrado, que são denominados mosquitos-palha, pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, e um vertebrado, que pode incluir uma variedade de mamíferos, inclusive o homem (Brasil, 2010; da Silva-Junior et al., 2014).

O ciclo de vida desse parasito inicia-se quando o flebotomíneo fêmea, ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ingere as formas amastigotas do protozoário que podem ser encontradas no interior de macrófagos ou livres na circulação sanguínea. Após a ingestão do sangue contendo os parasitos vivos, estes vão para o intestino médio do vetor, onde as formas amastigotas vão se transformar em promastigotas procíclicas. Em média, após cinco dias no intestino do inseto, estas promastigotas procíclicas, sofrem um processo de diferenciação celular denominado metaciclogênese, se diferenciando em promastigotas metacíclicas, as quais são infectantes para o hospedeiro vertebrado devido às várias alterações nos constituintes da sua membrana, gerando um glicocálice rico em várias moléculas como o lipofosfoglicano (LPG), que é a molécula mais abundante na superfície das promastigotas. (Grimaldi & Tesh, 1993; Bates, 2006).

O lipofosfoglicano (LPG) além de desempenhar um papel importante no momento da adesão do parasito ao intestino do vetor, também atua como um dos principais fatores de virulência durante o processo de interação parasito e célula hospedeira. (Kaye & Scott, 2011). Durante o repasto sanguíneo, as formas promastigota metacíclicas são inoculadas na pele juntamente com a saliva do vetor. A saliva é necessária para o processo de infecção, pois auxilia na modulação da resposta imunológica local bem como a localização dos vasos sanguíneos e a vasodilatação (Ramalho-Ortigão et al., 2010). As promastigotas metacíclicas são reconhecidas por células do sistema imune, fagocitadas e transferidas, para o meio intracelular, formando o vacúolo parasitóforo. Neste vacúolo, devido às alterações do pH e temperatura, essas formas do parasito sofrerão modificações morfológicas adquirindo a forma amastigota (Serenó et al., 2007).

As amastigotas, no interior da célula hospedeira, possuem mecanismos capazes de burlar a resposta microbicida gerada pelo hospedeiro, bem como modular a resposta imunológica inata e sinalização celular por meio de fatores de virulência como o Lipofosfoglicano e a Glicoproteína 63, que possui capacidade de interferir na cascata de ativação do sistema complemento (Cabezas et al., 2015; Isnard et al., 2012; Kaye & Scott, 2011; Walker et al. 2014;). Essa forma passa, então a ser capaz de se multiplicar no interior das células fagocíticas até a ruptura, passando a infectar novos macrófagos e outras células do sistema imune, além de também infectar novos vetores quando presentes no mesmo habitat do hospedeiro infectado (Bailey & Lockwood, 2007). Quando as formas amastigotas são ingeridas pelo vetor, elas passam novamente para as formas promastigotas que são capazes de aderir ao epitélio através de moléculas específicas, como o LPG. Após a adesão dessas formas no epitélio, o parasita passa a se multiplicar e, em seguida, migram para a região torácica do

intestino, onde sofrerão o processo de metaciclogênese, tornando-se formas altamente infectantes, iniciando o ciclo quando ocorre um novo repasto sanguíneo (Ramalho-Ortigão et al., 2010).

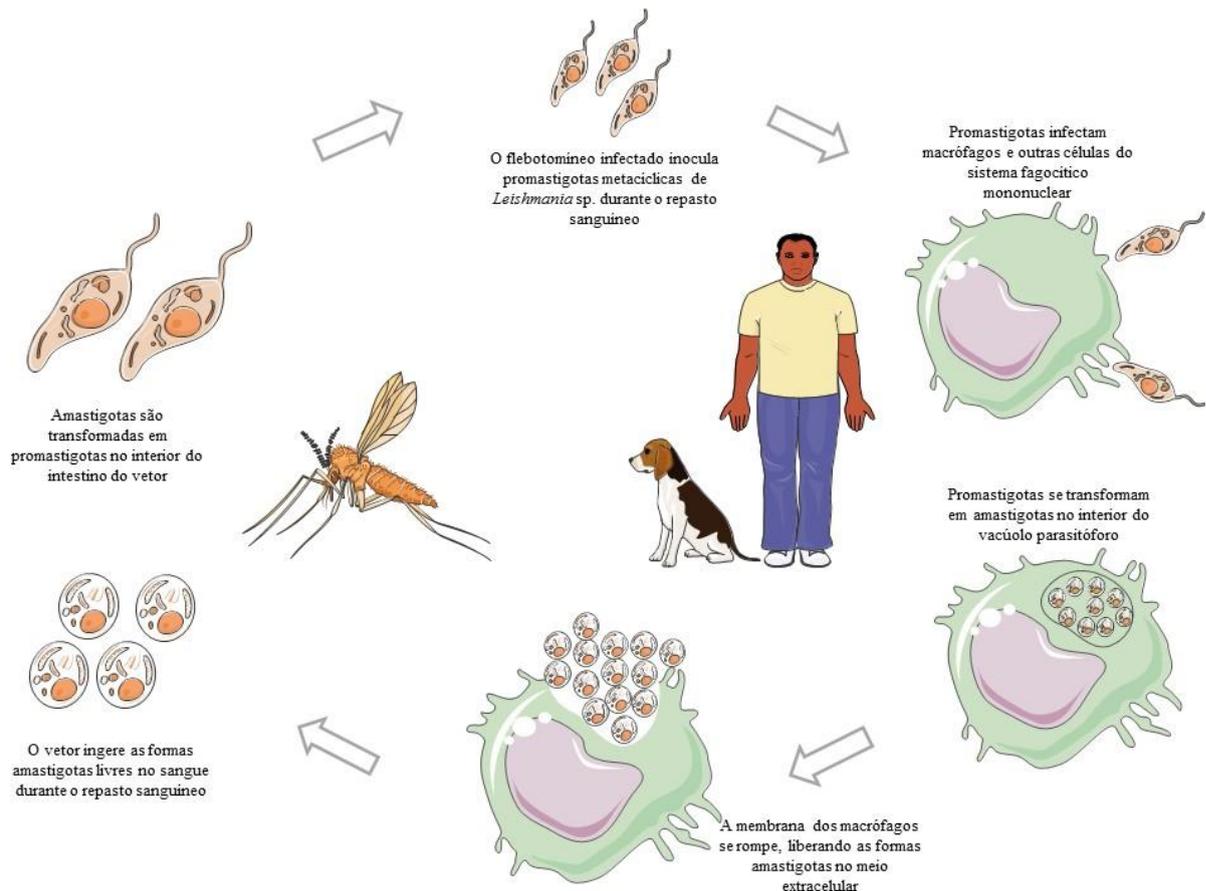


Figura 5: Figura esquemática do ciclo de vida do parasito *Leishmania* no hospedeiro vertebrado (mamífero) e invertebrado (flebotomíneo). FONTE: Adaptado de TEIXEIRA et al., 2013.

1.4. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, crônica, não contagiosa e uma zoonose de animais silvestres. O homem é caracterizado como hospedeiro acidental quando as fêmeas do vetor flebotomíneo realizam o repasto sanguíneo. A infecção se dá quando o vetor transmite formas promastigotas ao hospedeiro vertebrado,

1.4.1. Leishmanioses causadas por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

O parasito da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* apresenta como suas principais manifestações clínicas a leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB) e leishmaniose anérgica difusa (LCAD). Esta espécie possui ocorrência em vários países da América Central e América do Sul, com destaque para a região amazônica (OPAS/OMS, 2019).

A LCL pode ser causada por várias espécies de ambos os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. É caracterizada por ser a forma mais comum da doença e as lesões podem ocorrer em qualquer parte do corpo, mas surgem principalmente no local de inoculação do parasito através vetor. As lesões apresentam-se com bordas elevadas, redondas, com um denso infiltrado de macrófagos vacuolizados com uma grande quantidade de formas amastigotas em seu interior. Em alguns casos pode haver formação de uma mácula, seguida por uma pápula, que se ulcerada pode se expandir (Silveira et al., 2004; Pires et al., 2012; Brasil, 2017). As lesões podem se desenvolver durante semanas, meses ou mesmo anos após a infecção. A resposta imunológica desencadeada por este parasito é predominantemente mediada por linfócitos TCD4+, com perfil de citocinas do tipo Th1, onde atuam o interferon gama (INF- γ) e a interleucina 12 (IL-12) como citocinas pró-inflamatórias e a IL-4 e IL-10 como citocinas moduladoras da resposta inflamatória (Silveira et al., 2004).

A LCDB é considerada uma forma rara da doença, representando apenas 2% dos casos de leishmaniose. É caracterizada pela presença de inúmeras lesões que podem ser do tipo nodular ou ulcerada, sendo distribuídas por extensas áreas do corpo, podendo ter de vinte a mais de cem lesões cutâneas sem que haja o envolvimento das mucosas. Na LCDB causada pela espécie *Leishmania (L.) amazonensis* apresenta-se um equilíbrio entre as respostas do tipo Th1 e Th2 (Teixeira, et al., 2013; Silveira et al., 2009)

No Brasil, a única espécie capaz de causar a LCAD é a *Leishmania (L.) amazonensis*, que é considerada uma das formas mais graves da LTA. Essa forma da doença é caracterizada por uma imunossupressão celular específica, produzindo lesões fechadas, tais como pápulas, nódulos e tubérculos que raramente sofrem ulcerações. A espécie *Leishmania (L.) amazonensis* é conhecida pela sua capacidade de promover o silenciamento da resposta imunológica do hospedeiro vertebrado, subvertendo a maquinaria celular e modulando o microambiente a seu favor. O parasito age interferindo nas vias de sinalização intracelular da

célula hospedeira para evitar uma resposta imune efetiva (Olivier et al., 2005; Mukbel et al., 2007). Na LCAD, as lesões apresentam-se de forma disseminada com uma grande quantidade de formas amastigotas presentes nos nódulos, o que sugere uma falha específica nos mecanismos de proteção das células CD4, inativando a resposta imune do tipo Th1, responsável por controlar a infecção. Esse mecanismo resulta na ativação de um padrão de resposta imunológica do tipo Th2, onde ocorre um grande estímulo para a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , resultando em uma fraca resposta imunológica (Silveira, 2019) (Tabela1).

1.4.2. Leishmanioses causadas por *Leishmania (V.) braziliensis*

Infecções causadas por parasitos da espécie *Leishmania (V.) braziliensis* possuem uma vasta ocorrência em quase todos os países da América do Sul e da América Central, sendo mais predominante em regiões tropicais. Esta espécie é considerada o maior agente etiológico causador da LTA na América Latina devido à sua ampla distribuição (Silveira; 2019). A transmissão da doença se dá durante todo o ano porém com algumas flutuações sazonais e está relacionada, principalmente, às atividades na selva (WHO, 2010).

A espécie *L. (V.) braziliensis* é uma das espécies responsáveis por causar a forma mais branda da doença, a leishmaniose cutânea localizada (LCL). Nesta forma da doença, apresenta-se, predominantemente, uma resposta imune mediada por linfócitos TCD4+, com perfil de citocinas do tipo Th1. No entanto, a expressão do INF- γ por macrófagos infectados é muito elevada e a de citocinas anti-inflamatórias permanece em baixas concentrações, o que contribui para uma exacerbada resposta imune celular (Coutinho, *et al.*, 1996; Silveira *et al.*, 2004).

A LMC é uma doença degenerativa que afeta predominantemente a nasofaringe, podendo apresentar lesões ulceradas e infiltradas na mucosa oral, nasal, faríngea e laríngea (Nogueira et al., 2008; Sakthianandeswaren *et al.*, 2009). É mais comum nas áreas de transmissão por *Leishmania (V.) braziliensis* e geralmente desenvolve-se a partir de uma complicação da LCL, na qual os protozoários parasitam o trato mucoso. Caracteriza-se como uma condição clínica tardia de infecções mais brandas causadas por essa espécie. Os sintomas geralmente são evidenciados meses e até anos após uma espontânea remissão ou tratamento inadequado específico para lesões cutâneas. A doença desenvolve-se através de mecanismos fisiopatogênicos, que são responsáveis pela capacidade de migração dos macrófagos

infectados de uma lesão cutânea para o tecido mucoso, ocorre normalmente por meio da via linfohematogênica (Silveira, 2019) A infecção está relacionada a uma exacerbada resposta imune celular, apresentando-se como uma resposta imune mais intensa quando comparada à outras espécies do mesmo subgênero (Silveira et al., 2004). Além disso, o processo inflamatório é marcado por uma forte resposta imunológica TCD4+ do tipo Th1, com elevada produção de TNF- α , e IFN- γ (Tabela 1).

Spectro de doenças				
Formas clínicas	LCAD	LCBD	LCL	LM
Parasito	<i>L. (L.) a.</i>	<i>L. (L.) a.</i>	<i>L. (L.) a. /L. (V.) b.</i>	<i>L. (V.) b.</i>
Carga parasitária	++++	+++	+++ / ++	+
Tipo de lesão	Nódulo	Placa infiltrada	Ulcerado/Ulcerado	Ulcerado
Macrófagos	++++	+++	+++ / ++	++
Distribuição da lesão	Difusa	Disseminada	Única/Múltipla	Nasofaringe
Necrose	-	-	- / ++	++++
Granuloma	Macrofágico	Macrofágico	Macrofágico/epitelial	Tuberculóide
IFN-γ	+	++	++ / +++	++++
IL-4	++++	+++	++ / +	-
Cd4 Th1/Th2	Th1 < Th2	Th1 \geq Th2	Th1 > Th2	Th1 > Th2

LCAD = Leishmaniose cutânea anérgica difusa, LCBD = leishmaniose cutânea borderline disseminada, LCL = leishmaniose cutânea localizada, LM = leishmaniose mucosa, *L. (L.) a.* = *Leishmania Leishmania amazonensis*, *L. (V.) b.* = *Leishmania Viannia braziliensis*, IFN- γ = interferon gama, IL-4 = interleucina 4, Th1 = tipo de repostas imune Th1, Th2 = tipo de resposta imune Th2

Tabela 1: Aspectos clínicos, histopatológico e imunopatológico da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* no Brasil. FONTE: Silveira et al., 2019 (Modificada)

1.5. INTERAÇÃO PARASITO - CÉLULA HOSPEDEIRA

Os processos que ocorrem durante a interação entre o parasito *Leishmania* e a célula hospedeira são determinantes para o ciclo evolutivo do protozoário e para o curso de estabelecimento da infecção. Essa interação está envolvida em uma complexa associação entre os fatores de virulência do parasito e os mecanismos de defesa do sistema imune inato do hospedeiro vertebrado (WHO, 2010).

Inicialmente, o processo de interação ocorre pela adesão à superfície da membrana da célula hospedeira, com o objetivo de penetrar o meio intracelular através do processo denominado fagocitose, que é mediado por reconhecimento de receptores presentes na membrana dos macrófagos. O reconhecimento ocorre, predominantemente, via receptores de ativação do sistema complemento CR1 e CR3 (Ambrosio; de Messias-Reason, 2005; Brasil, 2017). Receptores de manose e da proteína C reativa também podem ser utilizados para favorecer a internalização dos parasitos. Outros receptores específicos para o fosfolípido fosfatidilserina, que estão presentes na superfície celular de macrófagos, também possuem grande importância para que ocorra o reconhecimento dos protozoários do gênero *Leishmania* (Van Zandbergen et al., 2006). A exposição da fosfatidilserina possui forte relação com a internalização e infectividade do parasito por atuar como uma molécula ligante para macrófagos (Farias et al., 2013).

Após a internalização do parasito, as formas amastigotas encontram-se presentes em um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma). Esta organela deriva da fusão entre fagossomas e lisossomas, que possuem enzimas com atividade microbicida, visando à eliminação do parasito (Brasil, 2017). No interior do fagolisossoma ocorrem a secreção de enzimas hidrolíticas e outras moléculas destrutivas que são, normalmente, secretadas no fagolisossoma e que o parasito *Leishmania* possui a capacidade de inibir. As peroxidoxinas e superóxido dismutase degradam derivados de nitrito e radicais intermediários reativos de oxigênio, que são as moléculas microbidas mais importantes (Holzemuller et al., 2005). Alguns estudos já demonstraram a capacidade de algumas espécies de *Leishmania* de resistir à ação do *burst oxidativo* do macrófago, aparentemente silenciando mecanismos de síntese de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (Holzemuller et al., 2005; Souza et al., 2010).

Protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios para macrófagos. Apesar disso, as primeiras células a interagirem com os parasitos após a inoculação pelo vetor são os neutrófilos e células dendríticas. Entretanto, essas células não

representam ambientes propícios para a replicação e sobrevivência do parasito em longo prazo (Van Zandbergen et al., 2004). Alguns estudos relatam que esses parasitos também possuem afinidade por outras populações celulares como fibroblastos (Bogdan et al., 2000; Kaye; scott, 2011). Devido à sua diversidade adaptativa a diferentes tipos celulares, sugere-se que o parasito possui vários mecanismos de escape e fatores de virulência que estão relacionados ao seu desenvolvimento evolutivo e adaptativo. Tais mecanismos possuem como objetivo promover a sobrevivência do parasito, ao passo que, tem a capacidade de subverter o potencial microbicida das células do sistema imune dos hospedeiros vertebrados.

Dentre os principais fatores de virulência está o LPG, que é uma proteína de superfície disposta sob todo o corpo celular e flagelar do parasito (Cabezas et al., 2015). É a macromolécula mais abundante na membrana dos parasitos e forma uma camada espessa de glicocálix conferindo ao parasito proteção contra a fixação do sistema complemento. Uma das principais funções do LPG é a inibição inicial da fusão fagolisossomal durante o processo de internalização do parasito na célula hospedeira. Além disso, essa molécula possui um importante papel na adesão do parasito à superfície das células epiteliais do intestino do hospedeiro invertebrado (Turco *et al.*, 1992; Gueirard et al., 2008; Barreto-bergter; Vermelho, 2010; Cabezas et al., 2015)

Outra molécula envolvida no processo de sobrevivência do parasito é a GP63, uma metaloprotease que atua protegendo o parasito da ação lítica do sistema complemento, por inibir a formação do complexo de ataque a membrana pela clivagem da cascata das convertases (Lina et al., 2011). Algumas espécies de *Leishmania* utilizam a GP63 para converter o C3b ativo em C3bi inativo, favorecendo a opsonização por moléculas inativas do sistema complemento, então sua internalização na célula hospedeira ocorre via receptor CR3 e não CR1, dessa forma, sua fagocitose não acionará mecanismos do *burst oxidativo* (Castro-neto, 2019)

1.6. METALOPROTEASES

As Metaloproteases (MMPs) são enzimas que possuem um metal no seu sítio catalítico. Dentro deste grande grupo de proteases, temos as Zincinas, proteases que dependentes do Zinco (Zn^{2+}), Na família das Zincinas temos enzimas especializadas em degradar componentes da matriz extracelular e que possui na sua estrutura um aminoácido Metionina em coordenação com átomo de zinco e por isso são também denominadas de matrixinas ou Metzincinas. Os íons são metais importante para manter a estabilidade e

expressão da atividade enzimática das metaloprotease. No sítio ativo dessas moléculas estão presentes o zinco (Zn^{2+}) e 2-3 íons de cálcio (Ca^{2+}). A expressão das metaloproteases é regulada por fatores de crescimento, hormônios, citocinas e transformação celular (Nagase et al, 1999). As MMPs fazem parte de uma família com mais de 20 enzimas e são caracterizadas pela sua capacidade de degradação da Matriz Extracelular, que pode ser definida como a parte não-celular dos tecidos e consiste em uma rede de suporte estrutural que possui uma variedade de proteínas, açúcares e outros componentes (Kular *et. al.*, 2014).

Dentro desta família de proteases temos as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs), e as metaloproteinases desintegrinas (ADAMs). As ADAMs são proteínas transmembrana que contém dois domínios principais: uma desintegrina e um sítio catalítico dependente de metal, no caso o zinco (Zn^{2+}) como a glicoproteína 63 (GP63) que está presente na membrana de parasitos do gênero *Leishmania* (Chang and Werb, 2001).

Tipicamente, as MMPs são estruturalmente compostas por um peptídeo sinal, um pró-peptídeo composto por um aminoácido de cisteína, um sítio catalítico zinco-dependente (Zn^{2+}) que faz uma ligação sulfidrilica com o pró-peptídeo, essa ligação é essencial para a regulação da atividade da enzima. Além disso, o grupo -SH da ligação sulfidrilica entre o pró-domínio e o sítio catalítico sinaliza a forma inativa da metaloprotease em forma de zimogênio, sendo responsável pela manutenção da enzima no estado latente. Este é chamado “*cysteine switch*”, pois quando este resíduo é deslocado do sítio ativo acontece a ativação da enzima. A metaloprotease tem ainda uma região de ligação “*hinge*” e um domínio hemopexina. A quebra da ligação sulfidrilica ocorre, principalmente, pela ação de outras enzimas pela produção de estresse oxidativo. As ADAMs fazem parte da família das metaloproteinases, ou seja, possuem a mesma estrutura com adição de um domínio desintegrina (Nagase et al., 1999; Giebler and Zigrino. 2016)

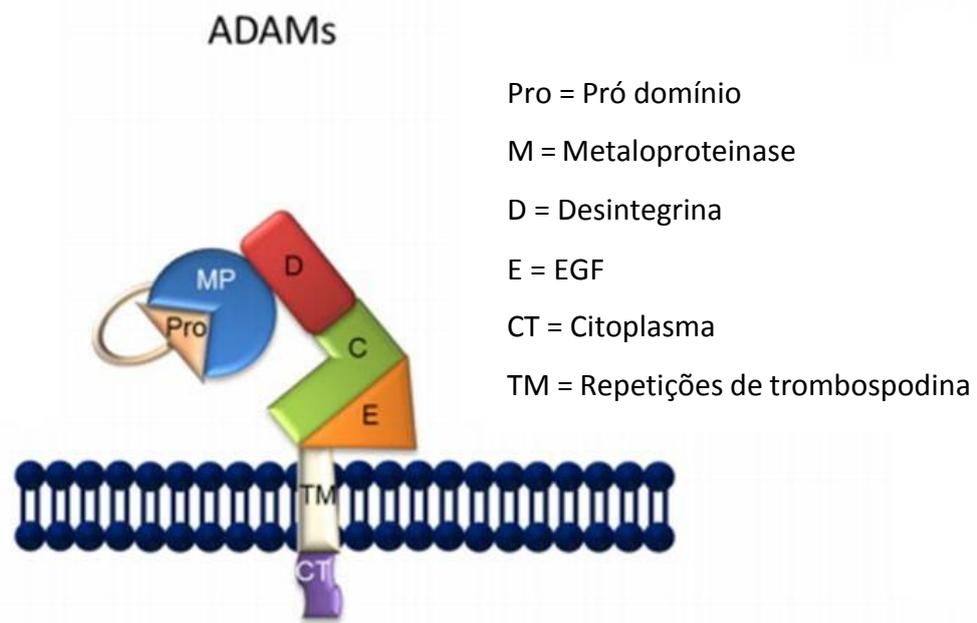


Figura 7: Figura esquemática da estrutura geral da ADAMs. Na figura é possível observar a estrutura das ADAMs representadas pelas moléculas do pró-peptídeo (Pro), metaloproteinase (M), desintegrina (D), EGF (E), citoplasma (CT) e repetições de trombospodina (TM) (Adaptado de GIEBELER and ZIGRINO, 2016).

1.7. GLICOPROTEÍNA 63 (GP63)

A protease GP63 (63 kDa), também conhecida como Leishmanolisina, foi descoberta em 1980 como o principal antígeno de superfície de promastigotas de várias espécies de *Leishmania*, representando mais de 1% da proteína total do parasito (Bordier, 1987 e Silva-López, 2010). Essa molécula é definida como um importante fator de virulência de parasitos do gênero *Leishmania* (Castro Neto, 2019).

Estruturalmente é caracterizada por um sítio catalítico zinco-dependente composto por *motif* HEXXH. Constitui uma proteína dividida em três regiões, sendo elas: amino terminal (N-terminal), domínio central, carboxi-terminal (C-terminal).

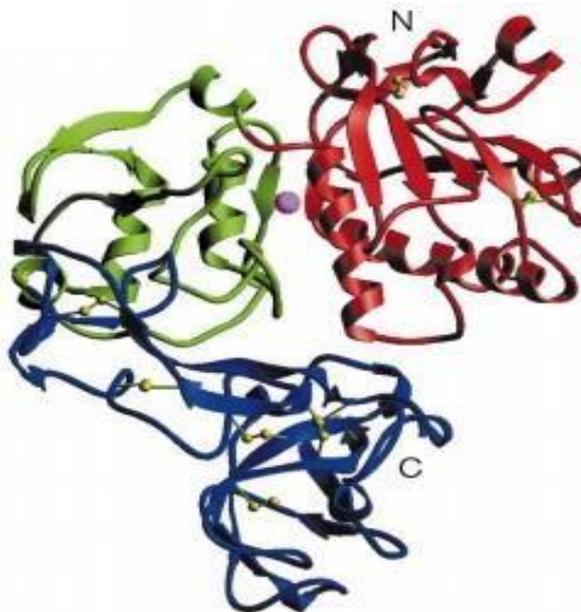


Figura 8: Esquema representativo da estrutura da molécula de GP63. Na figura é possível observar as porções estruturais representadas pela porção N-terminal (vermelho), domínio central(verde) e porção C-terminal (azul). As ligações de pontes dissulfeto estão representadas pela cor amarelo e a esfera rosa representa a molécula de zinco no sítio catalítico da molécula (SCHLAGENHAUF, 1998)

A GP63 é uma molécula abundantemente expressa na superfície da membrana do parasito e pode estar fixada através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), em alguns casos, se apresenta na forma secretada (Schlagenhauf, 1998 e Calixto, 2014). Silverman *et. al.*, (2012) demonstraram que as promastigotas liberam exossomas contendo centenas de proteínas, incluindo GP63, e sugerem que que essas nanovesículas contribuem para a patogênese do parasito por mediar o envio de moléculas da *Leishmania* para a célula hospedeira.

Os genes de GP63 apresentam um alto grau de conservação entre a maioria das espécies de *Leishmania*, já que eles codificam alguns fatores de virulência semelhantes. De acordo com a literatura as espécies *L. donovani* e *L. major* compartilham cerca de 80% da identidade da sequência do gene de GP63, entretanto, essas mesmas espécies são responsáveis por causar formas clínicas da doença muito distintas entre elas. Determinadas alterações na expressão da GP63 podem gerar um distinto e complexo perfil proteolítico de acordo com a espécie de *Leishmania* (Webb, 1991 e Lima, 2009).

De acordo com o que está descrito na literatura, a GP63 possui a capacidade de clivar uma opsonina do sistema complemento, convertendo a C3b (forma ativa) em C3bi (forma inativa), essa inativação possui a capacidade de prevenir a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), promovendo o silenciamento da ação do sistema complemento, favorecendo a fagocitose. O reconhecimento do parasito irá ocorrer via receptor de complemento 3 (CR3), e assim o protozoário poderá invadir os macrófagos de maneira silenciosa, favorecendo o processo de infecção e sobrevivência em parasitos da espécie *Leishmania (V.) braziliensis* (Castro Neto, 2019 e Walker et al., 2014). Além disso, essa molécula atua facilitando a entrada do parasito na célula hospedeira através de receptores de fibronectina, clivando proteínas da matriz extracelular do macrófago. Uma vez internalizado pelo parasito, em *Leishmania major*, a GP63 tem a capacidade de reduzir a produção de fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 12 (IL-12) e óxido nítrico (NO), que são responsáveis por contribuir para a proteção e sobrevivência do parasito (Olivier, 2012; Gupta, 2013 e Podinovskaia, 2015)

Outras evidências apontam que, na espécie *Leishmania donovani*, a GP63 é capaz de clivar o fator de transcrição AP-1, responsável por regular a produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico pela célula hospedeira (Contreras, 2010). Igualmente, em *L. major* essa molécula também é capaz de clivar um conjunto de moléculas da célula hospedeira que inclui componentes de cascatas de sinalização, fatores de transcrição e reguladores da fusão da membrana, provocando um silenciamento da resposta imune do hospedeiro (Arango-Duque, 2019 e Isnard, 2012). Estudos mostram a importância da GP63 durante processos de interação parasito-hospedeiro onde a regulação negativa de GP63 possui a capacidade de reduzir a infecção em macrófagos murinos, bem como fazer com que cepas de *L. (L.) amazonensis* fiquem mais susceptíveis à atuação do sistema complemento (Thiakaki, 2006; Cuervo et al., 2006; Cuervo et al., 2008; Kulkarni et al., 2008; Kulkarni et al., 2009; Gregory et al., 2008; Barbosa et al., 2018; Castro-Neto et al., 2019) (Tabela 2).

<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i>
<p>Thiakaki, 2006</p> <p>A diminuição da expressão de GP63 está relacionada com a lise extracelular e diminuição da capacidade de infecção de <i>Leishmania</i> sp.</p>	<p>Cuervo, 2006</p> <p>Distintos perfis de MMPs foram observados nas cepas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>. As diferenças podem ter relação com localização geográfica de incidência de cada espécie.</p>
<p>Kulkarni, 2008</p> <p>As duas principais formas evolutivas de <i>Leishmania</i> são capazes de ligar-se e degradar proteoliticamente a Fibronectina, que pode influenciar a ativação de macrófagos infectados.</p>	<p>Cuervo, 2008</p> <p>O padrão da atividade proteolítica do parasito é uma característica estável fenotípica</p>
<p>Kulkarni, 2009</p> <p>A proteína 61-kDa TcGP63 homóloga à GP63 de <i>Leishmania</i> é uma proteína transmembrana que auxilia na mediação da resistência ao sistema complemento, em conjunto com outros fatores.</p>	<p>Gregory, 2008</p> <p>Infecção por <i>Leishmania</i> produz uma forma modificada de NF-κB, que está envolvida na indução de citocinas; o patógeno possui a capacidade de subverter as vias regulatórias dos MØs na atividade de NF-κB</p>
<p>Barbosa, 2018</p> <p>A presença de Vesículas extracelulares contendo moléculas de LPG e GP63 pode contribuir para o estabelecimento da infecção e imunomodulação da resposta imune do hospedeiro. Estes achados sugerem uma relação direta das vesículas extracelulares com a sobrevivência do parasito e progressão da doença.</p>	<p>Castro-Neto, 2019</p> <p>Análise in-silico que permitiu observar um aumento na expansão de genes da GP63 no cromossoma 10 de parasitos <i>Leishmania</i>. Esse aumento pode estar relacionado à patogênese ou mecanismos de defesa direcionados ao hospedeiro vertebrado.</p>

Tabela 2: Conclusão de artigos sobre a GP63 em *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*.

Devido ao seu perfil proteolítico, a GP63 consegue degradar alguns componentes da matriz extracelular como fibronectina e colágeno. Formas promastigotas metacíclicas adquirem a capacidade de migrar através da matriz extracelular, saindo do sítio de inoculação e penetrando o tecido tegumentar. Essa característica favorece a disseminação do parasito para outros sítios distantes com o objetivo de estabelecer infecção (McGuire et al., 2003; Isnard et al., 2012). As metaloproteases são moléculas cruciais na compreensão da resposta imunológica do hospedeiro em uma infecção, na patogenicidade do parasito, progressão e cura da doença (Murase, 2018).

De acordo com o exposto, a GP63 é caracterizada como uma importante molécula durante os mecanismos envolvidos no processo de interação parasito-hospedeiro, sendo classificada como um dos mais importantes fatores de virulência do parasito *Leishmania*. Além disso, há uma grande variedade de atuação da GP63 dependendo da espécie analisada, podendo provocar diferentes perfis imunológicos e apresentar diversas manifestações clínicas no indivíduo acometido pela doença. Tendo isso em vista, é cada vez mais necessária a compreensão das formas de atuação da GP63 em cada espécie de parasitos do gênero *Leishmania*.

Na literatura ainda não existem estudos analisando a molécula de GP63 relacionando a mesma entre as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, que possuem a capacidade de provocar manifestações clínicas distintas da doença. Dessa forma, a hipótese deste estudo é se existe diferença na expressão do fator de virulência GP63 entre duas espécies causadoras de LTA que causam diferentes manifestações clínicas. Portanto, o objetivo do estudo é analisar de forma comparativa a expressão e atividade da GP63 em formas promastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar análise comparativa da expressão e atividade da metaloprotease GP63 nas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a atividade proteolítica da glicoproteína 63 das formas promastigotas nas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*
- Avaliar a expressão da glicoproteína 63 nas formas promastigotas nas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*
- Quantificar, através de imunofluorescência, a presença da metaloprotease GP63 nas formas promastigotas em espécies de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*

3. MATERIAL E MÉTODOS

Com a finalidade de facilitar o entendimento do presente trabalho, foi realizado um fluxograma do delineamento experimental geral, representado na figura 9, onde será analisada a molécula GP63 nas formas promastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* utilizando diferentes técnicas e marcações.

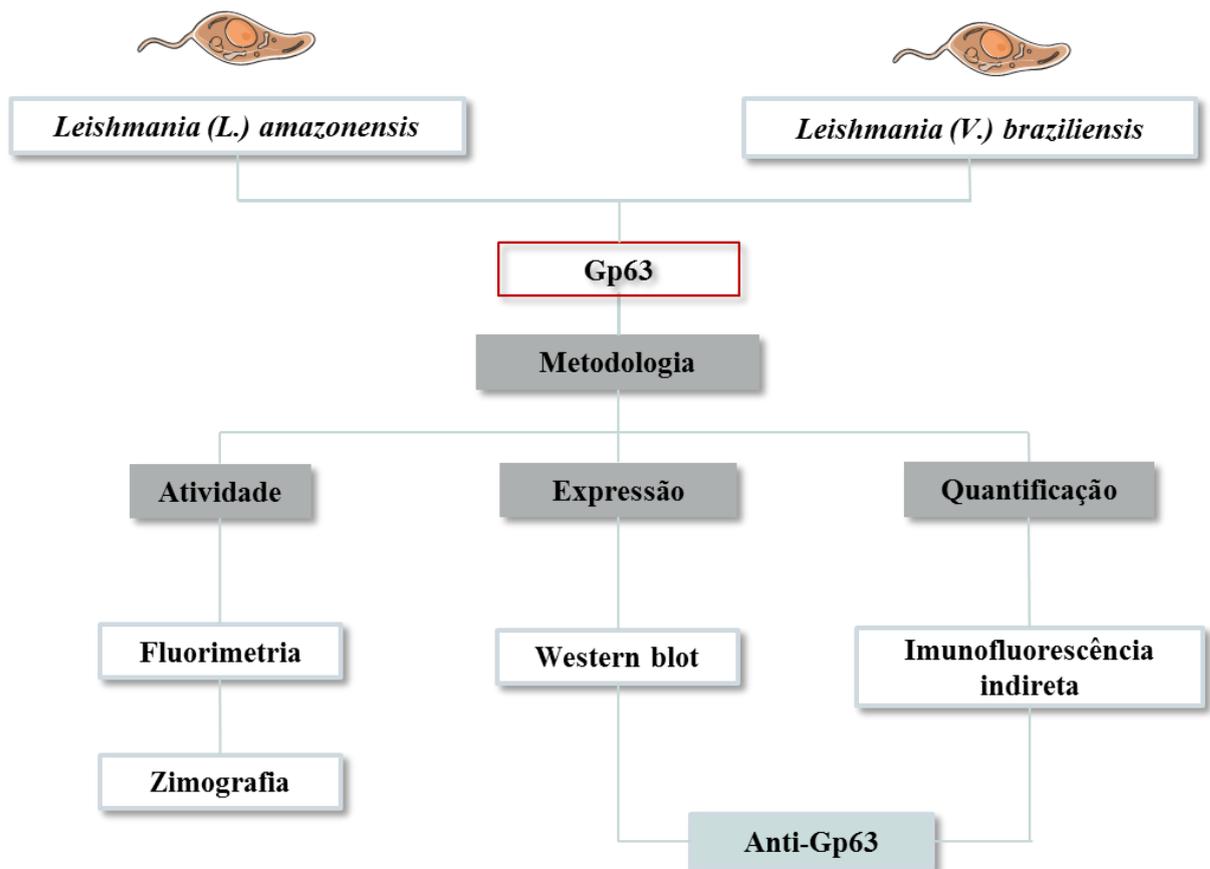


Figura 9. Fluxograma do Delineamento Experimental. Para a análise da molécula GP63 as formas promastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* serão submetidas primeiramente a ensaios pro fluorimetria e zimografia em gel com o intuito de avaliar a atividade da GP63. Para a análise da expressão proteica será realizado western blot utilizando anticorpo anti-GP63. Para a finalização do trabalho, serão realizados ensaios de imunofluorescência indireta também utilizando o anticorpo anti-GP63 para realizar a quantificação da proteína.

3.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/2009/26361) e *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1999/M17323), foram isoladas de um paciente com leishmaniose cutânea localizada e com leishmaniose mucocutânea, respectivamente. As cepas foram obtidas em meio NNN provenientes do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas no Pará, e mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 10% de GPPS (Glutamina 0,2 M; ácido piruvico 0,0125M; penicilina/estreptomicina 1%), e mantidos em 27 °C em estufa B.O.D (Biological Oxygen Demand). O repique foi realizado após o sétimo dia de crescimento de cada espécie. Para todas as análises foram utilizadas promastigotas em fase logarítmica (4º. Dia de cultivo) e estacionária inicial (EST-I) que corresponde ao 7º dia de cultivo.

3.2. ANÁLISE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE PROMASTIGOTAS POR ENSAIO FLUORIMÉTRICO

A atividade proteolítica da *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foi avaliada utilizando extrato do parasito lisado na concentração de 300 ng. O parasito foi cultivado em garrafa de cultivo celular conforme descrito no item 3.1. O conteúdo da garrafa foi centrifugado e o pellet ressuspendido em 1mL de PBS, do qual uma aliquota de 50 uL foi sonificado em potência de 50%, por 5 ciclos de 7 segundos e em tampão PBS com 1% de Triton x-100. A concentração proteica desse extrato foi quantificada utilizando o Kit BSA protein (thermofisher) conforme metodologia preconizada pelo fabricante. O ensaio de atividade foi realizado em placa preta opaca (Perkin Elmer®) no volume total de 200 µL. Todos os poços receberam: DQ™ gelatin na concentração de 10ug/mL (Invitrogen®); Tampão Tris (50mM) contendo CaCl₂ (10 mM, ph 7,4) em quantidade para completar o volume do poço; por fim, foram adicionadas as cepas das espécies *Leishmania L. amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em uma na concentração de 300 ng (extrato sonificado). As placas foram lidas em espectrofluorímetro (Perkin Elmer®) com excitação de 480nm e emissão de 520nm, 37°C, por 2h.

3.3. ZIMOGRAFIA EM GEL

A atividade da GP63 em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foi avaliada em ensaio de zimografia em gel, que consiste em uma corrida de eletroforese de gel SDS-PAGE contendo gelatina a 0.1% (substrato da GP63). Os parasitos mantidos em cultivo foram transferidos para eppendorfs e, posteriormente, foi adicionado tampão Tris 50 mM contendo 1% de triton x-100 e os inibidores EGTA (1mM), PMSF (1mM), EDTA (1mM), Fenantrolina (1mM), ortovonadato (2mM) e NEM (2mM) cuja função é evitar a degradação proteica. Posteriormente as amostras foram sonicadas em potência de 50%, por 5 ciclos de 7 segundos e centrifugada a 10.000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi extraído e acondicionado em eppendorfs, mantidos em temperatura de -80°C.

A dosagem de proteínas foi realizada antes do ensaio, utilizando o Kit BCA Protein (thermofisher) conforme metodologia preconizada pelo fabricante. 25 ng de cada amostra foram misturadas ao tampão de amostra não redutor [SDS (2%), Tris Base (125 mmol/L), glicerol (10% v/v) e azul de bromofenol 0,001%] foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 12% contendo gelatina (0,1%, Sigma). Após eletroforese, os géis foram submetidos a dois banhos de 30 min. com Triton X-100 (2% v/v, Sigma), para remover o SDS do gel. Em seguida, os géis foram incubados em solução Tris (50 mmol/L) contendo CaCl₂ (10 mmol/L), por 18 h a 37°C para permitir a degradação da gelatina presentes nos géis. Por último, os géis foram colocados em solução corante contendo metanol (30% v/v), ácido acético (10% v/v) e Coomassie Blue (0,05%), por 1h, para corar de azul a gelatina presente no gel. A degradação da gelatina (bandas brancas) foi visualizada descorando os géis com solução descorante [metanol (30% v/v) e ácido acético (10% v/v)]. As massas moleculares foram determinadas de acordo com a comparação com as proteínas padrão. As imagens dos géis foram realizadas em fotodocumentador Image Quant LAS 600 chemiluminescence CCD câmera (GE Healthcare®) e a quantificação das imagens foi realizada no software de domínio público, ImageJ 1.45s (Wayne Rasband, National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

3.4. EXPRESSÃO DA GP63 POR WESTERN BLOTTING

Para avaliar a expressão de GP63, primeiramente as culturas das espécies *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* foram centrifugadas e lavadas em

PBS. Em seguida, foram sonicadas em tampão PBS contendo os inibidores de proteases: fenantrolina 1 mM, PMSF 1mM e NEM 1 mM e triton 0,1%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado para dosagem de proteínas, que foi analisada pelo kit BCA protein (Thermo). 20 e 50 µg de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* foram misturados 1:1 em tampão de amostra (SDS 2%, Tris Base 125 mmol/L, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001% v/v) contendo 1% de mercaptoetanol e aplicadas em géis de poliacrilamida a 10%. As proteínas foram separadas por eletroforese e transferidas para membrana de PVDF em sistema semiúmido. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% por 1h e depois incubadas *overnight* com anticorpo monoclonal anti GP63 (clone #96, cedido gentilmente pelo Dr. Robert McMaster da University of British Columbia na concentração de 1:2000). Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário *goat anti-mouse* produzido em cabra conjugado com peroxidase por 1h. Como controle foi utilizado o Anticorpo anti-GAPDH. As membranas foram reveladas com substrato quimioluminescente (Imobilon Western, Millipore) em fotodocumentador (fotodocumentador ImageQuant LAS 500 chemiluminescence CCD câmera (GE Healthcare®)).

3.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* foram fixadas com 4% de paraformaldeído em tampão PHEM 0,1 M, pH 7.2 por um período de 30 minutos a 1h e posteriormente aderidas em lamínulas cobertas com 0,1% de poli-L-lysina, as células foram permeabilizadas com 0,1% de Triton-X 100 durante 30 minutos. Posteriormente, as células foram submetidas à lavagens com tampão PBS com 1% de Soro Albumina Bovina (PBS-BSA 1%) por 10 minutos e incubadas por 1 hora com 50mM de NH₄Cl, em seguida foi realizada a lavagem em PBS-BSA 1%. Foi realizada marcação para observação da presença da proteína GP63. Para isto, foi utilizado anticorpo Monoclonal anti-GP63, produzido em camundongo. O anticorpo primário foi incubado por 1 hora em temperatura ambiente com diluição 1:1000 em PBS-BSA 1% e posteriormente foram feitas lavagens com PBS-BSA 3%, PBS-BSA 1% e PBS, respectivamente. Foi realizada uma segunda incubação com o anticorpo secundário Alexa-Fluor 488 nm *goat anti-mouse* (Molecular Probes®) diluído 1:100 no mesmo tampão. Além disso, foi realizada também a

marcação com DAPI diluído 1:10 por 30 minutos para observação do núcleo celular. As lamínulas foram montadas em lâminas contendo ProLong Gold antifade Mountant with DAPI (Molecular ProbesR), e analisadas em microscópio AxioScope A1 Zeiss com câmera digital Zeiss® acoplada. Como controle negativo foi realizada a omissão do anticorpo primário.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram analisados por meio do programa *GraphPad Prism*® 6.0, os grupos foram comparados por ANOVA ou *test t* de Student, considerando significância estatística $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Atividade proteolítica da gp63 por fluorimetria

A análise fluorimétrica é uma das formas de se quantificar atividade proteolítica *in vitro* da metaloprotease GP63. Para avaliar essa atividade usa-se comumente a gelatinase DQ.TM gelatin como substrato. Pela degradação do substrato é possível medir a atividade proteolítica da GP63 na espécie *Leishmania (L.) amazonensis* e comparar com a atividade na *Leishmania (V.) braziliensis*.

Podemos observar que ambas as espécies analisadas apresentam degradação do substrato. No entanto, nos diferentes dias de cultivo (4 dias e 7 dias) *L. (L.) amazonensis* apresentou atividade proteolítica significativamente maior quando comparada com a *L. (V.) braziliensis* ($p < 0,05$; Fig. 10 A e B). Podemos observar que a intensidade de fluorescência é 5 vezes maior na *L. (L.) amazonensis* do que *L. (L.) braziliensis*. Esses resultados permitem concluir que a atividade da GP63 é maior na espécie *L. (L.) amazonensis* nos diferentes dias de cultivo em relação à espécie *Leishmania (V.) braziliensis* ($p < 0,05$). Não observamos diferença na atividade proteolítica entre 4 dias e 7 dias o que nos sugere dizer que a atividade da GP63 se mantém estabilizada e não diminui ao longo dos dias em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. ($p > 0,05$; Figura 10 B).

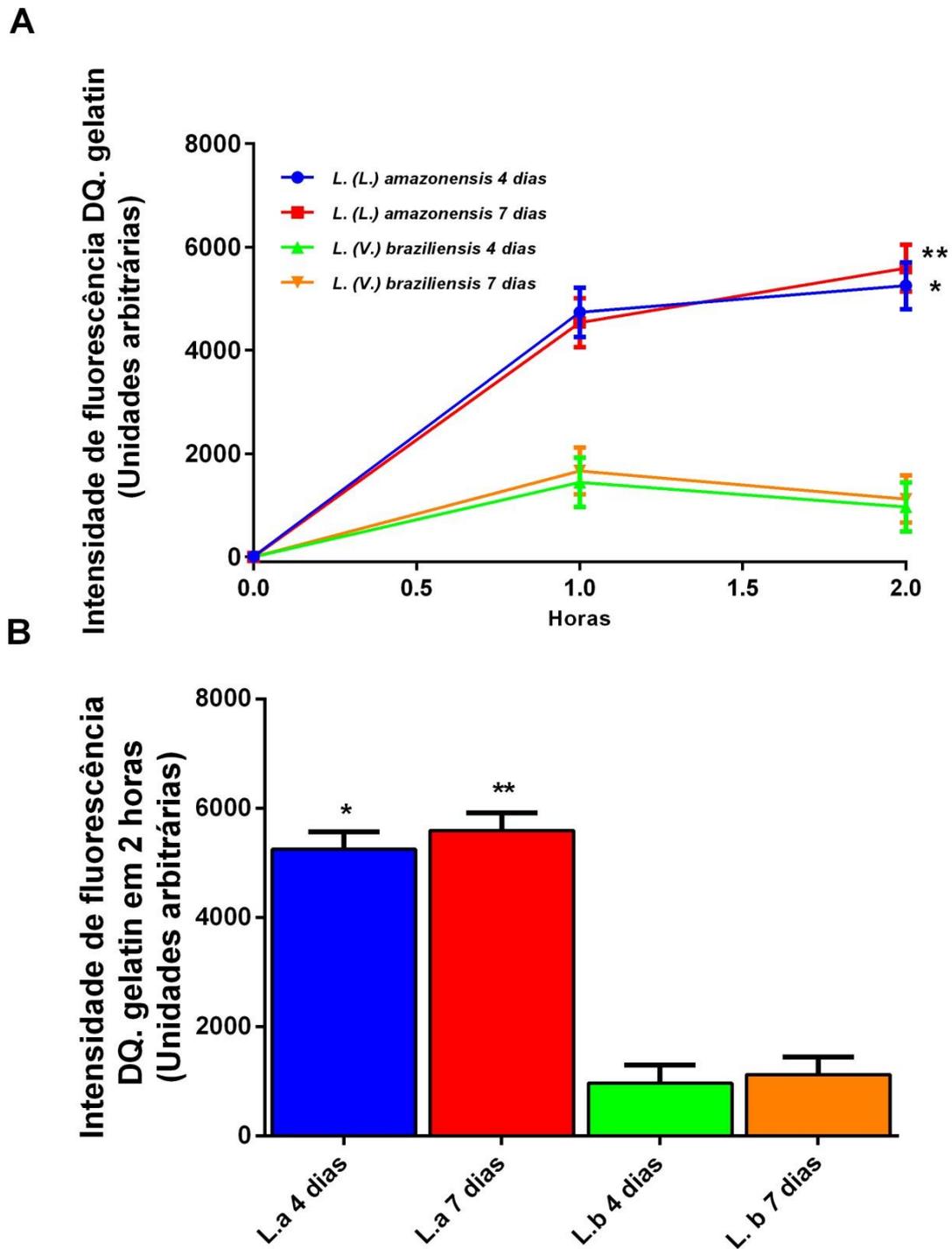


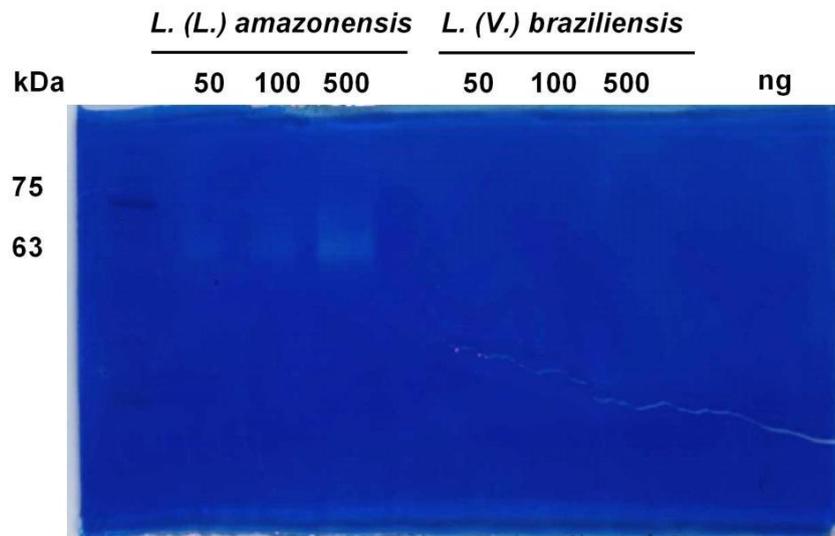
Figura 10: Atividade proteolítica da metaloprotease GP63 nas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*: Análise da atividade proteolítica da GP63 por fluorimetria. De acordo com os dados obtidos, foi possível observar que houve maior atividade da GP63 na espécie *L. (L.) amazonensis* em comparação entre as espécies e *L. (V.) braziliensis* ($p < 0,05$). * Relação de diferença significativa entre *L.a.* 4 dias e *L.b* 4 dias; ** Relação de diferença dignicativa entre *L.a.* 7 dias e *L.b* 7 dias;

4.1.2. Atividade proteolítica por zimografia em gel

Outro método utilizado para analisar a atividade proteolítica da GP63 é através da zimografia em gel. O ensaio permitiu avaliar atividade gelatinolítica, como atividade da proteína GP63 nas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

Foi observado no gel de zimografia intensa atividade gelatinolítica de *Leishmania (L.) amazonensis* em concentrações crescentes (50, 100 e 500 ng), evidenciado pelo aumento da degradação da gelatina do gel na banda correspondente ao peso molecular de 63 kDa (Fig. 11), enquanto que a espécie *L. (V.) braziliensis* apresentou baixa atividade gelatinolítica quando comparada com a espécie *L. (L.) amazonensis*, aplicadas nas mesmas concentrações no gel (50, 100 e 500 ng). Esses resultados estão em concordância ao ensaio fluorométrico. A atividade gelatinolítica foi quantificada pelo programa *ImageJ*® e analisada pelo software *GraphPad Prism*®. Podemos observar que na quantidade de 500 ng o aumento foi de 5x na *L. (L.) amazonensis* comparada a baixa atividade gelatinolítica da *L. (V.) braziliensis*.

C



D

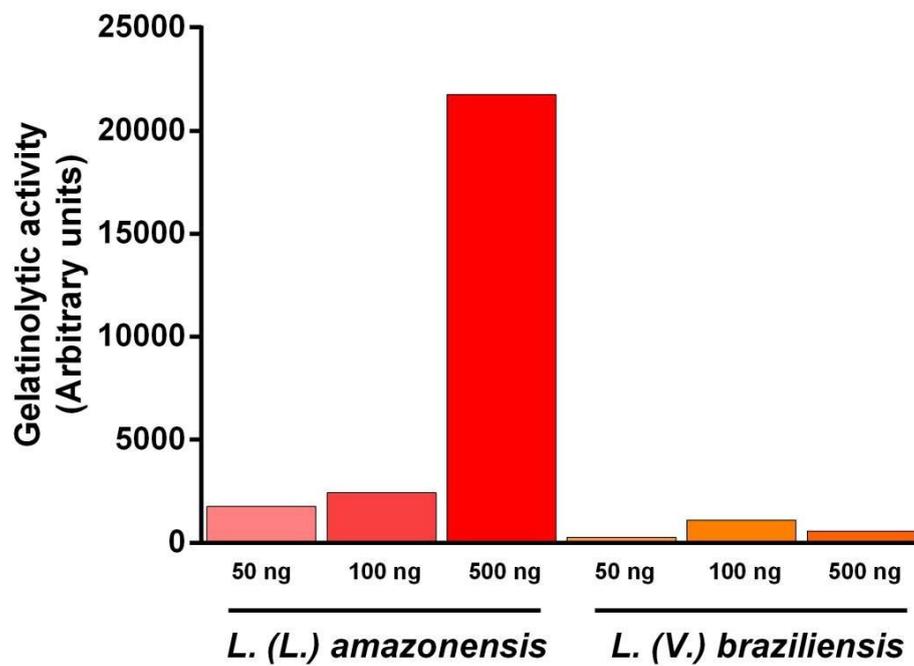
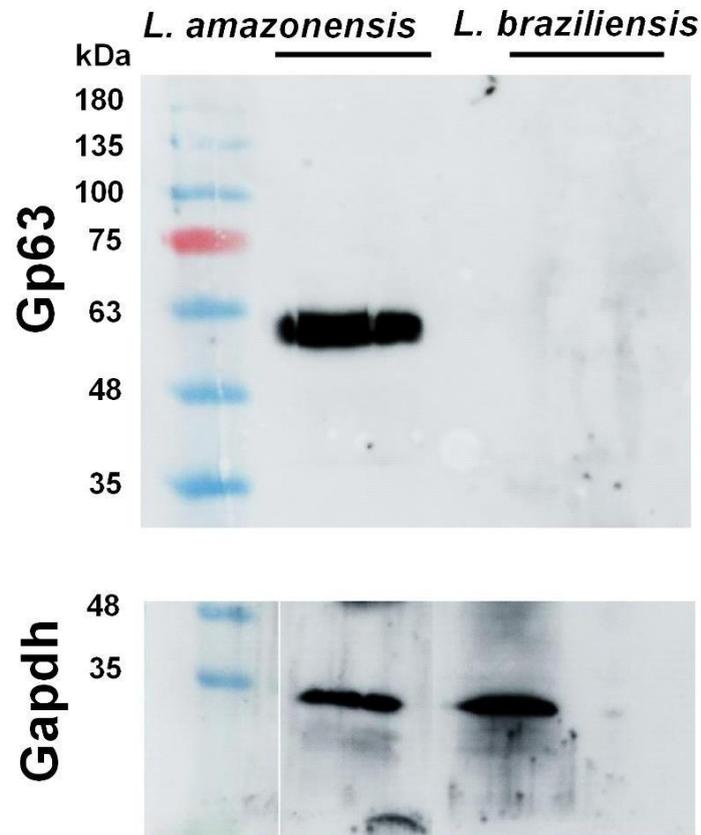


Figura 11: Atividade da metaloprotease GP63 nas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Foi possível realizar a análise da atividade da GP63 nas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* pelo método de zimografia em gel. É possível observar, de acordo com os dados obtidos, que houve maior atividade da GP63 na espécie *L. (L.) amazonensis* em comparação com a espécie *L. (V.) braziliensis* nas concentrações de 50, 100 e 500 ng (7^o dia de cultivo).

4.2. Expressão da gp63 por western blot

A figura 11 ilustra o resultado do western blot realizado a partir de 50µg do extrato protéico de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, evidenciada pelo aparecimento da banda correspondente ao peso molecular de 63 kDa. A banda correspondente ao extrato da *L. (L.) amazonensis* apresenta uma maior expressão da GP63, cerca de 5x comparado a expressão da espécie *L. (V.) braziliensis* ($p < 0,05$, Fig. 12 A), A quantificação da expressão da GP63 foi realizada utilizando o programa *Image J*® e analisada pelo software *GraphPad Prism*® ($p < 0,05$; Fig.12 B).

A



B

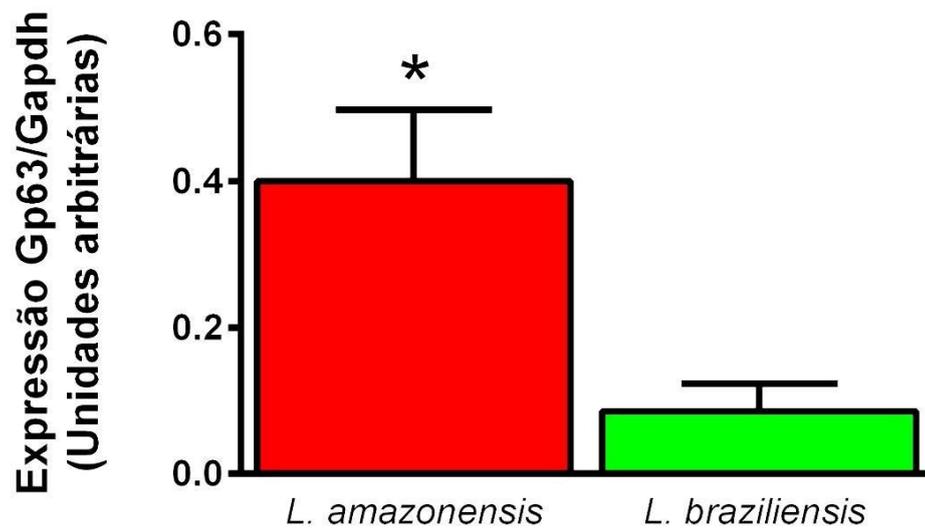


Figura 12: Expressão da metaloprotease GP63 nas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*: Expressão da metaloprotease GP63 nas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*: Foi utilizado Western blot para realizar análise da expressão da metaloprotease GP63. Nos experimentos foram aplicadas amostras na concentração de 50 μ g de cada espécie analisada (N=3) ($p < 0,05$).

4.3. Imunofluorescência indireta

Nos ensaios de imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo monoclonal anti-GP63, foi possível observar que as formas promastigotas das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* apresentaram marcação da proteína GP63. O resultado mostra que a espécie *L. (L.) amazonensis* (Fig. 13 A, B e C) apresenta uma marcação mais intensa nas formas promastigotas em comparação com a espécie *L. (V.) braziliensis* (Fig 13 D, E e F). A quantificação da marcação da GP63 foi realizada utilizando o programa *ImageJ*® e analisada pelo software *GraphPad Prism*® (Fig. 13 G).

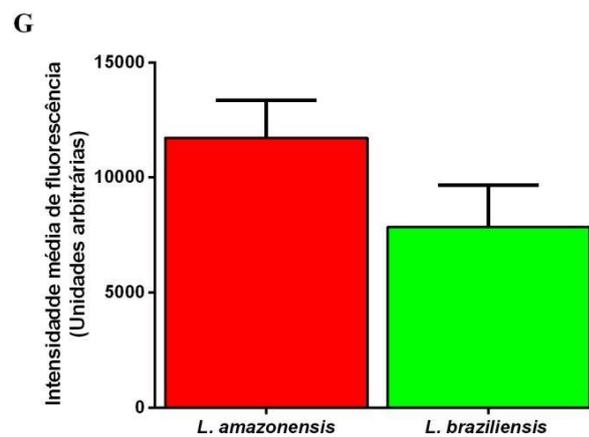
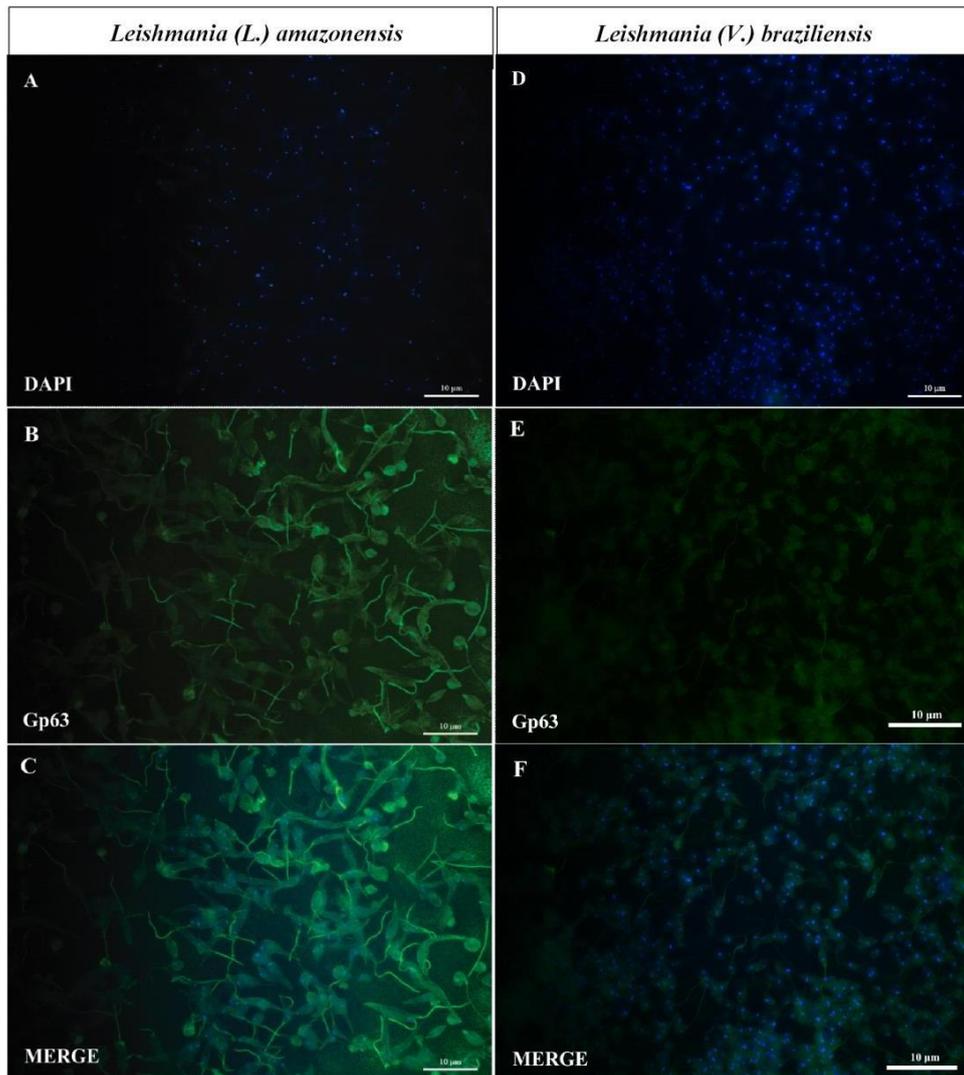


Figura 13: Ensaio de imunofluorescência indireta para marcação da proteína GP63. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (A,B e C) e *L. (V.) braziliensis* (D, E e F) foram fixadas na fase estacionária (7º dia de cultivo) e imunomarcadas com os anticorpos anti-GP63 e anti- IgG de camundongo conjugado com Alexa-Fluor 488 (GP63, verde). Os núcleos das células foram visualizados pela marcação com DAPI (azul). Em G verifica-se a representação gráfica da quantificação da imunofluorescência indireta utilizando os softwares ImageJ e GraphPad Prism 6.0.

5. DISCUSSÃO

A GP63 é uma protease que apresenta um metal dependente de zinco (Zn_{+2}) em seu sítio catalítico e é um importante fator de virulência em infecções causadas por parasitos do gênero *Leishmania* (Castro-Neto *et al.*, 2019). Neste trabalho foi realizada uma análise comparativa entre as espécies *L.(L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* tendo como alvo a análise da expressão e da atividade da GP63. Apesar de ambas as espécies serem causadoras da LTA no Brasil, apresentam características imunopatogênicas bem contrastantes entre elas. A espécie *Leishmania (L.) amazonensis* atua inibindo a resposta imunológica pró-inflamatória, modulando a infecção para o polo anérgico do espectro imunopatológico, provocando a leishmaniose cutânea difusa e induzindo uma resposta do tipo reguladora. Em contrapartida, a espécie *Leishmania (V.) braziliensis* induz a ativação da resposta pró-inflamatória, direcionando a infecção para o polo hiperérgico que é caracterizado por uma exacerbada resposta inflamatória (Silveira *et al.*, 2009). Considerando que os diferentes tipos pertencentes ao gênero *Leishmania* podem causar patologias distintas por mecanismos ainda desconhecidos em sua totalidade, este estudo pretendeu analisar a atividade e expressão da GP63, uma metaloprotease que é caracterizada como um fator de virulência desses parasitos e está diretamente relacionada com a sua infectividade. Portanto, a hipótese deste estudo é se existe diferença na expressão do fator de virulência GP63 entre duas espécies causadoras de LTA que causam diferentes manifestações clínicas.

Este trabalho mostrou pela primeira vez que a espécie *Leishmania (L.) amazonensis* apresenta maior expressão da glicoproteína 63 kDa em comparação com a espécie *Leishmania (V.) braziliensis*. A maior expressão desta protease também foi acompanhada do aumento da atividade gelatinolítica nas espécies analisadas. Da Silva Vieira e colaboradores (2019) mostraram que existem diversas variações intraespecíficas nos níveis de GP63 entre diferentes cepas da espécie *Leishmania (V.) braziliensis*, causadora de diferentes manifestações clínicas de leishmaniose tegumentar americana. O trabalho de Medina *et al.* (2016) corrobora esses dados por mostrar que a GP63 é uma molécula muito polimórfica mesmo entre parasitos de um mesmo foco endêmico.

Vale ressaltar que parasitos do gênero *Leishmania* possuem a capacidade de desencadear distintos padrões de resposta imunológica. Essa diferença pode estar diretamente relacionada com os níveis de expressão da GP63. Estudos mostram que a GP63 atua inibindo a ativação do sistema complemento, dessa forma silenciando a resposta imunológica (Castro Neto, 2019). Neste trabalho foi possível observar que a *L. (L.) amazonensis* apresentou maior expressão e atividade da GP63. As leishmanioses causadas por esta espécie apresentam padrão de resposta do tipo Th2 reguladora, caracterizada pela inibição do sistema complemento através da atuação da GP63 por meio da clivagem de opsoninas da resposta do sistema imunológico, convertendo-as da forma C3b (ativa) na forma C3bi (inativa), conseqüentemente tornando-as inativas e promovendo o silenciamento do sistema complemento, favorecendo a fagocitose (Castro Neto, 2019 e WALKER et al., 2014). Joshi e colaboradores (2002) reforçam essa ideia por mostrar que promastigotas *knockout* para GP63 apresentaram maior susceptibilidade à lise celular mediada pelo sistema complemento, além de promover atraso no desenvolvimento da formação de lesões em BALB/c. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a espécie *L. (V.) braziliensis* apresentou menor expressão e atividade da GP63. Parasitos desta espécie tendem a induzir uma resposta do tipo Th1 que apresenta um padrão de resposta caracterizado por um exacerbado processo inflamatório (SILVEIRA, 2009). Os resultados obtidos neste trabalho acrescentam novos dados sobre a expressão e atividade da GP63 em duas espécies causadoras de LTA no Brasil, o que permite sugerir uma possível relação entre a modulação da resposta imune no hospedeiro, gerada pelo parasito, à fatores de virulência com a GP63.

Segundo Chaudhuri e colaboradores (1989) a atividade proteolítica da metaloenzima na superfície dos parasitos está ligada à proteção de danos citolíticos durante sua sobrevivência, diferenciação e multiplicação nos fagolisossomos de macrófagos infectados. Além disso, os autores observaram que a atividade proteolítica da GP63 é muito maior em cepas virulentas do que em cepas avirulentas da espécie *Leishmania mexicana*. Dessa forma, o ambiente se torna propício para a proliferação e disseminação do parasito.

A metaloprotease GP63 é um importante fator de virulência que está envolvida diretamente no processo de infecção de protozoários do gênero *Leishmania*. Barbosa e colaboradores (2018) demonstraram em seu estudo o impacto que a GP63 possui no curso do estabelecimento da infecção através de análise acerca da liberação de exossomas. Os autores observaram a influência dessas nanovesículas no aumento da carga parasitária e no tráfego de moléculas que possuem propriedades imunomoduladoras como o LPG e a GP63, que podem

interferir no processo inicial de modulação da resposta imune inata de células como os macrófagos e células B-1, induzindo a produção de citocina IL-10 e modulando a resposta para o tipo Th2. Dados semelhantes foram encontrados em exossomos que apresentam GP63 e são oriundos das espécies *L. major* e *L. infantum*. Esses dados sugerem que a funcionalidade dessas nanovesículas liberadas para o meio extracelular por parasitos do gênero *Leishmania* favorece a sobrevivência do parasito e a progressão da doença tanto pelas suas propriedades inflamatórias quanto pela capacidade de imunomodular a sinalização e expressão gênica de macrófagos infectados (Hassani et al., 2014; Atayde et al., 2016;).

De acordo com dados descritos na literatura, a GP63 tem a capacidade de clivar várias proteínas envolvidas na cascata de sinalização da célula hospedeira, como a proteína c-Jun do fator de transcrição AP-1 de macrófagos, responsável por regular a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas além da produção de óxido nítrico (Contreras et al., 2010; Isnard et al., 2012). A GP63 também possui a capacidade de clivar a proteína C quinase, que é associada à sinalização da transdução que envolve proliferação, diferenciação e apoptose celular (Jaramillo et al., 2011). Esta metaloprotease também é responsável por clivar a proteína tirosina fosfatase (PTP), que regula negativamente a sinalização JAK/STAT, que está envolvida na regulação da produção de INF- γ , envolvida na cascata de produção de agentes antimicrobianos como o óxido nítrico (Zand & Narasu, 2014). A clivagem dessas proteínas interfere na cascata de sinalização por inativar essas vias e atuarem como mecanismo de escape do parasito *Leishmania* por permitir que o parasito infecte o macrófago de forma silenciosa, sem desencadear a sinalização que leva a ativação do *burst* oxidativo, principal mecanismo microbicida dos macrófagos (Ueno & Wilson, 2012; Calixto et. al, 2014; Walker et. al, 2014).

A GP63 possui um perfil proteolítico que lhe confere a capacidade de degradação de componentes da matriz extracelular, como fibronectina e colágeno VI que são cruciais durante o processo de infecção, auxiliando na disseminação e migração do parasito para outros sítios, além de promover a degradação e destruição do tecido do indivíduo infectado (McGwire et al., 2003; Isnard et al., 2012). Os dados obtidos neste trabalho sugerem que a maior expressão de GP63 nas diferentes espécies analisadas está relacionada à maior capacidade de invasão do parasito. A análise da atividade gelatinolítica da GP63 na espécie *L. (L.) amazonensis* apresentou maiores níveis de degradação da gelatina, composta por colágeno hidrolisado, em comparação com a espécie *L. (V.) braziliensis*, demonstrando que a primeira espécie possui maior capacidade de degradação e disseminação.

Isso é importante para compreender um pouco mais sobre o desenvolvimento e curso da infecção da doença. Alguns estudos na literatura direcionam para uma terapia alternativa no tratamento da leishmaniose através de inibidores de GP63. Esta metaloenzima pode ser um potencial alvo terapêutico para o tratamento da doença (Atayde et al., 2016; Hassani et al., 2014; Joshi et al., 2002; Kulkarni et al., 2006; McGwire et al., 2003; Thiakaki et al., 2006) As metaloproteases são proteínas cruciais na compreensão da resposta imunológica do hospedeiro em uma infecção, na patogenicidade do parasito, progressão e cura da doença (Murase et al., 2018). As leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas que podem variar entre espécies, região geográfica, cepas e sistema imunológico do hospedeiro vertebrado. Dessa forma, estudos que tenham como objetivo entender completamente como funciona os variados mecanismos de infecção, evasão e sobrevivência do parasito são de grande importância.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados e discutidos permitem concluir que as espécies *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*, causadoras da LTA, apresentam diferença significativa na expressão e atividade da GP63, sendo a espécie *Leishmania (L.) amazonensis* a espécie que apresentou maior expressão e atividade da GP63 em comparação com a espécie *Leishmania (V.) braziliensis*.

REFERÊNCIAS

AMBROSIO, A. R.; DE MESSIAS-REASON, I. J. T. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism. *Parasite Immunol*, v. 27, p. 333-340, 2005.

AMEEN, M.; Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, **35**: 699–705, 2010

ARANGO DUQUE G, JARDIM A, GAGNON É, FUKUDA M, DESCOTEAUX A. The host cell secretory pathway mediates the export of *Leishmania* virulence factors out of the parasitophorous vacuole. *PLoS Pathog.* 2019 Jul 29;15(7):e1007982. doi: 10.1371/journal.ppat.1007982. PMID: 31356625; PMCID: PMC6687203.

ATAYDE VD, HASSANI K, DA SILVA LIRA FILHO A, BORGES AR, ADHIKARI A, MARTEL C, OLIVIER M. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. *Cell Immunol.* 2016 Nov;309:7-18. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.07.013. Epub 2016 Jul 28. PMID: 27499212.

BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N.; Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, **25**. Review (2): 203- 211, 2007.

BAÑUL, AL.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F.; *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in Parasitology**. 2007;64:1-109. Review

BARBOSA FMC, DUPIN TV, TOLEDO MDS, REIS NFDC, RIBEIRO K, CRONEMBERGER-ANDRADE A, RUGANI JN, DE LORENZO BHP, NOVAES E BRITO RR, SOARES RP, TORRECILHAS AC, XANDER P. Extracellular Vesicles Released by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Promote Disease Progression and Induce the Production of Different Cytokines in Macrophages and B-1 Cells. *Front Microbiol.* 2018 Dec 21;9:3056. doi: 10.3389/fmicb.2018.03056. PMID: 30627118; PMCID: PMC6309564.

BARRETO-BERGTER; VERMELHO, A. B. Structures of glycolipids found in trypanosomatids: contribution to parasite functions. *Open Parasitol J*, v. 4, p. 84-97, 2010.

BATES P. A.; Housekeeping by *Leishmania*. **Trends in Parasitology**, 2006 Oct;22(10):447-8. Epub 2006 Aug 14. Review KAYE P.; SCOTT P.; Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, 2011 Jul 11;9(8):604-15. doi: 10.1038/nrmicro2608. Review.

BATES, P. A.; DEPAQUIT, J.; GALATI, E.A;B.; et al. Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. **Parasites & Vectors**, **8**. 2015.

BOGDAN, C. et al. Fibroblasts as host cells in latent Leishmaniosis. *J Exp Med*, v.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Série A. Brasília: Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, 180p. 2010.

BORDIER C. The promastigote surface protease of *Leishmania*. *Parasitol Today*. 1987 May;3(5):151-3. doi: 10.1016/0169-4758(87)90199-2. PMID: 15462939.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2019.** <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/25/LT-Casos.pdf> Último acesso em: 27/10/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.** Brasília/DF, 2017. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacOE/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf Último acesso em 23/11/2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos.** Brasília: Editora MS, 2º Ed, 2007. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_america.pdf > Último acesso em: 20/12/2017

CABEZAS, Y.; LEGENTIL, L.; ROBERT-GANGNEUX, F.; et al. *Leishmania* cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. **Organic & Biomolecular Chemistry**, **13** (31): 8393-8404, 2015

CALIXTO PHM, FAGUNDES DS, OLIVEIRA JCS. Estrutura tridimensional da Major Surface Protease de *Leishmania guyanensis* resolvida por modelagem comparativa. **Biota Amazônia** **4**(1): 74-80, 2014.

CAMARA CL, PAES M, GUERRA JA, BARBOSA MG, COELHO C, LIMA B, BRITO ME, BRANDAO FILHO SP. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitology Research*. 2011; 108:671-7.

CASTES, M.; TRUJILLO, D.; ROJAS, ME.; et al. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. **Biological Research**, v. 26, p. 233-238, 1993.

CASTRO NETO AL, BRITO ANALM, REZENDE AM, MAGALHÃES FB, DE MELO NETO OP. In silico characterization of multiple genes encoding the GP63 virulence protein from *Leishmania braziliensis*: identification of sources of variation and putative roles in immune evasion. *BMC Genomics*. 2019 Feb 7;20(1):118. doi: 10.1186/s12864-019-5465-z. PMID: 30732584; PMCID: PMC6367770.

CHANG C, WERB Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol*. 2001 Nov;11(11):S37-43. doi: 10.1016/s0962-8924(01)02122-5. PMID: 11684441; PMCID: PMC2788992.

CHAUDHURI G, CHAUDHURI M, PAN A, CHANG KP. Surface acid proteinase (GP63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J Biol Chem*. 1989 May 5;264(13):7483-9. PMID: 2708373.

Clin Microbiol Rev, v. 18, p. 293-305, 2005.

CONTRERAS I, GÓMEZ MA, NGUYEN O, SHIO MT, MCMASTER RW, OLIVIER M. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog*. 2010 Oct 14;6(10):e1001148. doi: 10.1371/journal.ppat.1001148. PMID: 20976196; PMCID: PMC2954837.

COUTINHO, S. G. et al. T cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis*

CUERVO P, SABÓIA-VAHIA L, COSTA SILVA-FILHO F, FERNANDES O, CUPOLILLO E, DE JESUS JB. A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* strains. *Parasitology*. 2006 Feb;132(Pt 2):177-85. doi: 10.1017/S0031182005008942. Epub 2005 Oct 3. PMID: 16197592.

CUERVO P, SANTOS AL, ALVES CR, MENEZES GC, SILVA BA, BRITTO C, FERNANDES O, CUPOLILLO E, BATISTA DE JESUS J. Cellular localization and expression of GP63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Acta Trop*. 2008 Jun;106(3):143-8. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.03.005. Epub 2008 Mar 20. PMID: 18423419.

DA SILVA VIEIRA T, ARANGO DUQUE G, ORY K, GONTIJO CM, SOARES RP, DESCOTEAUX A. *Leishmania braziliensis*: Strain-Specific Modulation of Phagosome Maturation. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Sep 6;9:319. doi: 10.3389/fcimb.2019.00319. PMID: 31555609; PMCID: PMC6743224.

DA SILVA-JUNIOR, G.B., BARROS, E. J. G., DAHER, E.F. Kidney involvement in leishmaniasis—a review. **Brazilian Journal of Infectious Disease** 18 (4): 434–440, 2014.

DAVID, CV.; CRAFT, N.; Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Nov-Dec; 22(6):491-502. doi: 10.1111/j.1529 8019.2009.01272.x. Review. **Dermatologic Therapy**. 2009

DE ARAUJO CF, SILVA VM, CRONEMBERGER-ANDRADE A, ARAGAO-FRANCA LS, ROCHA VC, SANTOS PS, PONTES-DE-CARVALHO L. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* amastigote extracts differ in their enhancement effect on *Leishmania infection* when injected intradermally. *BMC Res Notes*. 2014; 7(1):70

DE OLIVEIRA, C.I.; NASCIMENTO, I.P.; BARRAL, A.; et al. Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. **Parasitology International**. 58 (4): 319-324, 2009

FARIAS, L. H. et al. Phosphatidylserine exposure and surface sugars in two *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*, v. 207, p. 537-543, 2013.

GIEBELER N, ZIGRINO P. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. *Toxins (Basel)*. 2016 Apr 23;8(4):122. doi: 10.3390/toxins8040122. PMID: 27120619; PMCID: PMC4848645.

GOMES-SILVA, A.; DE CÁSSIA BITTAR, R.; DOS SANTOS NOGUEIRA R.; et al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? **Clinical and Experimental Immunology** 2007 Sep;149 (3):440-4. Epub 2007 Jul 5.

GREGORY DJ, GODBOUT M, CONTRERAS I, FORGET G, OLIVIER M. A novel form of NF-kappaB is induced by Leishmania infection: involvement in macrophage gene expression. *Eur J Immunol*. 2008 Apr;38(4):1071-81. doi: 10.1002/eji.200737586. PMID: 18383035.

GRIMALDI, G. JR.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Review**, 1993.

GUEIRARD, P. et al. Trafficking of Leishmania donovani promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell Microbiol*, v. 10, p. 100-111, 2008.

GUPTA G, OGHUMU S, SATOSKAR AR. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol*. 2013;82:155-84. doi: 10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3. PMID: 23415155; PMCID: PMC3697132.

HASSANI K, SHIO MT, MARTEL C, FAUBERT D, OLIVIER M. Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of Leishmania exosomes. *PLoS One*. 2014 Apr 15;9(4):e95007. doi: 10.1371/journal.pone.0095007. PMID: 24736445; PMCID: PMC3988155.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

HOLZEMULLER, P. et al. Leishmania infantum amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: Impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme

HURRELL, B.P., REGLI, I.B., TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. **Trends in Parasitology**, **32** (5): 392-401, 2016.

ISNARD A, SHIO MT, OLIVIER M. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 May 16;2:72. doi: 10.3389/fcimb.2012.00072. PMID: 22919663; PMCID: PMC3417651.

JARAMILLO M, GOMEZ MA, LARSSON O, SHIO M T, TOPISIROVIC I, CONTRERAS I, LUXENBURG R, ROSENFELD A, COLINA R, MCMASTER RW, OLIVIER M, COSTA-MATTIOLI M, SONENBERG N. *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. **Cell Host Microbe** **9**(4): 331-341, 2011.

JOSHI PB, KELLY BL, KAMHAWI S, SACKS DL, MCMASTER WR. Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol*. 2002 Mar;120(1):33-40. doi: 10.1016/s0166-6851(01)00432-7. PMID: 11849703.

KULAR JK, BASU S, SHARMA RI. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. *J Tissue Eng.* 2014 Dec 20;5:2041731414557112. doi: 10.1177/2041731414557112. PMID: 25610589; PMCID: PMC4883592.

KULKARNI MM, JONES EA, MCMASTER WR, MCGWIRE BS. Fibronectin binding and proteolytic degradation by *Leishmania* and effects on macrophage activation. *Infect Immun.* 2008 Apr;76(4):1738-47. doi: 10.1128/IAI.01274-07. Epub 2008 Jan 22. PMID: 18212076; PMCID: PMC2292850.

KULKARNI MM, OLSON CL, ENGMAN DM, MCGWIRE BS. *Trypanosoma cruzi* GP63 proteins undergo stage-specific differential posttranslational modification and are important for host cell infection. *Infect Immun.* 2009 May;77(5):2193-200. doi: 10.1128/IAI.01542-08. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19273559; PMCID: PMC2681764.

LAISON, R. & SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology.* W. Peters & R. Killick-kendrick (eds.). London, **Academic Press 1**: 1-120,1987.

LAISON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their Discovery, ecology and taxonomy. **Revista pan-Amazônica de saúde, 1**:213-232. 2010

LIMA AK, ELIAS CG, SOUZA JE, SANTOS AL, DUTRA PM. Dissimilar peptidase production by avirulent and virulent promastigotes of *Leishmania braziliensis*: inference on the parasite proliferation and interaction with macrophages. *Parasitology.* 2009 Sep;136(10):1179-91. doi: 10.1017/S0031182009990540. Epub 2009 Jul 27. PMID: 19631015.

LINA, Ma. et al. An evolutionary analysis of tripanosomatid GP63 proteases. *Parasitol Res*, v. 109, p. 1-10, 2011.

MCGWIRE BS, CHANG KP, ENGMAN DM. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease GP63. *Infect Immun.* 2003 Feb;71(2):1008-10. doi: 10.1128/iai.71.2.1008-1010.2003. PMID: 12540585; PMCID: PMC145380.

MEDINA LS, SOUZA BA, QUEIROZ A, GUIMARÃES LH, LIMA MACHADO PR, M CARVALHO E, WILSON ME, SCHRIEFER A. The GP63 Gene Cluster Is Highly Polymorphic in Natural *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Populations, but Functional Sites

Are Conserved. PLoS One. 2016 Sep 20;11(9):e0163284. doi: 10.1371/journal.pone.0163284. PMID: 27648939; PMCID: PMC5029894.

MICHALICK, M. S. M. & RIBEIRO, R. R.; Gênero Leishmania. In: NEVES D. P.; **Parasitologia Humana**. 12º Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. Cap. 7, p. 41-44.

MUKBEL, R. M. et al. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg*, v. 76, p. 669-675,

MURASE LS, DE SOUZA JVP, DE LIMA NETO QA, DE MELLO TFP, CARDOSO BM, LERA-NONOSE DSSL, TEIXEIRA JJV, LONARDONI MVC, DEMARCHI IG. The role of metalloproteases in *Leishmania* species infection in the New World: a systematic review. *Parasitology*. 2018 Oct;145(12):1499-1509. doi: 10.1017/S0031182018000367. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29530102.

NAGASE H, WOESSNER JF JR. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21491-4. doi: 10.1074/jbc.274.31.21491. PMID: 10419448.

NOGUEIRA, M. F.; SOTTO, M. N. CUCÉ, L. C.; American tegumentary leishmaniasis: Langerhans cells in Montenegro skin test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**. 2008 Sep-Oct;50 (5):283-6.

OLIVIER M, ATAYDE VD, ISNARD A, HASSANI K, SHIO MT. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect*. 2012 Dec;14(15):1377-89. doi: 10.1016/j.micinf.2012.05.014. Epub 2012 Jun 6. PMID: 22683718.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE- OPAS/OMS, LEISHMANIOSES INFORME EPIDEMIOLÓGICO DAS AMÉRICAS Nº 8- Dezembro, 2019. Disponível em https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51738/leishreport8_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y Último acesso em 04/11/2020.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE- OPAS/OMS. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas Nº 8- Dezembro, 2019**. Disponível em < https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51738/leishreport8_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y > Último acesso em 04/11/2020.

PIRES AMS, COSTA GC, GONÇALVES EGR, ALVIM AC, NASCIMENTO FRF. Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão. **Revista de Ciência da Saúde** **14(1)**:30-39, 2012

PIRES, A. S.; BORGES, A. F.; COELHO, A. C.; et al. Identification and Biological Characterization of *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* Isolated from a Patient with Tegumentary Leishmaniasis in Goiás, a Nonendemic Area for This Species in Brazil. **Biomed Research International**, 2015.

PODINOVSKAIA M, DESCOTEAUX A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol.* 2015;10(1):111-29. doi: 10.2217/fmb.14.103. PMID: 25598341.

promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol*, v.RAMALHO-ORTIGAO, M.; SARAIVA, E. M.; TRAUB-CSEKO, Y. M.; Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. **The Open Parasitology Journal** 2010 Jan 1;4:195-204

SAKTHIANANDESWAREN A, FOOTE SJ, HANDMAN E. The role of host genetics in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2009 Aug;25(8):383-91. doi: 10.1016/j.pt.2009.05.004. Epub 2009 Jul 18. PMID: 19617002.

SAVOIA, D.; Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 2015 Jul 4;9(6):588-96. doi:10.3855/jidc.6833. Review.

SCHLAGENHAUF E, ETGES R, METCALF P. The crystal structure of the *Leishmania* major surface proteinase leishmanolysin (GP63). *Structure.* 1998 Aug 15;6(8):1035-46. doi: 10.1016/s0969-2126(98)00104-x. PMID: 9739094.

SERENO, D.; CORDEIRO, DA SILVA A.; MATHIEU-DAUDE, F. et al. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitology International**, 2007 Mar;56(1):3-7.

SILVEIRA FT. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniases so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2019 May 29;trz037. doi: 10.1093/trstmh/trz037. Epub ahead of print. PMID: 31140559.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 423-431, 2009

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. O. P. Clinical and immunopathological spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 239-251, 2004.

SILVEIRA, F. T.; MULLER, S. R.; DE SOUZA, A. A. A.; et al. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina** 22(1): 9-20, 2008

SILVERMAN JM, REINER NE. *Leishmania* exosomes deliver preemptive strikes to create an environment permissive for early infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Jan 9;1:26. doi: 10.3389/fcimb.2011.00026. PMID: 22919591; PMCID: PMC3417360.

SOUZA, A. S. et al. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. *BMC Infect Dis*, v. 10, p. 1-

SOUZA, C. S. F.; MAIA, H.; CALABRESE, K. S.; As Leishmanioses. Departamento de protozoologia. **Fundação Oswaldo Cruz**, 1997.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; et al. **Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania**. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013.

THI, E. P.; LAMBERTZ, U.; REINER, N. E.; Sleeping with the enemy: how intracellular pathogens cope with a macrophage lifestyle. **PLOS Pathogens**, 2012;8(3):e1002551. doi: 10.1371/journal.ppat.1002551. Epub 2012 Mar 22.

THIAKAKI M, KOLLI B, CHANG KP, SOTERIADOU K. Down-regulation of GP63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes Infect*. 2006 May;8(6):1455-63. doi: 10.1016/j.micinf.2006.01.006. Epub 2006 Apr 3. PMID: 16698300.

TURCO SJ, DESCOTEAUX A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*. 1992;46:65-94. doi: 10.1146/annurev.mi.46.100192.000433. PMID: 1444269.

UENO N & WILSON M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology** 28(8): 335–344, 2012.

VALE, E. C. S.; & FURTADO, T.; Leishmaniose Tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiro de Dermatologia** **80**: 421-428, 2005.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *J immunol*, v. 173, p. 6521-6525, 2004.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A*

VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W.; Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Desing** 2002;8(4):297-318. Review.

WALKER DM, OGHUMU S, GUPTA G, MCGWIRE BS, DREW ME, SATOSKAR AR. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Apr;71(7):1245-63. doi: 10.1007/s00018-013-1491-1. Epub 2013 Nov 13. PMID: 24221133; PMCID: PMC4107162.

WEBB JR, BUTTON LL, MCMASTER WR. Heterogeneity of the genes encoding the major surface glycoprotein of Leishmania donovani. *Mol Biochem Parasitol*. 1991 Oct;48(2):173-84. doi: 10.1016/0166-6851(91)90113-k. PMID: 1762629.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019. Leishmaniasis. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/leishmaniasis/leishmaniasis-cl-2019.pdf?sfvrsn=7b1eedab_7 >. Último acesso em: 15/12/2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the Leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, p. 22-26, 2010.

ZAND M & NARASU M. L. *Leishmania* Mechanisms of Evasion. **International Research Basic Science** **8(4)**:419-425, 2014.