

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PAPEL DOS PROTEASSOMAS NA INTERAÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO DE *Leishmania chagasi* EM  
MACRÓFAGOS MURINOS

**Izaltina Silva Jardim**

Ribeirão Preto  
2001

Izaltina Silva Jardim

PAPEL DOS PROTEASSOMAS NA INTERAÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO DE *Leishmania chagasi* EM  
MACRÓFAGOS MURINOS

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO,  
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE  
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA.

**ORIENTADOR:** PROF. Dr. FRANCISCO JUAREZ RAMALHO PINTO

Ribeirão Preto  
2001

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo  
de Ribeirão Preto / USP

Silva-Jardim, Izaltina

Papel dos proteassomas na interação e desenvolvimento de  
*Leishmania chagasi* em macrófagos murinos.

Ribeirão Preto, 2001.

88 p. : il. ; 30cm

Tese de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto/USP – Área de Imunologia Básica e  
Aplicada.

Orientador: Ramalho-Pinto, Francisco Juarez.

1. Proteassoma - 2. *Leishmania chagasi* - 3. Lactacistina
4. Promastigotas - 5. Proteases

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia da Interação Parasita-hospedeiro do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, com o auxílio financeiro da FAPESP. A purificação do proteossoma foi realizada no Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitas, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

“ Um viajante ia caminhando em solo distante, às margens de um grande lago de águas cristalinas. Seu destino era a outra margem. Suspirou profundamente enquanto tentava fixar o olhar no horizonte. A voz de um homem coberto de idade, um barqueiro, quebrou o silêncio momentâneo, oferecendo-se para transportá-lo. O pequeno barco envelhecido, no qual a travessia seria realizada, era provido de dois remos de madeira de carvalho. Logo seus olhos perceberam o que pareciam ser letras em cada remo. Ao colocar os pés empoeirados dentro do barco, o viajante pode observar que se tratavam de duas palavras, num deles estava entalhada a palavra **ACREDITAR** e no outro, **AGIR**. Não podendo conter a curiosidade, o viajante perguntou a razão daqueles nomes originais dados aos remos. O barqueiro respondeu pegando o remo chamado **ACREDITAR** e remando com toda força. O barco, então, começou a dar voltas sem sair do lugar em que estava. Em seguida, pegou o remo **AGIR** e remou com todo vigor. Novamente o barco girou em sentido oposto, sem seguir adiante. Finalmente, o velho barqueiro, segurando os dois remos, remou com eles simultaneamente e o barco, impulsionado por ambos os lados, navegou através das águas do lago chegando ao seu destino, a outra margem. Então o barqueiro disse ao viajante: -Esse porto chama-se autoconfiança. Simultaneamente é preciso **ACREDITAR** e **AGIR** para que possamos alcançá-la.”

Prof.<sup>a</sup> Daniela Carnio C. Marassia

Com Amor, para meus pais e  
meus irmãos que sempre se orgulharam  
da “filha/irmã cientista”...

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao *Prof. Dr. Juarez Ramalho-Pinto* pelo incentivo, por toda confiança depositada em mim e principalmente por ter me dado liberdade total para desenvolver esta tese. Obrigada por ter me permitido iniciar no mundo científico e obrigado mais uma vez, por ter me incentivado e me ajudado a vencer mais um passo importante em minha vida. Agradeço também pelas críticas, às vezes severas, mas que foram necessárias para o meu aperfeiçoamento profissional. Sou imensamente grata pela sua amizade, pela sua preocupação com o meu bem-estar e principalmente por ter contribuído para o meu crescimento como pessoa e como cientista.

Agradeço à *Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria de Fátima Martins Horta*, a Patiu, por ter me orientado na Iniciação Científica e por ter me dado uma base sólida sobre o conhecimento científico. Agradeço também por ter me permitido utilizar o seu laboratório para a purificação do proteassoma e principalmente pelas sugestões, pelos incentivos e pela convivência bastante agradável durante todos os anos que eu estive no seu laboratório em Belo Horizonte.

Ao *Prof. Dr. Eduardo Brandt de Oliveira* agradeço pela gentileza e atenção em todos os momentos que solicitei seu auxílio. Obrigada por sempre ter enriquecido as nossas discussões, sugerindo alternativas ao encaminhamento dos experimentos e especialmente pela sua disponibilidade.



Agradeço à *Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Cristina Roque A. Barreira* e ao *Prof. Dr. João Santana* da Silva por permitirem meu acesso aos seus laboratórios em todos os momentos necessários.

À *Prof.<sup>a</sup> Dra. Ângela Cruz Kaysel* e à *prof.<sup>a</sup> Dra. Aldina Barral-Neto* agradeço a atenção, as sugestões dadas e também por participarem da avaliação do meu trabalho.

Ao *Prof. Dr. Elpídio Barbosa* agradeço pelo convívio e pela ajuda nos momentos necessários. Agradeço principalmente pelo cuidado com a minha saúde e por não ter permitido que eu ficasse com “raiva”.

À *Ana Cristine S. Ferreira* agradeço por ter sido sempre tão atenciosa e carinhosa comigo. Agradeço pela amizade e por estar sempre disposta a resolver os meus problemas burocráticos e pessoais com extrema eficiência e gentileza.

Agradeço às minhas colegas pós-graduandas do laboratório *Milene Kiyoto Moysés*, *Mara Rubia Nunes Celes*, *Denise Brufato Ferraz*, e mais recentemente *Fabiana Rodrigues dos Santos* pelo ótimo convívio durante este tempo que estou aqui. Agradeço pelas conversas, sugestões, pelo companheirismo e acima de tudo pelo respeito e pela amizade que está sendo fortalecida a cada dia.

Aos estagiários *Adriana Goulart Fanan* e *Edward Meireles* agradeço pela convivência muito agradável e pelas conversas nos poucos dias que nos encontramos.

À todo o pessoal do “*Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitas*” da UFMG agradeço a amizade e o carinho que sempre tiveram por mim. Agradeço pelo companheirismo, pelos incentivos constantes, e pela ajuda constante, principalmente depois que eu me mudei para Ribeirão. E o mais importante, por terem compartilhado comigo todos os momentos felizes e problemáticos nos anos em que estive lá. Em especial, agradeço à *Flávia Regina Almeida Campos* por ter tido paciência de me ajudar, sempre que necessário, a trabalhar e a resolver todos os problemas com o sistema de FPLC. Ao *José Elvano Moraes* agradeço pela ajuda no processo de purificação do proteossoma. E à *Jane Lima dos Santos* por todos os ensinamentos, incentivos e conversas; tudo isso foi de fundamental importância para a minha formação.

Às minha amigas *Adriana Malheiro*, *Ana Isabela Lopes Sales*, *Fernanda de Freitas Anibal*, *Larissa Vieira Bighetti*, *Lísia Maria Esper*, *Lúcia de Paula*, *Karina Maciel Pádua* e *Simone Bernardino* agradeço não só pela amizade, pelas conversas e pela ótima convivência, mas também por terem me ajudado a me adaptar em Ribeirão Preto. Obrigada por me proporcionarem a oportunidade de partilhar parte de minha vida com pessoas tão especiais.

À “Turma do mal” (*Corujita*, *M Róbia*, *Tamp’s de bulis*, *S’pegadinha* e *Chefona*) agradeço pela companhia e pelos ótimos momentos que passamos juntas. Agradeço as farras, as festas, os puxões de orelha e as conversas. Valeu a força pessoal!

Agradeço aos colegas da “Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada” pelo ótimo relacionamento e por tornarem o curso de mestrado uma experiência inesquecível em minha vida. Foi um período rico em experiências, muitas científicas, outras, não tão científicas mas igualmente importantes.

Aos funcionários do antigo Departamento de “Parasitologia, Microbiologia e Imunologia” agradeço pela agradável convivência e por serem sempre tão atenciosos e disponíveis.

À FAPESP pela ajuda financeira que permitiu a realização deste trabalho.

Agradeço, acima de tudo, à minha família, que sempre me incentivou a seguir os meus ideais. Sempre foram meu amparo nos momentos difíceis, o meu consolo nos momentos tristes, e a alegria da minha vida. Serei eternamente grata por tudo o que eles me proporcionaram e também por terem me ajudado chegar até aqui.

E agradeço também a todos que direta ou indiretamente me ajudaram no decorrer do meu trabalho e que por esquecimento não estão aqui citados.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMO.....	4
SUMMARY.....	6
INTRODUÇÃO .....	8
A leishmaniose e as leishmânias.....	9
Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.....	10
As proteases e o seu papel nas interações dos parasitas e seus hospedeiros.....	11
O proteassoma.....	13
O proteassoma 20S.....	14
O proteassoma 26S.....	19
Funções dos proteassomas.....	24
Inibidores de proteassomas.....	26
Proteassomas e protozoários parasitas.....	27
OBJETIVOS.....	30
MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
I. Obtenção e cultivo de promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> .....	33
I.1 - Parasitas.....	33
I.2 - Criopreservação das promastigotas.....	33
I.3 - Meio de cultura.....	33

I.4 - Cultivo do parasita.....	34
I.5 - Curva de crescimento.....	34
II. Purificação e caracterização de proteossomas de promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> .....	35
II.1 - Preparação do extrato protéico de promastigotas de <i>L. chagasi</i> .....	35
II.2 - Fracionamento das proteínas do extrato do parasita por <i>Fast Protein Liquid Chromathography</i> (FPLC).....	36
II.2.1 - Cromatografia de filtração molecular em coluna de Sephacryl S-400.....	36
II.2.2 - Cromatografia de troca aniônica em coluna Mono Q HR 5/5.....	36
II.2.3 - Ensaio enzimáticos.....	37
II.2.4 - Dosagem de proteínas.....	37
II.2.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).....	38
III. Obtenção e infecção de macrófagos.....	39
III.1 - Animais.....	39
III.2 - Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos.....	39
III.3 - Infecção dos macrófagos <i>in vitro</i> .....	39
III.4 - Avaliação da infecção dos macrófagos.....	40
RESULTADOS.....	41
Purificação do proteossoma de <i>L. chagasi</i> .....	42
Filtração molecular em Sephacryl S-400.....	42
Troca aniônica em Mono Q.....	45
Caracterização do proteossoma de <i>L. chagasi</i> .....	45

Atividade proteolítica do proteassoma de <i>L. chagasi</i> .....	50
Estudo do papel do proteassoma no desenvolvimento das promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> .....	52
Efeito da lactacistina no crescimento <i>in vitro</i> de promastigotas de <i>L. chagasi</i> .....	52
Efeito de outros inibidores de proteases no crescimento <i>in vitro</i> de promastigotas de <i>L. chagasi</i> .....	52
Efeito da lactacistina na infectividade das promastigotas de <i>L. chagasi</i> .....	55
Efeito da lactacistina no desenvolvimento intracelular de <i>L. chagasi</i> .....	55
 DISCUSSÃO.....	 61
 REFERÊNCIAS	
 BIBLIOGRÁFICAS.....	 73

## ABREVIATURAS



**ALLN** - Acetil-Leucina-Leucina-norleucinal

**bis-acrilamida** - N, N'- metileno-bis-acrilamida

**BrAAP** - *branched chain amino acid preferring*

**D.O.** - densidade óptica

**E-64** - *trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane*

**EDTA** - ácido etilenodiamino tetracético

**FPLC** - *Fast Protein Liquid Chromatography*

**kDa** - quiloDalton

**LLVY-AMC** - *N-succinyl-Leucine-Leucine-Valine-Tyrosine-7-amido-4-methylcoumarin*

**LRR-AMC** - *N-t-Butoxy-carbonyl-Leucine-Arginine-Arginine-7-amido-4-methylcoumarin*

**MG115** - *Carbobenzyloxy-Leucine-Leucine-norvalinal*

**MG132** - *Carbobenzyloxy - Leucine-Leucine-Leucinal*

**MGG** - *May Grünwald-Giemsa*

**MHC** - complexo principal de histocompatibilidade - *Major histocompatibility complex*

**p/v** - peso por volume

**PBS** - salina tamponada com fosfato

**PMSF** - fluoreto de fenilmetilsulfonila

**PSI** - *Carbobenzyloxy-Isoleucine-Glutamate-(O-t-Butyl)-Alanine-Leucinal*

**rpm** - rotações por minuto

**Schneider/SFB** - meio de cultura Schneider para Insetos, suplementado com soro fetal bovino

**SDS** - dodecil sulfato de sódio

**SDS-PAGE** - *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*

**SFB** - soro fetal bovino

**SNAAP** - *small neutral amino acid preferring*

**TLCK** - *tosyl lysine chloromethylketone*

**TPCK** - *tosyl phenylalanyl chloromethylketone*

**Tris** - tris(hidroximetil)aminometano

**Ub** - ubiquitina

**UR** - unidades relativas

**V** - volts

RESUMO

Nas células eucariotas a maioria das proteínas citoplasmáticas não são degradadas nos lisossomas, mas em organelas altamente conservadas encontradas em humanos, arqueobactérias, plantas e leveduras, os proteassomas. Esta estrutura multicatalítica é constituída por componentes menores, cujo núcleo funcional é o componente 20S, que contém várias atividades proteolíticas (trípica, quimotríptica, de peptidilglutamil peptidase, BrAAP e SNAAP). Esse componente 20S, associado ao complexo regulatório 19S, que é composto de múltiplas ATPases, forma o complexo 26S, responsável pela degradação de proteínas conjugadas com a ubiquitina. Estas estruturas citosólicas certamente desempenham papel importante no desenvolvimento de protozoários parasitas e na sua interação com células dos hospedeiros permissivos.

Nesta dissertação, apresentamos um estudo sobre o papel do proteassoma na interação e desenvolvimento de promastigotas de *Leishmania chagasi* em macrófagos murinos. Inicialmente, purificamos e caracterizamos parcialmente o proteassoma de promastigotas de *L. chagasi*. Observamos que o complexo presente na *L. chagasi* possui atividades proteolíticas frente a pelo menos dois substratos sintéticos, LLVY-AMC e LRR-AMC, que avaliam, respectivamente, as atividades quimiotripsina-símile e tripsina-símile. A atividade tripsina-símile é maior que a atividade quimiotripsina-símile; e além disso, esta última é totalmente inibida pela lactacistina, um inibidor específico do proteassoma, enquanto a atividade tripsina-símile é apenas parcialmente inibida.

Utilizando a lactacistina foi possível analisar o papel desse complexo proteolítico durante a infecção e desenvolvimento intracelular da *L. chagasi*. Promastigotas mantidas em cultura na presença de 50  $\mu$ M de lactacistina tiveram seu crescimento bloqueado. Essas promastigotas eram capazes de infectar macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, mas não conseguiam sobreviver dentro desses macrófagos. Esta incapacidade de sobrevivência foi específica para os parasitas tratados com a lactacistina, não sendo observado nos parasitas tratados com outros inibidores de proteases. Estes resultados sugerem que o proteassoma pode ter um papel importante no desenvolvimento intracelular e na replicação das promastigotas de *L. chagasi* no hospedeiro vertebrado.

## SUMMARY

Proteasomes are multicatalytic and multisubunit endopeptidase complexes widely distributed in eukaryotic cells. These enzymes are central proteases in the cytosol and nucleus and are involved in removal of abnormal, misfolded or incorrectly assembled proteins, in processing and degradation of transcriptional regulators in stress response and in the processing of protein antigens. This multicatalytic proteinase complex is composed of a catalytic core, 20S proteasome, which have multiple proteolytic activities (trypsin-like, chymotrypsin-like, peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing, BrAAP and SNAAP). The 20S proteasome associates with the multisubunit complex 19S to produce the 26S proteasome. The 26S proteasome has specificity for ubiquitinated protein substrates and hydrolyses ATP during proteolysis of ubiquitinated proteins. In the present work we have purified a 20S form of proteasome from *Leishmania chagasi* and partially characterized it. The purified 20S proteasome has activity towards fluorogenic substrates that are cleaved by trypsin or chymotrypsin, and is sensitive to lactacystin, a specific inhibitor of the proteasome. We show that the *L.chagasi* proteasome the trypsin-like activity is higher than the chymotrypsin-like. Therefore the chymotrypsin-like activity is inhibited by lactacystin and the trypsin-like it is only partially inhibited.

We show here that lactacystin blocks *in vitro* *L. chagasi* promastigote replication at a final concentration of 50  $\mu$ M. To evaluate the effect of proteasome inhibition on the infectivity and intracellular development of *L. chagasi*, murine macrophages were challenged with promastigotes from early stationary phase treated with lactacystin. Infectivity of macrophages was the same in lactacystin-treated parasites as in the untreated ones. Contrarywise, the intracellular development of the parasite is impaired by pretreating promastigotes with lactacystin. These promastigotes were able to infect BALB/c peritoneal macrophages but they did not survive inside macrophages. These data indicate the important role of the proteasomes of *L. chagasi* promastigotes on the intracellular development and replication in host cells *in vitro*.

## INTRODUÇÃO

## A leishmaniose e as leishmânias

A leishmaniose é uma doença que ocorre em regiões tropicais e subtropicais, e que acomete tanto pessoas quanto animais. Dados recentes da Organização Mundial da Saúde mostram que a leishmaniose ameaça 350 milhões de pessoas em 88 países do mundo; sendo que 72 destes são países em desenvolvimento. Nos últimos dez anos, surgiram novas regiões endêmicas e houve um aumento no número de casos da doença (WHO/OMS, 2000). No Brasil, o aumento da incidência da leishmaniose associado às altas taxas de morbidade e à difusão da doença para novas áreas geográficas, inclusive urbanas, tem constituído um grande problema para a saúde pública (BRANDÃO-FILHO & SHAW, 1994).

As manifestações clínicas da leishmaniose são variáveis e dependem da associação entre as características de virulência da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imunológica do hospedeiro (PEARSON & SOUZA, 1996). De acordo com as manifestações clínicas, a leishmaniose pode ser classificada em três grupos: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral. A leishmaniose cutânea caracteriza-se por úlceras crônicas na pele, desenvolvidas no local da picada do inseto vetor e que podem levar meses para cicatrizar. A leishmaniose mucocutânea causa, no início, úlceras na pele similares às aquelas da leishmaniose cutânea que, entretanto, cicatrizam, para depois reaparecerem, principalmente nas mucosas do nariz e da boca. A leishmaniose mucocutânea geralmente é acompanhada por infecções secundárias e destruição de grandes extensões do tecido. A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é uma doença sistêmica muito grave, com migração dos parasitas para o fígado, baço e medula óssea, podendo levar o hospedeiro à morte (HANDMAN, 2000).

Os parasitas causadores da leishmaniose são protozoários do gênero *Leishmania* pertencentes à ordem *Kinetoplastida* e à família *Tripanosomatidae*. Este gênero compreende muitas espécies epidemiologicamente diversas e complexas. LAINSON & SHAW (1987)



propuseram a divisão do gênero *Leishmania* em dois sub-gêneros, *Leishmania* e *Viannia*, tomando por base o desenvolvimento do parasita em seu vetor natural, na pele de hamsters e em meio de cultura ágar sangue. No subgênero *Viannia* são encontradas as espécies do complexo *braziliensis*, que causam a leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo como, por exemplo, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis*. No subgênero *Leishmania* encontram-se as espécies do complexo *donovani* como por exemplo, *Leishmania (Leishmania) donovani* e *L. (L.) chagasi*, responsáveis pela leishmaniose visceral no Velho e no Novo Mundo, respectivamente, e do complexo *mexicana*, que incluem as espécies causadoras da leishmaniose cutânea e mucocutânea do Novo Mundo, como a *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*. No sub-gênero *Leishmania* estão também espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea e mucocutânea no Velho Mundo, como *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica*, que, taxonomicamente, não se enquadram em nenhum dos complexos citados (GRIMALDI *et al.*, 1989, GRIMALDI & TESH, 1993).

Os protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* são transmitidos ao homem por fêmeas de insetos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). No Brasil, o inseto vetor de *L. (L.) chagasi* é *Lutzomyia longipalpis*, o cão doméstico, *Canis familiaris*, e a raposa, *Dusicyon ventulus*, são fontes de infecção e manutenção da doença (GENARO, 2000).

### **Ciclo de vida da *Leishmania* spp.**

A multiplicação das leishmânias nos seus hospedeiros ocorre por fissão binária, não tendo sido descrito nenhum ciclo sexual. Durante o seu ciclo evolutivo, estes protozoários apresentam duas formas básicas: as promastigotas e as amastigotas. As promastigotas são formas alongadas, flageladas, móveis, que vivem no lúmen do tubo digestivo do inseto vetor, enquanto as amastigotas são formas arredondadas, sem flagelo aparente, que infectam células

do sistema mononuclear fagocítico do hospedeiro vertebrado (CHANG, 1990). Uma vez inoculada na pele pela picada do inseto vetor, e usando um processo que envolve o reconhecimento de componentes da superfície celular, a forma promastigota é fagocitada pelo macrófago e induz a formação de vacúolos citoplasmáticos denominados fagolisossomos (RUSSEL, 1995). No interior dos fagolisossomos, as promastigotas diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se por fissão binária. Quando a célula hospedeira está densamente parasitada, há o rompimento da sua membrana e as amastigotas disseminam-se pelo tecido, infectando novos macrófagos, exacerbando assim, o quadro da infecção (**figura 1**).

### **As proteases e o seu papel nas interações dos parasitas com seus hospedeiros**

Proteases ou peptídeo-hidrolases são enzimas capazes de provocar a quebra de ligações peptídicas, tendo ampla distribuição filogenética. Com base no tipo de reação catalisada, as proteases são classificadas em exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases clivam ligações peptídicas nas extremidades amino e carboxila terminal das proteínas, enquanto que as endopeptidases, também chamadas proteinases, efetuam a clivagem no meio da cadeia polipeptídica. Com base no mecanismo de ação e comparação entre os sítios ativos, quatro classes de proteases são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica: serino-proteases, cisteíno-proteases, aspartato-proteases e metaloproteases. As serino-proteases são caracterizadas pela presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima, acompanhado de um resíduo de ácido aspártico e outro de histidina formando uma tríade catalítica. A catálise ocorre via formação de um estado de transição tetraédrico durante as etapas de acilação e desacilação. A tripsina, a quimiotripsina, a elastase e as calicreínas são exemplos de serino-proteases.

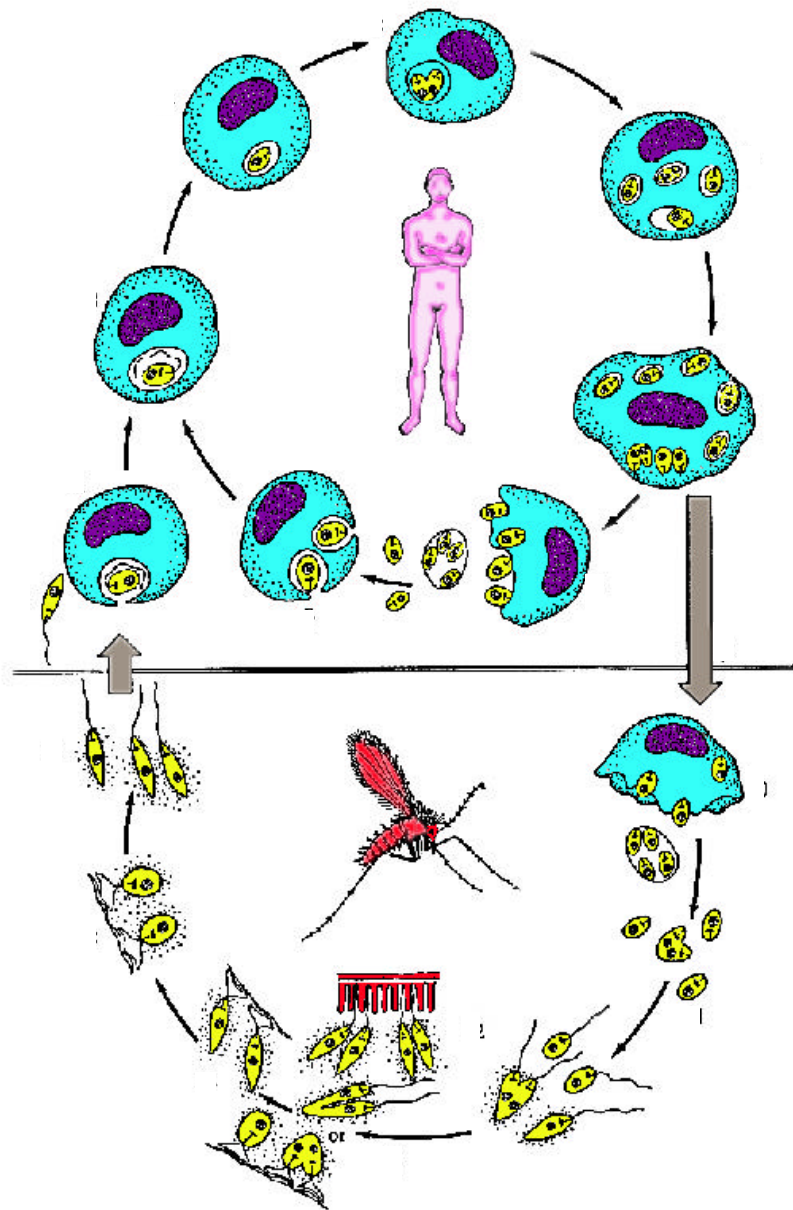


Figura 1 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (modificado de CHANG, 1990)

As cisteíno-proteases apresentam um resíduo de cisteína no centro ativo da enzima, que atua de forma semelhante ao resíduo de serina das serino-proteases. A catálise ocorre via um intermediário tiol-éster e é facilitada pelos resíduos adjacentes de histidina e ácido aspártico. São exemplos de cisteíno-proteases, a papaína, as catepsinas e as calpaínas. Uma característica importante das serino e cisteíno-proteases é a formação de ligação covalente do substrato com a enzima. Nas aspartato-proteases existem dois resíduos de ácido aspártico no centro ativo da enzima, um dos quais, na faixa de pH ótimo (em torno de 2 e 3) encontra-se ionizado, enquanto o outro não. São exemplos de proteases pertencentes a esta classe, a pepsina e a renina. As metaloproteases caracterizam-se por possuir um átomo de metal, comumente o zinco, localizado no centro ativo da enzima. O metal é essencial para a catálise, fornecendo uma forte atração eletrofílica para auxiliar o ataque à ligação peptídica por uma molécula de água. A carboxipeptidase e a termolisina são exemplos desta classe de proteases (NEURATH, 1994; DUNN, 1994).

Na última década, as proteases dos parasitas receberam considerável atenção dos pesquisadores, o que levou à caracterização de sua importância na interação parasita-hospedeiro. Um parasita bem sucedido deve conseguir penetrar e sobreviver no interior do hospedeiro, assimilando os componentes necessários à sua nutrição e conseguindo escapar da resposta imunológica do mesmo. As proteases participam de muitos dos mecanismos que os parasitas utilizam-se para persistirem no hospedeiro. Nos últimos anos, houve avanços no conhecimento sobre mecanismos de degradação protéica intracelular, tendo sido descritas várias novas famílias de proteases. Entre essas novas proteases estão os proteassomas.

## **O proteassoma**

Os proteassomas são proteases multicatalíticas extremamente importantes e estão envolvidos em várias funções celulares. Esta estrutura já recebeu mais de 21 nomes; sendo

que ARRIGO e colaboradores (1988) propuseram o nome *proteassoma* para indicar sua natureza proteolítica e particulada; desde então, este termo tem sido amplamente usado. O proteassoma é um componente essencial das células eucariotas, sendo o responsável pela degradação proteolítica dependente de ATP da maioria das proteínas celulares. Eles estão presentes no núcleo e no citosol, podendo representar até 1% das proteínas totais da célula (COUX *et al.*, 1996). Os proteassomas geralmente degradam as proteínas a pequenos peptídeos, a maioria dos quais são rapidamente hidrolisados por exopeptidases citoplasmáticas. Ele catalisa a rápida degradação de muitas enzimas, proteínas regulatórias, além de eliminar proteínas anormais, resultantes de mutação ou proteínas danificadas.

#### O proteassoma 20S

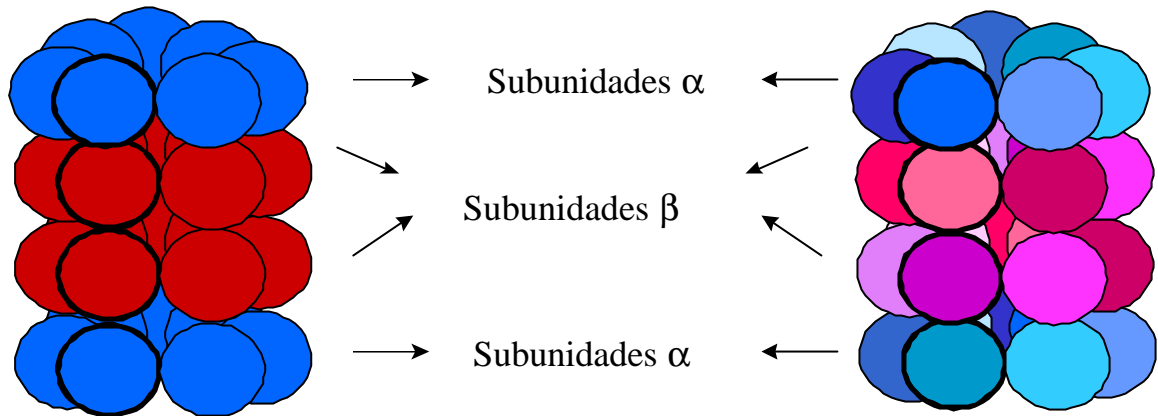
O proteassoma 20S, conhecido como Complexo Multicatalítico de Proteases, está presente em todos os eucariotos, sendo também encontrado em várias arqueobactérias e eubactérias (MAUPIN-FURLOW & FERRY, 1995). É a principal protease citosólica sendo responsável pelo *turnover* intracelular de proteínas. Ele também está envolvido em muitos processos regulatórios e, em eucariotos superiores, na apresentação de antígenos.

Estudos de microscopia eletrônica de proteassomas 20S purificados de diferentes tecidos e espécies, revelaram uma partícula de forma cilíndrica composta de 4 anéis sobrepostos (**figura 2**). Este complexo, que contém várias subunidades variando de 20 a 35kDa, tem uma massa molecular de 700-750 kDa, possui um diâmetro de aproximadamente 11nm e um comprimento de 15nm, formando uma larga cavidade interna, onde estão presentes os sítios catalíticos. A maioria das descobertas sobre a estrutura do proteassoma vem de estudos feitos com o proteassoma 20S da arqueobactéria *Thermoplasma acidophilum*, o qual contém apenas dois tipos distintos de subunidades, denominadas  $\alpha$  e  $\beta$  (DAHLMANN *et al.*, 1989). Análises por microscopia eletrônica e anticorpos mostraram que os dois anéis externos contém apenas subunidades do tipo  $\alpha$ , enquanto os anéis internos são formados de

subunidades do tipo  $\beta$  (GRZIWA *et al.*, 1991). Estudos de cristalografia por raios-X revelaram que esta partícula possui 14 subunidades  $\alpha$  e 14 subunidades  $\beta$ , com 7 subunidades por anel ( $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ ) (LÖWE *et al.*, 1995).

A composição do proteassoma 20S dos eucariotos é mais complicada que o complexo presente nas arqueobactérias (**figura 2**). A diferença entre os complexos é devido ao aumento no número de subunidades diferentes durante a evolução. Proteassomas de actinomicetes, como por exemplo *Mycobacterium* e *Streptomyces*, são compostos por uma única subunidade  $\alpha$  e uma  $\beta$  (NAGY *et al.*, 1998), com exceção de *Rhodococcus erythropolis*, que possui 2 subunidades de cada tipo (ZÜHL *et al.*, 1997a). Já os proteassomas de leveduras são compostos de 7 subunidades  $\alpha$  e 7 subunidades  $\beta$  distintas. Em eucariotos superiores, a composição das subunidades pode variar entre as espécies e está sujeita a uma regulação precisa. O interferon- $\gamma$ , por exemplo, induz a troca de 3 subunidades do tipo  $\beta$  para 3 subunidades do tipo  $\beta$  induzidas (GRIFFIN *et al.*, 1998). Apesar de todas essas diferenças, a arquitetura do proteassoma 20S é altamente conservada (VOGES *et al.*, 1999).

O proteassoma 20S de *Rhodococcus erythropolis* é o modelo para o estudo da montagem do complexo. Os dois tipos de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  reúnem-se em um proteassoma ativo quando uma única subunidade  $\alpha$  e uma única subunidade  $\beta$  são co-expressas em qualquer uma das quatro combinações possíveis (ZÜHL *et al.*, 1997a). As duas subunidades  $\beta$  são traduzidas como precursores com um pro-peptídeo de 59 a 65 resíduos. Quando as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são expressas individualmente, elas permanecem monoméricas e os precursores do tipo  $\beta$  não são processados; entretanto, quando juntas, elas reúnem-se imediatamente. Com isso, há a formação de um heterodímero, composto por um anel de subunidades  $\alpha$  e um anel de precursores das subunidades  $\beta$ .



**Figura 2: Esquema dos proteassomas 20S de procariotos e eucariotos.** À esquerda, o proteassoma 20S de organismos procariotos, mostrando sua composição de anéis sobrepostos com um tipo de subunidade  $\alpha$  e um tipo de subunidade  $\beta$ . À direita, está representado o proteassoma 20S de organismos eucariotos, no qual há 7 diferentes tipos de subunidades  $\alpha$  e 7 diferentes tipos de subunidades  $\beta$ .

Estes heterodímeros denominados meio-proteassoma (*half-proteasome*), permanecem inativos até que o pró-peptídeo das subunidades  $\beta$  seja deletado, indicando que a formação dos sítios ativos acontece apenas após a dimerização dos meio-proteassomas. Os pró-peptídeos das subunidades  $\beta$  não são essenciais para a montagem do complexo, mas a sua ausência retarda a formação do proteassoma (ZÜHL *et al.*, 1997b).

A montagem do proteassoma de eucariotos não é totalmente conhecida, mas sabe-se que requer um processo bastante regulado para garantir o posicionamento correto de cada uma das 14 subunidades diferentes. O processo de montagem dos proteassomas de eucariotos é similar ao do *Rhodococcus*. Em humanos, a subunidade  $\alpha 7$  forma um complexo tipo anel quando expressa sozinha; e um complexo heterodimérico quando co-expressa com outras subunidades. Já os pró-peptídeos das subunidades  $\beta$  são processados durante a sua agregação ao proteassoma 20S (SCHMIDT & KLOETZEL, 1997). O primeiro intermediário do proteassoma 20S caracterizado consistia de todas as subunidades  $\alpha$  e um grupo de subunidades  $\beta$  ( $\beta 2$ ,  $\beta 3$  e  $\beta 4$ ). A incorporação das outras subunidades  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 5$ - $\beta 7$ ) causa a dimerização e processamento dos pró-peptídeos, resultando em um proteassoma completamente montado e ativo (NANDI *et al.*, 1997). A remoção dos pró-peptídeos ocorre por um mecanismo de duas etapas: primeiramente, o sítio ativo vizinho cliva no meio da seqüência do pró-peptídeo; e depois, autocataliticamente, há a geração da treonina ativa no sítio catalítico (CHEN & HOCHSTRASSER, 1996). Recentemente, uma nova função foi atribuída ao pró-peptídeo. Além de auxiliar na montagem do proteassoma 20S, ele impede a acetilação da porção Nterminal dos resíduos de treonina do sítio catalítico, a qual poderia resultar em inibição das subunidades catalíticas (ARENDDT & HOCHSTRASSER, 1999).

No proteassoma, a cadeia lateral do resíduo de treonina aminoterminal (Thr-1 O $\gamma$ ) das subunidades  $\beta$  é o nucleófilo responsável pelo ataque catalítico ao carbono carbonil da ligação peptídica. Três das subunidades  $\beta$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 5$ , abrigam os seis sítios ativos. O resíduo



cataliticamente ativo é esta única treonina localizada na porção aminoterminal das três subunidades  $\beta$  e que caracteriza o proteassoma como um membro da família das hidrolases nucleófilas aminoterminal (KLOETZEL, 2001). No sítio ativo, uma molécula de água e o grupamento amino da treonina, provavelmente são necessários para receber o próton da hidroxila da cadeia lateral e iniciar o ataque nucleofílico. Outros resíduos essenciais para a atividade proteolítica são Glu-17, Lys-33 e Asp-166 (SEEMÜLLER *et al.*, 1995).

O proteassoma 20S dos eucariotos foi inicialmente caracterizado como uma protease multicatalítica, com atividades quimiotripsina-símile, que cliva após resíduos hidrofóbicos; tripsina-símile, após resíduos básicos; e peptidilglutamil peptidase-símile, que cliva após resíduos ácidos (RIVETT, 1989). Mais recentemente, estudos com inibidores sugeriram a presença de mais duas atividades adicionais: uma clivando preferencialmente após aminoácidos de cadeia ramificada (atividade BrAAP - *Branched chain amino acid preferring*) e outra clivando após pequenos aminoácidos neutros (atividade SNAAP - *Small neutral amino acid preferring*) (ORLOWSKI *et al.*, 1993). Já o proteassoma de *Termoplasma* possui apenas a atividade quimiotripsina-símile, embora já tenha sido demonstrado que o complexo hidrolisa qualquer ligação peptídica em substratos desnaturados (WENZEL & BAUMEISTER, 1993).

Vários substratos protéicos são degradados em série pelos proteassomas de *Termoplasma* (KISSELEV *et al.*, 1998), leveduras (NUSSBAUM *et al.*, 1998) ou músculo de coelho (KISSELEV *et al.*, 1999). Os produtos gerados possuem um comprimento entre 3 e 30 aminoácidos, com uma média de 7 a 8 resíduos, independente do número, especificidade ou arranjo espacial dos sítios ativos (KISSELEV *et al.*, 1999).

A degradação pelo proteassoma de pequenos peptídeos, mas não das proteínas desnaturadas ou ubiquitinadas, é em grande parte estimulada, de forma independente de ATP, pelo ativador PA28, também denominado regulador 11S. PA28 é um complexo

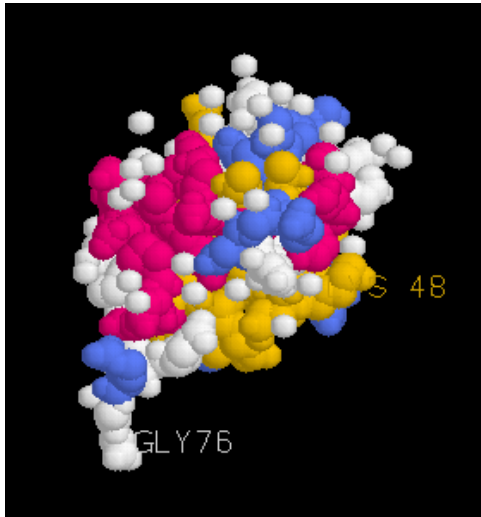
citoplasmático, formado por duas subunidades diferentes de 28kDa, PA28 $\alpha$  e PA28 $\beta$ , que formam um hetero-heptâmetro de 200kDa (GRAY *et al.*, 1994). Provavelmente, estas subunidades, que são induzidas por IFN- $\gamma$ , formam um complexo  $\alpha_3\beta_4$  (KNOWLTON *et al.*, 1997). O fato das subunidades PA28 $\alpha$  e PA28 $\beta$  serem controladas por IFN- $\gamma$  sugere que a função do PA28 pode estar relacionada com o processamento de antígenos (KLOETZEL, 2001).

### O Proteassoma 26S

Além de exercer suas funções, o proteassoma 20S *in vivo* constitui o núcleo proteolítico de um complexo protéico maior, que é responsável pela degradação de proteínas conjugadas à ubiquitina. Este complexo proteolítico foi denominado proteassoma 26S.

Em células eucariotas, a degradação de muitas proteínas é dependente da modificação dessas proteínas pela conjugação à ubiquitina (Ub), um polipeptídeo de 76 aminoácidos altamente conservado (**figura 3**). A conjugação covalente da ubiquitina à outra proteína, denominada ubiquitinação, é essencial para a degradação de proteínas que têm os níveis regulados constitutivamente ou em resposta a mudanças no ambiente celular. Uma das principais funções da ubiquitinação é a marcação de proteínas para serem degradadas pelo proteassoma 26S (WEISSMAN, 2001).

O proteassoma 26S está presente no núcleo e no citosol de todas as células eucariotas. Ele é um complexo protéico grande, com 45 nm de comprimento e 20 nm de largura. Possui uma massa molecular estimada em 2500 kDa, sendo composto por 32-34 subunidades distintas, sendo 14 subunidades no núcleo 20s e 18-20 no regulador 19S (VOGES *et al.*, 1999).

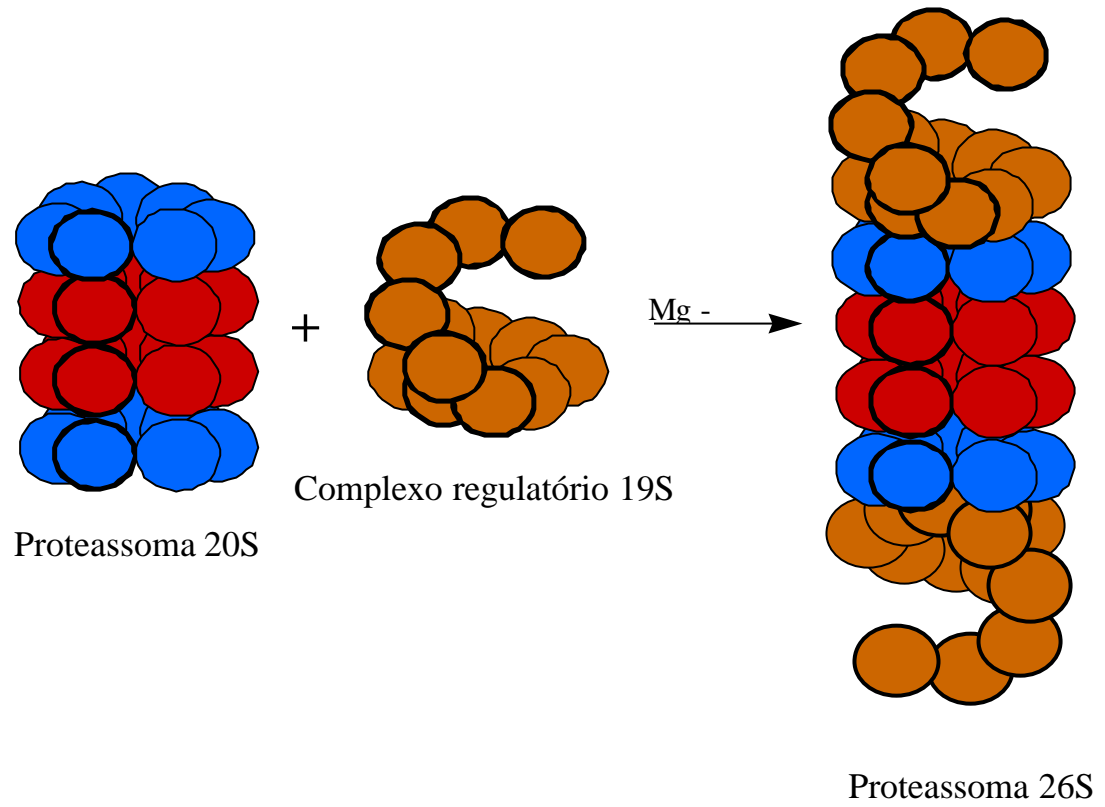


**MQIFVKLTG    KTITLEVEPS    DTIENVKAKI    QDKEGIPPDQ**  
**QRLIFAGKQL EDGRTLSDYN IQKESTLHLV LRLRGG**

**Figura 3:** Estrutura tridimensional e sequência de aminoácidos da ubiquitina humana (modificado de HAAS & SIEPMANN, 1997)

O proteassoma 26S é formado por dois sub-complexos: o proteassoma 20S, formando o núcleo proteolítico; e a partícula reguladora 19S, que é associada às duas extremidades do complexo 20S (**figura 4**). A associação do regulador 19S e do proteassoma 20S é estimulada por um complexo de 220 kDa, denominado modulador. O modulador consiste de duas ATPases (Rpt4 e Rpt5) e da proteína p27, uma subunidade do proteassoma. Ainda não está claro se o modulador forma um complexo estável com o proteassoma ou se ele apenas acopla-se transitoriamente ao proteassoma para facilitar a associação do regulador 19S ao proteassoma 20S (ZWICKL *et al.*, 2000). O complexo regulatório 19S prepara os substratos protéicos para a degradação pelo núcleo 20S. O 19S está envolvido no reconhecimento e ligação dos substratos, desubiquitinação, desenovelamento e translocação para dentro do núcleo do sub-complexo. Estudos bioquímicos, genéticos e análises por microscopia eletrônica do proteassoma 26S de levedura, mostraram que este complexo é formado por dois sub-complexos denominados tampa e base. O segundo sub-complexo, a base, permanece associada ao núcleo 20S na presença de Mg-ATP. Ele é formado por seis ATPases (Rpt1-6) e duas subunidades maiores (Rpn1 e Rpn2) do proteassoma (GLICKMAN *et al.*, 1998). As ATPases têm uma atividade de chaperonina e podem estar envolvidas no desenovelamento dos substratos e no transporte deles para o núcleo proteolítico do proteassoma 20S (KLOETZEL, 2001).

Os substratos preferencialmente degradados pelo proteassoma são proteínas que possuem uma cadeia de poli-ubiquitina. A atividade de três diferentes enzimas (E1, E2 e E3) culmina com a ligação de múltiplas ubiquitinas (Ub) a um resíduo de lisina das proteínas que serão eliminadas (HIRSCH & PLOEGH, 2000). As cadeias de poli-ubiquitina são formadas por ligações isopeptídicas entre uma lisina de uma ubiquitina com uma glicina carboxi-terminal de outra molécula de Ub. A escolha da lisina na molécula de Ub é um passo importante na construção da cadeia de poli-Ub.



**Figura 4: Esquema representativo do proteassoma 26 S.** Na presença de magnésio e ATP, o complexo regulatório 19S associa-se ao proteassoma 20S formando o proteassoma 26S.

A ubiquitina contém sete resíduos de lisina conservados e todos eles são sítios potenciais para a ligação isopeptídica à região carboxi-terminal de outra Ub. *In vivo*, Lys-11, Lys-29, Lys-48 e Lys-63 podem formar ligações ubiquitina-ubiquitina. Mas somente quando quatro ou mais moléculas de Ub ligam-se através da Lys-48 é que há um sinal adequado para o reconhecimento e degradação da proteína pelo proteassoma 26S (WEISSMAN, 2001).

O processo de ubiquitinação de proteínas ocorre em três etapas. Primeiramente, a enzima ativadora de ubiquitina, também conhecida como E1, forma uma ligação tio-éster com a glicina carboxi-terminal (Gly-76) da Ub num processo dependente de ATP. Em seguida, a enzima conjugadora/carreadora de ubiquitina, E2, recebe a Ub de E1 por uma transtioação. E finalmente, a ligase de ubiquitina (E3) catalisa a transferência da Ub de E2 para um resíduo de lisina no substrato (WEISSMAN, 2001). A enzima E2 age juntamente com E3, como fatores de reconhecimento, e determinam qual lisina da proteína alvo será ligada à ubiquitina (VOGES *et al.*, 1999). Uma proteína conjugada com uma cadeia de poli-Ub é degradada mais rapidamente do que formas não ubiquitinadas da mesma proteína (CHAU *et al.*, 1989).

A seleção das proteínas para a degradação pela via proteassoma-Ub parece ocorrer em uma única direção do proteassoma 26S envolvendo mecanismos como fosforilação, desfosforilação e formação dos conjugados de Ub (FERRELL, 2000). As características estruturais dos proteassomas, como o isolamento dos sítios proteolíticos dentro de câmaras internas e a pequena abertura dos anéis  $\alpha$ , claramente contribui para a regulação da proteólise e reduz as chances de uma digestão não específica dos constituintes celulares. Além disso, na ausência de partículas regulatórias, as entradas para o núcleo proteolítico estão fechadas. Uma porção aminoterminal das subunidades  $\alpha$  projeta-se para dentro do canal, bloqueando a entrada à cavidade catalítica. A ligação do PA28 causa um movimento da cauda aminoterminal das subunidades  $\alpha$  para cima, dentro da cavidade do PA28, abrindo a entrada do canal. Ainda não está estabelecido se o regulador 19S induz uma mudança

conformacional similar (KLOETZEL, 2001). Em eucariotos, a necessidade de ubiquitinação dos substratos e a presença do complexo 19S certificam que a entrada do polipeptídeo seja altamente seletiva.

A saída dos produtos de degradação pelo proteassoma não é de forma ativa. Ocorre por difusão e a largura da entrada do canal irá determinar a taxa de difusão. Quando o canal não está totalmente aberto, o tempo de retenção de um intermediário em processamento na câmara catalítica aumentará e a saída de grandes fragmentos de peptídeo será impedida. Com isso, a geração, acúmulo e liberação de pequenos fragmentos de peptídeos será favorecida. Por outro lado, se o canal está aberto, o tempo de retenção para o processamento do intermediário diminuirá e facilitará a difusão de fragmentos maiores de peptídeos (KLOETZEL, 2001).

### **Funções dos proteassomas**

A principal função dos proteassomas é catalisar a degradação das proteínas a pequenos peptídeos, a maioria dos quais são então rapidamente hidrolisados a aminoácidos. Recentemente foi demonstrado que a via proteassoma-Ub também pode catalisar o processamento proteolítico de um precursor inativo em uma proteína ativa. O fator de transcrição NF- $\kappa$ B é necessário para a expressão de várias proteínas críticas nas respostas imune e inflamatória, incluindo muitas citocinas e moléculas de adesão celular. Uma das suas subunidades, p50, é um polipeptídeo de 50 kDa gerado pelo processamento proteolítico de um precursor inativo de 105 kDa. p50 é mantido no citosol juntamente com a subunidade p65 em um complexo inativo ligado a uma proteína inibitória, I $\kappa$ B $\alpha$ . Sinais inflamatórios, como por exemplo a citocina TNF- $\alpha$ , ativa o NF- $\kappa$ B sinalizando para a degradação do inibidor I $\kappa$ B e estimulando o processamento proteolítico do precursor p105. A maturação de p105 é um processo ATP-dependente no qual a região C-terminal é destruída, liberando o fragmento N-

terminal ativo, o p50. O processamento de p105 e a degradação de I $\kappa$ B $\alpha$  requerem ubiquitinação e a presença do proteassoma 26S (PALOMBELLA *et al.*, 1994).

Uma importante função dos proteassomas em eucariotos superiores é a geração de peptídeos a serem apresentados, associados às moléculas de MHC de classe I, para os linfócitos circulantes (GOLDBERG & ROCK, 1992). Neste processo, peptídeos gerados durante a degradação das proteínas são transportados para dentro do retículo endoplasmático, onde eles são ligados à moléculas de MHC classe I e então levados à superfície celular. A apresentação destes peptídeos torna o sistema imune capaz de localizar e destruir células expressando polipeptídeos desconhecidos. Já foi demonstrado que inibidores que bloqueiam a via de degradação protéica dependente de ATP impedem a apresentação via MHC de classe I de peptídeos antigênicos derivados da ovoalbumina (ROCK *et al.*, 1994). O tratamento com os inibidores bloqueia reversivelmente a produção desses peptídeos, mas não reduz o transporte dos peptídeos para o retículo endoplasmático ou a sua transferência para a superfície celular.

Algumas das subunidades  $\beta$  dos proteassomas de mamíferos determinam suas propriedades funcionais e são reguladas por citocinas. O interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que estimula a apresentação de antígenos, além do IFN- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , alteram a composição das subunidades do proteassoma e sua atividade funcional. O IFN- $\gamma$  induz a expressão de três subunidades  $\beta$ , incluindo as subunidades LMP-2 e LMP-7 codificadas pelo MHC (AKI *et al.*, 1994). As subunidades  $\beta$ 1i (LMP2),  $\beta$ 5i (LMP7) e  $\beta$ 2i (MECL-1), que possuem atividade proteolítica e são induzidas por IFN- $\gamma$ , são chamadas de imunsubunidades. A incorporação dessas imunsubunidades no proteassoma 20S requer uma nova montagem do complexo (NANDI *et al.*, 1997). Durante a montagem,  $\beta$ 2i é incorporada apenas se  $\beta$ 1i está presente; enquanto que a incorporação de  $\beta$ 1i é independente de  $\beta$ 2i. Já  $\beta$ 5i parece influenciar a cinética de formação do imunoproteassoma (KLOETZEL, 2001). Estas imunsubunidades são



incorporadas nos proteassomas no lugar de subunidades normais homólogas. O imunoproteassoma resultante cliva preferencialmente após resíduos hidrofóbicos e básicos. Assim, há a produção de oligopeptídeos com regiões carboxi terminal hidrofóbicas e básicas; exatamente aqueles peptídeos que são preferencialmente transportados para o retículo endoplasmático e que ligam-se firmemente às moléculas de MHC de classe I (GOLDBERG,1995). Proteassomas contendo as subunidades LMP são encontrados no fígado e baço de camundongos normais, mas não são observados no músculo e cérebro, nos quais o conteúdo de moléculas de MHC-classe I é muito baixo (COUX *et al.*, 1996).

#### **Inibidores de proteassomas**

A recente identificação de inibidores que podem seletivamente bloquear a função dos proteassomas em células intactas permitiu grandes avanços no conhecimento de suas funções fisiológicas. Foram identificados vários tipos de inibidores de baixo peso molecular que podem entrar rapidamente nas células e inibir seletivamente a via de degradação. Os mais usados são os peptídeos aldeídicos, como o Cbz-Leu-Leu-leucinal (MG132), Cbz-Leu-Leu-norvalinal (MG115) e Acetil-Leu-Leu-norleucinal (ALLN). Estes agentes são análogos de substratos e potentes inibidores do estado de transição primário da atividade quimiotripsina-símile do proteassoma (ROCK *et al.*, 1994). Em análises por difração de raios X, ALLN era usado para localizar os sítios ativos e foi demonstrado que ele forma um complexo hemiacetal com o grupamento hidroxila da treonina N-terminal (LÖWE *et al.*, 1995). Outro inibidor peptídeo aldeídico usado é o Cbz-Ile-Glu(O-t-Bu)-Ala-leucinal (PSI). Este inibidor bloqueia a atividade proteolítica do proteassoma 26S sem influenciar as suas atividades de ATPase. A inibição da proteólise é rapidamente revertida após a remoção dos inibidores. Estes peptídeos aldeídicos também inibem certas cisteíno-proteases lisossomais e as calpaínas (LEE and GOLDBERG, 1998).

A lactacistina, que é um produto natural estruturalmente diferente dos peptídeos aldeídicos, é um inibidor específico para os proteassomas. Este agente, um metabólito de *Streptomyces*, foi descoberto por inibir a progressão do ciclo celular e induzir diferenciação em neuroblastomas murinos (FENTEANY *et al.*, 1994). Em solução aquosa, a lactacistina é convertida no derivado clasto-lactacistina  $\beta$ -lactona, que é a forma ativa do inibidor. Este derivado penetra mais rapidamente em determinadas células que a lactacistina (DICK *et al.*, 1996). Este inibidor irreversível liga-se covalentemente ao sítio ativo das subunidades  $\beta$  em culturas celulares (FENTEANY *et al.*, 1995). E foi demonstrado que este agente modifica covalentemente o resíduo de treonina amino-terminal de todas as subunidades  $\beta$ , inibindo assim todas as suas atividades peptidásicas, embora com afinidades diferentes. Com isso, a lactacistina ou a  $\beta$ -lactona reduz a degradação da maioria das proteínas celulares em células de mamíferos e suprime a produção de peptídeos antigênicos de modo similar aos peptídeos aldeídicos (CRAIU *et al.*, 1997). Assim, com o uso destes inibidores, é possível dissecar as funções intracelulares e os mecanismos do principal sistema de degradação protéica das células.

### **Proteassomas e protozoários parasitas**

As proteases têm um papel importante nos mecanismos patogênicos e nos eventos de diferenciação de protozoários parasitas. O papel principal da atividade proteolítica do proteassoma na regulação da homeostase celular foi muito bem descrita em várias espécies de leveduras e eucariotos superiores, como também no tripanosoma africano, *T. brucei* (HUA *et al.*, 1996; TO *et al.*, 1997).

Algumas modificações que ocorrem durante o ciclo de vida dos protozoários podem estar condicionadas à presença dos proteassomas. Isto porque uma característica marcante do ciclo de vida dos protozoários parasitas é o profundo remodelamento morfológico que eles

sofrem durante o seu desenvolvimento nos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Algumas das mudanças mais marcantes ocorrem quando os parasitas deslocam-se de um meio extracelular para um meio intracelular. Todas estas mudanças morfológicas envolvem a reestruturação de organelas, como flagelos e cinetoplasto; e o rearranjo do citoesqueleto para acomodar as variações de forma. Um bom exemplo desta função dos proteassomas foi demonstrada por GONZALEZ e colaboradores (1997 e 1999) que demonstraram que o proteassoma era necessário para o encistamento de *Entamoeba invadens*, um protozoário de répteis. Este protozoário é utilizado como modelo para o estudo do encistamento *in vitro*, já que o parasita humano, *E. histolytica*, não se encista eficientemente em culturas axênicas. Eles demonstraram que apenas a lactacistina, e não outros inibidores de protease, inibia a formação dos cistos.

O papel dos proteassomas no remodelamento de protozoários parasitas também foi descrito em *Trypanosoma cruzi*. Foi demonstrado que a lactacistina inibe a transformação de tripomastigotas em amastigotas e também o desenvolvimento de amastigotas em tripomastigotas. Em relação à infectividade dos parasitas, esses autores demonstraram que a lactacistina não afeta a invasão de mioblastos por tripomastigotas; entretanto, o desenvolvimento intracelular dos parasitas é inibido pela lactacistina (GONZALEZ *et al.*, 1996). Resultados similares foram obtidos com outros protozoários parasitas, como o *Plasmodium sp.* O tratamento de esporozoítos de *P. berghei* com lactacistina inibe o seu desenvolvimento em formas exoeritrocíticas *in vivo* e *in vitro*, mas não altera a sua capacidade de invasão. Os estágios eritrocíticos do *P. falciparum* também são fortemente inibidos *in vitro* pelo tratamento com a lactacistina (GANTT *et al.*, 1998).

A função dos proteassomas no desenvolvimento intracelular de parasitas também foi investigada em *Toxoplasma gondii* (SHAW *et al.*, 2000). O tratamento dos taquizoítos com lactacistina não interferiu na entrada dos parasitas nas células hospedeiras e nem no

estabelecimento do vacúolo parasitóforo. Entretanto, o crescimento e replicação dos parasitas foi bloqueado.

A importância da proteólise intracelular em protozoários do gênero *Leishmania* foi até hoje demonstrada apenas na espécie *Leishmania mexicana*. ROBERTSON (1999) demonstrou a presença dos proteassomas 20S e 26S nesta espécie, e a inibição do crescimento *in vitro* de promastigotas e amastigotas após o tratamento com os inibidores peptídeo aldeídicos. A lactacistina, no entanto, não inibiu o crescimento de *L. mexicana in vitro*.

A descrição do proteassoma em protozoários, principalmente em protozoários parasitas, e em particular no tripanossomatídeo *T. cruzi*, e a sugestão da sua participação em processos celulares essenciais para o estabelecimento desses parasitas em seus hospedeiros, levaram-nos à hipótese de semelhante importância em um outro tripanosomatídeo, a *Leishmania chagasi*. Assim, nos propusemos a investigar o papel do proteassoma no desenvolvimento de *L. chagasi* em células murinas e a caracterizar esta molécula que pode estar envolvida em muitos processos importantes para este parasita.

## OBJETIVOS

O nosso objetivo foi caracterizar o proteassoma de *L. chagasi* e estudar o seu papel no desenvolvimento intracelular dos parasitas. Assim, traçamos como objetivos específicos desta tese:

- 1 - Purificar o proteassoma de promastigotas de *L. chagasi*;
- 2 - Caracterizar a atividade do proteassoma de *L. chagasi*, através da sua capacidade de clivar diferentes peptídeos sintéticos;
- 3 - Determinar o efeito da lactacistina no crescimento *in vitro* das promastigotas de *L. chagasi*;
- 4 - Verificar o efeito da lactacistina na infecção e desenvolvimento da *L. chagasi* em células de camundongos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

## I. OBTENÇÃO E CULTIVO DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania chagasi*

### I.1 - Parasitas

Os parasitas utilizados no presente trabalho foram promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* cepa MHOM/BR/74/PP75, cuja cultura original foi gentilmente cedida pelo Dr. Gabriel Grimaldi, do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro.

### I.2 - Criopreservação das promastigotas

Para preservação e posterior utilização, as promastigotas eram criopreservadas em meio de cultura de Schneider para Insetos acrescido de glicerina a 10% (v/v). A glicerina era adicionada gota a gota na cultura sob agitação manual constante. Após 30 min de agitação, alíquotas da cultura glicerinada eram distribuídas em tubos de criopreservação de 1,8 ml (Nunclon-Delta, Nunc, Dinamarca), mantidas por 24 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  em suporte de isopor, em seguida transferida para *deep-freezer* (Bio Freezer, Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA) a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e finalmente conservadas em nitrogênio líquido (botijão modelo Omega EM-32, MVE Cryogenics, New Prague, Minnesota, USA). Para recuperação das promastigotas criopreservadas, o material era retirado do nitrogênio líquido, degelado rapidamente em banho a  $37^{\circ}\text{C}$  e inoculado em 10 ml de meio de cultura e mantidos a  $23^{\circ}\text{C}$  em estufa BOD (Revco modelo BOD50ABA, Revco Scientific Inc., Asheville, NC, USA ).

### I.3 - Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para a propagação *in vitro* das promastigotas de *L. chagasi* era o meio de Schneider para Insetos (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Fetal Bovine Serum Characterized, HyClone, Logan, Utah, USA). O meio era preparado segundo as instruções do fabricante, e era adicionado sulfato de gentamicina (Sigma Chemical Co) na concentração final de 50 mg/l.



O meio era esterilizado por filtração em membrana de nitrocelulose de poro 0,22  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Göttingern, Alemanha). O SFB, previamente inativado a 56°C por 30 min, era adicionado ao meio no momento do uso.

#### I.4 - Cultivo do parasita

Como mencionado, para a propagação *in vitro* das promastigotas de *L. chagasi* era utilizado o meio de cultura de Schneider para Insetos, suplementado com soro fetal bovino a 20% (Schneider/SFB). O inóculo utilizado era de  $5 \times 10^5$  promastigotas por ml de meio, obtidas de culturas de 5<sup>o</sup> dia de crescimento (final da fase logarítmica). O crescimento dos parasitas, que eram mantidos a 23°C, era avaliado por contagens de alíquotas de 10  $\mu\text{l}$  de cultura diluídas 1:100 em ISOTON (ácido cítrico 0,05 M, NaCl 0,12 M, formaldeído 0,5% p/v, pH 7,2). A contagem era feita em câmara hemocitométrica de Neubauer (C.A. Hausser & Son, Philadelphia, USA) em microscópio óptico com aumento de 400X. A média aritmética de duas contagens era utilizada para calcular o número de parasitas contidos em 1,0 ml de cultura. O cálculo era feito utilizando-se a fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de parasitas} = \text{média dos 4 quadrantes} \times \text{inverso da diluição da amostra} \times 10^4.$$

De cada 200 ml de cultura obtinham-se aproximadamente  $2 \times 10^{10}$  parasitas.

#### I.5 - Curva de crescimento

Para avaliação do crescimento dos parasitas em Schneider/SFB eram feitas curvas de crescimento. Alíquotas das culturas eram diluídas em 1 ml de PBS gelado (NaCl 145 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  9 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1 mM, pH 7,6) e eram acrescentados 100  $\mu\text{l}$  do corante Eritrosina B (Merck, Darmstadt, Alemanha) diluído a 0,4 % (p/v). Após 5 minutos no gelo, fazia-se a contagem diferencial das promastigotas em câmara de Neubauer. Os parasitas

corados de vermelho eram considerados mortos e aqueles birrefringentes e móveis eram considerados vivos. O cálculo era feito levando-se em consideração apenas o número de parasitas vivos.

## **II. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASSOMAS DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania chagasi***

### **II.1 - Preparação de extrato protéico de promastigotas de *L. chagasi***

Para a purificação do proteassoma, as promastigotas, no começo da fase estacionária, eram coletadas por centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos, lavadas três vezes com PBS e estocadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .  $1 \times 10^{10}$  promastigotas de *L. chagasi* eram ressuspensas em 25 ml de tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,5 contendo 1 mM EDTA e 150 mM NaCl, submetidas a 5 ciclos de 20 seg de sonicação e observadas em microscópio óptico para verificar a ausência de parasitas intactos. O lisado celular era centrifugado a 3000 rpm por 10 min, o sobrenadante era recolhido e centrifugado a 18000 rpm por 1 hora ou a 15000 rpm por 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  em centrífuga refrigerada (Sorvall, modelo RC-5B, DuPont Instruments, Wilmington, Delaware, USA). O sobrenadante (extrato protéico) era recolhido e concentrado para um volume final de 1 ml por ultra-filtração em sistema Amicon (Amicon corp., MA, USA) utilizando membrana Diaflo (Amicon Inc., MA, USA) com limite de exclusão de 10 KDa.

### **II.2 - Fracionamento das proteínas do extrato do parasita por *Fast Protein Liquid Chromathography* (FPLC)**

#### **II.2.1 - Cromatografia de filtração molecular em coluna de Sephacryl S-400**

O extrato protéico de parasitas, preparado como descrito acima e contendo aproximadamente 30 mg de proteínas, era inicialmente submetido a uma cromatografia de filtração molecular. A coluna utilizada foi a Sephacryl S-400 HR 25/35 (Pharmacia, Uppsala, Suécia), com faixa de resolução de 20 a 8000 kDa, equilibrada em tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,5 contendo 1 mM EDTA e 150 mM NaCl, e acoplada à um sistema de FPLC. As proteínas eram eluídas em um fluxo de 0,5 ml/min com o mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna. Frações de 1,5 ml eram recolhidas e 20 µl de cada uma eram ensaiados quanto a atividade proteolítica quimiotripsina-símile e ainda quanto a inibição dessa atividade pelo inibidor de cisteíno-protease E-64 e pelo inibidor de proteassoma lactacistina (Biomol Research Laboratories, Inc. PA, USA), como descrito posteriormente. As frações ativas, inibidas pela lactacistina e não pelo E-64, eram então agrupadas e utilizadas na etapa seguinte.

### **II.2.2 - Cromatografia de troca aniônica em coluna Mono Q HR 5/5**

As frações com atividade proteolítica provenientes da cromatografia em Sephacryl S-400 eram agrupadas, concentradas e dialisadas por ultra-filtração em sistema Amicon utilizando membrana Diaflo com limite de exclusão de 10 kDa, contra o tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0. A amostra era então fracionada por cromatografia em coluna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0. As proteínas eram eluídas com um gradiente contínuo de 0 a 1 M de KCl no mesmo tampão e em um fluxo de 0,5 ml/min. Frações de 0,5 ml eram recolhidas e 10 µl de cada uma eram ensaiados quanto à sua atividade proteolítica quimiotripsina-símile e ainda quanto a inibição dessa atividade pelo inibidor de cisteíno-protease E-64 e pelo inibidor de proteassoma lactacistina. As frações ativas eram agrupadas levando-se em consideração tanto o grau de atividade e a inibição por lactacistina e não por E-64, quanto o grau de pureza de cada fração, determinada por SDS-PAGE seguido de coloração pela prata.

### II.3 - Ensaio enzimáticos

Para os ensaios da atividade enzimática dos proteassomas foram utilizadas microplacas de fundo chato de 96 poços (Immunoplate, Nunc, Dinamarca), onde eram colocados 20  $\mu$ l das frações cromatográficas ou 10  $\mu$ l dos *pools* de frações e o volume completado para 100  $\mu$ l com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, contendo ou não 50  $\mu$ M de lactacistina, 50  $\mu$ M de E-64, 1mM de PMSF, 1mM de *o*-fenantrolina ou 20  $\mu$ g/ml de pepstatina A. A placa era mantida à temperatura ambiente por 30 min para estabilização da temperatura, quando então eram adicionados os substratos fluorogênicos. Para testar a atividade quimiotripsina-símile era utilizado o peptídeo N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) na concentração final de 100  $\mu$ M. Para a atividade tripsina-símile o peptídeo era o N-t-Boc-Leu-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) na concentração final de 25  $\mu$ M. A atividade enzimática era monitorada a 37°C pela leitura da fluorescência com excitação a 380 nm e emissão a 440 nm em espectrofluorímetro Biolumin<sup>TM</sup> 960 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

### II.4 - Dosagem de proteínas

Para a quantificação de proteínas, utilizamos o método de BRADFORD (1976) adaptado para microensaio. Em microplaca de 96 poços de fundo chato (Immunoplate, Nunc, Dinamarca) eram colocados 10  $\mu$ l da amostra ou do padrão protéico de soroalbumina bovina e adicionados 200  $\mu$ l da solução de Coomassie Blue (Bio-Rad, Richmond, CA, USA), diluída conforme especificação do fabricante. Após 5 minutos à temperatura ambiente, a densidade óptica (D.O.) era determinada em leitor de Elisa (Spectramax 340, Molecular Devices) com filtro de 600 nm.

## **II.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)**

Para análise eletroforética foi utilizado equipamento BioRad, constando de fonte modelo Power Pac 300 e cubas modelo Mini-Protean® II Cell. Alíquotas de cada etapa da purificação contendo 0,5 - 1 µg de proteínas eram fracionadas em SDS-PAGE utilizando-se um gel de separação de 12,5%. Estes eram preparados com uma solução 40% de acrilamida/bis-acrilamida na proporção 29:1 em 375 mM Tris-HCl pH 8,8 e 0,1% de SDS (LAEMMLI, 1970). O gel de concentração era preparado em Tris-HCl 125 mM pH 6,8 contendo 4% de acrilamida, 0,1% de bis-acrilamida e 0,1% de SDS.

As amostras eram misturadas (1:1) com o tampão da amostra (Tris-HCl 125 mM pH 6,8 contendo 2,5% SDS, 20% glicerol, 5% de β-mercaptoetanol e 0,01% azul de bromofenol), desnaturadas por 5 minutos em banho-maria a 100°C e aplicadas no gel. A corrida era feita sob voltagem constante de 200 V por 45 minutos a 4°C, utilizando-se tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM pH 8,3, contendo 0,1% SDS. Padrões de pesos moleculares eram utilizados em cada gel para determinar a mobilidade relativa das proteínas.

Após a separação das proteínas, o gel era corado pela prata utilizando-se o *kit Plusone* (Pharmacia Biotech AB, Uppsala Sweden).

## **III. OBTENÇÃO E INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS**

### **III.1 - Animais**

Para todos os experimentos de infecção *in vitro* foram utilizados camundongos machos com 7-10 semanas de idade, da linhagem BALB/c. Estes animais foram produzidos no Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais ou no Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP.

### **III.2 - Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos**

Para a obtenção de macrófagos peritoneais, os camundongos BALB/c eram inoculados por via intraperitoneal com 2 ml de tioglicolato 3% (GORDON *et al.*, 1974). Após 4 dias, 5 ml de PBS gelado eram injetados na cavidade peritoneal desses animais e em seguida recolhidos com seringa. O líquido peritoneal era lavado 3 vezes por centrifugação a 2000 rpm por 10 min em PBS estéril, contendo 50 mg/ml de sulfato de gentamicina. As células obtidas eram contadas em câmara hemacitométrica tipo Neubauer espelhada.  $1 \times 10^5$  células eram distribuídas em placas de cultura de plástico de 8 poços (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA) contendo 200  $\mu$ l de Schneider/SFB. Em seguida as células eram incubadas por 18 horas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (Estufa modelo 3157, Forma Scientific, Marietta, Ohio).

### **III.3 - Infecção dos macrófagos *in vitro***

Para a infecção dos macrófagos, 1 ml de cultura de *L. chagasi* era centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm e ressuspenso em meio Schneider/SFB contendo os inibidores de protease E-64 (50  $\mu$ M), PMSF (1 mM) ou o inibidor de proteassoma lactacistina (50  $\mu$ M). Após aproximadamente 20 horas as culturas de promastigotas de *L. chagasi* eram lavadas 2 vezes com PBS, contadas e ressuspendidas em Schneider/SFB.

Os macrófagos incubados em câmaras sobre lâminas eram infectados com as promastigotas pré-tratadas na taxa de 5 parasitas por célula. As células eram incubadas novamente por 24, 48, 72 ou 96 horas a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub> e as lâminas eram coradas como descrito a seguir.

### III.4 - Avaliação da infecção dos macrófagos

O número de parasitas intracelulares dos macrófagos peritoneais infectados com *L. chagasi* era avaliado pela contagem em microscópio óptico de 100 macrófagos, após coloração das lâminas pela técnica May Grünwald-Giemsa (MGG) (GIAIMIS *et al.*, 1992). Esta coloração consiste na fixação das células com solução de ácido tânico a 1% por 1 min, lavagem com meio de cultura, seguido da sua imobilização na lâmina com SFB. Depois de secas, o corante May-Grünwald era adicionado nas câmaras por 1-3 minutos e em seguida o corante Giemsa, por 5-10 minutos, preparado no momento do uso pela adição de 1 gota do corante para cada mililitro de água destilada. A câmara plástica era destacada da lâmina para a contagem das células infectadas. A taxa de infecção era determinada pela porcentagem de macrófagos infectados. Além disso, determinamos o índice fagocítico através do número de parasitas dentro de cada macrófago infectado. O cálculo era feito utilizando-se a fórmula:

Índice fagocítico: %macrófagos infectados x número médio de leishmânia por macrófago.

## RESULTADOS



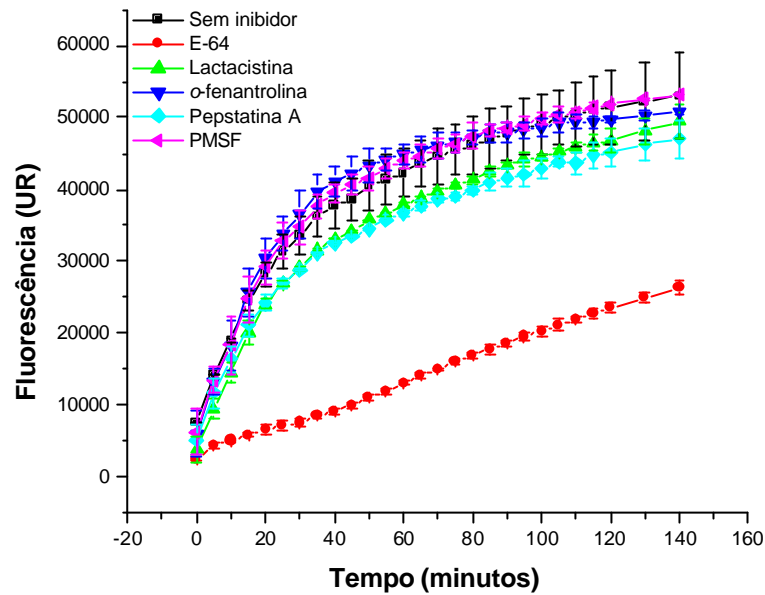
## **PURIFICAÇÃO DO PROTEASSOMA DE *Leishmania chagasi***

Iniciamos o processo de purificação, verificando a atividade proteolítica do extrato total de parasitas. Para tanto, as promastigotas de *Leishmania chagasi*, após serem lisadas em tampão Tris-HCl 25mM, EDTA 1mM, NaCl 150mM pH 7,5 por sonicação, foram submetidas à centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. Após uma nova centrifugação por 1 hora a 18000 rpm, ensaiamos o sobrenadante quanto a atividade proteolítica frente ao substrato N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC), que testa a atividade quimiotripsina-símile do proteassoma (**Figura 5**).

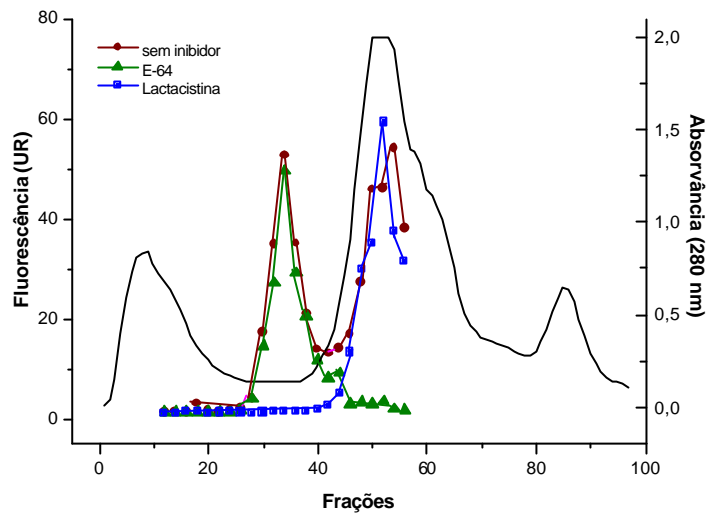
Verificamos uma alta atividade do extrato total, medida através da fluorescência emitida pela metilcumarina. Observamos que inibidores de serino-proteases (PMSF), aspartato-protease (Pepstatina A), metalo-protease (*o*-fenantrolina), além do inibidor específico de proteassoma, a lactacistina, interferem pouco com esta atividade. Por outro lado, o inibidor de cisteíno-protease (E-64) inibiu a atividade em aproximadamente 50%. O que provavelmente é devido à presença, no extrato, de grande quantidade de cisteíno-proteases da leishmânia. Com aproximadamente 30 mg de proteínas no extrato, passamos, então, para o processo de purificação, que foi feito em duas etapas: uma filtração molecular, seguida de uma troca aniônica.

### **Filtração molecular em Sephacryl S-400**

Como primeira etapa cromatográfica utilizamos uma coluna de filtração molecular, na qual as proteínas do extrato do parasita eram fracionadas. Obtinham-se sempre 3 picos, sendo que o proteassoma, com massa molecular aproximada de 700 kDa, era eluído no primeiro vale (**Figura 6**).



**Figura 5 - Atividade proteolítica do extrato total de promastigotas de *Leishmania chagasi*.** Dez microlitros do extrato eram adicionados a 90 $\mu$ l de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,8, contendo um dos inibidores: E-64 50 $\mu$ M, lactacistina 50 $\mu$ M, *o*-fenantrolina 1mM, pepstatina A 20 $\mu$ g/ml ou PMSF 1mM. A solução era mantida a temperatura ambiente por 30 minutos e então o substrato LLVY-AMC era adicionado, resultando em uma concentração final de 100 $\mu$ M. A atividade enzimática era monitorada por duas horas a 37°C. O resultado é apresentado pelas médias obtidas da leitura da fluorescência com excitação a  $\lambda=380$  nm e emissão a  $\lambda=440$ nm em espectrofluorímetro BioLumin<sup>TM</sup> 960.



**Figura 6 - Cromatografia em Sephacryl S-400.** Uma amostra do extrato total, contendo em torno de 36 mg de proteínas, foi aplicada a uma coluna de filtração molecular Sephacryl S 400 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 25mM pH 7,5 contendo EDTA 1mM e NaCl 150mM. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, em fluxo de 0,5 ml/min. Frações de 1,5 ml foram recolhidas e 20  $\mu$ l de cada uma foram ensaiados quanto à atividade proteolítica frente ao substrato LLVY-AMC, na presença de lactacistina (50 $\mu$ M) e E-64 (50 $\mu$ M). Sensibilidade 1,0.

A atividade proteolítica das frações era monitorada com o substrato N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC), na presença ou não dos inibidores lactacistina, específico para o proteassoma e o E-64, inibidor de cisteíno proteases.

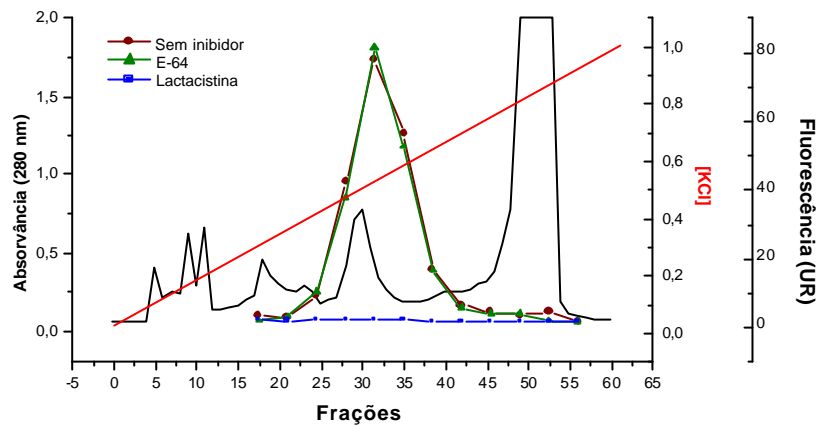
A atividade proteolítica quimiotripsina-símile, que era inibida pela lactacistina e não pelo E-64, estava associada às frações que continham o proteassoma, como representado na **figura 6**. Estas frações foram reunidas em um *pool* utilizado na próxima etapa.

### **Troca aniônica em Mono Q**

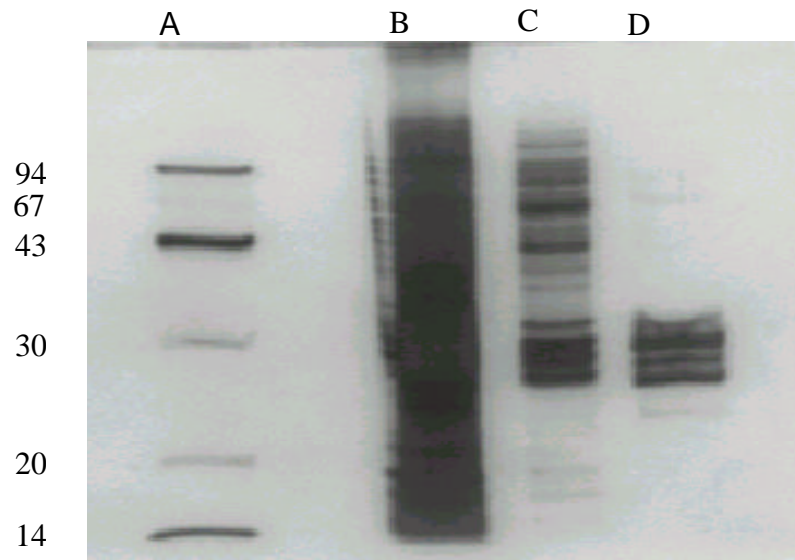
O *pool* de frações obtidas na filtração molecular era concentrado, dialisado contra tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e submetido a uma cromatografia de troca aniônica em coluna Mono Q, previamente equilibrada com o mesmo tampão. As proteínas eram eluídas com um gradiente linear de 0 - 1 M de KCl. Como mostrado na **figura 7**, obtinham-se vários picos de absorvância ao longo do gradiente salino. Cada uma das frações obtidas foram ensaiadas quanto a atividade proteolítica quimiotripsina-símile. A maior parte da atividade proteolítica, inibida pela lactacistina e não inibida pelo E-64, foi obtida em apenas um pico. As frações referentes a este pico foram, então, agrupadas em um *pool* e concentradas.

### **Caracterização do proteassoma de *L. chagasi***

Amostras de todas as etapas da purificação foram analisadas por SDS-PAGE. Como podemos observar na **figura 8**, há um enriquecimento de bandas com massa molecular entre 22 - 32 kDa, referentes às subunidades do proteassoma. Com isso, podemos sugerir que estamos com o proteassoma de *L. chagasi* parcialmente purificado.



**Figura 7 - Cromatografia em Mono Q.** O *pool* de frações obtidas na Sephacryl S-400, contendo em torno de 0,4 mg de proteínas, foi concentrado e dialisado por ultrafiltração contra o tampão Tris-HCl 20mM pH 8,0. A amostra foi então fracionada em coluna de troca aniônica Mono Q. A coluna foi lavada com o tampão inicial até a remoção das proteínas não ligadas. As proteínas retidas foram eluídas com um gradiente de 0 a 1 M de KCl. Sensibilidade 0,2. Frações de 0,5 ml foram recolhidas e 10  $\mu$ l de cada uma foram ensaiados quanto à atividade proteolítica frente ao substrato LLVY-AMC, na presença de lactacistina (50 $\mu$ M) e E-64 (50 $\mu$ M).



**Figura 8 - Análise por SDS-PAGE de amostras proteolíticamente ativas obtidas nas etapas de purificação do proteassoma de *L. chagasi*.** Aliquotas de cada passo da purificação, contendo 0,5  $\mu$ g de proteínas, foram separadas em gel 12,5%, e então coradas pela prata utilizando-se o *kit Plusone* (Pharmacia). Canaletas: A - Padrão de peso molecular; B - Extrato de promastigotas de *L. chagasi*; C - *Pool* de frações ativas obtidas após cromatografia de filtração molecular em coluna Sephacryl S-400; D - *Pool* de frações ativas obtidas após cromatografia de troca aniônica em coluna Mono Q.

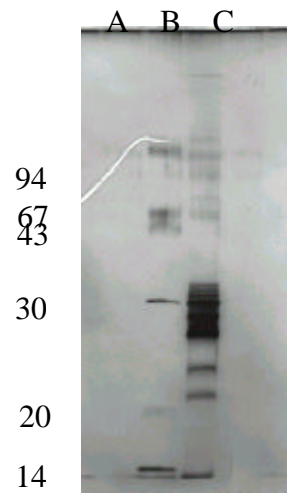
Como o proteassoma de organismos eucariotos possui 14 subunidades diferentes, fizemos um SDS-PAGE, com um gel de separação maior (aproximadamente 15 cm) para melhor observarmos o número de bandas. Foi possível identificar no proteassoma purificado até 10 bandas protéicas com massa molecular entre 22 e 32 kDa (**figura 9**).

O próximo passo da caracterização do proteassoma de *L. chagasi* foi verificar a sua atividade proteolítica frente a peptídeos sintéticos. Na **tabela I** podemos observar que o proteassoma possui atividade proteolítica frente aos dois substratos utilizados: N-succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC), que testa a atividade quimiotripsina-símile, e N-t-Boc-Leu-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (LRR-AMC), que testa a atividade tripsina-símile. É importante notar que o proteassoma de *L. chagasi* apresenta uma atividade tripsina-símile maior que a atividade quimiotripsina-símile.

**Tabela I:** Atividade proteolítica do proteassoma de *L. chagasi* sobre diferentes substratos

Substrato	Atividade proteolítica <sup>a</sup> (UR)
LLVY-AMC	2162
LRR-AMC	12014

<sup>a</sup> medida através da fluorescência emitida pela metilcumarina



**Figura 9 - Análise por SDS-PAGE do proteassoma purificado.** Uma alíquota de  $\mu\text{g}$  de proteassoma purificado foi fracionada em gel 12,5% e corada pela prata utilizando-se o *kit Plusone* (Pharmacia). Canaletas: A e D - Tampão da amostra; B - Padrão de peso molecular; C - Proteassoma de *L. chagasi* purificado.

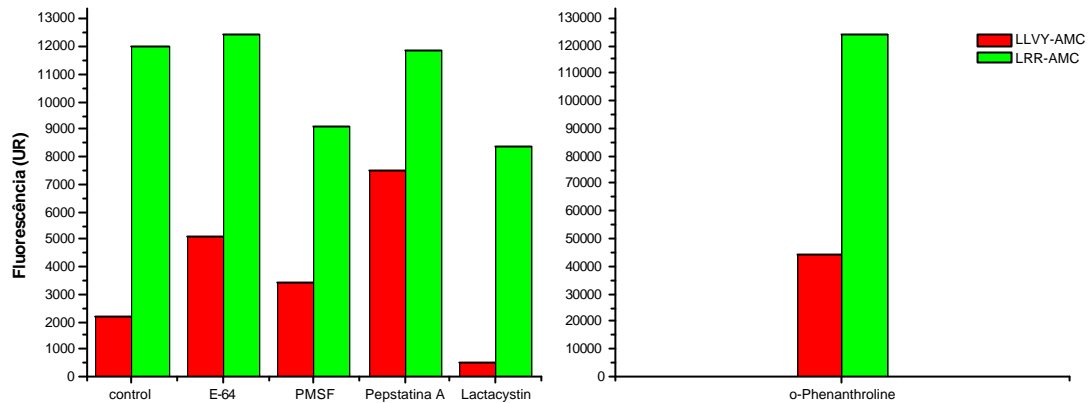


### Atividade proteolítica do proteassoma de *L. chagasi*

Para melhor caracterizar as atividades do proteassoma purificado de *L. chagasi* utilizamos os dois tipos de peptídeos sintéticos fluorogênicos, LLVY-AMC e LRR-AMC, e inibidores de todas as classes de protease, incluindo a lactacistina, inibidor específico do proteassoma. Como podemos observar na **Figura 10**, o proteassoma de *L. chagasi* degrada os dois peptídeos, sendo que ele apresenta uma maior atividade proteolítica sobre o peptídeo LRR-AMC, ou seja, uma maior atividade tripsina-símile.

Observamos também que a lactacistina inibiu em 75 % a atividade quimiotripsina-símile do proteassoma, e apenas 31% da atividade tripsina-símile. Em relação à atividade quimiotripsina-símile, observamos que os inibidores de outras classes de proteases, como o inibidor de cisteíno-proteases, E-64; o de serino-proteases, PMSF; aspartato-proteases, pepstatina-A; e em especial, o inibidor de metalo-proteases, a *o*-fenantrolina, aumentam a atividade do proteassoma. Enquanto os inibidores E-64, PMSF e pepstatina-A aumentam em 2,3, 1,6 e 3,5 vezes, a *o*-fenantrolina aumenta em 20 vezes a atividade quimiotripsina-símile do proteassoma.

Já a atividade tripsina símile, não foi afetada pelos inibidores E-64 e pepstatina-A, mas foi inibida em 24 % pelo inibidor PMSF. A *o*-fenantrolina também aumenta a atividade tripsina-símile, numa proporção de 10 x o controle.



**Figura 10 - Atividade proteolítica do proteassoma purificado.** O proteassoma purificado era incubado com os inibidores de protease E-64 (50 $\mu$ M), PMSF (1mM), *o*-fenantrolina (1mM), Pepstatina-A (20 $\mu$ g/ml) e o inibidor de proteassoma, lactacistina (50mM), à temperatura ambiente por 30 minutos. Os peptídeos, LLVY-AMC, para a atividade quimiotripsina-símile e LRR-AMC, para a atividade tripsina símile, eram então acrescentados. A atividade proteolítica era avaliada após duas horas de incubação a 37°C através da leitura de fluorescência emitida pela metilcumarina após excitação a 380nm e emissão a 440 nm. Resultados de um experimento representativo.

## **ESTUDO DO PAPEL DO PROTEASSOMA NO DESENVOLVIMENTO DAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania chagasi***

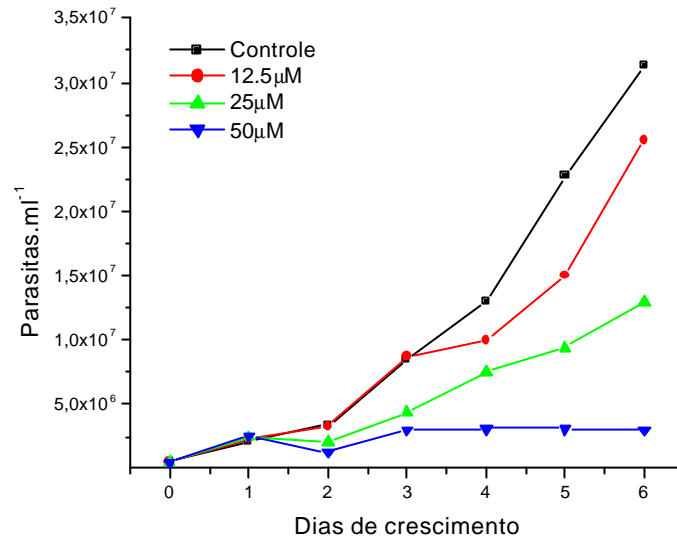
Nossa próxima etapa foi verificar a importância do proteassoma nos processos de infecção e desenvolvimento de promastigotas de *L. chagasi*. Para isto, utilizamos como ferramenta principal a lactacistina, o inibidor irreversível e específico do proteassoma. Inicialmente, investigamos o efeito da lactacistina no crescimento dos parasitas.

### **Efeito da lactacistina no crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. chagasi***

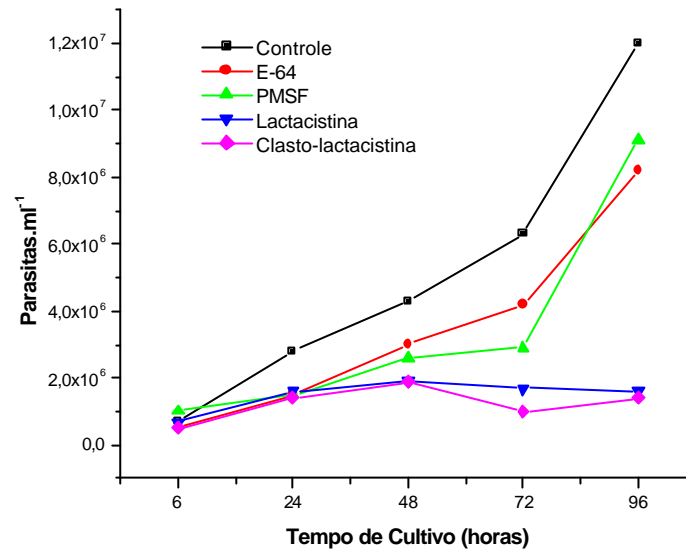
Para investigar o efeito da lactacistina sobre o crescimento *in vitro* dos parasitas, adicionamos às culturas de promastigotas lactacistina nas concentrações finais de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$ . O número de promastigotas na cultura era contado diariamente, utilizando-se o corante eritrosina-B para distinguirmos entre os parasitas vivos e mortos. Observamos que a lactacistina não interferia com a morfologia, mobilidade ou viabilidade dos parasitas, porém na concentração de 50  $\mu\text{M}$  havia um bloqueio na replicação das promastigotas (**figura 11**).

### **Efeito de outros inibidores de proteases no crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. chagasi***

Como utilizaríamos os inibidores E-64 e PMSF como controle em nossos experimentos, verificamos o efeito desses inibidores no crescimento dos parasitas. Como podemos observar na **figura 12**, esses inibidores não bloqueiam a replicação e o crescimento desses parasitas em cultura. Confirmando o resultado anterior, a lactacistina impediu a replicação das promastigotas. Além disso, a clasto-lactacistina  $\beta$  lactona, que é a forma ativa da lactacistina também inibiu o crescimento dos parasitas



**Figura 11 - Crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. chagasi* na presença de lactacistina.** As promastigotas de *L. chagasi* foram mantidas na presença da lactacistina nas concentrações de 12,5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  durante todos os dias de cultura. A contagem das promastigotas era feita diariamente utilizando-se o corante eritrosina-B para verificar o número de parasitas mortos e vivos.



**Figura 12 - Crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. chagasi* na presença de inibidores de protease.** As promastigotas de *L. chagasi* foram mantidas na presença de E-64 ( $50\mu\text{M}$ ), PMSF ( $1\text{mM}$ ), lactacistina ( $50\mu\text{M}$ ) ou clasto-lactacistina  $\beta$  lactona ( $36\mu\text{M}$ ) durante todos os dias de cultura. A contagem das promastigotas era feita diariamente utilizando-se o corante eritrosina-B para verificar o número de parasitas mortos e vivos.

Como a lactacistina é um inibidor irreversível da atividade proteolítica do proteassoma, analisamos o crescimento das promastigotas após a retirada da lactacisitna do meio de cultura. Como podemos observar na **figura 13**, o efeito de inibição do crescimento das promastigotas permanece mesmo após a retirada da lactacistina do meio de cultura. O mesmo efeito pode ser observado também para a clasto-lactacistina. Com os outros inibidores de proteases, E-64 e PMSF, as leishmânias permanecem com o seu crescimento normal.

### **Efeito da lactacistina na infectividade das promastigotas de *L. chagasi***

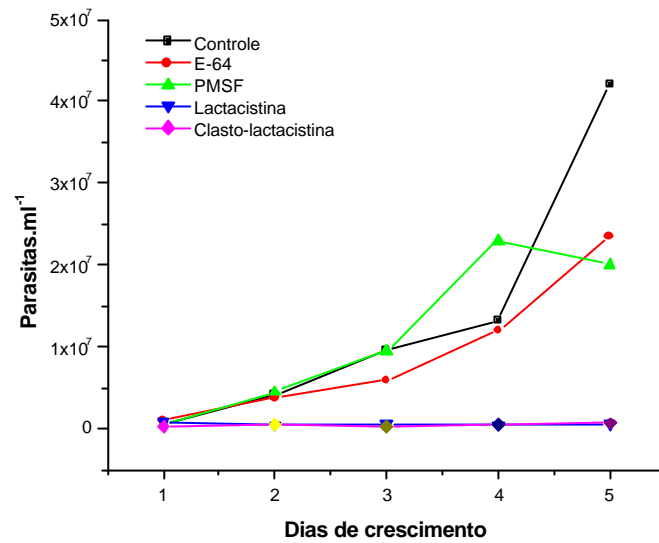
O primeiro passo para avaliar o papel do proteassoma no desenvolvimento intracelular de *L. chagasi* foi verificar a capacidade das promastigotas tratadas com lactacistina de infectar macrófagos murinos. Para isso, as promastigotas eram mantidas na presença de lactacistina ou dos inibidores de protease, E-64 ou PMSF, por aproximadamente 12 horas, e depois de lavadas, eram usadas para infectar macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. As culturas de macrófagos infectados eram mantidas a 37°C, após 24 horas, as lâminas eram lavadas para retirar as promastigotas não aderidas ou internalizadas e então coradas. Como podemos observar na **figura 14**, a lactacistina não interfere com a infectividade dos parasitas. Com 24 horas de infecção, tanto os macrófagos infectados com parasitas não tratados, quanto os macrófagos infectados com os parasitas tratados com lactacistina apresentaram uma taxa de infecção de 70%.

### **Efeito da lactacistina no desenvolvimento intracelular de *L. chagasi***

O desenvolvimento intracelular da *L. chagasi* também foi avaliado pelo tratamento das promastigotas com lactacistina e posterior infecção de macrófagos. As promastigotas eram

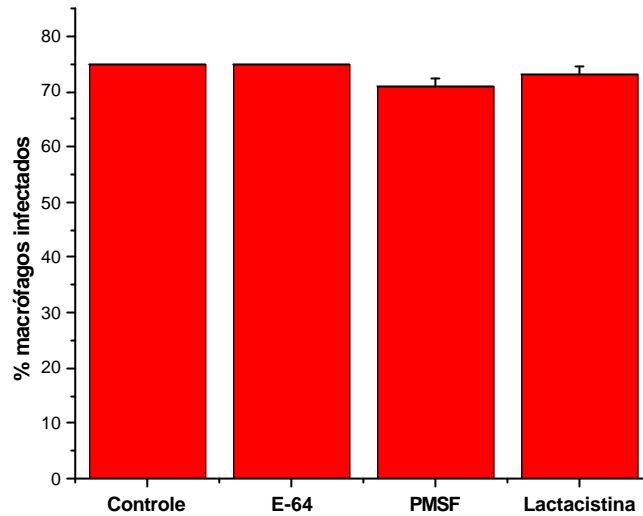
mantidas na presença do inibidor de proteassoma ou inibidores de protease por 12 horas e depois de lavadas eram usadas para infectar macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c *in vitro*. As culturas de macrófagos infectados eram mantidas a 37°C, e as lâminas coradas após 24, 48, 72 e 96 horas de infecção. Como podemos observar na **figura 15**, com 96 horas de cultura o número de parasitas intracelulares previamente tratados com lactacistina foi significativamente menor que o controle, indicando que a inibição do proteassoma afeta a multiplicação das leishmânias dentro da célula hospedeira, mas não a sua entrada na mesma. O tratamento das promastigotas com o inibidor de protease E-64 também causou uma diminuição no número de parasitas intracelulares, mas não foi tão acentuado quanto os parasitas tratados com lactacistina. As promastigotas tratadas com PMSF não conseguiram replicar eficientemente dentro dos macrófagos, provavelmente por causa da toxicidade do inibidor. Após o tratamento com PMSF, apesar de vivas, as promastigotas apresentavam mobilidade diminuída e a membrana não estava tão birrefringente quanto o controle, como observado após contagem com o corante eritrosina-B.

Para melhor expressar os resultados de infectividade dos macrófagos, utilizamos o índice fagocítico de 24 e 96 horas de infecção. Utilizando este índice, estamos analisando o número de leishmânias dentro de cada macrófago infectado. Como podemos observar na **figura 16**, com 96 horas de infecção, o número de parasitas intracelulares nos macrófagos infectados com promastigotas pré-tratadas com lactacistina foi muito baixo. O índice fagocítico foi de 0,03, enquanto o controle apresentou um índice de 3,09. Além da sua toxicidade, o PMSF deve ter afetado alguma serino-protease importante para o parasita, pois o índice fagocítico dos macrófagos infectados com promastigotas tratadas com PMSF foi de apenas 0,12, já com o E-64 foi de 2,55.

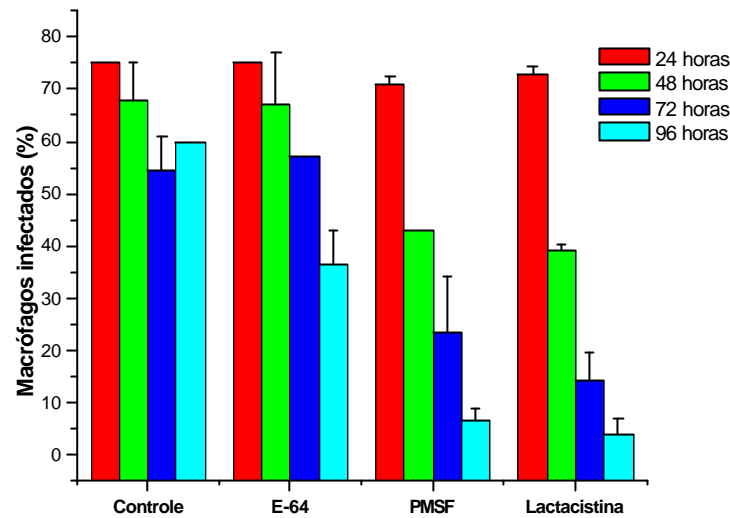


**Figura 13 - Crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. chagasi* após pré-tratamento com inibidores de protease.** As promastigotas de *L. chagasi* foram mantidas na presença de E-64 (50 $\mu$ M), PMSF (1mM), lactacistina (50  $\mu$ M) ou clasto-lactacistina  $\beta$  lactona (36 $\mu$ M) por aproximadamente 12 horas. Após este período as culturas foram lavadas 3 vezes com meio de cultura Schneider e mantidas em Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino. A contagem das promastigotas era feita diariamente utilizando-se o corante eritrosina-B para verificar o número de parasitas mortos e vivos.

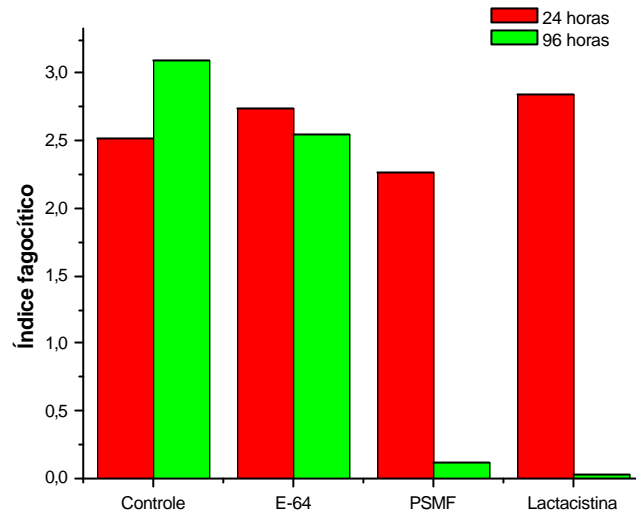




**Figura 14 - Efeito da lactacistina na infectividade das promastigotas de *L. chagasi*.** As promastigotas de *L. chagasi* foram mantidas na presença de E-64 (50 $\mu$ M), PMSF (1mM) ou lactacistina 50 $\mu$ M por aproximadamente 12 horas. Após este período, as promastigotas eram lavadas e a contagem era feita utilizando-se o corante eritrosina-B para verificar o número de parasitas mortos e vivos. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c eram infectados com 5 parasitas por macrófago, como descrito em materiais e métodos. Após 24 horas as lâminas eram coradas com May-Grünwald e Giemsa e o número de macrófagos infectados era contado em microscópio óptico. Era contado um campo com 100 macrófagos. Média de dois experimentos representativos.



**Figura 15 - Desenvolvimento intracelular de *L. chagasi* tratada com lactacistina.** As promastigotas de *L. chagasi* foram mantidas na presença de E-64 (50 $\mu$ M), PMSF (1mM), ou lactacistina 50 $\mu$ M por aproximadamente 12 horas. Após este período, as promastigotas eram lavadas e a contagem era feita utilizando-se o corante eritrosina-B para verificar o número de parasitas mortos e vivos. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c eram infectados com 5 parasitas por macrófago, como descrito em materiais e métodos. Após 24, 48, 72 e 96 horas as lâminas eram coradas com May-Grünwald e Giemsa e o número de macrófagos infectados era contado em microscópio óptico. Era contado um campo com 100 macrófagos. Média de dois experimentos representativos.



**Figura 16 - Desenvolvimento intracelular de *L. chagasi* tratadas com lactacistina analisado pelo índice fagocítico** As promastigotas de *L. chagasi* foram mantidas na presença de E-64 (50 $\mu$ M), PMSF (1mM) ou lactacistina 50 $\mu$ M por aproximadamente 12 horas. Após este período, as promastigotas eram lavadas e a contagem era feita utilizando-se o corante eritrosina-B para verificar o número de parasitas mortos e vivos. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c eram infectados com 5 parasitas por macrófago, como descrito em materiais e métodos. Após 24 e 96 horas as lâminas eram coradas com May-Grünwald e Giemsa. O número de macrófagos infectados e o número de parasitas dentro de cada macrófago era contado em microscópio óptico. Era contado um campo com 100 macrófagos. O cálculo do índice fagocítico era feito levando-se em consideração o número de leishmânias dentro de cada macrófago de acordo com a seguinte fórmula: percentual de macrófagos infectados multiplicado pelo número médio de leishmânia por macrófago.

## DISCUSSÃO

Assim como outros protozoário parasitas do gênero *Leishmania*, a *Leishmania chagasi* possui duas formas distintas durante o seu ciclo de vida: a forma promastigota, presente no inseto vetor e a forma amastigota, que vive em vacúolos citoplasmáticos dentro de macrófagos do hospedeiro vertebrado. A transformação da forma promastigota em amastigota ocorre quando o parasita desloca-se de um meio extracelular para um meio intracelular. Essa transformação é resultante de um profundo remodelamento morfológico, que envolve a reestruturação de organelas como o flagelo e o cinetoplasto, e o rearranjo do citoesqueleto para acomodar as variações de forma. As modificações morfológicas mais evidentes são no tamanho, no comprimento e no diâmetro do parasita. Também ocorre o encurtamento e o confinamento do flagelo na bolsa flagelar (DOYLE *et al.*, 1991). Além disso, ocorrem mudanças nas moléculas da superfície do parasita, possibilitando a sua sobrevivência dentro do ambiente hostil que são os vacúolos citoplasmáticos. Modificações estruturais também ocorrem em componentes da superfície das promastigotas de *Leishmania spp* durante a sua transformação de um estágio não-infectivo para um estágio infectivo para mamíferos. Esta transformação, chamada metaciclogênese, foi observada no trato digestivo de flebotomíneos infectados (SACKS & PERKINS, 1985) e, posteriormente, o mesmo processo foi visto durante o cultivo *in vitro* das promastigotas (SACKS & DA SILVA, 1987). As modificações mais marcantes que ocorrem durante este processo são o aumento no tamanho das moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) (McCONVILLE *et al.*, 1992), um dos principais componentes da membrana das promastigotas; e o espessamento do glicocálice (PIMENTA *et al.*, 1991). Em todos esses eventos, a proteólise dos componentes citoplasmáticos é de fundamental importância para a manutenção da homeostase do organismo.

Proteases estão claramente envolvidas na diferenciação de protozoários parasitas. A *Giardia lamblia*, por exemplo, requer uma cisteíno-protease, catepsina B-símile, para o seu encistamento (WARD *et al.*, 1997), enquanto o *Cryptosporidium parvum* depende de uma

serino-protease para esse encistamento do oocisto (FORNEY *et al.*, 1996). Em *Trypanosoma cruzi* foi demonstrado que uma cisteíno-protease, denominada cruzipaína, é importante para o crescimento e diferenciação do parasita. Estudando o papel da cruzipaína no desenvolvimento de *T. cruzi*, MEIRELLES e colaboradores (1992) demonstraram que a infectividade de tripomastigotas era inibida quando estas eram tratadas com inibidores sintéticos da cruzipaína. Além disso, estes inibidores bloqueavam a replicação das amastigotas e a sua transformação em tripomastigotas, indicando assim que a cruzipaína é importante para o desenvolvimento intracelular de *T. cruzi*.

O papel do proteassoma na regulação da homeostase celular já foi demonstrado em um grande número de organismos eucariotos. A sua função na diferenciação de protozoários parasitas como o *T. cruzi*, também já foi demonstrada. GONZÁLEZ e colaboradores (1996) mostraram que a transformação em culturas axênicas de tripomastigotas em amastigotas era inibida pela lactacistina ou pelos peptídeos aldeídicos. Também era inibido o desenvolvimento intracelular de amastigotas em tripomastigotas, evidenciando assim, a participação do proteassoma na diferenciação do protozoário.

Neste trabalho, nós purificamos o proteassoma do protozoário parasita, *Leishmania chagasi*, e utilizando o inibidor específico do proteassoma, a lactacistina, verificamos a importância desse complexo proteolítico nos processos de infecção e desenvolvimento de *L. chagasi* em macrófagos murinos.

Inicialmente, nós avaliamos a atividade proteolítica do extrato total de promastigotas de *L. chagasi*, frente ao substrato LLVY-AMC. Com esse substrato sintético, esta atividade proteolítica, quimiotripsina-símile, não era inibida pela lactacistina e sim pelo inibidor E64 (**figura 5**). A inibição parcial da atividade proteolítica do extrato pelo E-64 pode estar relacionada à presença de enzimas da família das cisteíno-proteases nesse extrato. A presença de cisteíno-proteases foi investigada em diferentes estágios de desenvolvimento de várias

espécies de *Leishmania*; e a atividade proteolítica foi detectada somente nas frações solúveis dos extratos de todas as espécies analisadas (TRAUB-CSEKO *et al.*, 1993).

A purificação do proteassoma de *L. chagasi* foi realizada por nós em dois passos de cromatografia em sistema de FPLC. No primeiro passo cromatográfico, uma filtração molecular, o extrato de promastigotas de *L. chagasi* foi fracionado em coluna de Sephacryl S-400 (**figura 6**). Realizada a separação das proteínas, uma atividade proteolítica inibida pela lactacistina foi detectada em torno de 700 kDa, o que é consistente com a massa molecular do proteassoma 20S de outras espécies (COUX *et al.*, 1996, GONZALEZ, 1996 e ROBERTSON, 1999). A atividade proteolítica obtida nestas frações era inibida pela lactacistina, mas não pelo E-64 (**figura 6**), indicando claramente a presença de atividade proteolítica compatível com a do proteassoma. O *pool* das frações obtidas na cromatografia de filtração molecular foi então fracionado em uma coluna Mono Q de troca aniônica. As frações com atividade proteolítica sobre o substrato LLVY-AMC, que eram inibidas pela lactacistina mas não pelo E-64, eram eluídas com aproximadamente 0,5 M de KCl (**figura 7**). A atividade proteolítica máxima ficou concentrada em apenas um pico. A análise por SDS-PAGE das amostras obtidas em cada um dos passos de purificação mostrou um enriquecimento de bandas com massa molecular variando de 22-32 kDa (**figura 8**). Essa massa molecular das bandas encontradas é consistente com o tamanho das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de proteassomas de outras espécies (COUX *et al.*, 1996, HUA *et al.*, 1996 e ROBERTSON, 1999). Após a cromatografia em Mono Q aparecem no gel apenas bandas com massas moleculares entre 22 e 32 kDa, provavelmente das subunidades do proteassoma de *L. chagasi*.

Uma amostra do proteassoma purificado foi analisada por SDS-PAGE, para melhor observarmos o número de bandas encontradas. Utilizamos um gel de separação de aproximadamente 15 cm de altura para haver uma maior separação das bandas. Com esse

procedimento, conseguimos observar até 10 bandas distintas, com massa molecular similar às daquelas das subunidades do proteassoma (**figura 9**). Com estes dados foi possível demonstrar a variedade de subunidades e a complexidade da estrutura do proteassoma de *L. chagasi*. O proteassoma de *L. chagasi*, como os proteassomas de outros eucariotos, é muito mais complexo em termos de número de subunidades diferentes que os proteassomas de *Termoplasma acidophilum*, que contém apenas dois tipos de subunidades (DAHLMANN *et al.*, 1989).

A atividade proteolítica do proteassoma purificado de *L. chagasi* foi testada sobre dois substratos sintéticos diferentes (**figura 10**). O complexo purificado hidrolisa peptídeos com resíduos básicos, Boc-Leu-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (LRR-AMC), e resíduos hidrofóbicos, suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC), ou seja, atividades tripsina-símile e quimiotripsina-símile, respectivamente. Utilizando o peptídeo LRR-AMC a atividade foi 5 vezes maior que quando utilizado o peptídeo LLVY-AMC. Já a inibição da atividade quimiotripsina-símile do proteassoma pela lactacistina foi muito mais eficiente que a inibição da atividade tripsina-símile. Com 50 $\mu$ M de lactacistina, a atividade do proteassoma sobre o peptídeo LLVY-AMC sofreu uma inibição de 75%, enquanto a atividade sobre o outro peptídeo, LRR-AMC, sofreu uma inibição de apenas 30%. Apesar da lactacistina se ligar específica e irreversivelmente ao sítio ativo do proteassoma, a inibição das atividades proteolíticas ocorre em diferentes taxas. CRAIU e colaboradores (1997) demonstraram que a lactacistina e a clasto-lactacistina  $\beta$ -lactona rapidamente inativam a atividade quimiotripsina-símile dos proteassomas 20S e 26S purificados de músculo esquelético de coelho. Enquanto que as atividades tripsina-símile e peptidilglutamil peptidase-símile desses proteassomas são inibidas mais lentamente e requerem altas concentrações de clasto-lactacistina  $\beta$ -lactona para a inibição.



O proteassoma purificado de *L. chagasi* apresenta duas das atividades proteolíticas clássicas descritas nos proteassomas de mamíferos. Em geral, os proteassomas de mamíferos possuem uma alta atividade quimiotripsina-símile, enquanto os proteassomas dos protozoários *Trypanosoma brucei* (HUA *et al.*, 1996), *T. cruzi* (GONZALEZ *et al.*, 1996) e *Entamoeba invadens* (GONZALEZ *et al.*, 1999) possuem uma alta atividade tripsina-símile e uma baixa atividade quimiotripsina-símile. Consistente com as atividades encontradas em outros protozoários, o proteassoma purificado de *L. chagasi* também apresenta uma alta atividade tripsina-símile e uma baixa atividade quimiotripsina-símile. Entretanto, o proteassoma de outro protozoário do gênero *Leishmania*, a *Leishmania mexicana*, parece não se encaixar neste padrão. O proteassoma da *L. mexicana* possui uma alta atividade quimiotripsina-símile e uma baixa atividade tripsina-símile (ROBERTSON, 1999), que é o padrão mais encontrado em células de mamíferos e outros organismos eucariotos. Estas diferenças nas atividades proteolíticas entre os proteassomas de protozoários, especialmente entre os membros do gênero *Leishmania*, ainda não foram explicadas e nem estudadas já que até o momento o único proteassoma de *Leishmania* purificado era o da *L. mexicana*. Estas diferenças podem estar relacionadas com a estrutura das subunidades  $\beta$  dos proteassomas, ou então, serem devido à composição de subunidades  $\beta$  que pode ser diferente de um parasita para outro. Mas isso só poderá ser elucidado futuramente, quando obtivermos o sequenciamento das subunidades  $\beta$  dos proteassomas de *Leishmania*.

A atividade tripsina-símile do proteassoma de *L. chagasi* não é alterada pelos inibidores de cisteíno-proteases (E-64) e de aspartil-proteases (pepstatina A) mas é bastante aumentada, cerca de 10 vezes, pela presença da *o*-fenantrolina. Por outro lado, o PMSF, que é um inibidor de serino-protease, inibiu cerca de 25%, esta atividade do proteassoma (**figura 10**). Este pequeno efeito inibitório do PMSF não é significativo, pois também foi observado em proteassomas de rato e de tripanossomas (HUA *et al.*, 1996). Já a atividade

quimiotripsina-símile foi aumentada na presença destes inibidores de proteases, sendo que com a *o*-fenantrolina esse aumento foi cerca de 20 vezes (**figura 10**). Para os proteassomas de *T. brucei* foi demonstrado que o inibidor TPCK (*tosyl-phenylalanine chloromethylketone*) aumenta as atividades proteolíticas dos proteassomas (HUA *et al.*, 1996). ORLOWSKI e colaboradores (1993) também demonstraram para proteassomas bovinos que o inibidor de serino proteases *3,4-dichloroisocoumarin*, provoca um grande aumento na atividade BrAAP. Com os dados obtidos das atividades proteolíticas e dos inibidores de proteases podemos descartar a possibilidade de contaminação da nossa preparação com outros tipos de proteases, já que os inibidores tiveram efeitos diferentes frente ao dois substratos utilizados.

Para analisarmos o papel do proteassoma no crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. chagasi* adicionamos lactacistina, o inibidor específico de proteassoma, às culturas de *L. chagasi*. A lactacistina afetou o crescimento das promastigotas de *L. chagasi* de forma dose dependente, sendo que na concentração de 50  $\mu$ M o crescimento dos parasitas foi totalmente bloqueado (**figura 11**). Isso sugere fortemente que a inibição do proteassoma interrompe a replicação do parasita. Outros autores também demonstraram que a lactacistina e outros inibidores que afetam a função do proteassoma, como o MG132 e o ALLN, bloqueiam o desenvolvimento de parasitas como *L. mexicana* (ROBERTSON, 1999), *Plasmodium falciparum* (GANTT *et al.*, 1998) e *Trypanosoma cruzi* (GONZALEZ *et al.*, 1996). MUTOMBA e colaboradores (1997) demonstraram que a inibição do proteassoma bloqueia o ciclo celular de tripanossomas africanos. Foi demonstrado que a incubação de formas procíclicas de *T. brucei* com a lactacistina leva ao acúmulo de células na fase G2 do ciclo celular e o bloqueio da progressão do ciclo de G2 para M. Por outro lado, a incubação de formas sangüíneas com lactacistina leva ao acúmulo de células em G1 e G2, indicando que a transição de G1 para S e de G2 para M também estavam bloqueadas. Resultados semelhantes foram obtidos por ROBERTSON (1999) com promastigotas de *L. mexicana*. A adição de

MG132 às culturas de *L. mexicana* causava um acúmulo de DNA 4N nas promastigotas. Todos esses dados sugerem que o proteassoma é necessário após a síntese de DNA e antes do término da mitose, uma vez que o crescimento do parasita é bloqueado em um ponto particular do ciclo celular quando o proteassoma é inativado. Isso pode ser explicado pela inibição da destruição de reguladores do ciclo celular durante a mitose. Por exemplo, a ciclina tipo B ativa quinases e são alvos para a ubiquitinação para posterior destruição pelo proteassoma 26S em células eucariotas. A inibição da destruição da ciclina tipo B bloqueia a saída da mitose e deixa a célula com dois grupos de cromossomos. Outras proteínas reguladoras do ciclo celular que são degradadas pelo proteassoma são os inibidores de quinases dependentes de ciclinas. A inibição da atividade quimi tripsina-símile do proteassoma de mamíferos com o peptídeo aldeídico N-acetil-Leucinil-Leucinil-Norleucinal-H (LLnL) resulta em acúmulo destes inibidores de quinases nas células, mostrando a importância do proteassoma na sua degradação (PAGANO *et al.*, 1995). O efeito observado no crescimento das promastigotas de *L. chagasi* durante a inibição do proteassoma, também pode ser devido à inibição da destruição de alguma proteína específica importante para o ciclo celular do parasita.

Outros inibidores de protease, como E-64 e PMSF, não afetam drasticamente o crescimento das promastigotas de *L. chagasi*. Já a forma ativa do inibidor lactacistina, a clasto-lactacistina  $\beta$  lactona, assim como a lactacistina, bloqueia o crescimento dos parasitas (**figura 12**). Como o E-64 e o PMSF inibem algumas famílias de proteases, eles apenas retardam o crescimento dos parasitas, mas não bloqueiam completamente a replicação dos mesmos, como acontece quando utilizamos a lactacistina ou a clasto-lactacistina  $\beta$  lactona. É importante ressaltar que as culturas de promastigotas estavam sob constante pressão das drogas; e que a lactacistina, ou a clasto-lactacistina  $\beta$  lactona, bloqueavam a replicação do parasita, mas não eram letais, pelo menos por um período de seis dias.

Como a lactacistina ou a sua forma ativa, a clasto-lactacistina  $\beta$  lactona, são inibidores irreversíveis das atividades do proteassoma, provavelmente, a sua retirada do meio de cultura não deveria reverter o bloqueio no processo de replicação dos parasitas. As leishmânias permaneciam por 12 horas na presença dos inibidores e depois eram transferida para meio de cultura sem o inibidor. As promastigotas pré-tratadas com E-64 e PMSF continuaram com o padrão normal de crescimento. Nesse experimento, houve um maior crescimento dos parasitas se comparado com o experimento anterior em que os parasitas permaneciam em contato com os inibidores durante todos os dias de cultura. Enquanto que as promastigotas tratadas com lactacistina e clasto-lactacistina  $\beta$  lactona continuaram com o seu crescimento bloqueado (**figura 13**). Estes resultados mostram claramente que a lactacistina é um inibidor irreversível da atividade do proteassoma e que a inibição dessa atividade bloqueia o crescimento das promastigotas de *L. chagasi*, sem afetar a viabilidade dos parasitas.

Uma vez que os parasitas tratados com a lactacistina não eram lesados pelo tratamento, verificamos então se estes parasitas seriam capazes de infectar as células de hospedeiro vertebrado. Para isso, infectamos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c com as promastigotas pré-tratadas com os inibidores. A lactacistina não tem efeito na infectividade das promastigotas de *L. chagasi*, implicando assim que a atividade do proteassoma não é necessária para a entrada e estabelecimento dos parasitas nas células hospedeiras. Tanto as leishmânias mantidas com lactacistina, quanto as leishmânias mantidas sem tratamento ou tratadas com E-64 ou PMSF tiveram uma taxa inicial de infecção de 70% (**figura 14**). Nestes experimentos, nós tentamos eliminar os possíveis efeitos das drogas nas células hospedeiras. Para isso, os parasitas tratados eram lavados antes da incubação com os macrófagos peritoneais. A inibição do proteassoma pela lactacistina não tem efeito no processo de invasão. A internalização dos parasitas ocorre via um processo de fagocitose convencional mediado por receptores do macrófago ou então por vários sistemas ligante-

receptor. Dependendo do estágio da *Leishmania*, a composição da superfície do protozoário pode selecionar diferentes receptores na membrana da célula fagocitária. No caso das promastigotas, macromoléculas como o lipofosfoglicano (LPG) expõe resíduos de açúcar que podem interagir com receptores manose-fucose, receptores de complemento e outros receptores na superfície do macrófago. Grande parte da superfície das amastigotas é coberta por glicosilfosfatidilinositol fosfolípides (GIPLs) que podem estar envolvidos na invasão do macrófago pelo parasita e na sua proteção dentro do vacúolo parasitóforo. Mas para o sucesso da infecção e propagação do patógeno, a interação da leishmânia com macrófago tem que envolver a criação de condições ideais para o estabelecimento da infecção; além do impedimento da resposta imunológica e da destruição da maquinaria da célula hospedeira (HENRIQUE & DE SOUZA, 2000).

Apesar da lactacistina não afetar a penetração das promastigotas na célula hospedeira, o desenvolvimento dos parasitas foi afetado. A taxa de macrófagos infectados com promastigotas de *L. chagasi* tratadas com lactacistina diminuiu drasticamente com o tempo de infecção, alcançando uma taxa de 4%, após 96 horas de infecção. Nos macrófagos infectados com leishmânias não tratadas a taxa foi de 60% (**figura 15**). Também observamos este efeito através do índice fagocítico (**figura 16**). Analisando o número médio de leishmânias dentro de cada macrófago e relacionando com a porcentagem de macrófagos infectados pudemos observar melhor a diferença de infecção das promastigotas pré-tratadas. Com 24 horas de infecção não havia diferença significativa entre os índices fagocíticos dos parasitas tratados e não tratados. Já com 96 horas de infecção, o índice fagocítico dos macrófagos infectados com parasitas tratados com a lactacistina foi de apenas 0,03; enquanto que dos parasitas não tratados foi de 3,09 e dos tratados com E-64 foi 2,55. Inesperadamente, a taxa de infecção dos macrófagos infectados com parasitas tratados com PMSF teve uma diminuição com o tempo e também apresentou um índice fagocítico baixo, 0,12, após 96 horas de infecção. Como o

PMSF é um inibidor bastante tóxico, ele pode ter afetado a viabilidade dos parasitas, pois além de inibir todos os tipos de serino protease, ele também pode inibir algumas cisteíno-proteases.

Estas observações são consistentes com estudos que mostraram os efeitos inibitórios dos inibidores de proteassoma no crescimento e/ou diferenciação celular de protozoários parasitas como o *T. cruzi* (GONZALEZ *et al.*, 1996), *T. brucei* (MUTOMBA *et al.*, 1997, MUTOMBA & WANG, 1998), *Plasmodium spp.* (GANNTT *et al.*, 1998) e *Toxoplasma gondii* (SHAW *et al.*, 2000). Em todos esses estudos foi demonstrada a importância do proteassoma nos processos de replicação, crescimento e diferenciação dos parasitas.

Com nossos resultados, podemos sugerir que a inibição do proteassoma pela lactacistina interfere com o desenvolvimento intracelular de *L. chagasi*. Isso pode ser devido à inibição da transformação das promastigotas em amastigotas, mas também há a possibilidade da lactacistina estar inibindo a proliferação das amastigotas, já que os proteassomas regulam, em células eucariotas, o ciclo celular. Em qualquer um dos casos, estes experimentos mostraram que os efeitos da lactacistina persistem durante o desenvolvimento intracelular do parasita. Já que a lactacistina é um inibidor irreversível dos proteassomas, o tratamento das promastigotas com esta droga pode ter afetado irreversivelmente uma função essencial do parasita, a qual é dependente do proteassoma.

A atividade do proteassoma é necessária para a replicação e desenvolvimento intracelular de *L. chagasi*. Mas as proteínas que são degradadas durante estes processos ainda não foram identificadas. Provavelmente há proteínas que mantêm a forma do parasita, como elementos do citoesqueleto; grupos de proteínas ou enzimas envolvidas em vias metabólicas; e proteínas estágio-específicas que precisam ser degradadas. Além disso, a degradação pelo proteassoma de proteínas regulatórias, pode desencadear mecanismos que iniciam o processo de diferenciação ou modificações estágio-específicas importantes para o parasita.

Além de modificações morfológicas, durante o processo de diferenciação, há uma intensa replicação de DNA e também expressão de fatores de transcrição que controlam a expressão de genes estágio-específicos. Qualquer um desses sistemas pode ser regulado pela ação do proteassoma e ser um modelo útil para o estudo da diferenciação de protozoários parasitas.

Deste modo, sugerimos que a atividade proteolítica do proteassoma é necessária para replicação *in vitro* de promastigotas de *L. chagasi*, mas não interfere com a sua invasão em células hospedeiras. Por outro lado, o proteassoma também é importante para o desenvolvimento intracelular de *L. chagasi*, mas a sua função precisa neste processo ainda necessita ser elucidada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



AKI, M., SHIMBARA, N., TAKASHIMA, M., AKIYAMA, K., KAGAWA, S., TAMURA, T., TANAHASHI, N., YOSHIMURA, T., TANAKA, K. and ICHIHARA, A. (1994). Interferon- $\gamma$  induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. **The Journal of Biochemistry** **115**: 257-269.

ARENDRT, C. S. and HOCHSTRASSER, M. (1999). Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. **The EMBO Journal** **18**: 3575-3585.

ARRIGO, A. P., TANAKA, K., GOLDBERG, A. L. and WELCH, W. J. (1988). Identity of the 19S "prosome" particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). **Nature** **331**: 192-194.

BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** **72**: 248-254.

BRANDÃO-FILHO, S. and SHAW, J. (1994). Leishmaniasis in Brazil. **Parasitology Today** **10 (9)**: 329-330.

CHANG, K. P. (1990). Cell Biology of *Leishmania*. In D. J. Wyler (ed.): Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects. New York: W. H. Freeman & Co., p. 79-90.

- CHAU, V., TOBIAS, J. W., BACHMAIR, A. MARRIOTT, D., ECKER, D. J., GONDA, D. K. and VARSHAVSKY, A. (1989). A multi-ubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. **Science** **243**: 1576-1583.
- CHEN, P. and HOCHSTRASSER, M. (1996). Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. **Cell** **86**:961-72.
- COUX, O., TANAKA, K. and GOLDBERG, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. **Annual Review of Biochemistry** **65**: 801–847.
- CRAIU, A., GACZYNSKA, M., AKOPIAN, T., GRAMM, C. F., FENTEANY, G., GOLDBERG, A. L. and ROCK, K. L. (1997). Lactacystin and *clasto*-Lactacystin  $\beta$ -lactone modify multiple proteasome  $\beta$ -subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. **The Journal of Biological Chemistry** **272**: 13437-13445.
- DAHLMANN, B., KOPP, F., KUEHN, L., NIEDEL, B., PFEIFER, G., HERGEL R. and BAUMEISTER, W. (1989). The multicatalytic proteinase (prosome) is ubiquitous from Eukaryotes to Archaeobacteria. **FEBS Letters** **251**: 125-131.
- DICK, L. R., CRUIKSHANK, A. A., GRENIER, L., MELANDRI, F. D., NUNES, S. L. and STEIN, R. L. (1996). Mechanistic studies on the inactivation of the proteasome by lactacystin. **The Journal of Biological Chemistry** **271**: 7273-7276.

- DOYLE, P. S., ENGEL, J. C., PIMENTA, P. F. P., DA SILVA, P. P. and DWYER, D. M.(1991). *Leishmania donovani*: long-term culture of axenic amastigotes at 37°C. **Experimental Parasitology 73**: 326-334.
- DUNN, B. M. (1994). Determination of protease mechanism. In: Beynon, R. J. and Bond, J. S. (ed) *Proteolytic enzymes: a practical approach*. IRL Press, Oxford University. Cap. 4, p. 57 - 82.
- FENTEANY, G., STANDAERT, R. F., REICHARD, G. A., COREY, E. J. and SCHREIBER, S. L. (1994). A  $\beta$ -lactone related to lactacystin induces neurite outgrowth in a neuroblastoma cell line and inhibits cell cycle progression in an osteosarcoma cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91**: 3358-3362.
- FENTEANY, G., STANDAERT, R. F., LANE, W. S., CHOI, S., COREY, E. J. and SCHREIBER, S. L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. **Science 268**: 726-731.
- FERRELL, K., WILKINSON, C. R. M., DUBIEL, W. and GORDON, C. (2000). Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. **Trends in Biochemical Science 25**: 83-88.
- FORNEY, J. R., YANG, S. and HEALY, M. C. (1996). Protease activity associated with excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts. **The Journal of Parasitology 82**: 889-892.

- GANTT, S. M., MYUNG, J. M., BRIONES, M. R. S., LI, W. D., COREY, E. J., OMURA, S., NUSSENZWEIG, V. and SINNIS, P. (1998). Proteasome inhibitors block development of *Plasmodium spp.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **42**: 2731-2738.
- GENARO, O. (2000). Leishmaniose visceral americana. In: Neves, D. P. (10<sup>a</sup> ed) *Parasitologia Humana*. São Paulo, Editora Atheneu. Cap. 10, p. 56 - 72.
- GIAIMIS, J., LOMBARD, Y., MAKAYA-KUMBA, M., FONTENEAU, P., and POINDRON, P. (1992). A new and simple method for studying the binding and ingestion steps in the phagocytosis of yeasts. **Journal of Immunological Methods** **154**: 185-193.
- GLICKMAN, M. H., RUBIN, D. M., COUX, O., WEFES, I., PFEIFER, G., CJEKA, Z., BAUMEISTER, W., FRIED, V. A. and FINLEY, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. **Cell** **94**: 615-623.
- GOLDBERG, A. L. (1995). Functions of the proteasome: the lysis at the end of the tunnel. **Science** **268**: 522-523.
- GOLDBERG, A. L. and ROCK, K. L. (1992). Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. **Nature** **357**: 375-379.

- GONZALEZ, J., RAMALHO-PINTO, F. J., FREVERT, U., GHISO, J., TOMLINSON, S., SCHARFSTEIN, J., COREY, E. J. and NUSSENZWEIG, V. (1996). Proteasome activity is required for the stage-specific transformation of a protozoan parasite. **Journal of Experimental Medicine** **184**: 1909-1918.
- GONZALEZ, J., FREVERT, U., GHISO, J., COREY, E. J. NUSSENZWEIG, V. and EICHINGER, D. (1997). Proteasome function is required for encystation of *Entamoeba invadens*. **Archives of Medical Research** **28**, Suppl., S139-S140.
- GONZALEZ, J., GUANGXING, B., FREVERT, U., COREY, E. J. and EICHINGER, D. (1999). Proteasome-dependent cyst formation and stage-specific ubiquitin mRNA accumulation in *Entamoeba invadens*. **European Journal of Biochemistry** **264**: 897-904.
- GORDON, S., UNKELESS, J. C. and COHN, Z. A. (1974). Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis; evidence for a two-stage process. **Journal of Experimental Medicine** **140**: 995-1010.
- GRAY, C. W., SLAUGHTER, C. A., and DEMARTINO, G. N.(1994). PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. **Journal of Molecular Biology** **236**: 7-15.
- GRIFFIN, T. A., NANDI, D., CRUZ, M., FEHLING, H. J., VAN KAER, L., MONACO, J. J. and COLBERT, R. A. (1998). Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation

of interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) inducible subunits. **The Journal of Experimental Medicine** **187**: 97-104.

GRIMALDI Jr, G. and TESH, R. B. (1993). Leishmaniasis of the new world current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Review** **6**: 230-250

GRIMALDI Jr., G., TESH, R. B. and McMAHON-PRATT, D. (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **41**: 687-725.

GRZIWA, A., BAUMEISTER, W., DAHLMANN, B. and KOPP, F. (1991). Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. **FEBS Letters** **290**: 186-190.

HAAS, A. L. and SIEPMANN, T. J. (1997). Pathways of ubiquitin conjugation. **The FASEB Journal** **11**: 1257-1268.

HANDMAN, E. (2000). Cell Biology of *Leishmania*. **Advances in Parasitology** **44**: 1-39.

HENRIQUES, C. and DE SOUZA, W. (2000). Redistribution of plasma-membrane surface molecules during formation of the *Leishmania amazonensis*-containing parasitophorous vacuole. **Parasitology Research** **86**: 215-225.

HIRSCH, C. and PLOEGH, H. L. (2000). Intracellular targeting of the proteasome. **Trends in Cell Biology** **10**: 268-272.

- HUA, S., TO, W., NGUYEN, T. T., WONG, M. and WANG, C. C. (1996). Purification and characterization of proteasomes from *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology** **78**: 33-46.
- KISSELEV, A. F., AKOPIAN, T. N. and GOLDBERG, A. L. (1998). Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. **Journal of Biological Chemistry** **273**: 1982-1989.
- KISSELEV, A. F., AKOPIAN, T. N., WOO, K. M. and GOLDBERG, A. L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20S proteasomes - implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. **Journal of Biological Chemistry** **274**: 3363-3371.
- KLOETZEL, P-M. (2001). Antigen processing by the proteasome. **Nature reviews Molecular Cell Biology** **2**: 179-187.
- KNOWLTON, J. R., JOHNSTON, S. C., WHITBY, F. G., REALINI, C., ZHANG, Z., RECHSTEINER, M. and HILL, C. P.(1997). Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha). **Nature** **390**:639-43.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680-685.

- LAINSON, R. and SHAW, J. J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W. & Killick-Kendrick, R. (eds). **The leishmaniases in Biology and Medicine**. Biology and epidemiology. London. Academic Press. vol.1, chap.1, 1-120.
- LEE, D. H. and GOLDBERG, A. L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. **Trends in Cell Biology 8**: 397-403.
- LÖWE, J., STOCK, D., JAP, B., ZWICKL, P., BAUMEISTER, W. and HUBER, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å<sup>0</sup> resolution. **Science 268**: 533 – 539.
- MAUPIN-FURLOW, J. A. and FERRY, J. G. (1995). A proteasome from the methanogenic archaeon *Methanosarcine thermophila*. **Journal of Biological Chemistry 270**: 28617-28622.
- McCONVILLE, M. J., TURCO, S. J., FERGUNSON, M. A. and SACKS, D. L. (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **The EMBO Journal 11**: 3593-3600.
- MEIRELLES, M. N., JULIANO, L., CARMONA, E., SILVA, S. G., COSTA, E. M., MURTA, A. C. and SCHARFSTEIN, J. (1992). Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. **Molecular and Biochemical Parasitology 52**: 175-184.



- MUTOMBA, M. C., TO, W-Y., HYUN, W. C. and WANG, C. C. (1997). Inhibition of proteasome activity blocks cell cycle progression at specific phase boundaries in african trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology** **90**: 491-504.
- MUTOMBA, M. C. and WANG, C. C. (1998). The role of proteolysis during differentiation of *Trypanosoma brucei* from the bloodstream to the procyclic form. **Molecular and Biochemical Parasitology** **93**: 11-22.
- NAGY, I., TAMURA, T., VANDERLEYDEN, J., BAUMEISTER, W. and De MOT, R. (1998). The 20S proteasome of *Streptomyces coelicolor*. **Journal of Bacteriology** **180**:5448-5453.
- NANDI, D., WOODWARD, E., GINSBURG, D. B. and MONACO, J. J. (1997). Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: implications for the assembly of precursor  $\beta$  subunits. **The EMBO Journal** **16**: 5363-5375.
- NEURATH, H. (1994) The Diversity of proteolytic enzymes. In: Beynon, R. J. and Bond, J. S. (ed) Proteolytic enzymes: a practical approach. IRL Press, Oxford University. Cap. 1, p. 1 - 14.
- NUSSBAUM, A. K., DICK, T. P., KEILHOLZ, W., SCHIRLE, M., STEVANOVIC, S., DIETZ, K., HEINEMEYER, W., GROLL, M., WOLF, D. H., HUBER, R. and HANS-GEORG, R. and HANSJÖRG, S. (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome  $\beta$  subunits deduced from digests of enolase1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **95**: 12504-12509.

- ORLOWSKI, M., CARDOZO, C. and MICHAUD, C. (1993). Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. **Biochemistry** **32**: 1563-1572.
- PAGANO, M., TAM, S. W., THEODORAS, A. M., BEER-ROMERO, P., DEL SAL, G., CHAU, V., YEW, P. R., DRAETTA, G. F. and ROLFE, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. **Science** **269**: 682-685.
- PALOMBELLA, V. J., RANDO, O. J., GOLDBERG, A. L. and MANIATIS, T. (1994). The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B1 precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. **Cell** **78**:773-785.
- PEARSON, R. D. and SOUZA, A. Q. (1996). Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious diseases** **22**: 1-11.
- PIMENTA, P. F. P., SARAIVA, E. M. B. and SACKS, D. L. (1991). The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. **Experimental Parasitology** **72**: 191-204.
- RIVETT, A. J. (1989). The multicatalytic proteinase. **The Journal of Biological chemistry** **264**: 12215-12219.

- ROBERTSON, C. D. (1999). The *Leishmania mexicana* proteasome. **Molecular and Biochemical Parasitology** **103**: 49-60.
- ROCK, K. L., GRAMM, C., ROTHSTEIN, L., CLARK, K., STEIN, R., DICK, L., HWANG, D. and GOLDBERG, A. L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. **Cell** **78**: 761-771.
- RUSSEL, D. G. (1995). Mycobacterium and Leishmania: stowaways in the endosomal network. **Trends in Cell Biology** **5**: 125-128.
- SACKS, D. L. and DA SILVA, R. P. (1987). The generation of infective stage of *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. **The Journal of Immunology** **139**: 3099-3106.
- SACKS, D. L. and PERKINS, P. V. (1985). Development of infective stage of *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sandflies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **34**: 456-459.
- SCHMIDT, M. and KLOETZEL, P.M. (1993). Biogenesis of eukaryotic 20S proteasomes: the complex maturation pathway of a complex enzyme. **The FASEB Journal** **11**: 1235-1243.

- SEEMÜLLER, E., LUPAS, A., STOCK, D., LÖWE, J., HUBER, R. and BAUMEISTER, W. (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. **Science** **268**: 579-582.
- SHAW, M. K., HE, C. Y., ROOS, D. S. and TILNEY, L. G. (2000). Proteasome inhibitors block intracellular growth and replication of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology** **121**: 35-47.
- TO, W-Y. and WANG, C. C. (1997). Identification and characterization of an activated 20S proteasome in *Trypanosome brucei*. **FEBS Letters** **404**: 253-262.
- TRAUB-CSEKO, Y.M., ALMEIDA, R. W., BOUKAI, L. K., COSTA-PINTO, D., DUBOISE, S. M. and McMAHON-PRATT, D. (1993). Cysteine proteinase of *Leishmania*. **Ciência e Cultura** **45**: 339-342.
- VOGES, D., ZWICKL, P. and BAUMEISTER, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. **Annual Review of Biochemistry** **68**: 1015-1068.
- WARD, W., ALVARADO, L., RAWLINGS, N. D., ENGEL, J. C., FRANKLIN, C. and McKERROW, J. H. (1997). A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for encystation of *Giardia*. **Cell** **89**: 437-444.
- WEISSMAN, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. **Nature reviews Molecular Cell Biology** **2**: 169-178.

WENZEL, T. and BAUMEISTER, W. (1993). *Thermoplasma acidophilum* proteasomes degrade partially unfolded and ubiquitin-associated proteins. **FEBS Letters** **326**: 215-218.

WHO/OMS - World Health Organization/ Organisation Mondiale de La Santé (2000). Disease and its impact. Geographical distribution. Disponível em: **<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>**  
Acessado em: 25/01/2001

ZÜHL, F., TAMURA, T., DOLENC, I., CEJKA, Z, NAGY, I., De MOT, R. and BAUMEISTER, W. (1997a). Subunit topology of the *Rhodococcus* proteasome. **FEBS Letters** **400**: 83-90.

ZÜHL, F., SEEMÜLLER, E., GOLBIK, R. and BAUMEISTER, W. (1997b). Dissecting the assembly pathway of the 20s proteasome. **FEBS Letters** **418**: 189-194.

ZWICKL, P., BAUMEISTER, W. and STEVEN, A. (2000). Dis-assembly lines: the proteasome and related ATPase-assisted proteases. **Current Opinion in Structural Biology** **10**: 242-250.