

KAROLINE MATHIAS LEITE

Análise da participação da Oligopeptidase B e Triparedoxina peroxidase
citoplasmática na virulência de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

Leite KM. Análise da participação da Oligopeptidase B e Triparedoxina peroxidase citoplasmática na virulência de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Leishmania ssp. são protozoários parasitas responsáveis por um complexo de doenças conhecidas como leishmanioses. Apresentam duas formas evolutivas principais: a promastigota flagelada, no todo digestivo do inseto vetor e a amastigota sem flagelo externo, no interior das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), preferencialmente macrófagos, do hospedeiro vertebrado. A capacidade de sobrevivência e multiplicação no interior de células especializadas na destruição de patógenos deve-se à capacidade do parasito de burlar a propriedade microbicida destas células pela produção de moléculas denominadas fatores de virulência. Estudos prévios do nosso laboratório compararam o proteoma de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de lesões de BALB/c e BALB/c nude com o intuito de analisar o impacto da presença de linfócitos T na expressão de proteínas do parasita. Dentre as proteínas diferencialmente expressas encontramos isoformas da Oligopeptidase B (OPB), uma serino peptidase que hidrolisa peptídeos de até 30 aminoácidos em resíduos de lisina e arginina, e da Triparedoxina peroxidase citoplasmática (CPX), proteína antioxidante que participa da detoxificação de hidroperóxidos. As duas tiveram isoformas significativamente mais expressas na ausência de linfócitos T, ou seja, nos parasitos isolados de BALB/c nude, e já foram descritas como fatores de virulência em tripanossomatídeos. De fato, promastigotas de *L.(L.) major* deficientes em OPB apresentaram significante redução na infecção e sobrevivência em macrófagos *in vitro* e lesões de evolução mais lenta no modelo murino de infecção na pata. De forma análoga, promastigotas de *L.(L.) donovani* superexpressoras de CPX apresentaram maior carga parasitária em macrófagos *in vitro*. Considerando a importância da *L.(L.) amazonensis* na epidemiologia da leishmaniose no Brasil, nosso objetivo foi analisar a importância da OPB e CPX na virulência desta espécie utilizando parasitas superexpressores e proteínas solúveis em modelos murinos de infecção *in vitro* e *in vivo*. Mostramos que a superexpressão de CPX aumentou a infectividade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* *in vitro* e que a proteína OPB solúvel também aumentou a infecção de macrófagos por essa espécie de *Leishmania*.

Palavras-chave: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Oligopeptidase B. Triparedoxina peroxidase citoplasmática. Fatores de virulência.

ABSTRACT

Leite KM. Analysis of the participation of Oligopeptidase B and Cytoplasmic Tryparedoxin Peroxidase in virulence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. [Masters thesis (Biology of the Pathogen-Host Relation)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Leishmania ssp. are parasitic protozoa responsible for a disease complex known as leishmaniasis. They present two major developmental forms: the flagellated promastigote in the digestive tract of the vector, and amastigote without external flagella inside cells of the mononuclear phagocytic system, preferably macrophages of the vertebrate host. The ability for survival and multiplication in cells specialized in the destruction of pathogens is due to the ability of the parasite to evade the microbicidal properties of these cells by the production of molecules called virulence factors. Previous studies from our laboratory compared the proteome of *L. (L.) amazonensis* amastigotes obtained from BALB/c and BALB/c nude lesions in order to analyze the impact of the presence of T lymphocytes in the expression of parasite's proteins. Among the differentially expressed proteins we found isoforms of Oligopeptidase B (OPB), a serine peptidase that hydrolyzes peptides up to 30 amino acids in lysine and arginine residues, and cytoplasmic tryparedoxin peroxidase (CPX), an antioxidant protein that participates in the detoxification of hydroperoxides. Both proteins had isoforms significantly more expressed in the absence of T lymphocytes, that is, in parasites isolated from BALB/c nude, and have been described as virulence factors in trypanosomes. In fact, promastigotes of *L. (L.) major* deficient for OPB showed significant reduction in infection and survival in macrophages *in vitro* and lesions of slower evolution in the murine model of footpad infection. Similarly, promastigotes of *L. (L.) donovani* overexpressing CPX had higher parasite loads in macrophages *in vitro*. Considering the importance of *L. (L.) amazonensis* in the epidemiology of leishmaniasis in Brazil, our objective was to analyze the importance of OPB and CPX in the virulence of this species using murine models of infection *in vitro* and *in vivo*. We have shown that overexpression of CPX increased infectivity of *L. (L.) amazonensis* promastigotes *in vitro* and that soluble OPB also increased infectivity of macrophage by this *Leishmania* species.

Keywords: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Oligopeptidase B. Cytoplasmic tryparedoxin peroxidase. Virulence factors.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

As leishmanioses constituem um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida (World Health Organization, 2009). A doença é endêmica em 98 países (Alvar, 2012) das áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo e estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos ao ano (Alvar et al., 2006; Murray et al., 2005). Existem cerca de 20 espécies de *Leishmania* capazes de causar doença no homem (Cupolillo et al., 2000; Shaw, 1994). Dependendo da espécie do parasito e de determinantes de susceptibilidade dos hospedeiros, as infecções apresentam características clínicas distintas, podendo ser reunidas em quatro grupos: (1) formas com lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém limitadas, designadas por leishmaniose cutânea localizada, (2) formas disseminadas cutâneas, com presença de nódulos múltiplos e ricos em parasitos que surgem tardiamente em pacientes infectados, chamadas de leishmaniose cutânea difusa, (3) formas que se complicam, com o aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas, particularmente do nariz, boca e faringe, denominadas coletivamente por leishmaniose mucocutânea e (4) formas em que os parasitos apresentam acentuado tropismo pelo SFM do baço, do fígado, da medula óssea e dos tecidos linfoides, designadas leishmaniose visceral ou calazar (Figura 1) (Rey, 2008).

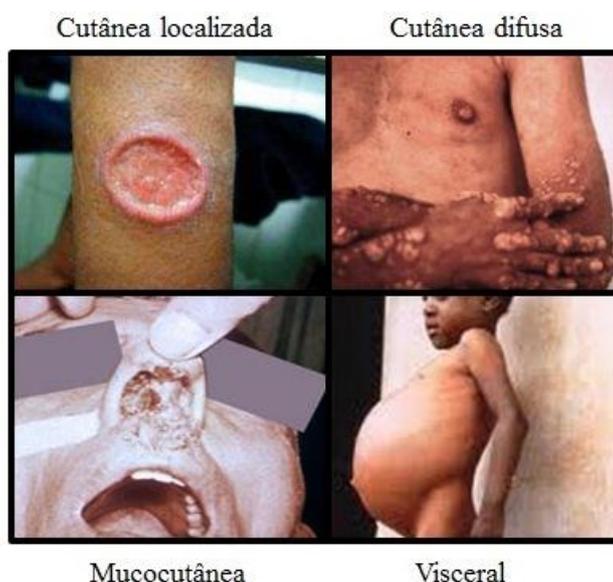


Figura 1. Manifestações clínicas da leishmaniose. Compilado do Manual da Vigilância da Leishmaniose, Brasil, Ministério da Saúde.

Infecções pela espécie *L. (L.) amazonensis*, a segunda mais comum no Brasil, estão associadas a quadros de leishmaniose cutânea localizada e cutânea difusa (Brasil, Manual de Vigilância da LTA, 2007), sendo essa última associada a uma anergia do paciente a antígenos do parasita (Balestieri et al., 2002; Convit et al., 1993; Silveira et al., 2004). Nosso grupo tem interesse particular nessa espécie por sua importância no país e pelo fato de diferentes respostas do hospedeiro estarem associadas a diferentes formas da doença.

1.2 Ciclo biológico da leishmânia

As *Leishmania ssp.* são transmitidas ao hospedeiro vertebrado pela picada da fêmea infectada do inseto vetor flebotomíneo. As leishmânias caracterizam-se por apresentarem dois estágios morfológicamente distintos: amastigota, forma oval e desprovida de flagelo externo encontrada no interior das células do hospedeiro vertebrado e promastigota, forma alongada e flagelada encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Bates, Rogers, 2004) (Figura 2). Durante o repasto sanguíneo do inseto são inoculadas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado, que se ligam a receptores existentes nos macrófagos, sendo fagocitadas e encapsuladas no vacúolo parasitóforo (Brodskyn et al., 2003). No interior do fagolisossomo as formas metacíclicas diferenciam-se em amastigotas, que se multiplicam por fissão binária (Alexander, Russel, 1992; Mc Conville, Handman, 2007). Os amastigotas são liberados dos macrófagos por um mecanismo ainda não totalmente caracterizado (Handman, Bullen, 2002; Mc Conville, Handman, 2007; Rittig, Bogdan, 2000) e podem invadir novas células do SFM. Quando o flebotomíneo pica o indivíduo ou o animal infectado, retira com o sangue ou linfa intersticial as leishmânias ou as células infectadas, que passarão a evoluir no interior de seu tubo digestivo (Von Stebut, 2007). No intestino do inseto, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas que se multiplicam por fissão binária. Posteriormente, ocorre a diferenciação em promastigotas metacíclicas, que migram para a região anterior do tubo digestivo do inseto, atingindo a probóscide, podendo ser transmitidas (Bates, Rogers, 2004; Sacks, Perkins, 1985).

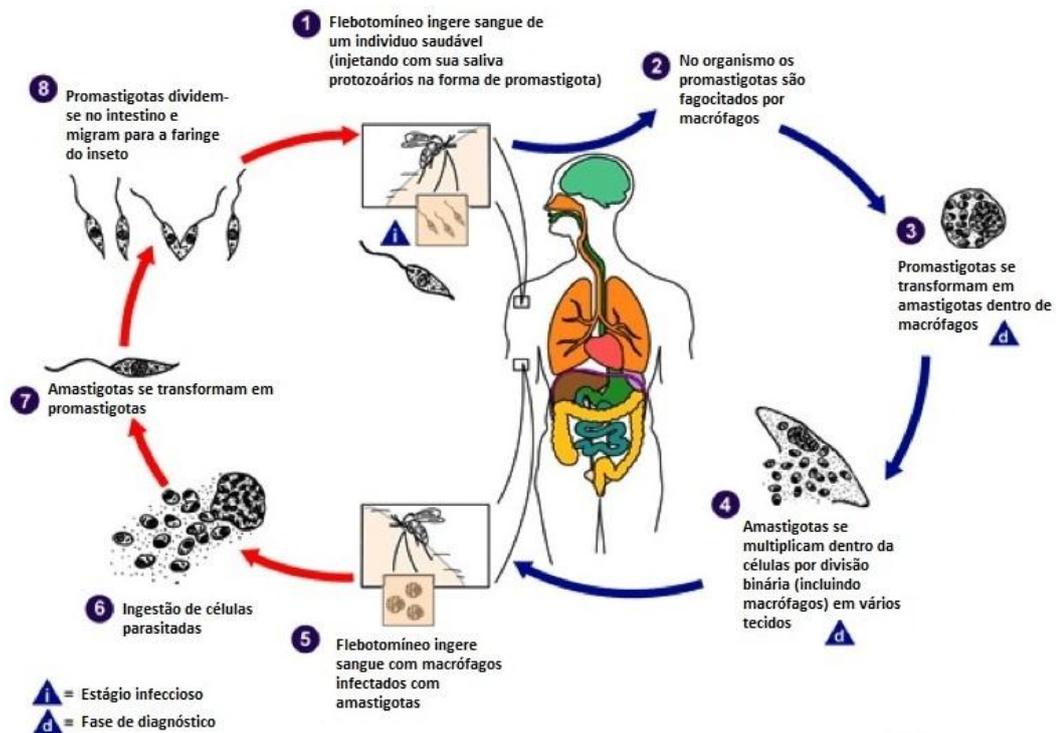


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Compilado do *Center for Disease Control and Prevention*.

1.3 Tratamento da leishmaniose

O tratamento das leishmanioses consiste essencialmente de quimioterapia (Herwaldt, 1999; Murray et al., 2005), que no Brasil baseia-se no uso de metais pesados tóxicos, principalmente compostos antimoniais. Quando o paciente é refratário são utilizados a pentamidina e a anfotericina B, preconizados como segunda escolha pelo Ministério da Saúde. Todos esses medicamentos necessitam de administração intravenosa e/ou intramuscular e supervisão médica ou hospitalização durante o tratamento devido à severidade dos possíveis efeitos adversos.

Considerado fármaco de primeira linha no tratamento da leishmaniose, o antimônio pentavalente tem sido utilizado como principal ferramenta há muitos anos, mostrando-se eficaz no tratamento de todas as manifestações para parte das espécies e isolados de *Leishmania* (ressalta-se que há muitos isolados resistentes) levando à regressão das lesões (Rath et al., 2003). Apresenta duas formulações: o gluconato de antimônio sódico e o

antiomoniato de N-metil glucamina, cujos mecanismos de ação ainda não estão precisamente definidos. Especula-se que ocorra a conversão do composto de Sb(V), considerado pró-fármaco, para Sb (III) pelo macrófago ou mesmo pelo próprio parasita (Callahan et al., 1997).

A forma ativa Sb (III), considerada mais eficaz, interfere com processos de metabolismo energético como a oxidação de ácidos graxos e a glicólise do parasita, levando a baixos níveis de ATP (Rath et al., 2003). Também causa fragmentação de ácidos nucleicos, interfere com a topoisomerase e inibe a Tripanotiona Redutase - componente da cascata TR-TXN-TXNPx (Croft et al., 2006; Friedrich, 2008). Apesar dos diversos mecanismos de ação sobre o parasita, esse fármaco tem propiciado o surgimento de cepas resistentes ao longo dos anos (Croft et al., 2006), limitando seu uso. Alguns dos mecanismos de resistência já descritos incluem a perda da expressão de certas enzimas redutoras de antimônio, baixa expressão de poros celulares para captação do fármaco e o uso de bombas de efluxo (Kaur, Rajput, 2014).

Medicamento de segunda linha no tratamento de leishmanioses, a pentamidina possui amplo espectro contra parasitas e alguns fungos, apresentando ainda atividade antitumoral em melanomas (Pathak et al., 2002). É comercializada na forma de sal isetionato, com aplicação intravenosa ou por aerossol (Cushion et al., 2004).

Graças ao crescente desenvolvimento de resistência aos antimônios, a pentamidina tem sido usada como alternativa no tratamento das leishmanioses cutânea e visceral, apresentando maiores taxas de desenvolvimento de resistência em relação à última (Croft et al., 2006). Seu mecanismo de ação também não está completamente elucidado, apenas com indicativos de inibição da biossíntese de poliaminas (inibição da S-adenosil-L-metionina), alteração do potencial da membrana mitocondrial, com grande acúmulo nesta organela e alta afinidade por regiões do DNA ricas em A-T (Croft et al., 2006; Kaur, Rajput, 2014). Os mecanismos de resistência hoje conhecidos incluem mudança na sequência genômica do kDNA, aumento da expressão de bombas de efluxo e queda na captação do fármaco (Kaur, Rajput, 2014).

Dentre os fármacos utilizados como leishmanicidas, a miltefosina (hexadecilfosfocolina ou HPC) é o único agente de via oral, tendo sido primeiramente empregado no tratamento de neoplasias como o câncer de mama (Croft et al., 2006). Não utilizada de forma clínica no Brasil, a miltefosina é utilizada na Ásia e Europa (Jha et al., 1999). Na Índia, onde é amplamente empregada no tratamento da leishmaniose visceral, apresentou altas taxas de cura (Sundar et al., 2006). Porém, estudos têm demonstrado que a

susceptibilidade do parasito ao fármaco varia entre diferentes espécies e cepas (Velez et al., 2010).

Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido. Estudos sugerem que devido a sua semelhança estrutural com um composto derivado do ácido araquidônico, o Fator de ativação de plaquetas (PAF) (Castro, 2011), ela tenha uma ação ativadora de macrófagos, aumentando a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12, citocinas responsáveis por uma resposta imunológica Th1 e consequente melhor prognóstico na recuperação do paciente, sendo considerado um fármaco imunomodulador (Wadhone et al., 2009). A indução da produção de IFN- γ também leva a maior ativação da iNOS, favorecendo a produção de NO e a eliminação do parasita (Wadhone et al., 2009).

Dentre seus efeitos diretos sobre o parasita, sabe-se que a miltefosina interfere na fluidez da membrana, assim como na composição dos fosfolipídeos, induzindo a apoptose (Filho et al., 2008). Apesar das características positivas da miltefosina, sua lenta eliminação do organismo e as baixas concentrações do medicamento no paciente contribuem para o desenvolvimento de resistência (Dorlo et al., 2008), por exemplo pela redução da expressão de transportadores na membrana, reduzindo a captação do fármaco (Kaur, Rajput, 2014).

Frente ao escasso arsenal terapêutico com restrições de uso quanto à toxicidade e âmbito hospitalar, é clara a premência da identificação e caracterização de biomoléculas parasito-específicas, como os fatores de virulência do parasito, que possam ser exploradas como alvo molecular para potenciais fármacos.

1.4 Internalização e sobrevivência da leishmânia no interior do macrófago

Os macrófagos são as principais células hospedeiras da *Leishmania* (McConville, Handman, 2007). A ativação do macrófago é o processo pelo qual essa célula adquire maior capacidade de fagocitar, matar e digerir microrganismos (Murray, Wynn, 2011). Esse processo depende da ligação de receptores PRRs (*Pattern recognition receptor*) ou estímulo com IFN- γ secretado por células NK ou Th1, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 e IL-6 (Medzhitov, 2007), de espécies reativas de oxigênio (como peróxidos, superóxidos e radicais hidroxilas) e nitrogênio (como óxido nítrico), proteases, hidrolases, proteínas e peptídeos antimicrobianos (Agerberth et al., 2000; Duits et al., 2002). Quando os promastigotas de *Leishmania* são fagocitados, os lisossomos fundem-se com o vacúolo parasitóforo formando o fagolisossomo, liberando seu conteúdo e aumentando

o metabolismo oxidativo do macrófago. A sobrevivência dos parasitos nesse ambiente depende da sua transformação em amastigotas, que possuem diversos mecanismos que reduzem ou impedem a ação destrutiva normal dos fagolisossomos (Olivier et al., 2005).

Os mecanismos que permitem a sobrevivência e contribuem para a patogenicidade da leishmânia, permitindo o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado, estão associados a moléculas denominadas fatores de virulência, que variam em importância dependendo da espécie do parasito (Silva-Almeida, 2012). Um dos fatores de virulência mais estudados em leishmânia é o LPG, importante na modulação da produção de NO, inibição da apoptose, atraso na maturação do fagolisossomo e inibição da transdução de sinal em macrófagos, entre outros (revisado em McMahon-Pratt, Alexander, 2004; Späth, et al., 2003). Apesar de essa molécula ser essencial para a virulência de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani*, ela não é necessária para o sucesso da infecção de *L. (L.) mexicana* (Ilg et al., 2001; Turco et al., 2001).

Outro fator de virulência muito estudado é a gp63, importante nas infecções por *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) donovani* (Chen et al., 2000; Joshi et al., 2002; Wilson et al., 1989). A gp63 inibe a lise do parasita mediada pelo complemento e sua liberação extracelular pode facilitar a migração e difusão da promastigota através do tecido por degradar componentes da matriz extracelular (McGwire et al., 2003). A gp63 extracelular também cliva MHC de classe I e CD4+, o que limita resposta de células T, e diminui a proteína relacionada a MARCKS (myristoylatedalanine-rich C kinase substrate), um fator de ativação de macrófagos (revisado em McMahon-Pratt, Alexander, 2004).

Como LPG e gp63 são expressas predominantemente ou exclusivamente (dependendo da espécie de *Leishmania*) em promastigotas, diversos estudos buscam identificar fatores de virulência expressos em amastigotas, fase do parasito que propaga a infecção no homem. Proteínas como a A2, o homólogo dos receptores para quinase C ativada (LACK) e cisteíno protease B do tipo catepsina (CPB) foram descritas como fatores de virulência de amastigotas de *L. (L.) donovani*, *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente (revisado em McMahon Pratt, Alexander, 2004).

1.5 Resistência de *Leishmania* ao estresse oxidativo

Em resposta a diferentes estímulos, macrófagos produzem um *burst* respiratório composto de diversas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Kaye, Scott, 2011).

Comumente suscetível às ROS, a *Leishmania* evita a liberação destas moléculas ou resiste aos seus efeitos tóxicos, possibilitando sua sobrevivência. A infecção do macrófago por *Leishmania* provoca pouca liberação de ROS devido a diversos fatores, entre eles moléculas de superfície que interagem com os receptores de complemento, como a gp63, prejudicando a maturação do fagossomo e sua atividade oxidativa, (Matheoud et al., 2013) e o LPG, que inibe o burst oxidativo e colabora para a instalação da infecção (Turco et al., 2001). Além disso, o parasita possui moléculas capazes de detoxificar as espécies reativas como a SOD, Glutathione Peroxidase independente de selênio (nsGPXs) (Wilkinson, Kelly 2003) e oxidorredutases, que atuam como moduladoras do estresse oxidativo na ausência das enzimas Catalase e Glutathione Peroxidase dependente de selênio (GPXs), presentes em eucariotos superiores mas não em *Leishmania* (Flohé et al., 1999; Kima, 2014; Schlecker et al., 2005). Um exemplar de oxidorredutase é a triparedoxina peroxidase, uma das proteínas estudadas neste trabalho.

1.6 Triparedoxina peroxidase citoplasmática

A triparedoxina peroxidase citoplasmática (CPX) é uma proteína antioxidante restrita aos tripanossomatídeos que participa da detoxificação de hidroperóxidos. Espécies reativas como H_2O_2 resultam usualmente de reações redox, mas também podem ser produzidas por atividade microbicida e na sinalização celular (Martinez, 2008). Os tripanossomatídeos mantêm o balanço redox por um mecanismo singular, por possuírem um sistema dependente de glutathione funcional, porém incompleto, que na maioria dos outros organismos é responsável por manter um ambiente intracelular redutor/protetor. Em substituição, eles possuem um sistema antioxidante baseado em tripanotiona, juntamente com outras três óxido-redutases: tripanotiona redutase, triparedoxina e triparedoxina peroxidase (CPX, citoplasmática e MPX, mitocondrial) (Nogoceke et al., 1997).

A CPX está sabidamente relacionada com a sobrevivência e virulência em tripanossomatídeos. Essa proteína confere proteção a *Trypanosoma cruzi* contra estresse oxidativo dentro do macrófago (Piacenza et al., 2008) e sua superexpressão aumentou a sobrevivência intracelular do parasita (Piñeyro et al., 2008). A CPX também participa da resistência oxidativa em *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* (Iyer et al., 2008; Romao et al., 2009), e promastigotas de *L.(L.) donovani* superexpressores de CPX apresentaram maior carga parasitária em macrófagos *in vitro* (Iyer et al., 2008). De forma semelhante, amastigotas

esplênicos de *L. (L.) donovani* expressam mais CPX do que amastigotas axênicos e apresentaram maior resistência ao estresse oxidativo por H₂O₂ (Pescher et al., 2011). Níveis elevados de CPX foram observados em cepas de *L. (L.) donovani* resistentes ao antimônio (Wyllie et al., 2010) e de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao arsenito (Lin et al. 2005), demonstrando que um melhoramento no metabolismo antioxidante de *Leishmania* pode implicar em resistência a esses compostos. Ainda em *L. (L.) amazonensis*, observou-se que a expressão de CPX se reduz a menos da metade em culturas com muitas passagens quando comparada a uma cultura recém-iniciada, mais virulenta (Magalhães et al. 2014).

Em algumas espécies de *Leishmania* foram identificadas duas ou três variantes de CPX (citoplasmáticas) (Barr et al., 2001; Henard et al., 2014; Kima et al., 2010). Em *L. (L.) amazonensis* foi encontrada uma isoforma de menor tamanho específica do estágio amastigota (Henard et al., 2014), com alta similaridade com a isoforma truncada encontrada em *L. (L.) chagasi* (Barr et al., 2001) e *L. (V.) pifanoi* (Kima et al., 2010) e que confere resistência a estresse oxidativo e nitrosativo (Henard et al., 2014).

1.7 Oligopeptidase B

Oligopeptidase B (OPB) pertence à classe das serino peptidases, caracterizada pela presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima cuja hidroxila participa da catálise e ligação ao substrato, e à família da prolil oligopeptidase (clã SC, família S9). Essa família de proteínas se restringe à hidrólise nos resíduos de lisina e arginina de peptídeos de no máximo 30 aminoácidos (Polgar, 2002). Embora essa proteína seja descrita como restrita a bactérias, plantas e tripanossomatídeos (Coetzer et al., 2008), peptidases da subfamília S9A estão presentes em inúmeros organismos, inclusive no homem (MEROPS peptidase database) e a OPB de *Leishmania* apresenta identidades de aproximadamente 24% em com as enzimas humanas mais semelhantes. A OPB tem sido considerada um importante fator de virulência (Burleigh, Woolsey, 2002) e alvo terapêutico em tripanossomatídeos (Cazzulo, 2002), sendo importante para sinalização cálcio-dependente durante invasão de células não fagocíticas por *T. cruzi* (Burleigh et al., 2002; Coetzer et al., 2008). Em *Leishmanias*, a expressão de OPB é aumentada em amastigotas em relação à promastigotas em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) donovani* (Gamboa et al., 2007; Rosenzweig, 2008), mas é igualmente expressa nos dois estágios em *L. (L.) major* (Munday et al., 2011) e *L. (L.) mexicana* (Holzer et al., 2006).

Promastigotas de *L.(L.) major* deficientes em OPB apresentaram uma deficiência na diferenciação da forma procíclica para a metacíclica, significante perda na capacidade de infecção e sobrevivência em macrófagos *in vitro*, mas infecção semelhante em camundongos quando comparados à linhagem selvagem (Munday et al., 2011). Outro estudo, porém, demonstrou um atraso significativo na formação da lesão em camundongos por *L. (L.) major* deficientes para OPB (Swenerton et al., 2011). O mecanismo de virulência associado à OPB em *L. (L.) major* parece estar relacionado com o controle da enolase na superfície do parasita (Swenerton et al., 2011). Nenhum estudo até o momento avaliou o efeito da superexpressão da OPB em leishmânias e não há nenhum trabalho sobre a enzima de *L. (L.) amazonensis*.

Além da OPB ou OPB1, uma proteína do tipo Oligopeptidase B denominada OPB2 foi descrita em *L. (L.) amazonensis*. A OPB2 tem uma extensão C-terminal pouco comum e pouca similaridade com a OPB1 e é expressa ao longo de todo o ciclo em *L. (L.) amazonensis* (Guedes et al., 2008).

1.8 Secreção de fatores de virulência

Há crescentes exemplos de proteínas de *Leishmania* que contribuem para a virulência do parasita, aumentando a infecção *in vitro* e *in vivo*. Parte delas são transportadas ao citoplasma do macrófago e interagem diretamente com vias de sinalização da célula hospedeira (Kima, 2007), contribuindo para o fenótipo desativado dos macrófagos infectados (Lambertz et al., 2012). Parte das proteínas secretadas por *Leishmania* seguem a via clássica de secreção baseada na presença de peptídeo sinal N-terminal, porém mais da metade do secretoma de *L. (L.) donovani* e provavelmente de outras espécies é feito por exossomos (Silverman et al., 2008; Silverman et al., 2010). Tanto a CPX quanto a OPB foram identificadas em exossomos de *L. (L.) donovani* (Silverman et al., 2008; Silverman et al., 2010), reforçando sua importância como fatores de virulência que potencialmente interagem com vias da célula hospedeira.

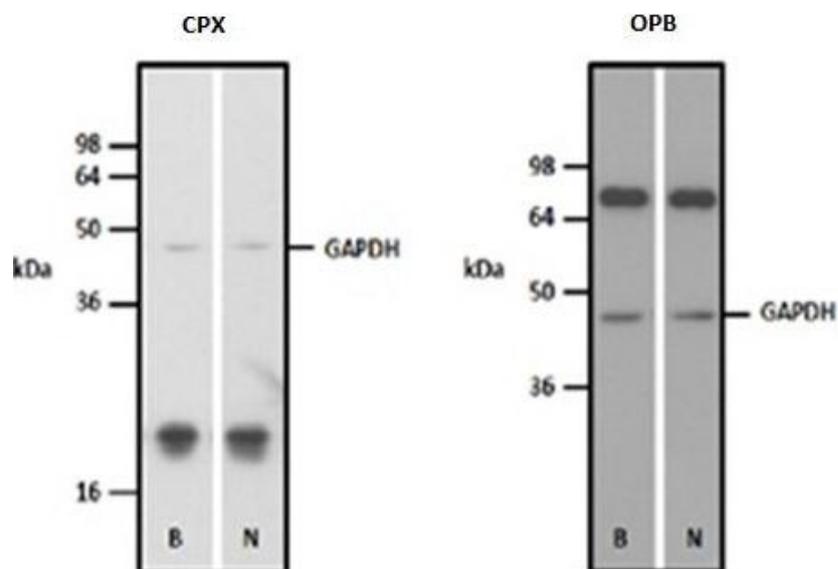
1.9 Resultados preliminares à dissertação: CPX e OPB no proteoma de amastigotas retirados de lesão de camundongos BALB/c x BALB/c nude experimentalmente infectados

Um estudo realizado em nosso laboratório avaliou a expressão proteica em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* modulada pela resposta imune de camundongos de

linhagens BALB/c e BALB/c nude experimentalmente infectados. Os animais BALB/c nude têm uma mutação genética que leva à deficiência de timo e, por consequência, de linfócitos T e suas citocinas. O objetivo do projeto foi identificar as diferenças no padrão de proteínas de amastigotas provenientes de lesões dos dois tipos de animais com base no sistema 2D DIGE. Foram identificadas 15 proteínas diferencialmente expressas, provavelmente moduladas pela presença de linfócitos T e suas citocinas, dentre as quais a OPB e a CPX. Ambas são descritas como ausentes em humanos, embora haja peptidases humanas semelhantes à OPB, sendo a CPX restrita aos tripanossomatídeos, característica que proporciona maior seletividade para um potencial fármaco. Tanto a OPB quanto a CPX tiveram isoformas (de mesmo tamanho, mas cargas distintas) mais abundantes em amastigotas isolados de BALB/c nude, sugerindo que a presença de linfócitos T regula negativamente sua abundância nos amastigotas (Teixeira et al., 2015).

Utilizando anticorpos específicos anti-CPX e anti-OPB, gentilmente cedidos pelo Dr. Carlos Robello e Dra. Dolores Piñeyro (Institut Pasteur, Montevideo) e Dr. Jeremy Mottram (University of Glasgow), respectivamente, foram realizados *Western Blots* (WB) de proteínas solúveis de amastigotas retiradas de lesão na pata de BALB/c e BALB/c nude em uma e duas dimensões. De acordo com os resultados (Figura 3), podemos observar que em abundância geral (gel em uma dimensão), não é possível observar diferenças na expressão das proteínas entre as diferentes linhagens de camundongos. Porém, um estudo das isoformas da proteína CPX (gel em duas dimensões) corrobora os dados encontrados no proteoma, onde as isoformas das diferentes linhagens têm abundâncias distintas.

A.



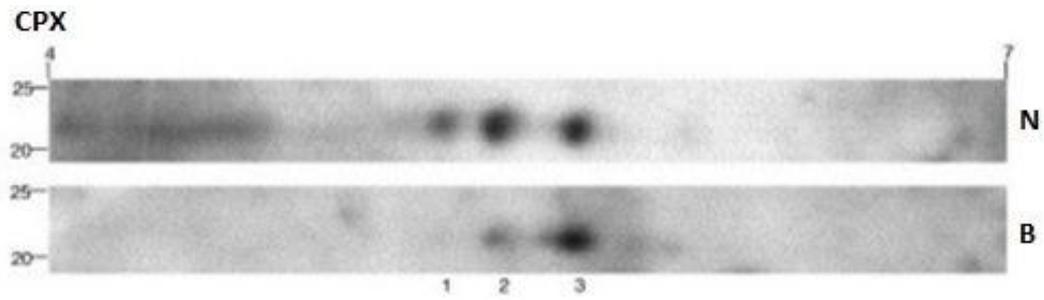
B.

Figura 3. *Western Blot* de proteínas solúveis de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* extraídas de lesão de camundongos BALB/c (B) e BALB/c nude (N) utilizando anticorpos contra CPX ou OPB em uma dimensão (A, Leonardo Velasquez, dados não publicados) e duas dimensões (Teixeira et al., 2015).

Neste trabalho avaliamos o efeito da superexpressão de CPX e OPB ou da presença da proteína solúvel na infecção, dependendo da proteína. Embora as transfecções com os plasmídeos contendo CPX e OPB tenham sido bem sucedidas, observamos que:

- O superexpressor de CPX expressa ao menos o dobro de proteína, enquanto o transfectante OPB não superexpressa a proteína. Nesse último caso, especulamos que possa haver algum controle pós traducional que impeça a superexpressão de OPB, uma vez que o mesmo vetor foi eficaz para outra proteína na mesma espécie de *Leishmania* ou que o parasita superexpressa OPB em uma quantidade não detectável pelo WB.

Com base nos experimentos com superexpressores de CPX e com as proteínas recombinantes CPX e OPB, chegamos às seguintes conclusões:

- Os promastigotas superexpressores de CPX são mais resistentes ao H₂O₂ e ao peroxinitrito *in vitro* e apresentam maior atividade peroxidase quando comparados ao parasita controle.

- Os parasitas superexpressores de CPX tem maior infectividade em experimentos *in vitro* com macrófagos peritoneais obtidos de BALB/c;

- A proteína CPX produzida em bactéria possui conformação funcional, demonstrada pela atividade peroxidase em ensaios enzimáticos.

- Não observamos diferenças na expressão da triparedoxina mitocondrial quando a forma citoplasmática é superexpressa.

- Amastigotas do isolado 69, Bahia, expressam cerca de três vezes mais CPX do que promastigotas do mesmo isolado e a cepa M2903 de *L. (V.) braziliensis* (que não infecta experimentalmente camundongos) expressa cerca de metade de CPX quando comparada a cepa IMG3 de *L. (V.) guyanensis* (que infecta experimentalmente camundongos), demonstrando que a CPX pode ser considerada fator de virulência em *Leishmania*.

- A proteína OPB produzida em HEK293T possui conformação funcional, demonstrada pela atividade peptidase em ensaios enzimáticos.

- Parasitas selvagens cepa M2269 tem maior infectividade in vitro em macrófagos peritoneais de BALB/c expostos à proteína recombinante OPB solúvel previamente e durante a infecção.

REFERÊNCIAS¹

¹De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Agerberth, B, Charo J, Werr J, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. 2000;96(9):3086-93.

Alexander J, Russell DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol*. 1992;31:175-254.

Alvar J, Velez ID, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*. 2006;22(12):552-7.

Andrade JM, Murta SM. Functional analysis of cytosolic trypanothione peroxidase in antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. *Parasit Vectors*. 2014;29(7):406.

Balestieri FM., Queiroz AR., Scavone C, et al. *Leishmania (L.) amazonensis* - induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect*. 2002;4:23–9.

Barr DS, Gedamu L. Cloning and Characterization of Three Differentially Expressed Peroxidase Genes from *Leishmania chagasi*. *The journal of biological chemistry*. 2001; 34279-87.

Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med*. 2004;4(6):601-9.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2007;2:147.

Brodskyn C, de Oliveira CL, Barral A, et al. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Rev Vaccines*. 2003;2,(5):705-17.

Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol*. 2002;4:701–11.

Callahan HL, Portal AC, Devereaux R, et al. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 1997;818-22.

Castro WD. Miltefosina exerce sua ação Leishmanicida através do receptor de PAF. *Ouro preto*. 2011.

Cazzulo JJ. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem*. 2002;2:1261–71.

Chen DQ, Kolli BK, Yadava N, et al. Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infect Immun*. 2000;68:80–6.

Coetzer TH, Goldring JP, Huson LE. Oligopeptidase B: a processing peptidase involved in pathogenesis. 2008;90(2):336-44.

- Convit J., Ulrich M., Fernandez CT, et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87:444–448.
- Croft SL, S. Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):111-26.
- Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today.* 2000;16(4):142-44.
- Cushion MT, Walzer PD, Collins MS, et al. Highly Active Anti-*Pneumocystis carinii* Compounds in a Library of Novel Piperazine-Linked Bisbenzamidines and Related Compounds. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;4209–16.
- Dorlo PC, van Thiel PP, Huitema AD, et al. Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrob Agents Chemotherapy.* 2008;2855-60.
- Duits LA, Rademaker M, Ravensbergen B, et al. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology.* 2002;106(4):517-25.
- Filho VC, Lucas C, Sampaio NR. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2008;424-27.
- Flohé L., Hecht HJ, Sterinert P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radical Biology and Medicine.* 1999;966–84.
- Friedrich K. Estudos da cinética do antimônio e alterações de citocromos P450 hepáticos em primatas e ratos tratados com antimoniatode meglumina. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública; 2008.
- Gamboa D, van Eys G, Victoir K, et al. Putative markers of infective life stages in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitology.* 2007;134:1689–98.
- Guedes HLM, de Carvalho, RSN, Gomes, DCO, et al. Oligopeptidase B-2 from *Leishmania amazonensis* with an unusual C-terminal extension. *Acta Parasitologica.* 2008;53(2):197–204.
- Handman E.; Bullen DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 2002;18(8):332-34.
- Henard AC, Carlsen ED, Hay C, et al. *Leishmania amazonensis* Amastigotes Highly Express a Tryparedoxin Peroxidase Isoform That Increases Parasite Resistance to Macrophage Antimicrobial Defenses and Fosters Parasite Virulence. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2014;1-11.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999;354(9185):1191-9.
- Holzer TR, McMaster WR, Forney JD. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes,

lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;146:198–218.

Ilg T, Demar M, Harbecke D. Phosphoglycan repeat-deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice. *J Biol Chem.* 2001;276:4988–97.

Iyer JP, Kaprakkaden A, Choudhary ML. Crucial role of cytosolic trypanothione peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Mol Microbiol.* 2008;68(2):372–91.

Jha, TK, Sundar S, Thakur CP, et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med.* 1999;341(24):1795-1800.

Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, et al. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;120:33–40.

Kaur G, Rajput B. Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in *Leishmania*. *Journal of Parasitology Research - Hindawi Publishing Corporation.* 2014;1-11.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature.* 2011;9:604-15.

Kima PE. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal for Parasitology.* 2007;37:1087–96.

Kima, PE. *Leishmania* molecules that mediate intracellular pathogenesis. *Institut Pasteur - Microbes and Infection.* 2014;1-6.

Kima PE, et al. Identification of *Leishmania* proteins preferentially released in infected cells using change mediated antigen technology. 2010;4(10)e842.

Lambertz U, Silverman JM, Nandan D, et al. Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis. *Journal of Leukocyte Biology.* 2012;(9):887-99.

Lin YC. et al. Distinct overexpression of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidases results in preferential detoxification of different oxidants in arsenite-resistant *Leishmania amazonensis* with and without DNA amplification. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;142(1):66-75.

Magalhães RD, Duarte MC, Matoos EC, et al. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2014;(8):e2764.

Martinez JCC. NADH desidrogenase mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*: subunidade 7 para diagnóstico diferencial de isolados humanos e análise diferencial. *ICB/SBIB143.* 2008.

Mathoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, et al. *Leishmania* Evades Host Immunity by Inhibiting Antigen Cross-Presentation through Direct Cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host & Microbe.* 2013;15-25.

- McConville MJ, Handman E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *International Journal for Parasitology*. 2007;(37):1047–51.
- McGwire BS, Chang KP, Engman DM. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect Immun*. 2003;71(2):1008–10.
- McLuskey K, Paterson NG, Bland ND, et al. Crystal structure of *Leishmania major* oligopeptidase B gives insight into the enzymatic properties of a trypanosomatid virulence factor. *J Biol Chem*. 2010. 285(50):39249-59
- McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunological Reviews* 2004;201:206-24.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819-26.
- Munday JC, et al. Oligopeptidase B deficient mutants of *Leishmania major*. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2011;175:49–57.
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews immunology*. 2011;11:723-37.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, et al. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496):1561-77.
- Nogoceke E, Gommel, DU, Kiess, M, et al. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothionemediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biolog Chemist*. 1997;378:827-36.
- Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;293–305.
- Pathak MK, et al. Pentamidine Is an Inhibitor of PRL Phosphatases with Anticancer Activity. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2002;1255-64.
- Pescher P, Blisnick T, Bastin P, et al. Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. *Cellular Microbiology*. 2011;13(7):978–91.
- Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, et al. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem. J*. 2008;410:359–36.
- Piñeyro MD, Parodi-Talice A, Arcari T, et al. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: Virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 408 (2008) 45–50. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;5;4(10).

- Polgar L. The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(2):349–62.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, et al. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. *Química Nova.* 2003;26(4):550-5.
- Rey L. *Parasitologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Rittig MG, Bogdan C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today.* 2000;16(7):292-7.
- Romao S, Castro H, Sousa, C, et al. The cytosolic trypanothione of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival. *Int J Parasitol.* 2009;39(6):703-11.
- Rosenzweig D, Smith D., Opperdoes F, Stern, et al. Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J.* 2008;22.
- Sacks DL, Perkins PV. Development of infective stage Leishmania promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34(3):456-9.
- Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. P1659.
- Schlecker T, Schmidt A, Dirdjaja N, et al. Substrate Specificity, Localization, and Essential Role of the Glutathione Peroxidase-type Trypanothione Peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry.* 2005;14385-94.
- Shaw JJ. Taxonomy of the genus Leishmania: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89(3):471-78.
- Silva-Almeida M, Pereira BA, Ribeiro-Guimarães ML, et al. Proteinases as virulence factors in Leishmania spp. infection in mammals. *Parasites & Vectors.* 2012;5:160
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:239–51.
- Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol.* 2008;9(2):R35.
- Silverman JM, Clos J, de Oliveira CC, et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages. *J Cell Sci.* 2010;123(6):842-52.
- Späth GF, Garraway LA, Turco SJ, et al. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100(16):9536–41.
- Sundar, S, Jha TK, Thakur CP, et al. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;1:S26-33.

Swenerton RK, Zhang S, Sajid M, Medzihradzky KF, et al. The Oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem*. 2011;7;286(1):429-40.

Teixeira PC, Velasquez LG, Lepique AP, et al. Regulation of *Leishmania (L.) amazonensis* protein expression by host T cell dependent responses: differential expression of oligopeptidase B, trypanothione peroxidase and HSP70 isoforms in amastigotes isolated from BALB/c and BALB/c nude mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):e0003411.

Turco SJ, Späth GF, Beverley SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol*. 2001;17:223–6.

Velez, I, Lopez L, Sanchez X, et al. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(2):351-6.

Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*. 2007;17(2):115-22.

Wadhone P, Maiti M, Agarwal R, et al. Miltefosine Promotes IFN-gamma-Dominated Anti-Leishmanial Immune Response. *The Journal of Immunology*. 2009;7146-54.

Wilkinson SR, Kelly JM. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biol Chem*. 2003;384(4):517-25.

Wilson ME., Hardin KK, Donelson JE. Expression of the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani* chagasi in virulent and attenuated promastigotes. *J Immunol*. 1989; 143:678–84. (revisado em McMahon-Pratt & Alexander, 2004).

World Health Organization: Research to support the elimination of visceral leishmaniases. WHO, 2009.

Wyllie S, Mandal G, Singh N, et al. Elevated levels of trypanothione peroxidase in antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2010;173(2):162-4.