Thiago Fidelis Ferrão

**A importância das peptidases parasitárias no fornecimento de
aminoácidos em promastigotas de *Leishmania (Leishmania)*
*infantum***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Mestre em Ciências

Programa de Medicina Tropical
Área de Concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade
Junior

São Paulo

2020

Thiago Fidelis Ferrão

**A importância das peptidases parasitárias no fornecimento de
aminoácidos em promastigotas de *Leishmania (Leishmania)*
*infantum***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Mestre em Ciências

Programa de Medicina Tropical
Área de Concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade
Junior

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferrão, Thiago Fidelis

A importância das peptidases parasitárias no fornecimento de aminoácidos em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* / Thiago Fidelis Ferrão. -- São Paulo, 2020.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Medicina Tropical. Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Heitor Franco de Andrade Junior.

Descritores: 1.Leishmania 2.Peptidases 3.Proteólise 4.Metabolismo
5.Aminoácidos 6.Glicocálice

USP/FM/DBD-111/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) a partir do processo nº 2016/15738-3.

Quero agradecer a Deus, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada. Aos meus pais **Maurício Carvalho Ferrão** e **Maria Cristina Fidelis Ferrão**, a minha irmã, **Thais Fidelis Ferrão**, assim como a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu concluísse mais esta etapa em minha vida.

Agradeço ao Professor **Dr. Heitor Franco de Andrade Jr**, pela sua orientação e companheirismo durante essa caminhada. Eu posso dizer que a minha formação acadêmica e pessoal, não teria sido a mesma sem sua orientação. E que as conclusões científicas obtidas neste trabalho são fruto de sua capacidade intelectual elevada que está sempre a serviço da ciência.

A Dra. **Camila Aparecida de Carvalho** por ser uma grande amiga, que sempre esteve a disposição para o auxílio na execução desse trabalho. Agradeço também por suas correções que sempre foram feitas com paciência e contribuíram para um trabalho mais claro e com um nível intelectual maior.

Aos amigos que fiz na pós-graduação: **Flávia Regina Novais de Freitas, Jaqueline Polizeli Rodrigues, Gisele Pacifico Sartori, Andrea da Costa** e **Alex M. Nasare**, obrigado pela amizade, apoio e ajuda de todos, principalmente na elucidação de dúvidas e técnicas durante os cafés da tarde.

Aos colegas do Laboratório de Protozoologia: **Bruno Márcio da Silva, Aline Bastos dos Passos, Beatriz Möller, Barbara Fialho, Cayuan Tadeu Brandão, Dennis Fujita, Elizama Carneiro Machado Bezerra, Fernanda Siqueira Cavalcante, Larissa Festa, Dr. Norival Kesper Jr., Marilda Savoia**.

Aos funcionários **Luciano Monteiro da Silva, Sandra Regina Castro Soares e Sonia Aparecida dos Anjos Ferraz**, pela ajuda prestada nas questões administrativas e auxílio na execução deste trabalho seja por meio da disponibilização de materiais ou auxílio na execução das técnicas.

Ao Departamento de Patologia da FMUSP, em especial a **Cleusa Fumíca Hirata Takakura**, pela ajuda na execução da microscopía eletrônica.

Aos professores, **Roberto Mitsuyoshi Hiramoto** e **Patrick Jack Spencer** pelas observações e sugestões apontadas em meu exame de Qualificação.

A **Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman** e **Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr.**, pela confiança depositada em mim e aos momentos de descontração.

Ao **Laboratório de Investigações Médicas-49 do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM49-HCFMUSP)**, pela disponibilização de materiais, equipamentos e reagentes necessários para realização deste projeto.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

Ferrão TF. A importância das peptidases parasitárias no fornecimento de aminoácidos em promastigotas de *leishmania (leishmania) infantum* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença amplamente distribuída no Brasil e no mundo, com alta morbidade e mortalidade. No Brasil, é causada pela espécie *Leishmania (L.) infantum* com transmissão vetorial através de fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. O parasito apresenta duas formas em seu ciclo de vida, as promastigotas presentes em insetos vetores e as amastigotas, presentes em células de mamíferos. A nutrição do parasito depende de aminoácidos obtidos por interações com o hospedeiro. Diferentes peptidases já foram documentadas no gênero *Leishmania*, com quatro grupos de acordo com o sítio ativo. Neste trabalho, avaliamos o papel de peptidases parasitárias em processos nutricionais na sobrevivência e multiplicação de promastigotas de *L. (L.) infantum*. Promastigotas foram cultivadas em meio padrão (MP199). O número de promastigotas foi acompanhado diariamente, e no 3 dia de permanência em cultura os parasitos e o meio foram analisados em relação a sua composição. Os dados obtidos foram utilizados como referência para padronização das técnicas analíticas posteriormente empregadas nos parasitos obtidos de meios ricos em aminoácidos livres (MRA) e rico em proteína (MRP) e seus sobrenadantes de cultura. A comparação entre os parasitos mantidos em MRA e MRP demonstrou uma maior concentração de proteínas em MRP 26,22 µg/mL em relação a MRA 10,71 µg/mL. As alterações morfológicas mostraram maior espessamento de glicocálice em promastigotas com maior atividade proteolítica obtidas de MRP, detectada com substratos proteicos marcados com fluorocromo FITC. Os dados aqui obtidos sugerem que as peptidases parasitárias têm atividades nutricionais e meios contendo proteínas em sua composição levam a alterações parasitárias induzindo a ação de peptidases e modificações da superfície do parasito para permitir maior facilidade do processamento destas moléculas e aquisição de aminoácidos, uma visão diferente da função destas enzimas possibilita um melhor entendimento do metabolismo parasitário e sua disponibilidade como alvo de novas drogas.

Descritores: Leishmania; Peptidases; Proteólise; Metabolismo; Aminoácidos; Glicocálice.

ABSTRACT

Ferrão TF. The importance of parasitic peptidases in the supply of amino acids in promastigotes of *Leishmania (leishmania) infantum* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Visceral leishmaniasis (VL) is a disease widely distributed in Brazil and worldwide, with high morbidity and mortality. In Brazil, it is caused by the species *Leishmania (L.) infantum* with vector transmission by females of *Lutzomyia longipalpis*. The parasite has two forms in its life cycle, the promastigotes present in insect vectors and amastigotes present in mammalian cells. The parasite's nutrition depends on amino acids obtained by interactions with the host. Different peptidases have already been documented in the *Leishmania* parasites, with four groups according to the active site. In this work, we evaluate the role of parasitic peptidases in nutritional processes, survival and multiplication promastigotes of *L. (L.) infantum*. Promastigotes were grown in standard medium (MP199). The number of parasites was monitored daily and on the 3rd day of stay in culture medium the parasites were analyzed in relation to its composition. The data obtained were used as a reference to standardize the analytical techniques used later in the parasites, captured by means rich in free amino acids (MRA) and rich in protein (MRP) and their culture supernatants. The comparison between parasites maintained in MRA and MRP demonstrates a higher protein concentration in MRP 26.22 µg / mL compared to MRA 10.71 µg / mL. As the morphological changes show a greater thickening of glycocalyx in promastigotes with greater proteolytic activity applied to MRP, detected with protein substrates marked with fluorochrome FITC. The data suggested here as parasitic peptidases present nutritional activities and methods that cause effects on their composition and cause parasitic changes inducing the actions of peptidases and modifications of the parasite surface to allow greater ease of use of the molecules and samples of amino acids, a different way from The function of these enzymes allows a better understanding of parasitic metabolism and its availability as a target for new drugs.

Descriptors: *Leishmania*; peptidases Peptide Hydrolases; Proteolysis; Metabolism; Amino acids; Glycocalyx.

ISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPL	Extrato de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
HCl	Ácido clorídrico
IgG	Imunoglobulina G
KDa	Kilodalton
LPLC	Cromatografia líquida de exclusão molecular (<i>Low Pressure Liquid Chromatography</i>)
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MP199	Meio padrão 199 suplementado com urina e soro fetal
MRA	Meio rico em aminoácidos.
MRP	Meio rico em proteínas
NaCl	Cloreto de Sódio
OVA	Ovalbumina
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
pM	Picomolar
SBF	Soro Fetal Bovino
TLC	Cromatografia de camada delgada (<i>Thin-layer chromatography</i>)
Tris	Hidroximetilaminometano
UA	Unidades arbitrárias
UFR	Unidades de fluorescência relativa

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo de vida de <i>L. (L.) infantum</i> . Biologia, infecção e replicação dos estágios do parasito em seus hospedeiros.....	20
Figura 2	Avaliação dos aminoácidos e proteínas presentes no meio de cultura e nos suplementos utilizados na manutenção de promastigotas de <i>L. (L.) infantum in vitro</i>	40
Figura 3	Gráfico de distribuição dos parasitos analisados em relação ao seu tamanho e fotomicroscopia de promastigota corada com Giemsa.....	45
Figura 4	Zimografia de EPL isolado de meio MP199 em diferentes concentrações e demonstração gráfica da densidade de bandas encontradas.....	53
Figura 5	Inibição da atividade proteolítica com: 1,10 Fenantrolina; EDTA; Quimostatina; Pepstatina A; Aprotinina; E-64 e PMSF sobre a principal peptidase do EPL de MP199 em Zimografia e representação da porcentagem de inibição da proteólise.....	54
Figura 6	Gráfico de dispersão do volume celular estimado dos parasitos mantidos em diferentes ambientes de crescimento com imagem aleatória de parasito mantido em MRA e MRP com coloração de Giemsa.....	57
Figura 7	Gráfico da porcentagem de parasitos mortos em cultura MRP e MRA e fotomicroscopia de promastigotas incubadas com iodeto de propídeo observadas em microscopia de fluorescência..	59
Figura 8	Eletroforese em SDS-page dos EPL obtidos nos meios de cultura: MRA e MRP. Coloração com prata.....	62
Figura 9	Microscopia eletrônica de promastigotas após período de três dias em cultura; MRA e MRP.....	63

Figura 10	Microscopia eletrônica de promastigotas mantidas em meios MRA e MRP por 3 dias. Avaliação da presença de vesículas.....	64
Figura 11	Microscopia eletrônica da membrana de promastigotas mantidas em meios, MRA e MRP por 3 dias. Avaliação do glicocálice com coloração de vermelho de rutênio.....	70
Figura 12	Representação esquemática da aquisição de aminoácidos em meio MRA e MRP.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos tipos, siglas, uso e composição de meios de cultura empregados neste trabalho.....	30
Tabela 2	Concentrações de proteínas e carboidratos presentes em promastigotas e secretados para o meio de cultura MP199.....	43
Tabela 3	Apresentação dos valores de P calculados estatisticamente por ANOVA, entre os EPLs obtidos de MRP e MRA com presença de inibidores e sem presença de inibidores.....	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Concentração de promastigotas/mL presentes em cultura MP199 a partir da inserção dos parasitos (Dia 0) até o término da cultura (Dia 6).....	42
Gráfico 2	Atividade proteolítica do EPL isolado de meio MP199. Período de incubação de 8 horas a 37°C. Diferentes pHs (3 a 11) foram utilizados para detecção da atividade proteolítica.....	46
Gráfico 3	Atividade proteolítica do EPL isolado de meio MP199 frente aos substratos conjugados a FITC.....	48
Gráfico 4	Atividade proteolítica do EPL de MP199 em ensaio fluorescente cinético de proteólise.....	49
Gráfico 5	Detecção da Inibição de peptidases de EPL em ensaio fluorescente com PMSF, Pepstatina A, Aprotinina e EDTA.....	50
Gráfico 6	Inibição da atividade proteolítica de peptidases presentes no EPL de MP199 em ágar /gelatina com os inibidores PMSF, Pepstatina A, Aprotinina e EDTA.....	51
Gráfico 7	Acompanhamento de cultura em meios MRP e MRA com contagem do número de parasitos/mL.....	56
Gráfico 8	Atividade metabólica detectada pela conversão de resazurina por promastigotas mantidas em MRP e MRA.....	58
Gráfico 9	Quantificação proteica em sobrenadantes de cultura após 3 dias de permanência dos parasitos em MRP e MRA.....	60
Gráfico 10	Quantificação proteica dos EPLs após 3 dias mantidos em cultura MRP e MRA.....	61
Gráfico 11	Consumo de carboidratos presentes nos ambientes de cultura após a incubação de promastigotas por 3 dias. Avaliação dos sobrenadantes dos meios MRA e MRP.....	66
Gráfico 12	Concentração de carboidratos em EPL de 10^8 parasitos/mL	

	obtido no meio MRA e MRP.....	67
Gráfico 13	Avaliação da presença de carboidratos precipitados, presentes no sobrenadante de meios de cultura MRA e MRP pós precipitação e análise por cromatografia de exclusão molecular.....	69
Gráfico 14	Detecção da proteólise de BSA/FITC em cultura de promastigotas mantidas com em MRP.....	71
Gráfico 15	Avaliação proteolítica do EPL de 5×10^7 promastigotas/mL, a partir da proteólise de caseína marcada com BODIPY [®] FL.....	72
Gráfico 16	Inibição da atividade proteolítica de cisteino, metalo, aspartil e serino peptidases em EPL de MRA e MRP.....	74
Gráfico 17	Comparação entre a inibição seletiva de metalo (1,10 fenantrolina), cisteino (E-64), aspartil (Pepstatina A) e serino peptidase (Aprotinina) em EPLs de MRA e MRP.....	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Ciclo parasitário.....	19
1.2	Epidemiologia.....	20
1.3	Manifestações clínicas.....	21
1.4	Diagnóstico.....	21
1.5	Tratamento.....	22
1.6	Peptidases e nutrição parasitária.....	23
2	OBJETIVOS.....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1	Manutenção dos Parasitos <i>in vivo</i>	29
3.2	Manutenção dos parasitos <i>in vitro</i>	29
3.3	Determinação do número de parasitos.....	31
3.4	Avaliação morfológica de promastigotas.....	31
3.5	Obtenção do extrato de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> (EPL).....	31
3.6	Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE).....	32
3.7	Viabilidade de parasitos com iodeto de propídio.....	32
3.8	Deteção da atividade metabólica por resazurina.....	33
3.9	Microscopia eletrônica.....	33
3.10	Marcação de substratos proteicos com isotiocianato de fluoresceína..	34
3.11	Processos de separação e avaliação molecular por cromatografia.....	34
3.11.1	Cromatografia líquida de exclusão molecular.....	34
3.11.2	Cromatografia de camada delgada (Thin-layer chromatography) TLC.	35

3.12	Detecção da atividade proteolítica <i>in vitro</i>	35
3.13	Detecção de fluorescência a partir da fragmentação de substratos marcados com FITC.....	36
3.14	Zimografia.....	36
3.15	Inibição de peptidases do EPL de <i>L. (L.) infantum</i>	37
3.16	Avaliação da inibição proteolítica em ágar/gelatina.....	37
3.17	Detecção e quantificação de carboidratos pelo método de fenol ácido sulfúrico.....	38
3.18	Avaliação estatística.....	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Padronização analítica.....	39
4.1.2	Avaliação dos aminoácidos e proteínas presentes no meio de cultura e nos suplementos utilizados na manutenção de promastigotas de <i>L. (L.) infantum in vitro</i>	39
4.1.3	Curva de crescimento de promastigotas em MP199.....	41
4.1.4	Perfil de proteínas e carboidratos estruturais e secretados de promastigotas.....	43
4.1.5	Caracterização morfológica de promastigotas mantidas em MP199.....	44
4.1.6	Comparação da atividade proteolítica do EPL de MP199 por método espectrofotométrico e fluorimétrico.....	45
4.1.7	Avaliação da atividade proteolítica do EPL sobre diferentes substratos.....	47
4.1.8	Avaliação da atividade proteolítica do EPL de MP199.....	48
4.1.9	Inibição da atividade proteolítica de EPL por PMSF, Pepstatina A, Aprotinina e EDTA em ensaio fluorimétrico.....	50

4.1.10	Confirmação da inibição da atividade proteolítica do EPL em ágar /gelatina.....	51
4.1.11	Avaliação do perfil proteolítico do EPL por zimografia.....	52
4.1.12	Inibição da atividade proteolítica da peptidase de 50 a 70 KDa.....	53
4.2	Avaliações de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> mantidas em MRP e MRA.....	55
4.2.1	Comparação e avaliação da multiplicação parasitárias em MRP e MRA.....	55
4.2.2	Avaliação do tamanho de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> em meios de cultura MRA e MRP.....	56
4.2.3	Deteção da atividade metabólica de promastigotas por resazurina.....	57
4.2.4	Porcentagem da mortalidade parasitária em cultura.....	58
4.2.5	Quantificação de proteínas nos sobrenadantes de cultura.....	59
4.2.6	Quantificação proteica dos EPLs.....	60
4.2.7	Perfil eletroforético de proteínas de EPL em SDS-page.....	61
4.2.8	Microscopia eletrônica de promastigotas mantidas em MRP e MRA..	63
4.2.9	Presença de vesículas na superfície dos parasitos.....	64
4.2.10	Consumo de carboidratos presentes no meio de cultura.....	65
4.2.11	Concentração de carboidratos estruturais em promastigotas.....	67
5.2.12	Deteção de carboidratos complexos no sobrenadante de culturas.....	68
4.2.13	Microscopia eletrônica da membrana de promastigotas mantidas em meios MRA e MRP.....	69
4.2.14	Deteção da atividade proteolítica em cultura a partir do consumo de BSA/FITC.....	70

4.2.15	Comparação entre a atividade proteolítica do EPL de MRA e MRP.....	71
4.2.16	Inibição da atividade proteolítica de cisteino, metalo, aspartil e serino peptidases em EPL de MRA e MRP.....	73
4.2.17	Comparação de inibição da atividade proteolítica do EPL de MRA e MRP.	75
5	DISCUSSÃO.....	77
6	CONCLUSÕES.....	89
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

1 Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma protozoonose endêmica em 88 países com uma estimativa de 300.000 novos casos anuais, podendo ser fatal em mais de 95% dos casos quando não tratados¹. Brasil, Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul são os países com maior número de casos, chegando a 90%¹. Devido ao clima e condições ambientais, o Brasil é o país mais acometido pela infecção nas Américas, entre os anos de 1990 a 2016, a taxa de incidência sofreu um aumento de 52,9%². Nas Américas, o agente etiológico causador da doença é a espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* e sua transmissão ocorre através do repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*³.

1.1 Ciclo parasitário

Quando transmitido a partir do vetor para o hospedeiro vertebrado, o parasito é fagocitado por macrófagos por meio de interações entre receptores de membrana presentes nessas células e moléculas presentes ou ligadas à superfície de promastigotas⁴. Após a fagocitose e formação do vacúolo parasitóforo, ocorre a fusão de lisossomos causando a diminuição do pH⁵. Em meio a esse processo, o parasito se modifica estruturalmente passando da forma promastigota para a forma amastigota, aumentando sua película superficial, reduzindo seu citoplasma, e sofrendo alterações em todo o compartimento da bolsa flagelar⁶. Modificações são adotadas pelo parasito para sua manutenção em um ambiente de estresse, como por exemplo, a síntese de bombas de prótons H⁺ para manutenção do pH neutro em seu interior mesmo em meio ao ambiente ácido ao seu redor^{7,8}.

Figura 1 - Ciclo de vida de *L. (L.) infantum*. Biologia, infecção e replicação dos parasitos em seus hospedeiros. Figura adaptada⁹.

1.2 Epidemiologia

Nos últimos anos um aumento no número de casos em regiões urbanas tem ocorrido, devido a adaptações do vetor¹⁰ e a presença do cão doméstico, principal reservatório urbano¹¹. Medidas de saúde pública para o controle têm sido amplamente empregadas nessas áreas, porém o número de casos não tem regredido¹².

Nas últimas décadas, modelos de dispersão dos parasitos pelo centro e sul do país foram propostos. Esses modelos sugerem a introdução de cepas dos parasitos nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo, por meio da migração de pessoas e seus cães durante a construção do gasoduto Bolívia-Brasil¹³. Além da dispersão dos parasitos pela fronteira boliviana a forte presença de vetores, cães sorologicamente positivos e casos humanos identificados a partir de 2016, classificam

a cidade de Foz do Iguaçu na tríplice fronteira como o ambiente provável de risco para introdução e disseminação da doença¹³.

Os últimos dados publicados pelo Ministério da Saúde indicam que no ano de 2018 foram diagnosticados no Brasil, 3.466 novos casos distribuídos em diversos estados, sendo que o maior número de indivíduos infectados foram detectados no Maranhão com 653 novos casos, seguido pelo Pará com 503 casos e Minas Gerais com 324 casos, dados federais do anos de 2019 ainda estão sendo contabilizados para publicação¹⁴.

1.3 Manifestações clínicas

Apenas parte dos casos de infecção em humanos evoluem para doença¹⁵. No mundo, cerca de 14,7% dos casos evoluem para forma sintomática após um período de 140 dias¹⁶. Já no Brasil, a proporção de doentes tende a ser menor, em torno de 5-6% dos infectados¹⁷, mas há poucos dados recentes da proporção de infecção assintomática. Nos casos onde ocorre evolução para doença, os principais sintomas relatados são febre irregular, hepatoesplenomegalia e hipergamaglobulinemia¹⁸.

O principal fator associado aos casos de infecção com progressão para a doença é a carência de uma dieta completa, pois crianças subnutridas são mais suscetíveis a doença, embora ainda não se saiba se o enriquecimento da dieta dessas possibilitam um maior controle da doença quando associado à terapias medicamentosas¹⁹.

1.4 Diagnóstico

Os casos suspeitos de LV no Brasil podem ser confirmados por diferentes métodos segundo o Ministério da Saúde, sendo considerados casos suspeitos todos os indivíduos que apresentam febre e esplenomegalia em áreas endêmicas²⁰.

A confirmação é feita pela pesquisa de anticorpos séricos em análises de amostras de soro e pela detecção dos parasitos em biópsias de baço, medula óssea ou linfonodos. Quando o diagnóstico laboratorial é impossibilitado por questões de logística ou ausência de condições adequadas para coletas de material, o tratamento do

indivíduo suspeito pode ser iniciado a partir de critérios clínicos epidemiológicos²⁰. Nesse caso, o diagnóstico presuntivo para instalação do tratamento pode ser a presença de sinais clínicos como esplenomegalia e a sorologia positiva por qualquer teste.

O diagnóstico da LV possui aspectos a serem melhorados, no caso das análises sorológicas de detecção dos anticorpos, a dificuldade está relacionada a ocorrência de resultados falsos positivos devido a reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, como o *Trypanossoma cruzi*²¹ ou mesmo a presença de anticorpos por infecção sem doença e a presença de esplenomegalia por outras causas, como a esquistossomose. Já a pesquisa do parasito em biópsia apresenta limitações quanto à coleta, pelo risco de acidentes, e deve ocorrer em instalações apropriadas e necessita de uma equipe médica treinada para análise e identificação correta do parasito²².

Em resposta a essas dificuldades, novos testes têm sido pesquisados para auxiliar no diagnóstico da LV, um deles é o ELISA dissociativo aplicado em amostras contendo possíveis imunocomplexos²³.

1.5 Tratamento

A ausência de vacinas eficazes para a prevenção da LV dificulta o combate a essa enfermidade. Atualmente apenas indivíduos com presença de sintomas clínicos são submetidos ao tratamento medicamentoso²⁴. Os medicamentos utilizados são fármacos com atividade leishmanicida como antimoniais, anfotericina B, miltefosine e pentamidina, que podem ser utilizados de forma isolada ou combinada²⁴. No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza a utilização de antimoniato de N-metil glucamina, anfotericina B lipossomal e o desoxicolato de anfotericina B para o tratamento da LV, a escolha destes fármacos é baseada em critérios individuais do paciente e os riscos que as terapias possuem²⁵.

Embora amplamente utilizados esses medicamentos possuem custo elevado e efeitos colaterais frequentes como alterações de frequência cardíaca, nefrotoxicidade, hipocalcemia, hepatotoxicidade e pancreatite²⁶. Além dos efeitos colaterais descritos, os antimoniais não são indicados em regiões do subcontinente indiano devido à presença de cepas resistentes, limitando ainda mais o número de terapias

medicamentosas disponíveis nessa área²⁷. No Brasil, uma série de estados apontaram, no passado, problemas após a utilização do antimoníato de meglumina contaminado por chumbo e mercúrio²⁸. Devido a problemas como esse, somente uma empresa farmacêutica comercializa o medicamento em países endêmicos, a Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda²⁹. Frente a esses problemas nos últimos anos, cerca de meio milhão de novos compostos foram estudados em busca de agentes quimioterápicos para LV por laboratórios públicos e privados³⁰.

A interação de conhecimentos relacionados ao metabolismo parasitário pode contribuir para identificação de novos alvos terapêuticos. A utilização de compostos inibidores de peptidases possui eficiência no controle de enfermidades como doenças virais, hipertensão, trombose, pancreatite e doenças respiratórias, para essas enfermidades já estão disponíveis cerca de 20 medicamentos comerciais³¹. A utilização dos inibidores de peptidases tem sido responsável pelo controle de infecções causadas pelos vírus do HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) e Hepatite C por meio da inativação dessas enzimas importantes no metabolismo desses agentes³².

1.6 Peptidases e nutrição parasitária

Uma grande quantidade de peptidases também está presente no interior de protozoários patogênicos, e embora sejam atribuídas diversas funções biológicas específicas, como a invasão de células hospedeiras, encistamento de coccídeos, progressão do ciclo celular, citoaderência e estimulação ou evasão da resposta imune, a mais relevante para este trabalho é a sua utilização no processamento de proteínas para o fornecimento de aminoácidos³³.

O gênero *Leishmania* mantém aminoácidos livres em seu citoplasma, aproximadamente 300 mM, sendo que 50-70 mM são alanina, 34 mM ornitina, 14 mM glutamato e 14 mM glicina³⁴. A variedade de aminoácidos biossintetizados por parasitos intracelulares é inferior quando comparado aos biossintetizados por humanos³⁵. Em *L. (L.) major* é estimada a síntese de 9 dos 20 aminoácidos necessários para a produção de proteínas³⁵. Esses 9 aminoácidos biossintetizados são alanina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, prolina e tirosina(a partir de

fenilalanina exógena)³⁵. Os demais aminoácidos não podem ser produzidos devido à ausência de enzimas envolvidas no processo e devem ser adquiridos por meio de interações com os hospedeiros, que podem fornecer essas moléculas já sintetizadas³⁵. Trabalhos têm demonstrado que a internalização desses aminoácidos pode ocorrer por meio de transportadores de membrana^{36,37}. A alta dependência de alguns aminoácidos como a serina, pode ter induzido o desenvolvimento de um sistema de captura presente em ambas as formas do parasito garantido seu suprimento a partir do ambiente³⁸. A grande maioria dos aminoácidos sintetizados ou adquiridos por tripanossomatídeos são utilizados na síntese proteica, com uma minoria sendo usada em outras vias metabólicas³⁹.

A ausência dessas moléculas pode ocasionar alterações no metabolismo celular como a expressão de fosfatidilserina, componente das membranas celulares, a mudança no potencial da membrana mitocondrial e a liberação de cálcio intracelular, essas alterações acabam lesando o DNA parasitário e podem levar a sua lise⁴⁰. Além da aquisição de aminoácidos livres por meio de transportadores de membrana, a captura da hemoglobina por endocitose e sua subsequente digestão também parece ser um mecanismo nutricional importante para o parasito, por fornecer aminoácidos e grupos prostéticos, como o heme⁴¹.

Foram descritas uma variedade de peptidases no gênero *Leishmania*, sendo que essas enzimas estão distribuídas em quatro grandes grupos: cisteíno peptidase, aspartil peptidase, metalo peptidase e serino peptidases. Estes por sua vez se subdividem em uma variedade de famílias e clãs que ao final abrigam cerca de 158 enzimas proteolíticas, codificadas a partir de 1,8% do genoma do parasito⁴². Estes estudos têm sido feitos baseados em experimentos onde as enzimas são extraídas do organismo e avaliadas de forma isolada o que acarreta em uma maior dificuldade no entendimento das funções destas peptidases no organismo vivo.

As cisteíno peptidases são abundantemente encontradas em compartimentos intracelulares principalmente em amastigotas, entretanto quantidades menores também estão presentes em promastigotas⁴³. Suas principais funções parecem ser proteção e manutenção de amastigotas e seu crescimento dentro de macrófagos, mas são consideradas como fatores de virulência, podendo também exercer funções imuno-reguladoras⁴³. Embora seja possível a inibição dessas peptidases, não é comum sua

aplicação como terapia devido à toxicidade apresentada pelos inibidores atualmente disponíveis⁴³.

As serino peptidases desempenham papéis importantes na interação parasito hospedeiro⁴⁴. Dentre as serino peptidases encontradas no gênero *Leishmania*, destaca-se uma serino peptidase extracelular que contém dois domínios totalizando 115 KDa de tamanho e que cliva hemoglobina, albumina do soro bovino, ovalbumina, fibrinogênio, colágeno, gelatina e substratos peptídicos contendo arginina⁴⁵. A maior concentração desta enzima ocorre próxima ao flagelo e em vesículas citoplasmáticas presentes em promastigotas e amastigotas, essas informações sugerem que a secreção desta serino peptidase envolve a bolsa flagelar, possibilitando também a ingestão macropinocítica de proteínas⁴⁶. As funções dessa enzima ainda não são bem definidas, entretanto a proteólise de moléculas como a hemoglobina sugerem uma atividade proteolítica com interesse nutricional para o parasito, pois os subprodutos dessa clivagem são o heme, íons de ferro e aminoácidos essenciais e não essenciais^{45,46}. A degradação de proteínas séricas é importante para a aquisição de aminoácidos essenciais no metabolismo dos protozoários e tem sido amplamente descrita em plasmódios⁴⁷.

As aspartil peptidases são um grupo de enzimas que possuem uma ação hidrolítica em baixo pH e tem uma preferência por clivagem entre aminoácidos maiores e hidrofóbicos⁴⁸. Faltam informações sobre essas peptidases nas espécies de *Leishmania*, por dificuldades na purificação e caracterização, entretanto estudos com inibidores de aspartil peptidases utilizadas nas terapias contra o HIV vêm sendo realizados nestes parasitos⁴⁸. Foi descrita uma redução acentuada da incidência, morbidade e mortalidade dos indivíduos co-infectados com HIV/leishmania após a introdução dos inibidores de aspartil peptidases na terapia anti-retroviral, entretanto as doses necessárias *in vitro* para a inativação de peptidases do parasito são superiores as utilizadas no tratamento do HIV⁴⁹.

A peptidase mais abundante em *L. (L.) infantum* é a metalopeptidase Leishmanolisina ou glicoproteína de 63 KDa (gp63), uma metalopeptidase zinco-dependente presente na membrana do parasito que corresponde a mais de 1% das proteínas totais⁴². Além da clivagem de fatores do complemento como o C3b, sabe-se também que esta proteína isolada é capaz de hidrolisar proteínas como albumina,

caseína, fibrinogênio, hemoglobina e anticorpos⁵⁰. Um aumento no número de estudos sobre peptidases tem ocorrido devido ao fato da inibição dessas enzimas ser uma promissora estratégia no controle de infecções por parasitos em doenças como toxoplasmose, criptosporidiose e leishmaniose⁵¹.

A identificação das enzimas proteolíticas parasitárias empregadas no mecanismo de aquisição de aminoácidos essenciais é de grande importância pois a partir de sua identificação será possível melhor entendermos a relação parasito-hospedeiro no que diz respeito ao metabolismo proteico parasitário. O conhecimento obtido em relação à atuação dessas peptidases em cultura de *L. (L.) infantum* também fornecerá informações relevantes sobre a importância metabólica destas enzimas para a manutenção das condições fisiológicas e metabólicas do parasito, o que as tornariam alvos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da LV.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar as interações entre promastigotas de *L. (L.) infantum* com o microambiente, a partir da análise da síntese e secreção de moléculas parasitárias envolvidas na aquisição de nutrientes.

2.2 Específicos

- Avaliação da cultura de promastigotas de *L. (L.) infantum* mantida em meio padrão 199[©] (MP199) em relação a seu crescimento, concentração de proteínas e carboidratos estruturais e excretados/secretados;
- Detecção da atividade proteolítica do Extrato de Promastigotas de *L. (L.) infantum* (EPL) mantida em MP199 em metodologias independentes e identificação das peptidases;
- Avaliação da inibição de metalo, cisteino, serino e aspartil peptidases sobre o EPL obtido de MP199;
- Avaliação de cultura de promastigotas de *L. (L.) infantum* mantidas em MRA e MRP em relação a seu crescimento, concentração de proteínas e carboidratos estruturais e excretados/secretados;
- Comparação do metabolismo parasitário das promastigotas mantidas em MRA e MRP, por meio do consumo de carboidratos presentes nos meios de cultura, metabolização de resazurina e avaliação da mortalidade celular por iodeto de propídeo;
- Avaliação da morfologia parasitária de promastigotas mantidas em MRA e

MRP;

- Detecção da atividade proteolítica do EPL obtido de MRP a partir da degradação de BSA/FITC.
- Avaliação da inibição de metalo, cisteino, serino e aspartil peptidases sobre os EPLs obtidos de MRA e MRP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os sais e reagentes utilizados possuem qualidade pró-análise, sendo a água deionizada purificada em sistema MilliQ® (Millipore®), apresentando resistividade de 18,2 mega Ω .

3.1 Manutenção dos Parasitos *in vivo*

Foram utilizados promastigotas de *L. (L.) infantum* cepa (MHOM/BR/1972/LD) mantidos pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. A obtenção dos parasitos ocorreu através da manutenção *in vivo* por meio de infecção experimental em hamsters. Em nossos experimentos, foram usados hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) machos, recém-desmamados. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina/SP e mantidos em alojamento para animais no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical. A eutanásia destes animais foi feita por injeção intraperitoneal de Tiopental sódico em dose letal (150 mg/kg) e sua manipulação foi feita conforme as normas de cuidados de animais de laboratório⁵². Este projeto de pesquisa foi aprovado junto a CEUA-IMTSP/USP (000346A).

3.2 Manutenção dos parasitos *in vitro*

Os inóculos para manutenção de promastigotas foram de 1×10^6 promastigotas/mL. Esses inóculos foram ajustados para cultivo em 20 mL de meios de cultura. Os repiques foram feitos a cada 3 dias para manutenção dos parasitos no meio MP199 com acréscimo de 5% de urina humana masculina e 10% de soro fetal. Os demais meios, MRA e MRP foram utilizados em nossos experimentos a fim de avaliar as modificações estruturais e bioquímicas presentes nos parasitos após condições de estresse, nestes dois meios não foram efetuados repiques para manutenção dos

parasitos. A descrição dos meios de cultura utilizados, sua sigla, uso e composição estão representados na tabela 1.

Tabela 1 - Descrição dos tipos, sigla, uso e composição de meios de cultura empregados neste trabalho.

Meio	Sigla	Uso	Composição
Meio 199 [©] (urina 5% e soro fetal bovino 10%)	MP199	Padronização de técnicas Manutenção de cepa <i>in vitro</i> . Avaliação das promastigotas mantidas <i>in vitro</i> e sobrenadante da cultura.	Meio comercial 199; 2 mL de solução de hemina 0.076 mM em NaOH 1 M; NaHCO ₃ 4.09mM; Hepes 39.86 mM; 750 µl/L de gentamicina; 5% de urina humana; 10% de soro fetal bovino.
Meio rico em aminoácidos.	MRA	Avaliação das promastigotas mantidas <i>in vitro</i> e sobrenadante da cultura.	Solução de sais de Earle com aminoácidos (0,1 mg/mL de cada aminoácido de síntese proteica); 2 mL de solução de hemina 0.076 mM em NaOH 1 M; NaHCO ₃ 4.09 mM; Hepes 39.86 mM e 750µl/L de gentamicina.
Meio rico em proteínas	MRP		Solução de sais de Earle com 1% de proteína; 2 mL de solução de hemina 0.076 mM em NaOH 1 M; NaHCO ₃ 4.09 mM; Hepes 39.86 mM e 750µl/L de gentamicina.

3.3 Determinação do número de parasitos

Alíquotas de 1 mL foram retiradas diariamente das culturas analisadas para contagem de promastigotas e determinação da concentração parasitária/mL. As amostras foram homogeneizadas em corante adequado, na proporção de 3 volumes de cultura para 1 volume de lugol forte, após coradas, essas promastigotas foram quantificadas em câmara de Neubauer.

3.4 Avaliação morfológica de promastigotas

Promastigotas de *L. (L.) infantum* foram lavadas 3 vezes em solução de NaCl 150 mM e concentradas a partir de centrifugações à 2.800 G por 20 minutos. Os parasitos foram homogeneizados com soro fetal bovino para dispersão por esfregaço em lâminas de vidro. Após a secagem dos esfregaços, as lâminas foram fixadas com metanol absoluto por 5 minutos e coradas com corante de Giemsa na diluição de 1:15. A análise do tamanho dos parasitos foi feita a partir de fotografias obtidas com aumento de 1000x em microscopia ótica. O cálculo do tamanho médio dos parasitos em cada meio foi realizado a partir da estimativa de tamanho de 90 parasitos aleatórios analisados após digitalização da imagem, e sua área média foi estimada utilizando o software ImageJ®, utilizando unidades arbitrárias (UA) como medida de área. A dispersão foi apresentada por valores individuais e foi estimado o volume médio e seu erro padrão. A avaliação do tamanho dos parasitos foi feita sempre em promastigotas mantidas previamente por 3 dias em cultura.

3.5 Obtenção do extrato de promastigotas de *L. (L.) infantum* (EPL)

Promastigotas de *L. (L.) infantum* quantificadas e lavadas em solução de NaCl 150 mM, foram concentradas a partir de centrifugações a 2.800 G por 20 minutos. O processo de sonicação ocorreu em água destilada por 3 períodos de 40 segundos cada

com intervalos de 10 segundos, sob banho de gelo constante. As amostras preparadas foram submetidas à determinação proteica pelo método de Bradford⁵³, após a quantificação de proteínas os EPLs foram separados em alíquotas mantidas a - 80°C até seu uso. Todos os EPLs foram obtidos a partir de promastigotas mantidas previamente por 3 dias em cultura.

3.6 Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE)

Amostras de EPL foram homogeneizadas com tampão de amostras (1% de SDS, 10 mM de Tris-HCl pH 6,8, glicerol 20% e azul de bromofenol 0,001%). A concentração de acrilamida do gel utilizado foi de 7,5% e o material foi submetido à eletroforese em tampão de corrida 1x (15 g de glicina, 3,025 g Tris base pH 8.3, em água destilada adicionada até 1000 mL) por cerca de 1 hora a 100 volts. Após a corrida o gel foi fixado em solução de ácido acético 45% e álcool metílico 10% por 45 minutos. A coloração foi feita com solução de brilhante blue G 250 0,1%, metanol 45%, ácido acético 10% por uma hora, seguido por descoloração (ácido acético 5% e metanol 10%) durante um dia ou por coloração de prata, com impregnação de solução de prata (0,4 g de nitrato de prata em 150 mL de água) por 30 minutos, seguido de três lavagens com água destilada e revelação com solução reveladora (4,5 g de Na₂CO₃, 0.2 mL de formol em 150 mL de água).

3.7 Viabilidade de parasitos com iodeto de propídio

Alíquotas de 1 mL foram retiradas da cultura para marcação dos parasitos com 20 µl de solução de Iodeto de Propídio (50 µg/mL PBS pH 7,4). O período de incubação para marcação dos parasitos foi de 15 minutos, seguido por 3 lavagens por centrifugação com PBS. Nas culturas analisadas, uma alíquota obtida foi fixada com formol 10% em PBS e seguiu os demais passos descritos anteriormente para marcação. Os parasitos foram lidos em microplacas de 96 poços pretas em um fluorímetro nos comprimentos de onda: excitação 485nm e emissão 630nm. A porcentagem de

parasitos mortos foi calculada a partir da diferença entre a amostra viva marcada comparados com o total de parasitos mortos(fixados) com iodeto de propídio.

3.8 Detecção da atividade metabólica por resazurina

A atividade metabólica de promastigotas foi aferida a partir de concentrados parasitários contendo 10^7 parasitos/poço em microplaca de 96 poços. O volume de meio de cultura contendo os parasitos foi de 100 μ L acrescidos de 20 μ L de solução de resazurina em PBS (150 μ g/mL de resazurina). Os parasitos foram incubados por 3 horas a 37°C, após o período de incubação as amostras foram lidas em microplacas de 96 poços pretas em um fluorímetro nos comprimentos de onda: excitação 535 nm e emissão 595 nm.

3.9 Microscopia eletrônica

Os parasitos após concentrados e lavados foram ressuspensos em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4, com vermelho de rutênio 0,25% e glutaraldeído 3%. Após a fixação eles foram incubados em tetróxido de ósmio 2% e tampão s-colidine 0,1 M pH 7,4. Posteriormente as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1 M com sacarose 2%, e contrastadas com acetato de uranila 5% em etanol 50%, seguidas por lavagens com etanol 70%, desidratadas em 2,2-dimetoxipropeno acidificado com ácido clorídrico 1 N e com acetona 100%. As promastigotas foram incubadas com acetona 100% e com Epon Polymer 812 e Araldite 502. Após a polimerização total foram realizados cortes ultrafinos, submetidos a coloração com acetato de uranila saturada e citrato de chumbo. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico Philips Tecnai-10[®] no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP. Todo material submetido a microscopia eletrônica foi processado no laboratório de patologia de Moléstias Infecciosas do Departamento de Patologia da FMUSP.

3.10 Marcação de substratos proteicos com isotiocianato de fluoresceína

Nos experimentos com substratos fluorescentes, a proteína marcada utilizada foi a albumina bovina sérica (*Bovine serum albumin* - BSA), conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate* - FITC), originando o conjugado BSA/FITC. A conjugação ocorreu da seguinte forma: foi adicionado 10% do volume total de BSA em tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0.5 M, pH 9.0 e em seguida 1 mg de FITC para cada 100 mg de proteína, após ter sido ajustada a concentração de BSA na solução para 20 mg/mL com tampão carbonato/bicarbonato 0.05 M, pH 9.0. A solução foi mantida sob agitação magnética branda a 4°C, por 24 horas. O excesso de FITC não conjugado foi eliminado da solução por cromatografia de exclusão molecular em gel de Sephadex G25®.

3.11 Processos de separação e avaliação molecular por cromatografia.

3.11.1 Cromatografia líquida de exclusão molecular

A cromatografia por exclusão molecular também denominada aqui de LPLC (*Low Pressure Liquid Chromatography*) foi feita em coluna de 60 mL (3 cm de diâmetro e 10,5 cm de comprimento). A resina utilizada foi Sephadex G-25® hidratada como fase estacionária e PBS 0,1 x como fase móvel. As condições cromatográficas utilizadas para a padronização da coluna e análise foram as mesmas, o fluxo de tampão utilizados foi de 4 mL/ min com coleta de frações contendo 3,5 mL em um sistema Akta Prime® automático. A amostra de 5 mL foi aplicada após lavagem e estabilização do sistema e da coluna com 50 mL do tampão PBS 0,1x. Foi determinada a absorbância de UV a 278 nm e a condutividade da amostra para determinação das frações contendo proteína ou solutos como a fluoresceína.

3.11.2 Cromatografia de camada delgada (*Thin-layer chromatography*)

TLC.

Nessa técnica foram usadas placas confeccionadas *in house* a partir de sílica e sulfato de cálcio (5M e 0,33M respectivamente). As placas utilizadas como fase estacionárias possuíam dimensões de 8cm X 10cm e uma fina camada de sílica (partículas de 10 a 40 μ m) com sulfato de cálcio. Para estes testes foram utilizados como fase móvel um tampão contendo butanol, ácido acético e água (4/1/1, respectivamente). Para o controle da técnica foram utilizados uma mistura de aminoácidos e albumina. A partir da borda inferior da placa foi aferida uma distância de 0,5 cm de espaço para a aplicação tanto das amostras como dos padrões. Na borda superior também foi preservado 0,5 cm, finalizando a migração das moléculas quando a fase móvel atingia este nível. A seguir, a placa era cuidadosamente seca e reagida com ninhidrina em acetona em spray para evidenciação dos aminoácidos e proteínas. Fotografias digitais foram obtidas para documentação.

Os padrões de migração de aminoácidos e proteína podem ser vistos na figura 2. Onde foi utilizado uma concentração de 2,5 μ M de cada um dos aminoácidos por meio de um pool (totalizando 50 μ M) e 2 mg de albumina.

3.12 Detecção da atividade proteolítica *in vitro*

Para a detecção de aminoácidos aromáticos por espectrofotometria em ultravioleta foram utilizados 400 μ l de tampão universal modificado (Ácido cítrico 31,27 mM, Fosfato monopotássico 28,60 mM, Ácido bórico 28,61 mM, Ácido barbitúrico 28,58 mM, Hidróxido de sódio adicionado até obtenção do pH desejado)⁵⁴, acrescido de 80 μ l de solução de BSA 3% (em água destilada) e 20 μ l de EPL. As amostras foram incubadas por 8 horas a 37°C em agitação constante. Após esse período o pH foi alcalinizado para 12 por meio da adição de solução de Hidróxido de sódio 1 M. Essas amostras foram homogeneizadas e receberam 10 μ l de solução de Ácido tricloroacético (TCA 50% em água destilada) para induzir a precipitação do substrato não degradado, isso se deu por meio de incubação a 37°C por 30 minutos seguida por

centrifugação a 10.000 G por 20 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram separados e as absorbâncias determinadas em 280 nm.

3.13 Detecção de fluorescência a partir da fragmentação de substratos marcados com FITC

O ensaio de atividade proteolítica foi feito a partir de incubações contendo 120 µl de tampão universal modificado no pH de teste, 20 µl de substrato marcado com FITC (250 µg/mL) e 20 µl de EPL (50 µg/mL). As incubações foram feitas em microplacas pretas de 96 poços. Após a adição dos componentes descritos anteriormente, as placas foram agitadas por 1 minuto e incubadas a 37°C durante o tempo necessário para cada teste. Ao término do período de incubação ou durante este, para os ensaios cinéticos, as amostras foram lidas em espectrofluorímetro FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices®, em comprimentos de onda de 485 nm para excitação e 535 nm para emissão. Os dados obtidos foram utilizados para calcular a porcentagem de unidades de fluorescência relativa. O cálculo foi feito mediante a subtração do valor de fundo da reação e os valores obtidos para cada amostra. Este método baseia-se no fato de que a fluoresceína ligada em macromoléculas é menos acessível a luz que a fluoresceína livre, então a fluorescência cresce com a ação da peptidase.

3.14 Zimografia

Para os ensaios de zimografia, foram produzidos géis de poliacrilamida a 7,5% com 3 mg de substrato proteico/mL. Uma curva base 2 com concentrações de EPL relativas a $1,5 \times 10^7$ - 1×10^9 parasitos/mL foi utilizada no experimento de padronização, sendo sempre aplicado 25 µl/poço. Já nos ensaios com inibidores foi utilizada uma concentração de EPL de 3 mg/mL de proteínas. Após a corrida eletroforética os géis foram removidos e incubados durante uma hora em Triton X 100 2.5%, para recuperação de peptidases e remoção do SDS. Concluído esse período, os géis foram

lavados com água destilada e novamente inseridos em uma solução de incubação (50 mM de Tris/HCL pH 7.4). A coloração e descoloração dos géis foram realizadas de acordo com o protocolo de SDS-PAGE convencional com Coomassie Blue.

3.15 Inibição de peptidases do EPL de *L. (L.) infantum*

Os inibidores de peptidases utilizados em nossos experimentos foram: Aprotinina (para a inibição de serino peptidases); PMSF (para a inibição de cisteino e serino peptidases); EDTA e 1,10 fenantrolina (para a inibição de metalo peptidase); pepstatina A (para inibição de aspartil peptidase); E-64 (para a inibição de cisteino peptidases). Esses inibidores foram utilizados de forma individual ou conjunta de acordo com a necessidade do experimento. As concentrações utilizadas foram: Aprotinina (0,5 μ M), PMSF (0,5 μ M) e Pepstatina A (5 μ M), 1,10 fenantrolina (0,5 μ M), E-64 (10 μ M), Quimostatina (100 μ M) e EDTA (5 mM).

3.16 Avaliação da inibição proteolítica em ágar/gelatina

Foram produzidos géis de ágar 2% com 3 mg/mL de gelatina. Após o aquecimento à 90°C do produto para diluição total a solução pronta foi aplicada em lâmina de vidro. A solidificação do gel ocorreu sob luz ultravioleta e poços de 2 mm foram feitos. As amostras do EPL homogeneizadas com os inibidores PMSF, Aprotinina, Pepstatina A e EDTA foram aplicadas nos poços (2 μ l/ poço), seguido de incubação por 12 horas a 37°C. Após a incubação os géis foram fixados com solução de metanol 100%, seguido por coloração feita com Coomassie Brilliant Blue G 250 0,1%, metanol 45% e ácido acético 10% por 1 hora, seguido por descoloração repetidas com ácido acético 5% e metanol 10%, até distinção adequada.

3.17 Detecção e quantificação de carboidratos pelo método de fenol ácido sulfúrico

A detecção quantitativa de açúcares foi feita pela oxidação por fenol na presença de ácido sulfúrico. Uma curva padrão foi feita a partir das concentrações de: 1400, 1200, 1000, 800, 600, 400, 300, 250, 200 150 e 100 $\mu\text{g/mL}$ de (D+) galactose para padronização da reação e cálculo da regressão linear. A reação foi executada em tubos a partir da adição de 50 μl de amostras, 30 μl de solução de fenol 1% em água e 150 μl de Ácido Sulfúrico, após homogeneização os tubos foram aquecidos à 90°C por 5 minutos seguidos por leitura da absorbância em microplacas a 492 nm. As mesmas concentrações de reagentes, períodos e temperaturas utilizados para padronização do método de Fenol/Ácido sulfúrico foram utilizados na quantificação de carboidratos presentes em amostras.

3.18 Avaliação estatística

Os resultados aqui expressos em gráficos foram produzidos por meio da inserção dos dados no programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia USA), utilizado o modelo mais adequado para o esclarecimento e exposição dos resultados obtidos, sempre utilizando como critérios a correlação de Pearson e seus índices. Os modelos de curvas proteicas foram comparados geralmente pelo modelo de regressão não linear variável ou sigmoidal dose-resposta. A comparação entre grupos de análise sempre foi feita pelo teste de t(dois grupos) ou ANOVA(mais de dois grupos), após checagem da homogeneidade de variâncias (teste de Levine), assumindo-se que a diferença existia quando a probabilidade de igualdade era menor que 5% e esta afirmação tinha um poder de 90%(erro tipo II).

4. RESULTADOS

4.1 Padronização analítica

Para o estabelecimento de condições analíticas usadas nos experimentos de avaliação de promastigotas em microambiente rico em aminoácidos e proteínas, optamos por padronizar os métodos e etapas em cultura padrão (MP199) de promastigotas de *L. (L.) infantum*. Os resultados obtidos foram usados como referência de condições nos experimentos posteriores.

4.1.2 Avaliação dos aminoácidos e proteínas presentes no meio de cultura e nos suplementos utilizados na manutenção de promastigotas de *L. (L.) infantum* *in vitro*.

Para entendermos melhor a composição proteica e de aminoácidos presentes no meio de cultura e suplementos usualmente utilizados na manutenção de promastigotas de *L. (L.) infantum* utilizamos as técnicas de TLC e LPLC. O TLC possui papel fundamental para a detecção de aminoácidos presentes nas amostras avaliadas e o LPLC foi utilizado para a separação de moléculas de alta massa e baixa massa molecular. Com base nas análises das duas técnicas foi possível identificarmos as principais fontes de proteínas e aminoácidos presentes nos componentes da cultura.

O meio de cultivo de promastigotas utilizado como padrão em nossos experimentos foi o 199[®] suplementado com urina humana e soro fetal bovino. Características como a concentração de proteínas e seus perfis de absorção de UV (280 nm) e condutividade foram determinados em cromatografia de exclusão molecular (frações individuais) em LPLC de forma isolada para cada componente (meio 199[®], urina humana e soro fetal bovino). Testes de padronização permitiram identificar a presença de proteínas nas 10 primeiras frações coletadas, e a presença de aminoácidos e peptídeos nas frações posteriores.

Para cada corrida cromatográfica as frações foram coletadas de forma individual. Para otimização da análise, cada 3 tubos sequenciais originaram *pools*

posteriormente analisados por TLC. Esses TLCs foram testados e revelados para a evidência de aminoácidos e proteínas. Controles contendo aminoácidos e proteína (BSA) foram usados como comparativo na TLC. Os resultados estão demonstrados na Figura 2.

Figura 2 - Avaliação de urina humana (A), soro fetal bovino (B) e M199 (C). Por LPLC e TLC. As linhas segmentadas vermelhas presente nos gráficos indicam a detecção da condutividade e a linha azul continua indica a densidade ótica das amostras analisadas no LPLC. A linha preta tracejada na vertical faz a divisão de moléculas de alta e baixa massa molecular. Os espaços entre as linhas pontilhadas indicam a formação de amostras unidas para análise por TLC, imagem abaixo do gráfico.

Os resultados mostraram diferentes perfis de concentrações de proteínas e aminoácidos para o meio de cultura 199[®] e seus suplementos, urina humana e soro fetal bovino. A amostra de urina usada na suplementação foi analisada e os resultados permitiram identificar maiores concentrações proteicas detectadas por UV na 10^o

fração coletada, seguida da 14^o fração da LPLC. Os *pools* originados foram testados em TLC e o perfil de migração pela resina mostrou compatibilidade com moléculas de alta massa no 4^o *pool* e de menor massa nos 5^o e 6^o *pools*, os quais foram positivos para a reação colorimétrica de aminas. Esses dados se tornam mais fortes quando associados aos obtidos pelo TLC que evidenciam moléculas de maior massa molecular presente nas frações iniciais e de menor massa nas frações finais.

O soro fetal, diferentemente da urina apresentou maiores concentrações proteicas nas primeiras frações da LPLC, como esperado. O *pool* de frações contendo maior concentração de proteínas detectada por UV, quando analisada em TLC, apresentou um perfil de alta massa molecular, a coloração foi fortemente reativa à aminas, sugerindo a presença de abundantes proteínas. Devido à ausência de mais picos bem definidos na LPLC e colorações fortemente marcadas na TLC, indica a baixa concentração de aminoácidos livres presentes nestas amostras.

Assim como já esperado, na análise do meio 199[®] foi observada a presença de aminoácidos. Isso se deve a presença de diferentes colorações observadas no TLC de forma intensa pela revelação de aminas entre os *pools* das frações de 4 a 7. Também como esperado não foram observados picos para proteínas na LPLC e nem coloração nos *pools* iniciais. Os dados obtidos na análise do meio 199[®] já eram esperados pois foram concordantes com a composição do produto divulgada pelo fabricante, que possui uma variedade de aminoácidos e ausência de proteínas.

4.1.3 Curva de crescimento de promastigotas em MP199

A multiplicação parasitaria e aumento do número de parasitos é um dado importante pois com base nele é possível de se determinar a fase de crescimento parasitário que a cultura está. Neste experimento foi observada a curva de crescimento de promastigotas mantidas no MP199 por 6 dias.

Promastigotas de *L. (L.) infantum* mantidas em cultura em MP199 foram quantificadas a cada 24 horas para estabelecimento de curva de crescimento *in vitro*. A quantificação dos parasitos foi realizada a partir da retirada de alíquotas da cultura, contadas em câmara de Neubauer com coloração de lugol. A concentração de

parasitos/mL está demonstrada no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Concentração de promastigotas/mL presentes em cultura MP199 a partir da inserção dos parasitos (Dia 0) até o término da cultura (Dia 6). A linha tracejada na vertical indica o terceiro dia de cultura até onde houve crescimento exponencial.

Um crescente número de promastigotas foi observado nos três primeiros dias de cultura, após o terceiro dia foi possível observar uma estagnação na multiplicação parasitária. Com base nos resultados obtidos da curva de crescimento, foi determinado que a análise dos parasitos, assim como a análise do meio de cultura ocorreriam sempre após a permanência das promastigotas por 3 dias nos diferentes meios de cultura presentes neste trabalho. Foram testados sistemas automáticos de contagem, como Scepter e MUSE da Millipore, sem discriminação devido ao tamanho variável ou pequeno das promastigotas (dados não apresentados).

4.1.4 Perfil de proteínas e carboidratos estruturais e secretados de promastigotas

Os parasitos ao serem mantidos em meios de cultura sofrem e causam interações com o microambiente ao seu redor, para entendermos melhor essas interações avaliamos a concentração de carboidratos e proteínas presentes tanto na estrutura parasitaria como os que foram secretados para o meio externo, além dessas análises também observamos o consumo de carboidratos pois esse dado está ligado diretamente ao metabolismo energético e nos fornece informações quanto a ausência ou presença de atividade metabólica.

Após a manutenção dos parasitos em cultura por 3 dias em MP199, foram feitos concentrados de 10^6 promastigotas/mL para a análise de sua composição proteica e de carboidratos. Além da análise da concentração de proteínas e carboidratos estruturais parasitários, os sobrenadantes de cultura também foram analisados em relação a presença de carboidratos e proteínas secretados pelos parasitos e o consumo de carboidratos. Como referência para os experimentos futuros com MRA e MRP. Os dados obtidos estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações de proteínas e carboidratos presentes em promastigotas e secretados para o meio de cultura MP199.

Dados de Promastigotas mantidas em MP199 por 3 dias e sobrenadante cultura.	
Concentração de proteínas estruturais parasitarias.	7,08 µg
Concentração de carboidratos estruturais parasitários.	2,48 µg
Concentração de proteínas secretadas (sobrenadante de cultura).	0,193 µg/mL*
Concentração de carboidratos de alta massa molecular secretados (sobrenadante de cultura).	7,88 µg/mL*
Consumo de carboidratos em cultura	917µg*

* Os dados de sobrenadantes de cultura não se referem especificamente a 10^6 parasitos/mL pois são obtidos de sobrenadante das culturas que ao longo do período de incubação possui variação no número de parasitos devido a multiplicação.

As concentrações de proteína e carboidratos estruturais de 10^6 parasitos foram de 7,08 μg e 2,48 μg , respectivamente. As concentrações de proteínas e carboidratos secretados pelos parasitos até o 3º dia de incubação da cultura foram respectivamente de 0,193 $\mu\text{g/mL}$ e 7,88 $\mu\text{g/mL}$. Estruturalmente foi observada uma proporção maior de proteínas que carboidratos presente na superfície e no interior das promastigotas, já quando analisada a secreção presente nos meios de cultura foi evidenciado o inverso com uma maior presença de carboidratos com massa molecular maior do que monossacarídeos, dispersos pelo sobrenadante do meio em relação a proteínas.

4.1.5 Caracterização morfológica de promastigotas mantidas em MP199

Além das quantificações da composição molecular de proteínas e carboidratos fizemos a análise do tamanho dos parasitos, para observarmos se eles mantinham suas características convencionais ou se haviam alterações estruturais como regressão flagelar.

Promastigotas mantidas em MP199 foram analisadas por microscopia ótica em aumento de 1000x após fixação e coloração com Giemsa. Os parasitos após observados, foram fotografados e as imagens analisadas pelo programa ImageJ®. Um total de 90 parasitos foram analisados para obtenção da média e erro padrão do tamanho. Os parasitos foram medidos em relação a sua área e os dados estão demonstrados na Figura 3 em unidades arbitrárias (UA) obtidas pela multiplicação do maior eixo pelo menor eixo.

Figura 3 - Direita - Gráfico de distribuição dos parasitos analisados em relação ao seu tamanho, com erro padrão e média do grupo. Esquerda – Foto de promastigota corada com Giemsa 1000x aumentada, N – núcleo, K- cinetoplasto, F- flagelo.

Os parasitos analisados apresentaram conformação típica alongada com presença de núcleo, cinetoplasto e flagelo. A média do tamanho obtido foi de 348,6 UA. Esses resultados foram utilizados como referência ou padrão para análise morfológica de promastigotas mantidas em meios de cultura modificados.

4.1.6 Comparação da atividade proteolítica do EPL de MP199 por método espectrofotométrico e fluorimétrico

Com a finalidade de avaliar o potencial das técnicas baseadas em fluorimetria e espectrofotometria na detecção da atividade proteolítica do EPL, foram feitos ensaios utilizando BSA/FITC como substrato para a detecção fluorimétrica, e BSA não marcada para a detecção espectrofotométrica, conforme descrito em métodos. Os resultados estão demonstrados no Gráfico 2. Devido a sensibilidade do fluorocromo FITC a diferentes pHs, os resultados obtidos neste experimento foram utilizados para

calcular o incremento de fluorescência, este cálculo foi feito a partir da seguinte forma:

$$\frac{(UFR_{final} - UFR_{inicial} \times 100)}{UFR_{final}} = \% \text{ de incremento de UFR}$$

Gráfico 2 - Atividade proteolítica do EPL isolado de meio MP199. Período de incubação de 8 horas a 37°C. Diferentes pHs (3 a 11) foram utilizados para detecção da atividade proteolítica. Detecção de aminoácidos aromáticos por espectrofotometria (triângulos). Porcentagem de incremento na intensidade de fluorescência (quadrados).

Ao comparar os resultados das técnicas de detecção de atividade proteolítica, obtivemos o mesmo padrão de atividade com maior intensidade em pH ácido, seguido por uma menor atividade em pH neutro e levemente alcalino. A maior atividade proteolítica foi observada em pH 4 para ambos os métodos utilizados. Nos demais pHs também foi constatado atividade, entretanto de forma menor que a obtida em pH 4. Foi possível identificar que um platô de atividade proteolítica também está presente entre os pHs 6 e 9. Já a menor atividade detectada foi observada em pH 11, onde os dados obtidos foram os mais baixos. Embora ambas as técnicas tenham sido eficientes na

detecção da proteólise, a detecção da atividade proteolítica por fluorescência foi escolhida para os demais testes deste trabalho.

4.1.7 Avaliação da atividade proteolítica do EPL sobre diferentes substratos.

Devido a seletividade de algumas peptidases, nós avaliamos diferentes substratos para identificarmos se a atividade proteolítica detectada nos experimentos anteriores se modificava dependendo do substrato. Foram analisados quanto a sua possível degradação pelas peptidases de *L. (L.) infantum*. A BSA, imunoglobulina G (IgG) e ovalbumina (OVA) foram utilizados após marcação com FITC em ensaios de atividade proteolítica do EPL isolado de meio MP199. O ensaio foi feito de forma cinética com leituras a cada dois minutos, após a primeira 1 hora de incubação as leituras foram paralisadas e as amostras se mantiveram incubadas por mais 11 horas para uma nova leitura. Os dados obtidos foram matematicamente convertidos por normalização de 0 a 100% e analisados estatisticamente por Michaelis-Menten. Os resultados estão demonstrados na Gráfico 3.

Gráfico 3 - Atividade proteolítica do EPL isolado de meio MP199 frente aos substratos com FITC. As curvas representam os substratos utilizados e os pontos cada período analisado. Substratos indicados com triângulos para ovalbumina, quadrados para albumina bovina sérica e círculos para IgG.

O ensaio de atividade proteolítica forneceu resultados que foram utilizados para avaliação estatística pelo teste de Michaelis-Menten a partir de uma regressão não linear. Os valores de K_m obtidos para cada substrato foi de 59,82 para IgG, 47,85 para BSA e 37,77 para ovalbumina. Os valores de r^2 foram respectivamente 0,97, 0,97 e 0,99. A análise destes resultados, confirmam o potencial de utilização das 3 proteínas testadas como substratos. Entretanto devido a maior disponibilidade e técnicas preestabelecidas de conjugação ao FITC e purificação, o substrato determinado para os demais experimentos foi o BSA.

4.1.8 Avaliação da atividade proteolítica do EPL de MP199

Para melhor compreender a atividade do EPL de MP199 e seus dados referentes a atividade proteolítica, utilizamos amostras analisadas por ensaio cinético de 1 hora com leituras a cada 2 minutos, conforme descrito em métodos. O ensaio avaliou a proteólise de BSA/FITC a partir do incremento de Unidades de Fluorescência Relativa (UFR), os resultados estão demonstrados no gráfico 4.

Gráfico 4 - Atividade proteolítica do EPL de MP199 em ensaio de proteólise fluorescente. Incubação por 60 minutos e leitura a cada 2 minutos com avaliação cinética calculada por Michaelis-Menten. UFR- Unidades de Fluorescência Relativa.

A atividade proteolítica do EPL apresentou um incremento detectável a partir dos 20 minutos de incubação da amostra. Esse incremento foi crescente até os 48 minutos de incubação onde atingiu um platô de atividade mantido até os 60 minutos totais do ensaio. A análise estatística da atividade enzimática foi calculada por Michaelis-Menten, levando em consideração os dados obtidos a partir dos primeiros 20 minutos até 60 minutos. Os resultados obtidos apresentaram um V_{max} de $4,29 \times 10^7$, K_m de 22,42 e alta correlação com R^2 de 0,92. Os resultados obtidos demonstram uma atividade proteolítica fortemente presente e possível de ser analisada quanto a sua inibição.

4.1.9 Inibição da atividade proteolítica de EPL por PMSF, Pepstatina A, Aprotinina e EDTA em ensaio fluorimétrico

A atividade proteolítica do EPL de MP199 foi testada na presença dos inibidores PMSF, Pepstatina A, Aprotinina e EDTA em ensaio fluorimétrico em microplaca. Os valores de fluorescência obtidos foram utilizados para calcular a porcentagem de inibição da proteólise, considerando a atividade proteolítica sem presença de inibidores como atividade total, as porcentagens de inibição calculadas para cada um dos inibidores estão apresentadas no Gráfico 5. A equação utilizada para calcular as porcentagens foi a seguinte:

$$\left(\frac{\text{Atividade proteolítica com inibidor} \times 100}{\text{Atividade proteolítica sem inibidor}} \right) - 100 = \% \text{ de Inibição}$$

Gráfico 5 - Detecção da Inibição de peptidases de EPL em ensaio fluorescente. Os inibidores testados foram; PMSF, Pepstatina A, Aprotinina e EDTA.

A demonstração gráfica é inversamente proporcional a atividade proteolítica do EPL na presença dos inibidores. A detecção de inibição da atividade proteolítica na

presença dos inibidores PMSF, Pepstatina A, Aprotinina e EDTA no ensaio fluorescente demonstrou que um maior potencial inibitório foi obtido com o EDTA pois 73,18% da proteólise foi interrompida. A aprotinina e a Pepstatina A apresentaram potencial inibidor do processo proteolítico de 70% e 63,51%, respectivamente. O PMSF quando comparado aos demais inibidores, promoveu a menor inibição da proteólise sendo responsável por apenas 32,85%.

4.1.10 Confirmação da inibição da atividade proteolítica do EPL em ágar/gelatina

Para confirmação dos resultados de inibição da proteólise anteriormente descritos, uma metodologia diferente foi testada, a atividade proteolítica de peptidases do EPL de MP199 foi avaliada com os inibidores; EDTA, aprotinina, pepstatina A e PMSF. O ensaio de inibição ocorreu em placas de ágar/gelatina como descrito em material e métodos. Após o ensaio, as placas foram fotografadas e analisadas pelo software ImageJ® para o cálculo da porcentagem de inibição proteolítica. O Cálculo foi feito a partir da determinação da área sobre o gel onde houve degradação proteica com presença de algum dos inibidores e sem presença de inibidor. A fórmula utilizada para o cálculo foi a seguinte:

$$\left(\frac{\text{Atividade proteolítica com inibidor} \times 100}{\text{Atividade proteolítica sem inibidor}} \right) - 100 = \% \text{ de Inibição}$$

Gráfico 6 - Inibição da atividade proteolítica de peptidases presentes no EPL de MP199 em ágar /gelatina. O gráfico demonstra a porcentagem de inibição da atividade proteolítica calculada a partir da densidade de pixels na presença de cada inibidor.

A demonstração gráfica é inversamente proporcional a atividade proteolítica do EPL em presença dos inibidores. A comparação das áreas de inibição da atividade proteolítica para cada inibidor testado, indicou menor inibição na presença de PMSF (0%) e como esperado na área controle (0%). Os demais inibidores Pepstatina A (10,54%), Aprotinina (27,40%) e EDTA (39,75%), apresentaram resultados de % de inibição maiores quando comparados a ausência de inibidores. Em consequência da maior atividade de inibição promovida pelo EDTA, sua área de proteólise foi a menor detectada.

4.1.11 Avaliação do perfil proteolítico do EPL por zimografia

Com a confirmação do potencial proteolítico do EPL e a presença de enzimas sensíveis aos inibidores de metalo, aspartil, serino e cisteino peptidases foi avaliado o perfil de enzimas proteolíticas presentes no EPL por meio de uma zimografia. Essa análise teve como objetivo identificar as possíveis peptidases envolvidas no processo de proteólise de substratos presentes no meio de cultura. O gel sintetizado utilizou albumina como substrato e foi produzido em uma concentração de 7,5% de acrilamida/bis-Acrilamida. O extrato parasitário foi diluído em concentrações de promastigotas/mL, nas seguintes concentrações: $1,5 \times 10^7$; $3,1 \times 10^7$; $6,2 \times 10^7$; $1,2 \times 10^8$; $2,5 \times 10^8$; 1×10^9 . Como marcador de massa molecular foi utilizado um grupo de proteínas entre 20 - 250 KDa. Para uma melhor compreensão dos resultados, após o registro fotográfico da zimografia a intensidade da principal banda encontrada foi analisada pelo software ImageJ® e os dados obtidos foram apresentados na forma de gráfico. Os resultados estão demonstrados na Figura 4.

Figura 4 - Zimografia de EPL isolado de meio MP199. Na primeira coluna à esquerda se encontra o padrão comercial de massa molecular, da segunda a nona coluna, estão os EPLs após zimografia com diferentes concentrações de parasitos por mL, especificadas acima da imagem. A análise realizada pelo Software ImageJ[®] está demonstrada no gráfico, sobreposto a imagem.

De acordo com nossos resultados, concentrações de $1,5 \times 10^7$ até 1×10^9 parasitos/mL apresentaram atividade proteolíticas detectadas pelo método. Entretanto uma maior diferenciação foi presente nas maiores concentrações, em que a concentração de $1,2 \times 10^8$ apresentou clara diferenciação entre a digestão causada pela peptidase e a área não digerida, levando em consideração a menor concentração de parasitos por mL. A atividade proteolítica foi observada apenas em bandas com massa molecular entre 50 e 75 KDa, nenhuma outra banda foi observada no gel.

4.1.12 Inibição da atividade proteolítica da peptidase de 50 a 70 KDa

Após a eletroforese do EPL de MP199, foi possível identificar uma peptidase fortemente presente na região de 50KDa a 75KDa. Para uma melhor caracterização desta peptidase um ensaio de inibição seletiva foi desenvolvido a partir de inibidores de metalo, aspartil, cisteino e serino peptidases em gel de zimografia.

A peptidase foi avaliada em relação a sua possível inibição com; 1,10 fenantrolina, EDTA, quimostatina, Pepstatina A, aprotinina, E-64 e PMSF. Após a

corrida eletroforética do EPL de forma homogênea por todo o gel, foi feita uma secção em 9 partes, sendo que 7 destas partes foram incubadas com um dos inibidores, e das duas restantes uma amostra foi incubada com todos os inibidores e outra sem nenhum inibidor. Após o término da zimografia os géis foram fotografados e analisados pelo software ImageJ® para obtenção da densidade e cálculo da porcentagem de inibição proteolítica, que foi feito com base na fórmula abaixo. Os resultados estão demonstrados na Figura 5.

$$\left(\frac{\text{Atividade proteolítica com inibidor} \times 100}{\text{Atividade proteolítica sem inibidor}} \right) - 100 = \% \text{ de Inibição}$$

Figura 5 - Inibição da atividade proteolítica com: 1,10 Fenantrolina; EDTA; Quimostatina; Pepstatina A; Aprotinina; E-64 e PMSF sobre a principal peptidase do EPL de MP199. Acima - Zimografia. Abaixo - Representação da porcentagem de inibição da proteólise.

A principal atividade inibitória foi observada em: 1,10 fenantrolina, com 100% de inibição e EDTA, com 60,78% de inibição ambos inibidores de metalo peptidases. Os demais inibidores apresentaram as seguintes taxas de inibição: Quimostatina e Aprotinina 41,95%; Pepstatina A 38,42; E-64 22,57% e PMSF 11,53%.

4.2 Comparação entre promastigotas de *L (L.) infantum* mantidas em MRP e MRA

Os resultados anteriormente adquiridos e padronizados com promastigotas de *L (L.) infantum* mantidas em MP199 foram essenciais para uma maior compreensão da composição e atividade biológica deste parasito. A partir daqui duas novas culturas foram comparadas entre si em relação a síntese de carboidratos, síntese de proteínas, multiplicação parasitaria, presença de peptidases, morfologia parasitaria e interações com o meio de culturas. Os parasitos obtidos de MRA e MRP foram adquiridos destas culturas após serem mantidos nestes meios por 3 dias (62 horas), exceto pelo acompanhamento da curva de crescimento que necessariamente utilizou alíquotas do primeiro e segundo dia. As análises executadas neste trabalho a partir deste ponto tiveram como finalidade a comparação entre os parasitos obtidos do MRP e MRA.

4.2.1 Comparação e avaliação da multiplicação parasitariamente em MRP e MRA

Com a finalidade de compararmos em qual meio, MRP ou MRA, havia uma multiplicação mais intensa dos parasitos, foi feita uma curva de crescimento de promastigotas de *L. (L.) infantum*, obtida com base na contagem do número de parasitos/mL a cada 24 horas. A quantificação dos parasitos foi feita a partir da retirada de alíquotas da cultura, que foram contadas em câmara de Neubauer. A concentração de parasitos por mL, nos meios MRP e MRA estão demonstrados no Gráfico 7.

Gráfico 7 - Acompanhamento de cultura em meios MRP e MRA. Contagem do número de parasitos/mL de cultura do dia 0-3.

Após a inserção dos parasitos em cultura usando MRP e MRA, foi possível observar um aumento gradativo no número de promastigotas nos dias analisados, com exceção do 3º dia para MRP. No final de três dias, a concentração de parasitos presente em MRP e MRA foram de $1,3 \times 10^6$ e $3,1 \times 10^6$, respectivamente.

4.2.2 Avaliação do tamanho de promastigotas de *L. (L.) infantum* em meios de cultura MRA e MRP

Com os resultados de curvas de crescimento distintas o tamanho dos parasitos foi avaliado. Promastigotas após permanecerem por 3 dias em MRA e MRP foram concentradas para análise de sua morfologia e tamanho por microscopia ótica. Os parasitos foram corados com Giemsa e analisados em microscópio com aumento de 1000x após esfregaço em lâmina de vidro. Após visualização, 90 parasitos de cada meio foram fotografados e analisados pelo software ImageJ® para mensuração do tamanho das promastigotas e cálculo da média de cada grupo. Os resultados estão demonstrados na Figura 6.

Figura 6 - A - Gráfico de dispersão do volume celular estimado dos parasitos mantidos em diferentes ambientes de crescimento, as barras expressam média e erro padrão da média, com significância estatística pelo teste t, $p < 0,0001$. B - Imagem aleatória de parasito mantido em MRA, aumento de 1000x com coloração de Giemsa. C - Imagem aleatória de parasito mantido em MRP, aumento de 1000x com coloração de Giemsa F - Flagelo, N - núcleo e K- Cinetoplasto.

Ao analisarmos o tamanho dos parasitos após a permanência nos diferentes meios de cultura, foi possível observar que o corpo celular do parasito apresentou diferença em relação ao tamanho quando comparados. Os parasitos mantidos em MRA apresentaram-se menores, em relação aos mantidos em MRP. Quando observados em relação ao flagelo, é possível sugerir que os parasitos mantidos em MRP possuem um flagelo com aproximadamente o tamanho do corpo celular, já os parasitos mantidos em MRA possuem um flagelo maior que seu corpo celular em 1 ou 2 vezes.

4.2.3 Detecção da atividade metabólica de promastigotas por resazurina

Com um tamanho menor dos parasitos mantidos em MRA e uma multiplicação mais lenta dos mantidos em MRP foi necessária a avaliação destas promastigotas quanto ao seu metabolismo. Essa avaliação ocorreu pelo ensaio de redução de

resazurina. Para este ensaio de atividade metabólica o número de parasitos foi corrigido para 10^8 promastigotas/mL de meio de cultura. Os parasitos foram preparados e o teste foi executado com incubação de 3 horas e detecção da atividade metabólica por incremento de fluorescência. Os resultados estão demonstrados na Gráfico 8.

Gráfico 8 - Gráfico da atividade metabólica detectada pela conversão de resazurina por promastigotas mantidas em MRP e MRA.

A atividade metabólica observada em promastigotas mantidas em MRP foi menor que a observada em MRA, entretanto estatisticamente não houve diferença significativa, quando os resultados foram analisados pelo Teste T, o valor de P obtido foi de 0,47.

4.2.4 Porcentagem da mortalidade parasitária em cultura

Afim de confirmar a presença de parasitos viáveis, além de metabolicamente como já analisado pelo ensaio de resazurina anteriormente descrito, uma avaliação da porcentagem de promastigotas mortas dentro da cultura também foi feita tanto em MRA como em MRP. A diferenciação de parasitos vivos e mortos em cultura foi calculada a partir da marcação de promastigotas com iodeto de propídio. O número

total de promastigotas foi obtido após fixação com solução de formol tamponado 10% e marcação com iodeto de propídio. Os valores de porcentagem expressos no gráfico foram calculados a partir da diferença entre o total de promastigotas e as promastigotas mortas. Os resultados estão demonstrados na Figura 7.

Figura 7 - A - Gráfico da porcentagem de parasitos mortos em cultura em MRP e MRA. B – Foto de promastigotas incubadas com iodeto de propídeo e observadas em microscopia de fluorescência.

Os parasitos mantidos nos meios analisados MRP e MRA apresentaram porcentagem de mortalidade próximas, sendo que a taxa de parasitos mortos no meio MRP foi de 29,73% e dos parasitos em MRA 37,55%.

4.2.5 Quantificação de proteínas nos sobrenadantes de cultura

Uma quantificação de proteínas no sobrenadante dos meios de cultura foi feita, pois foi necessário avaliarmos a interação dos parasitos com o ambiente onde foram mantidos e a secreção de proteínas pode estar relacionada a metabolização de aminoácidos a partir da fragmentação de substratos proteicos presentes na cultura.

A secreção de proteínas para o sobrenadante de MRA e MRP foi avaliada no

terceiro dia de incubação dos parasitos pelo método de Bradford. A concentração (incremento) de proteína secretada foi calculada a partir da diferença entre a concentração final menos a concentração inicial presente no sobrenadantes. Os resultados estão demonstrados na Gráfico 9.

Gráfico 9 - Quantificação proteica em sobrenadantes de cultura após 3 dias de permanência dos parasitos em MRP MRA.

A avaliação da concentração proteica de MRP e MRA após a inserção de promastigotas, evidenciou que nas duas condições fornecidas houve um incremento na concentração de proteínas. A concentração de proteínas secretadas por promastigotas mantidas em MRP foi de 14,67 µg/mL e para promastigotas mantidas em MRA a concentração foi de 3,98 µg/mL, quase 3 vezes menos. Entretanto não foi observada diferença estatística, o valor de p obtido foi de 0,165 segundo o Teste T.

4.2.6 Quantificação proteica dos EPLs

Com a ausência de diferença estatística na concentração de proteínas secretadas pelos parasitos para os meios de cultura MRA e MRP foi então analisada a síntese e concentração de proteínas presentes na estrutura das promastigotas. Essa análise foi

efetuada devido a possibilidade de as peptidases sintetizadas pelo parasito serem presentes em sua superfície em maior concentração do que secretadas para o meio de cultura. Os parasitos mantidos por três dias em cultura foram concentrados em 10^6 promastigotas/mL. A partir destas amostras, EPLs foram feitos e analisados pelo método de Bradford em relação a concentração proteica estrutural. Para cada meio analisado foram avaliadas três culturas independentes em duplicata. Os resultados estão demonstrados no Gráfico10.

Gráfico 10 - Quantificação proteica dos EPLs após 3 dias mantidos em cultura em MRP e MRA.

Os resultados obtidos evidenciaram uma maior concentração proteica em parasitos que foram mantidos em MRP (26,22 µg/mL) quando comparado aos mantidos em MRA (10,71µg/mL), entretanto a diferença entre a concentração proteica presente nos dois EPLs foi sutil e quando analisadas estatisticamente pelo teste de T, apresentou diferença significativa com um valor de $P = 0,0125$.

4.2.7 Perfil eletroforético de proteínas de EPL em SDS-page

Devido a diferença da concentração de peptidases estatisticamente significante observada na análise anterior entre os parasitos mantidos em MRA e MRP foi avaliado

o perfil de proteínas presentes nos parasitos mantidos em cada um destes dois meios de cultura. Essa avaliação ocorreu devido a possibilidade de alteração no perfil proteico por meio de uma adaptação parasitaria para melhor desenvolvimento e multiplicação das promastigotas. Foi efetuada uma análise em relação ao perfil proteico destes parasitos por eletroforese em SDS-page 10% corado com prata, como descrito nos materiais e métodos deste trabalho. Para análise das migrações eletroforética foi utilizado um padrão de massa molecular de 14,3 - 66 KDa. Os resultados estão demonstrados na Figura 8.

Figura 8 - Eletroforese em SDS-page dos EPL obtidos nos meios de cultura: MRA e MRP. Coloração com prata.

A análise eletroforética não demonstrou variações entre o perfil de bandas proteicas presentes nos EPLs obtidos a partir de MRA e MRP. O padrão de bandas proteicas foi semelhante em ambos os EPLs. Este resultado sugere a ausência de expressão de novas proteínas por algum dos meios.

4.2.8 Microscopia eletrônica de promastigotas mantidas em MRP e MRA

Com a ausência de perfis proteicos diferentes nos parasitos mantidos em MRA e MRP, associados a presença de promastigotas com maior tamanho no MRP foi avaliada de forma mais detalhada as estruturas destes parasitos por microscopia eletrônica. Com esta técnica foi possível analisar as estruturas celulares com maior grau de detalhamento. Os parasitos após 3 dias em MRP e MRA foram isolados e preparados para microscopia eletrônica como descrito em materiais e métodos. Os resultados estão demonstrados na Figura 9.

Figura 9 - Microscopia eletrônica de promastigotas após período de três dias em cultura; MRA e MRP. A - MRP, aumento de 6200x. B - MRA, aumento de 8900x. N - Núcleo, F - flagelo, FP - bolsa flagelar, K - cinetoplasto.

Os parasitos obtidos de MRP e MRA, apresentaram semelhança na organização dos compartimentos celulares e boa definição das organelas. Foi possível observar núcleo, cinetoplasto, bolsa flagelar e membranas. Com suas estruturas preservadas e

sem alterações que evidenciassem estresse celular ou diferenças morfológicas desencadeadas pelo microambiente fornecido (MRP e MRA).

4.2.9 Presença de vesículas na superfície dos parasitos

Devido à ausência de alterações internas em organelas presentes no parasito, uma avaliação da superfície foi feita. A análise estrutural da superfície do parasito por microscopia eletrônica possibilitou a identificação de estruturas e interações com o meio de cultura a partir de sua membrana. Os resultados estão demonstrados na Figura 10.

Figura 10 - Microscopia eletrônica de promastigotas mantidas em meios MRA e MRP por 3 dias. Avaliação da presença de vesículas. A - MRA, aumento de 8600x. B - MRP, aumento de 1500x. Setas sinalizam vesículas.

Foram evidenciadas vesículas de secreção na superfície de promastigotas nas duas culturas analisadas, MRP e MRA. Essas vesículas estão presentes de forma homogênea e intensa em toda a superfície dos parasitos. A presença destas vesículas

pode estar relacionada a interações entre os parasitos e o microambiente onde estão presentes.

4.2.10 Consumo de carboidratos presentes no meio de cultura

A análise do metabolismo energético foi feita em outra metodologia além da resazurina, baseado pela determinação do consumo de carboidratos presentes na cultura. Além de poder confirmar os resultados obtidos pelo teste de metabolismo energético obtidos anteriormente essa nova análise também poderia demonstrar a necessidade e importância de monossacarídeos na cultura. As concentrações de carboidratos presentes nos meios de cultura foram aferidas pelo teste de fenol ácido sulfúrico antes e após a permanência dos parasitos pelo tempo de incubação. Os dados obtidos foram utilizados para calcular o consumo de carboidratos até o terceiro dia, isso se deu a partir da subtração da concentração inicial de carboidratos pela concentração final. Os resultados estão demonstrados no Gráfico 11.

Gráfico 11 - Consumo de carboidratos presentes nos ambientes de cultura após a incubação de promastigotas por 3 dias. Avaliação dos sobrenadantes dos meios MRA e MRP.

A concentração inicial de carboidratos nos meios de cultura foi próxima a 1 mg/mL (dados não demonstrados). Sendo que após o período de incubação a concentração de carboidratos em todos os meios foi menor que a concentração inicial. A partir do cálculo entre a concentração inicial e final foi possível observar que o MRA foi o meio com maior consumo de carboidratos e o MRP teve o menor consumo de carboidratos, os valores foram de 909 $\mu\text{g/mL}$ e 432 $\mu\text{g/mL}$. Este consumo diferente pode estar associado a presença de um maior número de parasitos no meio MRA quando comparado ao MRP ou por uma necessidade energética maior destes parasitos.

4.2.11 Concentração de carboidratos estruturais em promastigotas

Devido ao diferente consumo de carboidratos observados nos dois meios de cultura uma avaliação da concentração de carboidratos presentes no mesmo número de parasitos, 10^8 foi feita para elucidar se o maior consumo está relacionado a maior densidade de parasitos ou se está relacionado a uma maior utilização destas moléculas na estrutura dos parasitos. Estes parasitos após concentrados foram lisados e a determinação da concentração de carboidratos ocorreu por teste de fenol ácido sulfúrico. Os resultados estão demonstrados na Gráfico 12.

Gráfico 12 - Concentração de carboidratos em EPL de 10^8 parasitos/mL. Avaliação dos EPLs obtido no meio MRA e MRP.

A maior concentração de carboidratos foi observada nos parasitos obtidos do MRP, com uma concentração de 31,87 µg/mL e os obtidos do meio MRA cerca de

25,28 µg/mL sendo este com menor concentração de carboidratos. Comparativamente uma concentração de carboidratos maior está presente nos parasitos mantidos em MRP quando comparado aos mantidos em MRA.

4.2.12 Detecção de carboidratos complexos no sobrenadante de culturas.

Diferentes carboidratos complexos, ligados a peptídeos e grupos fosfatos são sintetizados por promastigotas e secretados ou perdidos para o microambiente. Devido a este fato uma análise de carboidratos de alta e baixa massa molecular precipitáveis por etanol foram avaliados a partir do sobrenadantes de culturas utilizadas na manutenção dos parasitos. Os sobrenadantes das culturas MRA e MRP foram concentrados por precipitação com etanol 60%, os precipitados foram resuspensoes em tampão PBS e a análise cromatográfica foi feita por exclusão molecular em coluna Sephadex G-25[®]. As frações obtidas foram quantificadas em relação a concentração de carboidratos por Fenol ácido sulfúrico, os resultados estão demonstrados na Gráfico 13 onde há uma divisão entre carboidratos de baixa massa (2-6 tubos) e alta massa (7-11 tubo).

Gráfico 13 - Avaliação da presença de carboidratos precipitados, presentes no sobrenadante de meios de cultura MRA e MRP pós precipitação e análise por cromatografia de exclusão molecular. MRA- relacionado ao eixo Y da esquerda e MRP- relacionado ao eixo Y da direita.

Os resultados da cromatografia de exclusão molecular evidenciam a presença de dois perfis de carboidratos, provavelmente conjugados a outras moléculas, caracterizando glicoconjugados de alta massa molecular e baixa massa molecular. A fração de alta massa molecular é mais abundante no MRA e sua presença foi quase indetectável no MRP.

4.2.13 Microscopia eletrônica da membrana de promastigotas mantidas em meios MRA e MRP

A partir das análises de glicoconjugados presentes nos sobrenadante de cultura

e carboidratos presentes na estrutura dos parasitos foi analisada a membrana destas promastigotas. As membranas foram analisadas em microscopia eletrônica após impregnação com vermelho de rutênio para marcação de carboidratos presentes no glicocálice. Os resultados estão demonstrados na Figura 11.

Figura 11 - Microscopia eletrônica da membrana de promastigotas mantidas em meios, MRA e MRP por 3 dias. Avaliação do glicocálice com coloração de vermelho de rutênio. A - MRA. B - MRP. Setas sinalizam o glicocálice. Aumento de 65000x.

As membranas visualizadas nos parasitos mantidos nos dois meios foram observadas e apresentaram uma boa marcação. O glicocálice de parasitos mantidos em MRA aparentou uma espessura mais delgada quando comparados ao observado no MRP.

4.2.14 Detecção da atividade proteolítica em cultura a partir do consumo de BSA/FITC

Para a confirmação de degradação de proteínas presentes no meio de cultura

por peptidases parasitarias BSA/FITC foi utilizada em uma cultura como fonte proteica de MRP. O sobrenadante desse MRP com BSA/FITC foi avaliado em relação a proteólise a partir do incremento nos valores de fluorescência. A cada 24 horas uma alíquota foi removida do meio e o sobrenadante foi separado para quantificação fluorescente. Os resultados estão demonstrados na Gráfico 14.

Gráfico 14 - Detecção da proteólise de BSA/FITC em cultura de promastigotas com MRP. Detecção de fluorescência no sobrenadante a cada 24 horas. UFR- Unidades de Fluorescência Relativa.

A fluorescência detectada nos primeiros dias foi menor que a obtidas nos dias finais. Este valor se mostrou correlacionado ao período de interação entre os parasitos e o meio de cultura, quanto maior o tempo de incubação maior foi o incremento de fluorescência. Os resultados apresentaram alta correlação com R^2 0,8669 e foram significantes estatisticamente ($P=0,0008$).

4.2.15 Comparação entre a atividade proteolítica do EPL de MRA e MRP.

Devido as disponibilidades distintas de aminoácidos nos meios MRP e MRA.

Concentrados parasitários contendo 5×10^7 promastigotas/mL foram sonicados e analisados em relação a presença de atividade proteolítica frente a caseína marcada com fluorescência (EnzChek® Protease Assay Kit). O EPL obtido dos meios MRA e MRP foram incubados por 1 hora, as análises foram feitas em duplicata e os resultados foram analisados estatisticamente pelo Test T.

Gráfico 15 - Avaliação proteolítica do EPL de 5×10^7 promastigotas/mL, a partir da proteólise de caseína marcada com BODIPY® FL. A análise estatística foi feita pelo Teste T.

A atividade proteolítica obtida no MRA produziu uma média do sinal fluorescente de aproximadamente $15,8^4$ UFR e a atividade proteolítica obtida no MRP produziu uma média do sinal fluorescente de aproximadamente $27,9^4$ UFR. A análise estatística pelo teste T indicou um valor de $P = 0,0114$ com significância. Isso reforça a ideia de uma maior atividade proteolítica no MRP para aquisição de aminoácidos por meio da proteólise das proteínas presentes no microambiente.

4.2.16 inibição da atividade proteolítica de cisteino, metalo, aspartil e serino peptidases em EPL de MRA e MRP.

A partir da avaliação e diferença entre a atividade proteolítica de peptidases presentes em EPL de MRA e MRP foi necessária a análise da inibição seletiva de enzimas pertencentes aos grupos de metalo, serino, aspartil e cisteino peptidases. A detecção e classificação dos principais grupos de peptidases presentes nestes parasitos é importante. EPLs de promastigotas mantidos em MRP e MRA foram utilizados em ensaio de proteólise com o substrato caseína marcada com fluorocromo (EnzChek® Protease Assay Kit). O ensaio foi feito em duplicatas em seis amostras. Uma amostra foi analisada em relação a atividade total de inibição (todos os inibidores; 1,10 fenantrolina, E-64, Pepstatina A, Pepstatina A) e outra sem a presença de inibidores. As demais amostras foram testadas em relação a inibição seletiva de metalo peptidase (1,10 fenantrolina), cisteino peptidase (E-64), aspartil peptidase (Pepstatina A) e serino peptidase (Aprotinina). Os valores de fluorescência obtidos foram calculados de acordo com a fórmula:

$$\left(\frac{\text{Atividade proteolítica com inibidor} \times 100}{\text{Atividade proteolítica sem inibidor}} \right) - 100 = \% \text{ de Inibição}$$

Gráfico 16 - Inibição seletiva de metalo peptidase (1,10 fenantrolina), cisteino peptidase (E-64), aspartil peptidase (Pepstatina A) e serino peptidase (Aprotinina) em promastigotas mantidas em MRA (A) e MRP (B).

Os resultados demonstram uma maior atividade de metalo seguida por cisteino, serino e aspartil peptidases, tanto no EPLs obtido do MRA quanto no obtidos do MRP. Todos os inibidores se mostraram eficientes mesmo que em diferentes proporções quando comparados, exceto a Pepstatina A, inibidora de aspartil peptidase que não

produz il inibição estatisticamente significativa em nenhum dos ELPs, e a aprotinina inibidora de serino peptidases que no EPL de origem do MRA não apresentou significancia estatistica na inibição. Os demais inibidores possuem significancia estatística quando utilizados em MRA e MRP como demonstrado na tabela abaixo.

Tabela 3 – Apresentação dos valores de P calculados estatisticamente por ANOVA, entre os EPLs obtidos de MRP e MRA e comparados entre os incubados sem presença de inibidores e com os inibidores indicados abaixo.

MRA			MRP		
Inibidor	Valor de P	Significância estatística	Inibidor	Valor de P	Significância estatística
Pepstatina A	>0,9999	Não	Pepstatina A	0,3428	Não
Aprotinina	0,3354	Não	Aprotinina	0,0064	Sim
E-64	0,0004	Sim	E-64	<0,0001	Sim
1, 10 Fenantrolina	0,0001	Sim	1, 10 Fenantrolina	<0,0001	Sim
Todos os inibidores	<0,0001	Sim	Todos os inibidores	<0,0001	Sim

4.2.17 Comparação de inibição da atividade proteolítica do EPL de MRA e MRP

Com a identificação dos grupos de peptidases com maior atividade no EPL dos parasitos foi verificada a presença ou ausência de diferença entre os parasitos mantidos em MRA e MRP. Para uma avaliação de diferenças entre a atividade de peptidases entre MRA e MRP foi comparado a presença dos inibidores em cada um dos meios. O gráfico 18 demonstra essas diferenças comparando os dados obtidos em colunas.

Gráfico 17 – Comparação entre a inibição seletiva de metalo peptidase (1,10 fenantrolina), cisteino peptidase (E-64), aspartil peptidase (Pepstatina A) e serino peptidase (Aprotinina) em promastigotas mantidas em MRA e MRP.

Quando observamos o gráfico e levamos em consideração que quanto maior a intensidade de inibição maior a concentração de peptidases é possível observar que em todas as análises, exceto na E-64 o EPL de MRP foi maior que o de MRA. Entretanto estes resultados não foram estatisticamente significantes quando analisados por ANOVA pareada.

5. DISCUSSÃO

Ao analisarmos a urina comumente utilizada na cultura de leishmania foi possível observarmos a presença tanto de proteínas como aminoácidos. Em relação a composição proteica, já se sabe a muito tempo que ela possui uma fração proteica que está presente em todos os indivíduos sadios e é de cerca de 100 a 150 mg/L ⁵⁵. Embora também tenha sido identificado um segundo pico na LPLC e este tenha demonstrado reatividade a ação da ninhidrina no TLC, ele pode não se tratar totalmente de aminoácidos utilizados na síntese proteica, pois na urina há uma abundância de sais de ureia e ácido úrico que em sua composição possuem aminas possivelmente reativas a coloração de ninhidrina. E devido ao baixo tamanho destes sais podem se assemelhar aos aminoácidos na LPLC ⁵⁶.

O soro fetal bovino (SBF) quando cromatografado apresentou um pico de densidade ótica da 5ª a 10ª fração colhida, exceto por este pico não foram observadas mais alterações significativas nas demais frações coletadas da cromatografia. Ao analisarmos as frações que foram unidas da cromatografia para avaliação por TLC observamos que as amostras 2 e 3 apresentaram abundância de proteínas fortemente coradas pela ninhidrina e alta massa molecular devido sua imobilidade pelo TLC. Assim como houve ausência de demais picos na cromatografia também não houveram manchas com boa definição no TLC sugestivas de aminoácidos. A análise deste componente da cultura é importante para entendermos a origem das fontes proteicas e de aminoácidos para o parasito, a elevada concentração de proteínas encontrada em nossos experimentos esta associada a presença de diversas moléculas proteicas presentes no soro fetal bovino, como fatores de crescimento, proteínas de transporte entre outras que chega a corresponder de 5 – 6 mg por mililitro de meio quando usado como suplemento a 10% ⁵⁷. Esses dados reforça a ampla disponibilidade de fontes proteicas de onde há a possibilidade de obtenção de aminoácidos para promastigotas mantidas em culturas com suplementação de SBF.

O Meio de cultura 199 nos forneceu um perfil já esperado na cromatografia, pois a ausência de picos detectáveis por densidade ótica a 280 nm nas frações iniciais condizem com as informações fornecidas pelas fabricantes onde a presença de proteínas é ausente ⁵⁸. Diferentemente das proteínas uma intensa concentração de

aminoácidos foi observada a partir da 12^a a 24^a fração coletada. Os homogeneizados destas frações também demonstraram reação a ninhidrina sugerindo presença abundante de aminoácidos. Assim com os dados obtidos referentes a ausência de proteínas a concentração de aminoácidos no meio também é fornecida pela fabricante e os dados corroboram com os encontrados aqui, onde uma diversidade de todos os aminoácidos utilizados na síntese proteica estão presentes em concentrações de 0,1 a 100 mg/L ⁵⁸.

A curva de crescimento de promastigotas em MP199 observada em nossos experimentos, confirmou o que já vem sendo documentado em outros trabalhos. O parasito apresenta uma fase logarítmica com multiplicação até o terceiro dia de permanência em cultura ⁵⁹. Fatores como a concentração parasitária e a escassez de nutrientes podem estar relacionados a interrupção do aumento no número de parasitos após o 3^o dia. A viabilidade da cultura de parasitos depende de interações entre essas células com o microambiente, a secreção de moléculas com finalidade biológica é comum e possível de ser observada em culturas celulares de outros microrganismos, como as bactérias, que em conjunto modulam seu ambiente para melhor aproveitamento de nutrientes e resistência a fatores microbicidas ⁶⁰.

Quando analisada em relação a secreção de moléculas, promastigotas mantidas em MP199 apresentaram uma relação cerca de 40 vezes maior na secreção de carboidratos quando comparados a proteínas em µg/mL. Isso pode estar relacionado a maior facilidade na síntese de carboidratos. Parasitos do gênero *Leishmania* apresentam uma camada densa de glicoconjugados sobre sua membrana plasmática essa camada, também denominada glicocálice, possui uma variedade de moléculas, como os Lipofosfoglicanos (LPG) os glicosilfosfatidilinositol (GPI) e glicoproteínas ⁶¹. A ampla distribuição destes carboidratos associada a elevada massa molecular que parte dessas moléculas possuem poder justificar sua maior proporção em relação a proteínas secretadas.

Em nossos experimentos, as promastigotas apresentaram uma conformação de parasitos mantidos em fase logarítmica com um volume corporal típico deste período. A cultura apresentou uma homogeneidade entre os parasitos analisados, com presença de flagelo de tamanho similar ao corpo do parasito, características similares as observadas e relatadas em estudo que avaliou a variação espacial de promastigotas

leptomonas em culturas de *Leishmania mexicana* ⁶².

Ao analisarmos a atividade proteolítica do EPL obtido de MP199 *in vitro* por ensaios fluorimétricos e espectofotométricos, observamos atividade proteolítica similar em pHs ácidos e levemente alcalinos. A maior atividade proteolítica ocorreu em pHs ácidos próximos a 4. Neste mesmo pH uma forte atividade da metalo peptidase Leishmanolisina abundantemente presente na superfície do parasito é relatado ⁴². Nossos resultados, sugerem a presença e atividade de GP63, ideia reforçada pela atividade proteolítica em uma faixa de pH ácido. Outro fator que reforça essa hipótese é o pH ótimo para a GP63 depender do substrato disponível, possibilitando uma atividade mesmo em condições não ácidas ⁶³.

Os dados obtidos nos experimentos anteriores se baseiam na degradação da albumina livre ou marcada com FITC pelo EPL de M199. Embora tenham demonstrado alta eficiência outras duas proteínas marcadas com FITC foram utilizadas como substratos para comparação, ovalbumina e imunoglobulina G. A análise das proteínas marcadas com FITC, como substrato, nos forneceu dados que comprovam não haver diferença significativa entre elas. Quando levamos em conta o K_m e o R^2 obtidos, a ovalbumina apresentou os melhores resultados, entretanto imunoglobulina G e albumina também foram considerados como substratos igualmente competentes na análise da atividade proteolítica. Estes dados se confirmam pelo fato da catalise da albumina e da ovalbumina já terem sido descritas na literatura por peptidases de *leishmania* ⁴⁵ assim como a imunoglobulina G ⁵⁰. Helmintos são capazes de produzir peptidases para degradação de proteínas do hospedeiro e obtenção de seus nutrientes, estas enzimas parecem possuir pouca especificidade para substratos específicos, o que é uma vantagem para os parasitos quando interagem com uma grande variedade de moléculas que podem servir de fontes de aminoácidos ⁶⁴. Este fato corrobora com os dados obtidos neste trabalho onde uma baixa seletividade por diferentes substratos foi observada.

A atividade proteolítica do EPL foi detectável a partir dos primeiros 20 minutos de incubação, sugerindo a ativação de peptidases expressas na forma de zimogênios. Após o período inicial o incremento nos valores de fluorescência foi progressivo até os 48 minutos de incubação, a partir deste ponto é possível que a manutenção do sinal esteja associada ao consumo total do substrato a partir dos sítios de clivagem das peptidases.

Cascatas catalíticas são propostas em modelos parasitários, a degradação da hemoglobina por *Plasmodium falciparum* é um destes exemplos, onde inicialmente há uma atividade catabólica de aspartil peptidase sobre a hemoglobina, seguida por ação de outras aspartil peptidases junto a cisteino peptidases sobre as cadeias globinicas e uma nova atividade proteolítica da metalo peptidase falcilisina sobre peptídeos ⁶⁵. Assim como a catálise da hemoglobina por *Plasmodium falciparum* a degradação de proteínas como a albumina por *L. (L.) infantum* parece depender da atividade de peptidases para seu início.

A atividade proteolítica do EPL de MP199 quando analisada no ensaio de proteólise pelo método fluorescente demonstrou que todos os inibidores testados possuem eficácia inibitória. A atividade proteolítica também foi testada em ágar/gelatina junto aos inibidores, e confirmou os resultados obtidos no ensaio fluorescente, inclusive com a reprodução da eficácia de inibidores testados, exceto pelo PMSF que nesta técnica não possuiu atividade inibitória. A comparação dos resultados evidenciou maiores porcentagens de inibição detectadas pelo método baseado em fluorescência, evidentemente esta diferença está associada a sensibilidade de detecção dos métodos. A forte atividade inibitória do EDTA pode estar relacionada a abundância de metalo peptidases presentes no EPL.

A análise por Zimografia do EPL obtido de MP199 mostrou maior atividade proteolítica em uma região específica do gel, que compreende bandas de massa molecular entre 50 e 75 KDa, o que é compatível com a principal peptidase de *Leishmania* spp., a GP63 ⁶⁶. A ausência de mais peptidases detectáveis no gel pode estar associada a expressão de sua forma inativa pelo parasito, sendo necessárias interações enzimáticas para sua ativação, isto é um mecanismo comum presente em diferentes organismos para evitar a alta degradação de proteínas de forma descontrolada ⁶⁷. Estas enzimas ainda não ativadas também conhecidas como zimogênios podem ser ativadas após exposição a baixos pHs ou por meio de clivagem por peptidases ⁶⁷. O número de parasitos utilizados no ensaio de zimografia demonstrou que em concentrações de até $1,5 \times 10^7$ promastigotas mantidas no MP199 possibilitam a visualização de uma atividade proteolítica presente entre 50 e 75 KDa. Maiores concentrações de parasitos produziram bandas mais intensas, isso se deve ao fato de uma maior concentração de peptidases estarem presentes nessas alíquotas e

consumirem mais o substrato.

A principal peptidase encontrada em nossos ensaios foi uma proteína entre 50 e 70 KDa responsável pela degradação de gelatina e albumina. Quando avaliada de forma isolada em relação a sua neutralização por inibidores de serino, aspartil, cisteino e metalo peptidases, a peptidase de EPL localizada entre 50 e 70 KDa, demonstrou ser totalmente inibida por 1,10 fenantrolina e apresentou 60% de inibição para EDTA, já para os demais inibidores a inibição da atividade catalítica foi inferior a 50%. A forte inibição por 1,10 fenantrolina e EDTA, a caracteriza como uma enzima pertencente ao grupo das metalo peptidases e seu tamanho e ampla presença no parasito sugerem que se trate da GP63.

Com base nos resultados obtidos de cultura MP199 de promastigotas de *L.(L.) Infantum* e padronização das técnicas foram iniciados os experimentos comparativos entre culturas mantidas em MRA e MRP.

Os meios de cultura onde os parasitos foram inseridos, MRA e MRP, demonstraram influenciar no período de multiplicação parasitária. O maior número de parasitos observados em MRA quando comparado ao MRP, provavelmente está relacionado a maior facilidade na assimilação de aminoácidos. Um estudo anteriormente publicado relata que a multiplicação dos parasitos está relacionada com a composição do meio, em soluções ricas em nutrientes necessários para o desenvolvimento parasitário o tempo de duplicação é menor e a concentração de parasitos por volume de meio de cultura é maior⁶⁸. A presença de aminoácidos em sua forma livre reforça a ideia de uma maior predileção do parasito por essas moléculas ao invés de grandes complexos como as proteínas. A aquisição de aminoácidos por promastigotas já vem sendo bem descrita na literatura^{36 37}. O cultivo de parasitos *in vitro* é uma ferramenta importante para melhor entendermos seus mecanismos de crescimento, essas informações podem auxiliar em novas abordagens no controle da doença⁶⁹.

Os parasitos mantidos em MRA apresentaram um tamanho menor quando comparado aos mantidos em meio MRP. Estes parasitos além de possuírem um menor volume corporal, possuíam um flagelo maior que seu corpo, aproximadamente uma ou duas vezes. Estes fatos são similares aos documentados e observados em culturas de *Leishmania Mexicana* quando estas passam de sua forma procíclica, para metacíclica

⁷⁰. Modificações no ambiente são fatores que promovem alterações estruturais e morfológicas *Leishmania spp.*, como por exemplo, o processo de metaciclogênese que ocorre em meio a acidificação do meio de cultura e a carência de nutrientes, estes estímulos estão associados a diferenciação de formas promastigotas procíclicas em formas metacíclicas ⁷¹.

Estas promastigotas quando avaliadas metabolicamente demonstraram que as mantidas em MRA metabolizavam a resazurina de forma mais rápida que as mantidas em MRP. Embora tenha sido observada essa diferença, ela não foi estatisticamente significativa e os resultados sugerem que devido a uma maior disponibilidade de nutrientes o metabolismo foi mais ativo. Assim como não foi possível a identificação de diferenças metabólicas significantes entre promastigotas mantidas em MRA e MRP, também não foram apresentadas grande distinção entre a porcentagem de mortalidade de parasitos em cultura. Esses dados reforçam a ideia de que estes parasitos se adaptam a condições ambientais e modificam seu metabolismo conforme sua necessidade. Dados recentemente publicados, mostram que há uma queda no nível de mRNA dos genes envolvidos no metabolismo da glicose, com um aumento no nível de mRNA dos genes que codificam os transportadores de aminoácidos à medida que o parasita muda de promastigota procíclica para nectomonas ⁷².

As culturas de promastigotas foram avaliadas em relação a proporção de células mortas, no meio MRP foi observada uma proporção de 29,73% e em MRA 37,55%. Esses valores obtidos são superiores aos observados em culturas convencionais onde a concentração de parasitos mortos é menor de 10% ⁷³. Entretanto deve ser levado em conta que a baixa mortalidade pode estar relacionada a ampla variedade de nutrientes, nos meios MRA e MRP foram disponibilizados apenas sais, fontes de aminoácidos livres ou polimerizados, glicose e hemina como fontes nutricionais. A ausência de demais moléculas pode ter influenciado nas taxas mais elevadas de morte celular.

A fim de entendermos melhor as interações dos parasitos com o meio de cultura em relação a secreção de proteínas, os meios de cultura MRA e MRP foram quantificados em relação a sua concentração proteica antes e após a inserção dos parasitos, a diferença entre essas concentrações foi determinada como a concentração de proteína secretada. Ambos os meios, MRA e MRP apresentaram resultados positivos para secreção de proteínas, entretanto a maior concentração secretada pelo

meio MRP sugere que a composição do meio estimula a secreção de enzimas proteolíticas. Ensaios anteriores descritos na literatura, relatam a presença de múltiplas proteínas secretadas e excretadas por promastigotas no gênero *Leishmania* para o meio de cultura, essas proteínas estão ligadas a imuno-modulação, transdução de sinal e sobrevivência intracelular ⁷⁴. Diferente dos resultados obtidos na avaliação dos sobrenadantes de cultura em MRA e MRP, a concentração proteica detectada em EPL apresentou-se semelhante, quando comparadas, isso sugere que a disponibilidade de aminoácidos de forma livre assim como a disponibilidade de aminoácidos polimerizados em proteínas não compromete a síntese proteica parasitária. Essa afirmação é reforçada com os resultados obtidos pela análise dos EPLs em SDS-page, em que foi possível observar que o padrão de bandas presentes nos EPLs de MRA e MRP são similares, tanto em relação ao perfil, como em relação a intensidade observada.

A análise por microscopia eletrônica dos parasitos obtidos de MRA e MRP, não evidenciou desorganizações estruturais como deformações celulares e perda de definição das organelas, características presentes em parasitos expostos a condições de estresse severo. A presença de danos às mitocôndrias com desorganização da membrana mitocondrial interna, vacuolização citoplasmática intensa, excesso de corpos lipídicos citoplasmáticos, vesículas no interior de vacúolos na bolsa flagelar são alterações relatadas em parasitos expostos a essas condições ⁷⁵. Vesículas de secreção na superfície de promastigotas nas culturas utilizando MRA e MRP, foram observadas. Essas vesículas possuem papéis fundamentais na infectividade do parasito, pois modulam a resposta imunológica do hospedeiro a partir de carboidratos e peptidases que carregam em seu interior, como a GP63 e o LPG ⁷⁶.

A principal finalidade de glicose na formulação de meios de cultura é sua utilização como molécula energética. Promastigotas naturalmente se desenvolvem no intestino de flebotomíneos onde uma abundância de glicose está presente em meio a um pH levemente alcalino ⁷⁷.

Em nossos experimentos foi possível identificar que o maior consumo de glicose ocorreu em MRA seguido por MRP, esse fato provavelmente está associado ao número de parasitos, pois a multiplicação de parasitos foi respectivamente mais intensa em MRA do que em MRP. Ao avaliarmos a modulação do microambiente por

meio da secreção de carboidratos, observamos que após a permanência das promastigotas nos diferentes meios de cultura houve um aumento nos níveis de carboidratos de massa molecular mais elevada em MRA. Já se sabe que promastigotas mantidas em meios de cultura, entram em processo de metaciclogênese, o que causa modificações em seu glicocálice e na secreção de glicoconjugado como o LPG. As promastigotas mantidas em MRA apresentaram tamanho reduzido e maior proporção de seu flagelo em relação ao corpo celular, o que é compatível com a morfologia observada em uma fase de metaciclogênese, forma com maior presença de glicoconjugados. A partir desses resultados, é possível sugerir que a presença de aminoácidos em abundância na cultura pode favorecer uma metaciclogênese em períodos mais precoces que em meios com alta concentração proteica.

Ao analisarmos a membrana dos parasitos foi possível observar que uma estrutura mais delgada e organizada está presente em promastigotas mantidas em MRA. Já os parasitos obtidos de MRP apresentaram uma membrana mais espessa. Esse fato pode estar relacionado a precipitação de proteínas e peptídeos na superfície do parasito, assim como, a concentração de glicoconjugados.

A atividade proteolítica realizada em sobrenadante de cultura de promastigotas em MRP com BSA/FITC, demonstrou um incremento no sinal fluorescente com o passar do tempo. Esse fato está associado a ação proteolítica de peptidases presentes em promastigotas, ocasionando um processo de proteólise da BSA/FITC. Promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp. possuem interações com o ambiente que parasitam, peptidases e outros fatores de virulência são liberados por exossomos em culturas e no intestino dos flebotomíneos para modulação da infecção ⁷⁸.

Quando comparadas as concentrações de peptidases presentes em MRP e MRA é possível observar que parasitos que permaneceram em MRP apresentam uma maior proporção de peptidases. Isso se deve a adaptação a necessidade de processamento de proteínas para obtenção de aminoácidos. Protozoários como o *T. Cruzi* possuem peptidases similares as presentes em *leishmania* como a cruzipaina, essa peptidase embora presente em todas as formas do parasito e sintetizada e compartimentalizada ou escretada conforme a necessidade do protozoário ⁷⁹.

A variedade de atividade inibitoria presente tanto no EPL de MRP como de MRA demonstra a diversidade de peptidases presentes nesses extratos parasitários. A

maior atividade inibitoria em ambas as amostras analisadas demonstraram que a principal atividade proteolítica está ligada à presença de metalopeptidases. Provavelmente devido à presença abundante de GP63⁴². E a maior presença de genes responsáveis pela codificação destas enzimas, cerca de 43% de todos os genes de peptidases⁸⁰. Entretanto mesmo os parasitos mantidos em meio MRA possui uma alta taxa de atividade de metalopeptidases sendo que na composição de seu meio de cultura há ausência de proteínas. Essa presença mesmo nos parasitos que foram mantidos em meio MRA justificase devido a demais funções da GP63 além da nutricional, pois sua presença é essencial para o parasito em momento de evasão do sistema imuno⁶⁵.

As cisteína peptidases possuem uma cisteína em seu sítio catalítico. No entanto uma variedade de peptidases desta classe não apresentam este aminoácido nesta posição. De todas as 259 proteínas de protozoários presentes na família C1 (“tipo catépsina”), 16% não possuem Cys-His em seu sítio catalítico⁸¹. Isso causa dificuldades na classificação de cisteína peptidases de parasitos. O gênero *Leishmania* possui uma variedade de cisteína peptidases presentes em lisossomos, estas peptidases desempenham funções nutricionais e de regulação do ciclo parasitário pois a ação delas estão envolvidas na metaciclo genese do parasito e na alteração de forma devido a autofagia proteica⁸². A atividade destas peptidases podem ser mediadas pela concentração de proteínas⁸³. De acordo com nossos resultados as cisteína peptidases foram a segunda classe de enzimas proteolíticas mais abundante no parasito, isso corrobora com a avaliação do genoma do parasito que possui 42% de genes relacionados a estas enzimas do total de genes relacionado a peptidases⁸⁰. Devido sua localização e relação com a degradação de proteínas endógenas sua utilização para proteólise de proteínas presentes no meio pode ser limitada, isso corrobora com a inalteração de sua atividade entre MRA e MRP.

Embora apresentem baixa atividade as serino peptidases estão em contato frequente com as promastigotas devido sua rápida produção pelo vetor para digestão do repasto sanguíneo, afim de modular a concentração destas peptidases e evitar sua degradação, promastigotas biosintetizam inibidores seletivos para essa classe de enzimas proteolíticas como o LdISP2 que é o inibidor natural de serino peptidases produzido por *L.(L.) Donovanii*⁸⁴. A presença destes inibidores no EPLs dos parasitos mantidos em MRA e MRP podem estar envolvidos nas baixas atividades proteolíticas observadas

em algumas análises deste trabalho, para obtenção de resultados mais claros ainda são necessárias técnicas mais criteriosas com remoção destas enzimas inibidoras.

A classe de protease com o menor número de genes codificadores é a aspartica, apenas três genes para essa classe estão presentes em diferentes espécies de leishmania nos cromossomos 1, 15 e 29⁸⁰. Na avaliação do potencial da atividade proteolítica a classe de aspartil peptidases foi a que desempenhou menor atividade sendo indetectável e estatisticamente insignificante em MRA e levemente reativa em MRP.

A inibição de peptidases parasitárias com finalidade terapêutica já vem sendo feita em *Trypanosoma cruzi* por meio da inibição da cruzipaina em roedores e cães, pois sua eficácia tem sido observada com um menor número de efeitos colaterais quando comparado às terapias atualmente empregadas⁸⁵. A identificação da presença de peptidases com ação moduladora do potencial de inibição, possibilita sua aplicação futura no controle da LV através da identificação de alvos específicos responsáveis pela sobrevivência e multiplicação parasitária.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho foi feito um esquema dos parasitos mantidos em meio MRA e MRP (Figura 12). O esquema evidencia a presença dos carboidratos presentes na membrana parasitária e o fluxo de aminoácidos a partir da aquisição de sua forma livre ou internalização após o processamento de proteínas. Também são evidenciadas as proporções do corpo celular e velocidade de multiplicação.

Como podemos notar no esquema, as promastigotas mantidas em meio rico em proteínas tem a capacidade de manter seu glicocálice mais denso. Isso pode permitir que as proteínas aderidas a ele sejam degradadas pela peptidase da superfície celular, e os aminoácidos originados dessa proteólise sejam captados por bombas e canais de transporte para dentro da célula, pela ausência de difusão para o meio, já que estão presas no glicocálice. Na presença de aminoácidos, as promastigotas não precisam de ação da peptidase para obterem aminoácidos e o cálice celular é muito mais frágil, como evidenciado pela microscopia eletrônica demonstrada anteriormente.

Figura 12 - Representação esquemática da aquisição de aminoácidos em meio MRP e MRA.

Os dados obtidos neste trabalho foram essenciais para melhor compreendermos o metabolismo das promastigotas de *L. (L.) infantum* em relação a aquisição de aminoácidos por meio da degradação de proteínas. Os resultados obtidos sugerem que as peptidases, principalmente a Gp63, presentes na superfície do parasito interagem com proteínas do meio de cultura e as degradam em aminoácidos posteriormente internalizados e utilizados para manutenção da sua viabilidade. De forma complementar a este mecanismo adaptativo e possível que o glicocálice do parasito sofra um espessamento a partir da síntese de glicoconjugados com cadeias de monossacarídeos maiores e mais complexas, isso pode ocorrer para facilitar a interação de proteases e substratos proteicos e melhorar a captura dos aminoácidos, pois estes possivelmente se mantêm próximos a membrana parasitaria envolvidos em meio a malha de glicoconjugados. Além desta funcionalidade alterações entre o tamanho das cadeias do glicocálice e sua complexidade podem estar envolvidos na liberação de haptenos presentes na leishmaniose visceral. Os resultados até aqui obtidos reforçam a versatilidade do parasito em adaptar-se a variadas condições e concentrações de nutrientes presentes no microambiente. Essas condições podem aumentar a síntese e secreção de moléculas estruturais presentes no glicocálice ou em sua secreção. Essas

informações são importantes e devem ser levadas em consideração no estudo de novas drogas parasitárias que tenham como foco o bloqueio de vias metabólicas associadas a aquisição de aminoácidos por meio de peptidases.

6. CONCLUSÕES

6.1 Geral

- Os parasitos quando mantidos em meios de cultura com diferentes fontes de aminoácidos, MRA e MRP, apresentam variações na concentração de carboidratos e proteínas endógenas e na secreção destas moléculas. Essas alterações não são fatores limitantes para sobrevivência do parasito, entretanto as características estruturais sofrem alterações. Esses fatos reforçam a plasticidade parasitária e adequação do ciclo biológico parasitário a partir de influências ambientais.

6.2 Específicas

- Parasitos mantidos em MP199 apresentaram um crescimento exponencial com síntese de carboidratos e proteínas presentes em sua estrutura e no sobrenadante do meio de cultura;
- Em promastigotas isolados de MP199 foi possível identificar a presença de atividade proteolítica no EPL por duas metodologias independentes baseadas fluorescência e espectrofotometria. O perfil de peptidases presentes no parasito foi pouco diversificado e a maior parte da atividade proteolítica está associada a uma peptidase entre 50 e 75 KDa de massa;
- A maior atividade proteolítica do parasito está relacionada a presença da metalo peptidases GP63, que apresentou maior inibição a partir de inibidores 1,10 fenantrolina e EDTA. Os demais inibidores apresentaram eficiência reduzida;
- A inclusão de promastigotas de *L. (L.) infantum* em MRP e MRA, induziu alteração no tamanho dos parasitos, na síntese de carboidratos e na concentração de proteínas;

- O consumo de carboidratos associado a metabolização da resazurina e mortalidade parasitária presentes nos meios de cultura foram similares confirmando a atividade metabólica dos parasitos nos microambientes fornecidos, ressaltando a capacidade adaptativa dos parasitos;
- A morfologia parasitária evidenciou promastigotas maiores em MRP quando comparadas as observadas em MRA, entretanto alterações e modificações não foram observadas em análise de microscopia eletrônica, exceto pela presença de uma maior densidade de carboidratos em sua membrana;
- O sobrenadante de MRP contendo BSA/FITC apresentou atividade proteolítica a partir da inserção de promastigotas. O incremento da fluorescência detectada evidenciou a atividade de peptidases de *L. (L.) infantum* sobre o substrato proteico;
- Os EPLs de MRA e MRP de forma similar demonstraram uma redução na sua atividade proteolítica com maior intensidade a partir da inibição de metalo peptidases seguidas por cisteino peptidases, aspartil peptidases e serino peptidases.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization - WHO. Leishmaniose: Epidemiological situation. [acessado em 10 de junho de 2018]. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>
3. Bezerra JMT, de Araújo VEM, Barbosa DS, Martins-Melo FR, Werneck GL, Carneiro M. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. PLoS Negl Trop Dis. 2018. [citado em 21 de fevereiro de 2017]. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006697>
3. Lainson R, Ward RD, & Shaw J.J. Experimental transmission of Leishmaniasis chagasi causative agent of neotropical visceral leishmaniasis by the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Nature. 1977;266:628-630.
4. Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. Trends Parasitol. 2012 Aug; 28(8):335- 344.
5. McConville MJ, Saunders EC, Kloehn J, Dagley MJ. *Leishmania* carbon metabolism in the macrophage phagolysosome- feast or famine?. 2015 Oct; 4:938.
7. Marchesini N, Docampo R. A plasma membrane P-type H(+)-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. Mol Biochem Parasitol. 2002 Feb; 119(2):225-236.
8. Sen SS, Bhuyan NR, Bera T. Characterization of plasma membrane bound inorganic pyrophosphatase from *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes. Afr Health Sci. 2009 Dez; 9(4):212-217.
9. CDC, Centers for Disease Control and Prevention: Leishmaniasis. [Acesso em: 04 de janeiro de 2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.
10. Cerbino Neto J, Werneck GL, Costa CH. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. Cad Saúde Pública. 2009;25(7):1543-1551.

11. Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2008;24(12):2948-2952.
12. Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva- Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol*. 2012;28(12):531-538.
13. Pasquali AKS, Baggio RA, Boeger WA, et al. Dispersion of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* in central-southern Brazil: Evidence from an integrative approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(8): 1-20.
14. Ministerio da saude, Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas de 1990 a 2018. [Acesso em: 27 de janeiro de 2018]. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/14/LV-Casos.pdf>
15. Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host. *Int J Infect Dis*. 2013;17(8):572-576.
16. Chapman LA, Dyson L, Courtenay O, Chowdhury R, Bern C, Medley GF, Hollingsworth TD. Quantification of the natural history of visceral leishmaniasis and consequences for control. *Parasit Vectors*. 2015 Oct 22;8:521.
17. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1986;154(6):1003–1011.
18. Roberts MT. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull*. 2006;75- 76:115-130.
19. Custodio E, López-Alcalde J, Herrero M, et al. Nutritional supplements for patients being treated for active visceral leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;3(3):1-26
20. Brasil. Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral. Ministério da

saúde. 2014; 1 (5):7-120

21. Zanette MF, Lima VM, Laurenti MD, et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(1):105–107.

22. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(11):873–882.

23. de Carvalho CA, Partata AK, Hiramoto RM, et al. A simple immune complex dissociation ELISA for leishmaniasis: standardization of the assay in experimental models and preliminary results in canine and human samples. *Acta Trop*. 2013;125(2):128–136

25. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde 2017;1(3): 519-522.

26. Sundar S, Singh A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. *Ther Adv Infect Dis*. 2016 Jun;3(3-4):98-109.

27. Khanra S, Sarraf NR, Das S, Das AK, Roy S, Manna M. Genetic markers for antimony resistant clinical isolates differentiation from Indian Kala-azar. *Acta Trop*. 2016;164:177-184.

28. FUNASA (Fundação Nacional da Saúde). Boletim eletrônico epidemiológico. Reações adversas graves associadas com o uso de Antimoniato de meglumina contaminado com arsênio e chumbo. Editora do Ministério da Saúde. 2001;1(1):2-9

29. Boechat, N.; Carvalho, A. S.; Duarte, S. L.; Costa, J. C. S. Um novo processo para a obtenção do antimoniato de meglumina, visando a produção do medicamento genérico. *Revista Virtual de Química* 2015, 7(2), 684-696.

30. Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?. *Int J Parasitol*

Drugs Drug Resist. 2012;2:11–19.

31. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Sep;5(9):785-799.

32. Anderson J, Schiffer C, Lee SK, Swanstrom R. Viral protease inhibitors. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(189):85-110.

33. Klemba, M., Gluzman, I., & Goldberg, D. E. A *Plasmodium falciparum* Dipeptidyl Aminopeptidase I Participates in Vacuolar Hemoglobin Degradation. *Journal of Biological Chemistry.* 2004; 279(41), 43000–43007.

34. Vieira LL, Cabantchik ZI. Amino acid uptake and intracellular accumulation in *Leishmania* major promastigotes are largely determined by an H⁽⁺⁾-pump generated membrane potential. *Mol Biochem Parasitol.* 1995 Dec;75(1):15-23.

35. Payne SH, Loomis WF. Retention and loss of amino acid biosynthetic pathways based on analysis of whole-genome sequences. *Eukaryot Cell.* 2006 Feb; 5(2):272-276.

36. Shaked-Mishan P, Suter-Grotemeyer M, Yoel-Almagor T, Holland N, Zilberstein D, Rentsch D. A novel high-affinity arginine transporter from the human parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Mol Microbiol.* 2006 Apr;60(1):30-38.

37. Schlisselberg D, Mazarib E, Inbar E, Rentsch D, Myler PJ, Zilberstein D. Size does matter: 18 amino acids at the N-terminal tip of an amino acid transporter in *Leishmania* determine substrate specificity. *Sci Rep.* 2015 Nov 9;5:1-9.

38. dos Santos MG, Paes LS, Zampieri RA, da Silva MF, Silber AM, Floeter- Winter LM. Biochemical characterization of serine transport in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol.* 2009 Feb;163(2):107-113.

39. Olin-Sandoval V, González-Chávez Z, Berzunza-Cruz M, Martínez I, Jasso-Chávez R, Becker I, Espinoza B, Moreno-Sánchez R, Saavedra E. As enzimas da via de tripanotina através da modelagem metabólica. *FEBS J.* 2012 May; 279 (10): 1811-1833.

40. Mandal A, Das S, Roy S, Ghosh AK, Sardar AH, Verma S, Saini S, Singh R, Abhishek K, Kumar A, Mandal C, Das P. Deprivation of L-Arginine Induces Oxidative Stress Mediated Apoptosis in *Leishmania donovani* Promastigotes: Contribution of the Polyamine Pathway. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jan 25;10(1) 1-26.
41. Agarwal S, Rastogi R, Gupta D, Patel N, Raje M, Mukhopadhyay A. Clathrin-mediated hemoglobin endocytosis is essential for survival of *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(5):1065–1077.
42. Silva-Lopez, Raquel Elisa da. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Quím. Nova, São Paulo*. 2010;33(7):1541-1548
43. Soares RM de A, Barreto ALS, José AC, Portela MB. Protease Inhibitors with Antileishmanial Activity. *Current Enzyme Inhibition*. 2011;7(1):24-31
44. Santana JM, Grellier P, Scherével J, Teixeira AR. A *Trypanosoma cruzi*- secreted 80 KDa protease with specificity for human collagen types I and IV. *Biochemical Journal*.1997;324,129–137.
45. Silva-Lopez RE, Coelho MG, De Simone SG. Caracterização de uma extracelular serinaprotease de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitologia*. 2005 Julho; 131(Pt 1):85-96.
46. Silva-Lopez RE, Morgado-Díaz JA, ALVES CR, CÔRTE-REAL S, GIOVANNI De SIMONE S. Subcellular localization of an extracellular serine protease in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology Research*. 2004;93,328–331.
47. Trenholme KR, Brown CL, Skinner-Adams TS, Stack C, Lowther J, To J, Robinson MW, Donnelly SM, Dalton JP, Gardiner DL. Aminopeptidases of malaria parasites:new targets for chemotherapy. *Infect Disord Drug Targets*. 2010 Jun;10(3):217-25.
48. Santos LO, Garcia-Gomes AS, Catanho M, Sodre CL, Santos AL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Aspartic peptidases of human pathogenic trypanosomatids: perspectives and trends for chemotherapy. *Curr Med Chem*. 2013;20(25):3116-3133.

49. van Griensven J, Diro E, Lopez-Velez R, Boelaert M, Lynen L, Zijlstra E, Dujardin JC, Hailu A. HIV-1 protease inhibitors for treatment of visceral leishmaniasis in HIV-coinfected individuals. *Lancet Infect Dis*. 2013 Mar;13(3):251-259.
50. Bouvier J, Schneider P, Etges R, Bordier C. Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. *Biochemistry*. 1990 Oct 30;29(43):10113-10119.
51. McKerrow JH, Rosenthal PJ, Swenerton R, Doyle P. Development of protease inhibitors for protozoan infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Dec;21(6):668-672.
52. Clark JD. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences. National Research Council. Washington, D.C. National Academy Press. 2011;8:1-220.
53. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254
54. Johnson W., Lindsey A. An improved universal buffer. *Analyst*. 1939;64(760); 490-492
55. Sousa C. A. Márcilio de, Lessa Ines S., Leboreiro Odulia. Concentração de proteínas na urina de indivíduos normais. *Rev. Saúde Pública*. 1973; 7(4): 405-408.
56. Rose C, Parker A, Jefferson B, Cartmell E. The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2015;45(17):1827–1879
57. Shin J, Kim G, Kabir MH, Park SJ, Lee ST, Lee C. Uso de banco de dados de proteínas compostas, incluindo sequências de resultados de pesquisa para análise espectrométrica de massa do secretoma celular. *PLoS One* . 2015;10(3):1-11
58. Thermo Fisher Scientific. Technical Resources, catálogo 11150059; composição do meio 199. [acessado em 19 de julho de 2018]. Disponível em:<https://www.thermofisher.com/br/en/home/technical-resources/media->

formulation.86.html

59. Siripattanapipong S, Boontanom P, Leelayoova S, Mungthin M, Tan-Ariya P. In vitro growth characteristics and morphological differentiation of *Leishmania martiniquensis* promastigotes in different culture media. *Acta Trop*. 2019;197:1-7
60. Raina MM, Ian LP, Charles PG, Terry JG, Bacterial growth. *Environmental Microbiology*. Academic Press, California. 2015;3: 37–56.
61. Forestier CL, Gao Q, Boons GJ. *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Front Cell Infect Microbiol*. 2015 Jan 21;4:193.
62. Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*. 2002 May;124(5):495-507.
63. Tzinia AK, Soteriadou KP. Substrate-dependent pH optima of gp63 purified from seven strains of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 1991 Jul;47(1):83-89.
64. Caffrey CR, Goupil L, Rebello KM, Dalton JP, Smith D. Cysteine peptidases as digestive enzymes in parasitic helminths. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Aug 23;12(8):1-17.
65. Klemba M, Goldberg DE. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:275-305.
66. Chaudhuri G, Chang KP. Acid peptidase activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1988 Jan 1;27(1):43-52.
67. Verma S, Dixit R, Pandey KC. Cysteine Peptidases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Front Pharmacol*. 2016;7:107.
68. Fritsche, C., Sitz, M., Weiland, N., Breitling, R., Pohl, H.D. Characterization of the growth behavior of *Leishmania tarentolae*: a new expression system for recombinant proteins. *J. Basic Microbiol*. 2007;47,384–393.

69. Ahmed NH. Cultivation of parasites. *Trop Parasitol.* 2014 Jul;4(2):80-89.
70. Bates PA, Tetley L. *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. *Exp. Parasitol.* 1993;76:412–423.
71. Bates PA. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Cur. Opin in Microbiol.* 2008;11:340–344.
72. Inbar E, Hughitt VK, Dillon LA, Ghosh K, El-Sayed NM, Sacks DL. The Transcriptome of *Leishmania* major Developmental Stages in Their Natural Sand Fly Vector. *MBio.* 2017 Apr 4;8(2):1-18
73. Moreira D, Santarém N, Loureiro I, Tavares J, Silva AM, Amorim AM, Ouaisi A, 72. Moreira D, Santarém N, Loureiro I, et al. Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(1):1-12
74. Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia L, Mendonça-Lima L, Domont GB, Cupolillo E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigotes. *J Proteomics.* 2009 Nov 2;73(1):79-92.
75. Britta EA, Scariot DB, Falzirolli H, Ueda-Nakamura T, Silva CC, Filho BP, Borsali R, Nakamura CV. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde hiosemicarbazone derived from S-limonene. *BMC Microbiol.* 2014;14:1-12.
76. Barbosa FMC, Dupin TV, Toledo MDS, Reis NFDC, Ribeiro K, Cronemberger-Andrade A, Rugani JN, De Lorenzo BHP, Novaes E Brito RR, Soares RP, Torrecilhas AC, Xander P. Extracellular Vesicles Released by *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Promote Disease Progression and Induce the Production of Different Cytokines in Macrophages and B-1 Cells. *Front Microbiol.* 2018;9:1-14.
77. Subramanian A, Jhawar J, Sarkar RR. Dissecting *Leishmania infantum* Energy Metabolism - A Systems Perspective. *PLoS One.* 2015;10(9):1-34.
79. Souto-Padrón T, Campetella OE, Cazzulo JJ, de Souza W. Cysteine proteinase in

Trypanosoma cruzi: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J Cell Sci.* 1990 Jul;96 (Pt 3):485-490.

80. Silva-Almeida M, Souza-Silva F, Pereira BA, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. *Parasit Vectors.* 2014;7:1-8.

81. Atkinson HJ, Babbitt PC, Sajid M. A paisagem global da cisteína peptidase em parasitas. *Tendências Parasitol .* 2009; 25 (12): 573–581.

82. Williams RA, Tetley L, Mottram JC, Coombs GH. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol.* 2006 Aug;61(3):655-674.

83. Mottram JC, Robertson CD, Coombs GH, Barry JD. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol.* 1992 Jul;6(14):1925-1932.

84. Verma S, Das S, Mandal A, et al. Role of inhibitors of serine peptidases in protecting *Leishmania donovani* against the hydrolytic peptidases of sand fly midgut. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):1-16.

85. Barr SC, Warner KL, Kornreic BG, Piscitelli J, Wolfe A, Benet L, McKerrow JH. A cysteine peptidase inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Dec;49(12):5160-5161.