



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação da ativação do sistema complemento
por extratos proteicos de *Leishmania* spp.

Ana Francisca Barroca Lemos

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
na especialidade de **Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional**

(Outubro, 2016)



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Avaliação da ativação do sistema complemento por
extratos proteicos de *Leishmania* spp.

Autor: Ana Francisca Barroca Lemos

Orientador: Investigador Doutor Marcelo Sousa Silva

Coorientador: Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular em Medicina Tropical e Internacional.

Agradecimentos

À minha família, amigos, colegas e professores que me deram todo o apoio e me ajudaram a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica, os meus mais sinceros agradecimentos.

Resumo

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários intracelulares do género *Leishmania* transmitidos por picadas de fêmeas de flebótomo infetados. A doença existe em três tipos: visceral, cutânea e mucocutânea. A leishmaniose visceral atinge os órgãos viscerais e é usualmente fatal no prazo de dois anos caso não seja tratada. A leishmaniose cutânea é a forma mais prevalente, causando úlceras na pele que se podem curar espontaneamente. Na leishmaniose mucocutânea o parasita invade as membranas mucosas do trato respiratório superior causando a sua destruição. A distribuição desta doença tem-se expandido e o número de casos reportados tem vindo a aumentar exponencialmente. É prevalente em 98 países e por ano ocorrem aproximadamente 1.3 milhões de novos casos: 300 000 são viscerais e um milhão são cutâneos ou mucocutâneos. O número de mortes estimado para a leishmaniose cutânea pode ir de 20 000 a 50 000 anualmente. Esta doença afeta maioritariamente as populações pobres e é considerada uma doença tropical negligenciada. O sistema imunitário é um fator importante na eliminação do parasita. Embora a via clássica do sistema complemento seja ativada por *Leishmania*, é a via alternativa que amplifica a destruição de parasitas. Contudo, o parasita desenvolveu estratégias para se evadir à atividade do sistema imunitário, encontrando-se descrito um número significativo de fatores de virulência que atuam contornando a resposta imune do hospedeiro. Um desses fatores é a metaloprotease de zinco gp63. O presente estudo tem como objetivo analisar a interação do parasita com os eritrócitos humanos, sabendo que uma vez introduzido na derme do hospedeiro o parasita para sobreviver tem de ser rapidamente fagocitado. O estudo dos perfis proteicos totais dos extratos de três espécies cutâneas de *Leishmania* demonstrou a possível presença de diversas proteínas, incluindo uma banda compatível com a gp63 que também é segregada para o meio de cultura, tal como previamente descrito. O estudo também confirma a atividade enzimática da banda compatível com a gp63. A atividade desta enzima parece estar diretamente relacionado com a concentração utilizada para sensibilizar as membranas. Adicionalmente, foi constatado que a atividade hemolítica está dependente da presença dos extratos do parasita adjuvada por fatores do complemento. No seu conjunto estes resultados indicam que *Leishmania* usa as suas enzimas proteolíticas, sobretudo a abundante gp63 para promover a lise do eritrócito na presença de complemento assegurando o

suplemento de ferro, uma vez que estes parasitas não são capazes de gerar o grupo heme. Este estudo também contribui para a compreensão das interações entre o hospedeiro e o parasita, podendo vir a ser importante na identificação de alvos terapêuticos e profiláticos, assim como na melhoria das metodologias de diagnóstico.

Palavras-chave: *Leishmania*; metaloproteases; gp63; sistema complemento; eritrócitos

Abstract

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by an intracellular protozoan of the genus *Leishmania* transmitted by the bites of infected female phlebotomine. The disease has three principal clinical presentations: visceral, cutaneous and mucocutaneous. In visceral leishmaniasis the parasite reaches the organs of the mononuclear phagocyte system, leading to death within two years if left untreated. Cutaneous leishmaniasis is the most prevalent form, causing skin ulcers that may heal spontaneously. In mucocutaneous leishmaniasis, the parasite invades the mucous membranes of the upper respiratory tract, causing their destruction. This disease had expanded and the reported cases have been increasing exponentially. It is prevalent in 98 countries and each year there are approximately 1.3 million new cases, being 300,000 visceral and one million cutaneous or mucocutaneous. However, the number of deaths estimated each year can ascend to 50,000. This disease affects mainly the poor populations and is considered a neglected tropical disease. The host immune system is an important factor in the parasite elimination. However, the parasite has developed strategies to evade the activity of the immune system, being described a number of virulence factors that ensure parasite survival in the host. One such factor is the metalloproteinase zinc dependent gp63. While the classical complement pathway is activated by *Leishmania* is the alternative pathway that amplifies parasite destruction. Therefore, this study aims to analyze the interaction of the parasite with human erythrocytes, knowing that once introduced into the dermis host the parasite must be rapidly phagocytosed to assure its own survival. Protein profiles of extracts obtained from three cutaneous *Leishmania* species showed several proteins of different molecular mass, including a band compatible with gp63 which is also secreted into the culture medium, as previously described. The observation that the same band also present enzymatic activity is again indicative of gp63. It has been found that the activity of this enzyme is dependent of the amount used to sensitize erythrocyte membranes. Furthermore, parasite extracts seems to be crucial to activate the complement system. Since these parasites are unable of generating the heme group, taken together these results indicate that *Leishmania* proteolytic enzymes, especially the abundant gp63 adjuvanted by the complement factors can promote extense erythrocyte lysis ensuring the necessary iron supplement. This study also contributes to the understanding of the interactions between the host and

the parasite and can also bring light in the identification of therapeutic and prophylactic targets, as well in improving diagnostic methodologies.

Key-words: *Leishmania*; metalloprotease; gp63; complement system; erythrocytes

Índice	
Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Índice	vi
Índice de figuras	viii
Lista de abreviaturas	ix
1. Introdução	1
1.1 Doenças tropicais negligenciadas	1
1.2 <i>Leishmania spp.</i>	1
1.2.1 Família Trypanosomatidae	1
1.2.2 Taxonomia de <i>Leishmania spp.</i>	2
1.2.2 Morfologia	3
1.3 Leishmaniose	4
1.3.1 Epidemiologia	4
1.3.2 Características clínicas	6
1.3.3 Diagnóstico da doença	7
1.4 Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	8
1.4.1 Hospedeiro invertebrado	8
1.4.2 Hospedeiro vertebrado	9
1.4.3 Ciclo de vida	9
1.5 Resposta do sistema imunitário	10
1.5.1 Mecanismos de ativação do sistema complemento	12
1.5.2 Sistema complemento em <i>Leishmania spp.</i>	14
1.6. Metaloproteases em tripanossomídeos	15
1.6.1 gp63 em <i>Leishmania spp.</i>	16
2. Objetivos	19
3. Materiais e Métodos	20
3.1 Culturas dos parasitas	20
3.2 Preparação dos extratos	20
3.3 Constituição de soluções	21
3.3.1 Solução de Alsever	21
3.3.2 Veronal Buffer solution – Tampão VBS⁺⁺	21
3.3.3 <i>Sample Buffer 2x</i> -Tampão de amostra para SDS-PAGE	21

3.3.4 Zymogram Sample Buffer 3x – Tampão para Zimografia	22
3.4 Preparação de eritrócitos e soro humano para os estudos da metaloprotease e ensaios hemolíticos.....	22
3.5 Quantificação de proteínas totais dos extratos proteicos de <i>Leishmania</i> spp.....	22
3.6 Determinação do perfil eletroforético de extratos de <i>leishmania</i> spp. por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	23
3.7 Determinação da atividade enzimática do extrato proteico de <i>Leishmania</i> spp.....	26
3.8 Atividade da metaloproteinase na membrana do eritrócito.....	27
3.8.1 Preparação da suspensão de eritrócitos humanos não sensibilizados.....	27
3.8.2 Preparação da suspensão de eritrócitos humanos sensibilizados	27
3.9.3 Controlos	27
3.9 Avaliação da interação das metaloproteinases de <i>Leishmania</i> spp, com eritrócitos humanos e possível atividade hemolítica mediada pelo sistema complemento	28
3.9.1 Sensibilização dos eritrócitos humanos	28
3.9.2 Estudo da lise dos eritrócitos sensibilizados mediada pelo complemento	28
3.9.3 Análise estatística.....	29
4. Resultados e discussão	30
4.1 Perfil proteico total de <i>Leishmania</i>	30
4.2 Atividade enzimática dos extratos proteicos de <i>Leishmania</i> spp.	32
4.3 Atividade da metaloproteinase na membrana do eritrócito.....	33
4.4 Avaliação da interação das metaloproteinases de <i>Leishmania</i> spp. com eritrócitos humanos e possível atividade hemolítica mediada pelo sistema complemento	34
5. Conclusão.....	37
6. Bibliografia	38

Índice de figuras

Quadro 1 Classificação taxonómica de <i>Leishmania</i> spp.....	3
Figura 1 Morfologia de <i>Leishmania</i>	4
Figura 2 Estado da endemicidade de leishmaniose cutânea no mundo em 2013.....	5
Figura 3 Estado da endemicidade de leishmaniose visceral no mundo em 2013.....	5
Figura 4 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp	10
Figura 5 Esquematisação da relação que se estabelece entre <i>Leishmania</i> e a resposta imunitária do hospedeiro	12
Figura 6 Estrutura tridimensional de gp63.....	16
Figura 7 Domínios da gp63.....	17
Quadro 2 Constituição da curva padrão para a quantificação do extrato.....	23
Tabela 1 Composição do gel de acrilamida a 10%.....	24
Tabela 2 Preparação de amostras dos sedimentos de parasitas	25
Tabela 3 Preparação de amostras de sobrenadante das culturas de parasitas.....	25
Quadro 3 Concentrações das amostras colocadas na placa de microtitulação.....	29
Figura 8 Perfil proteico total dos extratos e sobrenadantes de <i>Leishmania</i>	30
Figura 9 Perfil proteico total dos extratos de <i>Leishmania</i> com nitrato de prata.....	32
Figura 10 Atividade enzimática dos extratos de <i>Leishmania</i>	33
Figura 11 Atividade da metaloproteinase em eritrócitos sensibilizados com extrato proteico de <i>Leishmania</i>	34
Figura 12 Efeito do complemento em eritrócitos sensibilizados com extratos proteicos	36

Lista de abreviaturas

AP-1 - Proteína-1 ativada

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

FBS - soro fetal bovino

gp63 - Glicoproteína de 63kDa

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

HEPES - Ácido 2-[4-(2-hidróxi-1-piperazinil)-etanosulfónico

IFN- γ - Interferon-gama

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

IL - Interleucina

IRAK-1 - Cinase 1 associada ao recetor de interleucina-1

JAK - Cinase janus

MAC – Complexo de ataque à membrana

MAPK - Cinase ativada por mitogénios

MASP – Protease de serina

MBL - lectina ligadora de manose

MMP - Metaloprotease de matriz de mamífero

NF- κ B – Factor nuclear κ B

NK - Células natural-killer

PBS - Tampão fosfato salino

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PTP - Proteína tirosina fosfatase

RNA - Ácido ribonucleico

SDS - Dodecil sulfato de sódio

T CD4⁺ - Linfócito T CD4⁺

T CD8⁺ - Linfócito T CD8⁺

Th1 - Linfócito T auxiliar do tipo 1

Th2 - Linfócito T auxiliar do tipo 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TORC1 – Actividade regulada CREB

VBS++- Veronal Buffer solutin

1. Introdução

1.1 Doenças tropicais negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas são um subconjunto das doenças infecciosas que predominam nas zonas tropicais e subtropicais. Afetam especialmente locais de grande pobreza uma vez que muitas destas infeções são em parte atribuíveis à falta de acesso a água potável, saneamento e habitações adequadas. Assim a sua predileção por locais quentes é explicada pelo facto de que a pobreza é encontrada em maior concentração nas comunidades rurais remotas, favelas urbanas e populações isoladas perto do equador (Feasey, Wansbrough-Jones, Mabey & Solomon, 2009).

A Organização Mundial de Saúde elaborou uma lista onde indicou as 17 doenças tropicais negligenciadas: dengue; raiva; tracoma; úlcera de Buruli; boubá; hanseníase; doença de Chagas; doença do sono; leishmaniose; teníase e neurocisticercose; dracunculose; equinococose; trematodíases de origem alimentar; filariose linfática; oncocercose; schistosomose e helmintíases transmitidas pelo solo (WHO (a), 2015). Com base nos limitados recursos investidos no diagnóstico, tratamento e controle e a forte associação com pobreza, a leishmaniose é classificada como uma das doenças mais negligenciadas (Bern, Maguire & Alvar, 2008).

1.2 *Leishmania spp*

1.2.1 Família Trypanosomatidae

Segundo a classificação atual, *Leishmania* pertence à família *Trypanosomatidae* que inclui eucariontes flagelados com um cinetoplasto. Os tripanosomatídeos são distinguíveis de outros protozoários por características organizacionais distintas, tais como a presença de DNA cinetoplástico, um tipo de DNA mitocondrial que consiste em maxi e mini-círculos de DNA localizados na única mitocôndria perto do corpo basal do flagelo. Os seus genes nucleares da subunidade t-RNA revelam uma organização complexa com a ocorrência de espaçadores internos transcritos que separam as regiões

de codificação em moléculas de rRNA, duas grandes A e B, e cinco pequenas S1-S4 e S6. Estes organismos parecem ser capazes de adaptar com facilidade a energia do seu metabolismo à disponibilidade de substratos e de oxigénio, podendo dar-lhes capacidade de estabelecer um novo ciclo de vida se as condições o permitirem (Gómez, Valdés, Piñero & Hernández, 1991; Santos, Branquinha & D'Avila-Levy, 2006).

Os géneros reconhecidos na família *Trypanosomatidae* podem ser divididos em dois grupos: monoxénico e heteroxénico. Os géneros monoxénicos ocorrem num único hospedeiro invertebrado, embora existam exceções de tripanossomídeos encontrados em plantas e da existência de alguns em hospedeiros mamíferos. Os géneros heteroxénicos alternam entre inseto ou planta vetor e mamífero hospedeiro. É neste último grupo que se encontra o género *Leishmania* (d'Avila-Levy, Altoé, Uehara & Santos, 2014).

1.2.2 Taxonomia de *Leishmania* spp.

O género *Leishmania* (quadro 1) é dividido em dois subgéneros: *Leishmania* presente tanto no Antigo (África, Ásia e Europa) como no Novo Mundo (Américas), e *Vianna*, restringido ao Novo Mundo. Estes subgéneros são definidos com base na sua localização no intestino. A classificação da espécie pode ser efetuada através de critérios intrínsecos, tais como características imunológicas, bioquímicas e genéticas. Hoje em dia são conhecidas 30 espécies e aproximadamente 20 são patogénicas para os seres humanos (Bañuls, Hide & Prugnolle, 2007; WHO (b), 2015).

Reino	Protista Haeckel, 1866	
Sub-reino	Protozoa Goldfuss, 1817	
Filo	Sarcomastigophora Honigberg & Balamuth, 1963	
Sub-filo	Mastigophora Desing, 1866	
Classe	Zoomastigophorea Calkins, 1909	
Ordem	Kinetoplastida Honigberg, 1963, Vickerman, 1976	
Sub-ordem	Trypanosomatida Kent, 1880	
Familia	Trypanosomatidae Doflein, 1901, Grobden, 1905	
Género	<i>Leishmania</i> Ross, 1903	
Subgénero	<i>Leishmania</i> Ross, 1903, Safjanova, 1982	<i>Vianna</i> Lainson & Shaw, 1987
Espécie	<i>L. donovani</i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. tropica</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. major</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. lainsoni</i>

Quadro 1- Classificação taxonômica de *Leishmania* spp.

1.2.2 Morfologia

O parasita *Leishmania* tem dois estágios de desenvolvimento proeminentes, amastigota e promastigota (**Fig. 1**). Os amastigotas são organismos esféricos, não-flagelados com tamanho reduzido, cerca de 2-4 µm de diâmetro. O núcleo e o cinetoplasto estão rodeados por um pequeno anel de citoplasma vacuolizado. Estas células que estão entre as mais pequenas células nucleadas conhecidas encontram-se no interior de vesículas em células fagocitárias dos hospedeiros vertebrados (The Australian Society for Parasitology Inc., 2016). O promastigota tem forma alongada com um cinetoplasto anterior, são flageladas e maiores do que as amastigotas, variando entre 5-14 µm de comprimento e 1.5-3.5 µm de largura. Sobrevive a nível extracelular e, geralmente, ligada ao intestino médio do vetor (The Australian Society for Parasitology Inc., 2016). Os promastigotas metacíclicos são morfologicamente distinguíveis dos promastigostas procíclicos pelo seu flagelo alongado, pelo menos o dobro do tamanho da célula, e pelo tamanho menor do corpo (Yao & Wilson, 2016).

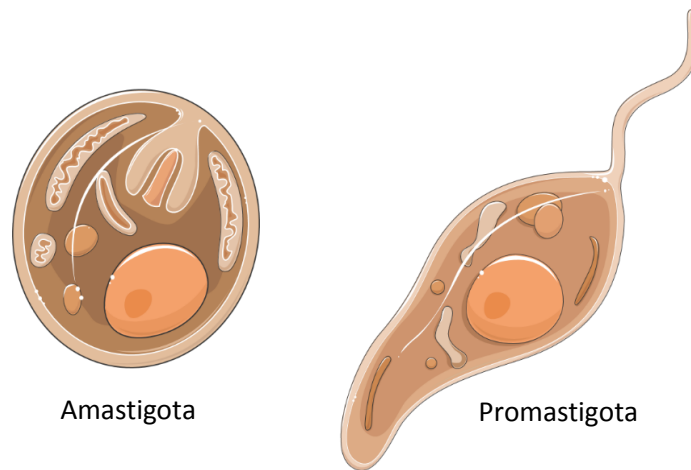


Figura 1- Morfologia de Leishmania (adaptado de Servier Medical Art)

1.3 Leishmaniose

A leishmaniose é um complexo de doenças infecciosas transmitidas por vetores, causadas por mais de 20 espécies do protozoário do género *Leishmania*, e que podem causar desde úlceras cutâneas localizadas a doença sistémica letal (Bern, Maguire, & Alvar, 2008). Os esforços de pesquisa ao longo da última década para obter um melhor controlo da leishmaniose têm aumentado o leque de ferramentas de diagnóstico aplicável em campo e de fármacos eficazes disponíveis, especialmente para a leishmaniose visceral. O uso apropriado das intervenções de controlo de vetores, tais como mosquiteiros tratados com inseticida e pulverização residual de interiores, reduziria grandemente a incidência da doença. No entanto, os esforços de controlo da leishmaniose têm sido atrasados pela falta de uma estratégia simples, como uma vacina por exemplo (Bern, Maguire, & Alvar, 2008).

1.3.1 Epidemiologia

A leishmaniose ocorre predominantemente em regiões tropicais e subtropicais mas está presente em todos os continentes exceto na Oceânia e Antártida. A leishmaniose cutânea prevalece na América Latina, Ásia Central e sudoeste da Ásia (**Fig. 2**), e 90% da leishmaniose visceral do mundo ocorre na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (**Fig. 3**) (Feasey, Wansbrough-Jones, Mabey, & Solomon, 2009). No “Venho Mundo” a

maioria das transmissões ocorre peri domesticamente em áreas semiáridas modificadas pelos humanos. Já no “Novo Mundo”, os parasitas são mais comuns em habitats silvestres embora algumas espécies apresentem transmissão predominantemente peridomiciliar (Akhoundi et al., 2016). A doença é geralmente caracterizada por grandes surtos em cidades densamente povoadas, especialmente em zonas de guerra e conflitos, campos de refugiados e em ambientes onde há migração populacional em grande escala (WHO, 2016).

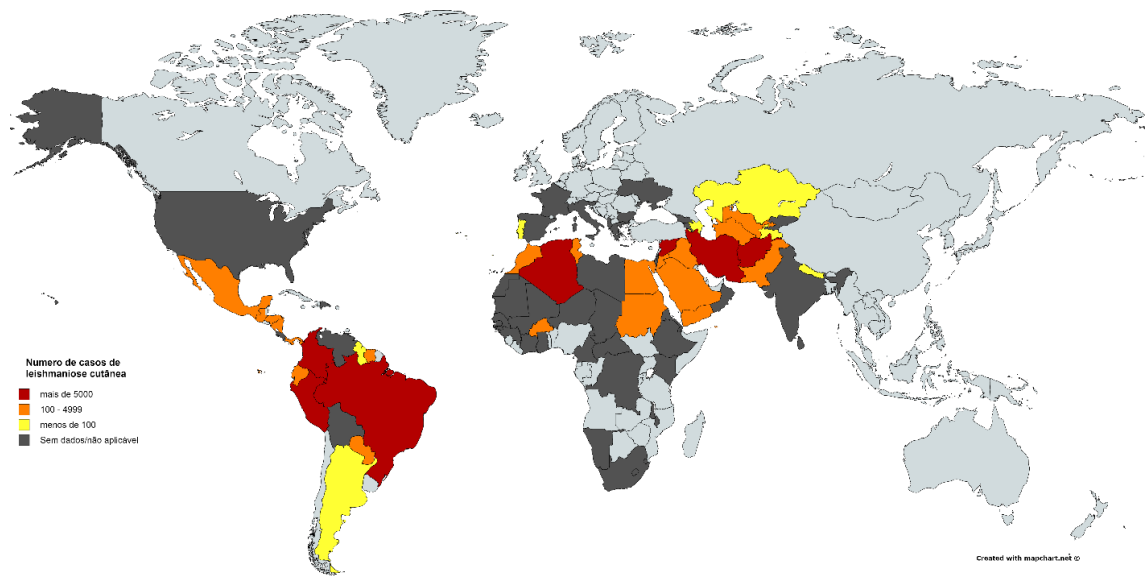


Figura 2 - Estado da endemicidade de leishmaniose cutânea no mundo em 2013. Baseado em WHO, Control of Neglected Tropical Diseases, 2015

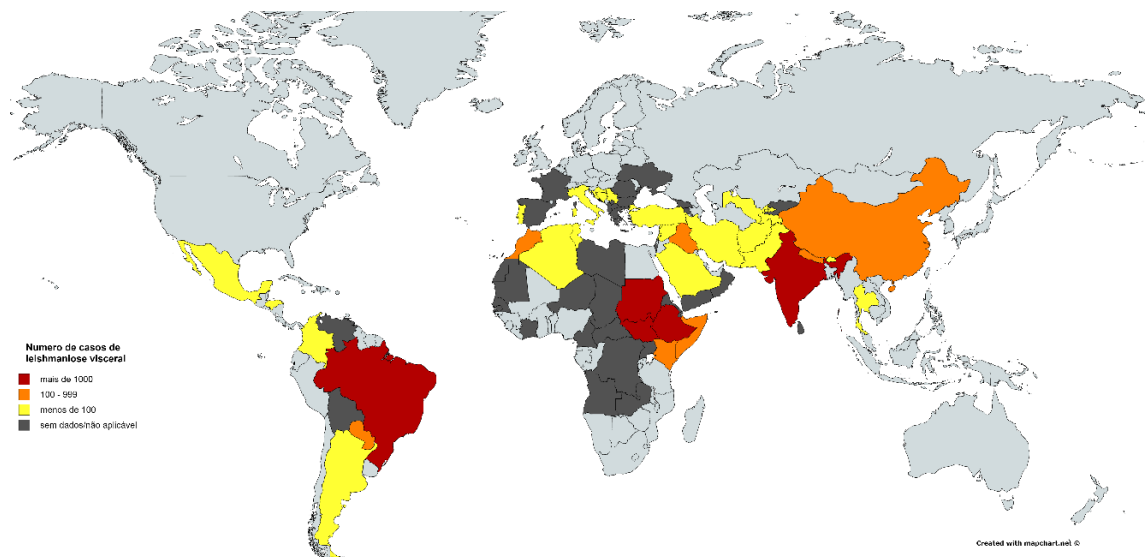


Figura 3 - Estado da endemicidade de leishmaniose visceral no mundo em 2013. Baseado em WHO, Control of Neglected Tropical Diseases, 2015

1.3.2 Características clínicas

Leishmania é causador de três principais formas clínicas – cutânea, mucocutânea e visceral - distinguidas de acordo com a localização do parasita nos tecidos do mamífero (Akhoundi et al., 2016).

A síndrome mais comum é a leishmaniose cutânea, mais frequentemente causada por *Leishmania major* e *L. tropica* no Velho Mundo, e *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* entre outras espécies no Novo Mundo. A cura pode ser espontânea mas requer meses a anos e varia dependendo da espécie (Bern, Maguire & Alvar, 2008). Causa lesões na pele e a lesão primária é geralmente única. À medida que vai evoluindo progride para um notável polimorfismo das lesões. As úlceras normalmente têm bordas elevadas, endurecidas e fundo com tecido de granulação grosseira, podendo dar origem a infecções secundárias causadas por outros microrganismos (Gontijo & Carvalho, 2003).

A leishmaniose mucocutânea geralmente ocorre meses ou anos após a cura de leishmaniose cutânea primária, geralmente causada por *L. braziliensis*, e pode provocar a destruição do septo nasal e de outras estruturas das mucosas, levando a mutilação facial devastadora, estigmatização social e, raramente, à morte. Outras formas complicadas incluem leishmaniose cutânea disseminada, doença não-ulcerosa nodular difusa e leishmaniose recidiva caracterizada por apresentar lesões localizadas que não cicatrizam. Ambas são raras, difícil de tratar, e podem apresentar gravidade elevada (Bern, Maguire & Alvar, 2008).

A leishmaniose visceral geralmente causada por *L. donovani* e *L. infantum* é caracterizada por febre progressiva, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia, e pancitopenia. Tem como complicações associadas a imunossupressão e infecções bacterianas secundárias, hemorragia, anemia e, quando ocorre durante a gravidez, perda fetal ou leishmaniose congênita. É letal em quase todos os casos não tratados e, mesmo em pacientes tratados, as taxas de letalidade podem atingir 10% dos casos (Bern, Maguire & Alvar, 2008).

A leishmaniose cutânea difusa causada por *L. aethiopica* ou *L. amazonensis* e a leishmaniose pós-kala-azar dérmica que surge após tratamento da leishmaniose visceral

causada por *L. donovani* são outras formas de leishmaniose menos comuns que as anteriores (Bañuls, Hide & Prugnotte, 2007).

1.3.3 Diagnóstico da doença

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose é complexo devido à existência de doenças com um espectro clínico semelhante como a tuberculose, a febre tifoide e a malária por exemplo. No entanto o diagnóstico é importante para a distinguir dessas mesmas doenças que muitas vezes partilham as mesmas áreas de endemicidade (Sundar & Rai, 2002; Reithinger & Dujardin, 2007). O diagnóstico pode ser feito das seguintes formas:

- Demonstração e isolamento do parasita - é realizada uma examinação microscópica de esfregaços da biópsia da lesão ou aspirados do nódulo linfático, medula óssea e baço, corados com Giemsa. A microscopia é provavelmente a abordagem mais utilizada nas áreas endémicas por ser uma técnica mais económica e que oferece elevada especificidade. A cultura em combinação com multilocus enzimático permite a identificação de espécies de parasitas e a sua caracterização. No entanto, é requerido mais tempo, profissionais e equipamentos especializados e os resultados podem ser desequilibrados devido ao isolamento e procedimentos de manutenção *in vitro*. A sensibilidade da microscopia e da cultura são baixas e podem ser altamente variáveis, dependendo do número e da dispersão de parasitas em amostras de biopsia, do processo de amostragem e das capacidades técnicas dos profissionais (Sundar & Rai, 2002; Reithinger & Dujardin, 2007).

- Método de deteção de DNA - A técnica de PCR com ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) que pode ser utilizado através de amostras de sangue periférico no caso de leishmanias que se ficam pelo sangue como é o caso de *L. donovani*. A sensibilidade desta técnica (75%) é consideravelmente mais elevada que a microscopia (26,3%). Apesar disso, os ensaios de PCR com preparações de camada leucoplaquetária são 10 vezes mais sensíveis que preparações de sangue total (Sundar & Rai, 2002).

- Deteção de anticorpos - O diagnóstico pode ser realizado por deteção de anticorpos anti-parasita no soro ou por antígenos parasitários na urina. Este último é

um teste de aglutinação em látex que deteta antigénios do parasita na urina fervida. Os métodos convencionais para detecção de anticorpos são a difusão em gel, teste de fixação de complemento, hemaglutinação indireta. A sensibilidade e especificidade da maior parte dos testes têm sido fatores limitantes devido a poder ser baixo o número de anticorpos circulantes contra parasitas causadores e pela existência de parasitas de reação cruzada em algumas áreas (Sundar & Rai, 2002; Sundar, Agrawal, Pai, Chance & Hommel, 2005; Reithinger & Dujardin, 2007).

1.4 Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Durante o ciclo de vida, os parasitas de *Leishmania* são expostos a ambientes extra e intracelular dando origem a duas fases principais: uma extracelular com um hospedeiro invertebrado (flebotomo) e outra intracelular no macrófago do hospedeiro vertebrado (Grimaldi Jr. & Tesh, 1993).

1.4.1 Hospedeiro invertebrado

Salvo algumas raras exceções como a transmissão venérea, transmissão congénita ou por transfusão de sangue, a leishmaniose é adquirida pela picada de um flebotomo que previamente se alimentou de sangue infetado. Apenas a fêmea é hematófaga uma vez que necessita da alimentação sanguínea para o desenvolvimento dos ovos.

Os flebotominios estão inseridos na sub-ordem Nematocera da ordem Diptera, família Psychodidae e da sub-família Phebotominae. Os géneros clinicamente mais importantes são o género *Phlebotomus* existente no Velho Mundo e o género *Lutzomyia* que se encontra no Novo Mundo. Quando presente no hospedeiro invertebrado, o parasita diferencia-se na forma promastigota (Grimaldi Jr. & Tesh, 1993; Killick-Kendrick, 1999; Bañuls, Hide & Prugnolle, 2007).

1.4.2 Hospedeiro vertebrado

Leishmania infeta naturalmente vários mamíferos como roedores, canídeos, marsupiais e primatas não humanos, por exemplo. A infecção ocorre quando os macrófagos dos mamíferos tentam eliminar os parasitas que invadem o seu organismo parasitando estas células. Uma vez que a espécie se adapta mais facilmente a hospedeiros nos quais os vetores se alimentam regularmente, os seres humanos são hospedeiros possíveis mas na maioria dos casos são considerados hospedeiros acidentais. Uma vez no interior da célula hospedeira por excelência, os macrófagos, o parasita diferencia-se na forma amastigota (Grimaldi Jr. & Tesh, 1993; Bañuls, Hide & Prugnolle, 2007).

1.4.3 Ciclo de vida

O ciclo de vida inicia-se quando o flebótomo se alimenta de sangue e nesse processo introduz promastigotas metacíclicos na pele do mamífero hospedeiro. A picada induz a infiltração rápida de neutrófilos e o recrutamento substancial de macrófagos, independentemente da presença de parasitas (Beattie & Kaye, 2011). Nessas células, os promastigotas transformam-se em amastigotas, multiplicando-se por fissão binária longitudinal. O excesso de parasitas causa a lise celular, libertando os amastigotas que são fagocitados por outras células mononucleares fagocíticas (Gupta, Oghumu & Satoskar, 2013; CDC, 2016). Uma vez no hospedeiro vertebrado, o primeiro objetivo do parasita é proliferar de modo a aumentar a probabilidade de transmissão para o hospedeiro invertebrado (Beattie & Kaye, 2011).

O parasita, o hospedeiro e outros fatores determinam se a infecção se torna sintomática e se tem como resultado leishmaniose cutânea ou visceral (CDC, 2016). Ao ingerirem sangue infetado do mamífero, os flebótomos tornam-se também eles infetados (CDC, 2016). A alteração das condições ao se deslocarem do hospedeiro vertebrado para o intestino médio do flebótomo (tais como diminuição da temperatura e aumento do pH) desencadeia a transformação morfológica e desenvolvimento do parasita no vetor. Os amastigotas transformam-se em promastigotas pró-cíclicos, formas com fraca motilidade devido ao curto batimento flagelar na extremidade anterior da célula e intensa replicação. Posteriormente, os parasitas começam a abrandar a replicação, diferenciam-se em promastigotas mais longos e com maior motilidade que se dirigem

para o lúmen do intestino médio (Dostálová & Volf, 2012). Numa última fase, os parasitas transformam-se em promastigotas metacíclicos infecciosos que são inoculados na pele do hospedeiro vertebrado durante a próxima alimentação de sangue (Dostálová & Volf, 2012).

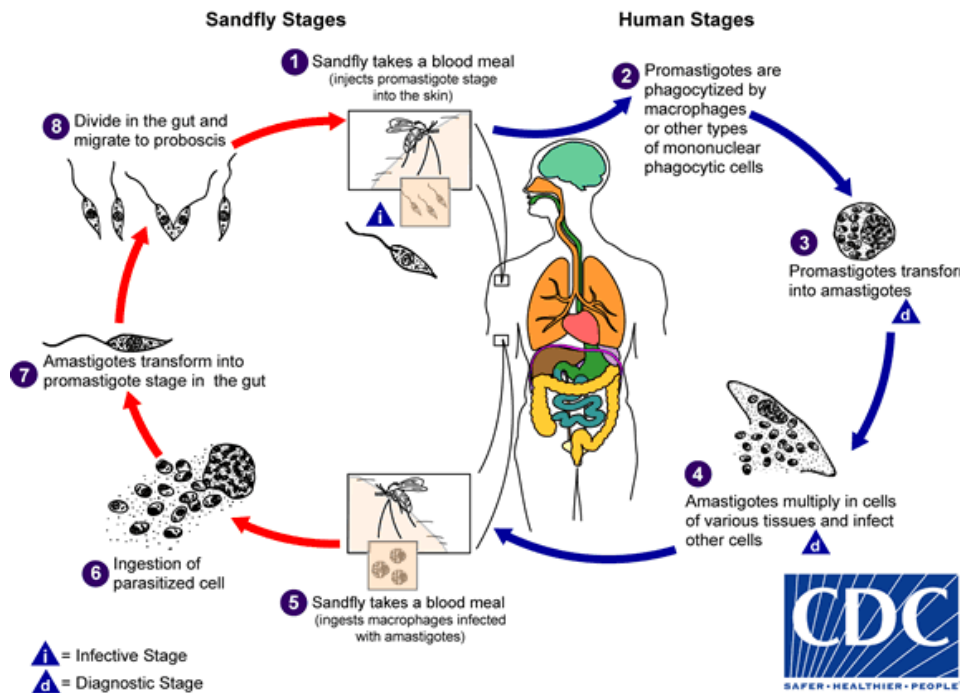


Figura 4 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (CDC, 2016)

1.5 Resposta do sistema imunitário

O organismo hospedeiro de uma infecção parasitária, como a leishmaniose ativa a resposta imunitária para combater o parasita (**Fig. 5**). Quando ocorre a infecção através da alimentação sanguínea do vetor infetado (A), chegam numa primeira fase ao local da inoculação alguns neutrófilos que fazem o recrutamento de neutrófilos. Seguidamente, chegam mais neutrófilos (fase de amplificação), agrupam-se e estabilizam (fase de estabilização). Ao mesmo tempo, os neutrófilos fagocitam ativamente o parasita. Os neutrófilos acabam por sofrer apoptose e estes corpos apoptóticos infecciosos são eliminados por macrófagos (B). No estado estacionário, as células dendríticas patrulham

a camada dérmica. Após a inoculação dos parasitas, as células dendríticas tornam-se sésseis e alargam as suas dendrites, recolhendo os parasitas livres ou nos corpos apoptóticos de neutrófilos. Por fim, migram para os gânglios linfáticos de drenagem onde apresentam antígenos e iniciam a resposta das células T (C). Cerca de uma semana após a deposição de *Leishmania* pelo vetor, são geradas células T CD4⁺ específicas para o antígeno que migram para o local da infeção onde se acumulam. Finalmente, através da interação dos recetores das células T (TCR) e com as moléculas de classe II do complexo major de histocompatibilidade (MHCII) de macrófagos infetados, as células T CD4⁺ específicas para o antígeno são capazes de produzir interferão (IFN- γ) que pode atuar não só através do contacto com a célula infetada, mas também em células circundantes através do efeito de "bystander", ou seja, as células são influenciadas por sinais transmitidos por células vizinhas (D) (Chong, Evrard & Ng, 2013).

Na altura do aumento das células T CD4⁺, quando a resposta é do tipo Th1, são produzidas citocinas como interleucina (IL)-2, IFN- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-12 que induzem as células *natural killer* (NK), T CD4⁺ e T CD8⁺ a produzirem mais IFN- γ que é essencial para o desenvolvimento da resposta protetora. Se a resposta é do tipo Th2, são produzidos IL-4 e IL-10, inibindo a ativação dos macrófagos e contribuindo para o crescimento do parasita nas lesões. IL-4 diminui a regulação da expressão da subunidade β dos recetores de IL-2 nas células Th1, suprimindo a produção de IFN- γ , o que leva ao desenvolvimento da resposta Th2 (Reis, Brito, Souza & Pereira, 2006).

A resposta imune é dependente de células T e é aceite que a diferença entre resistência e suscetibilidade à infeção também está relacionada com o nível de expansão de células Th1 e Th2, respetivamente. Os linfócitos T levam à produção de IFN- γ que após reconhecimento pelos recetores do macrófago, ativam esta célula que passa a sintetizar intermediários reativos de azoto e oxigénio levando à morte dos parasitas. O perfil das citocinas Th1 é crucial para o controlo da infeção por *Leishmania*, enquanto que o desenvolvimento de uma resposta imunitária Th2 favorece a multiplicação parasitária, dificultando o controlo da infeção e conduzindo ao estabelecimento da doença. Além disso, os mecanismos imunorreguladores que envolvem células T reguladoras e de

memória podem influenciar significativamente o desfecho da infecção (Reis, Brito, Souza & Pereira, 2006; Lakhal-Nauar, Slike, Aronson & Marovich, 2015).

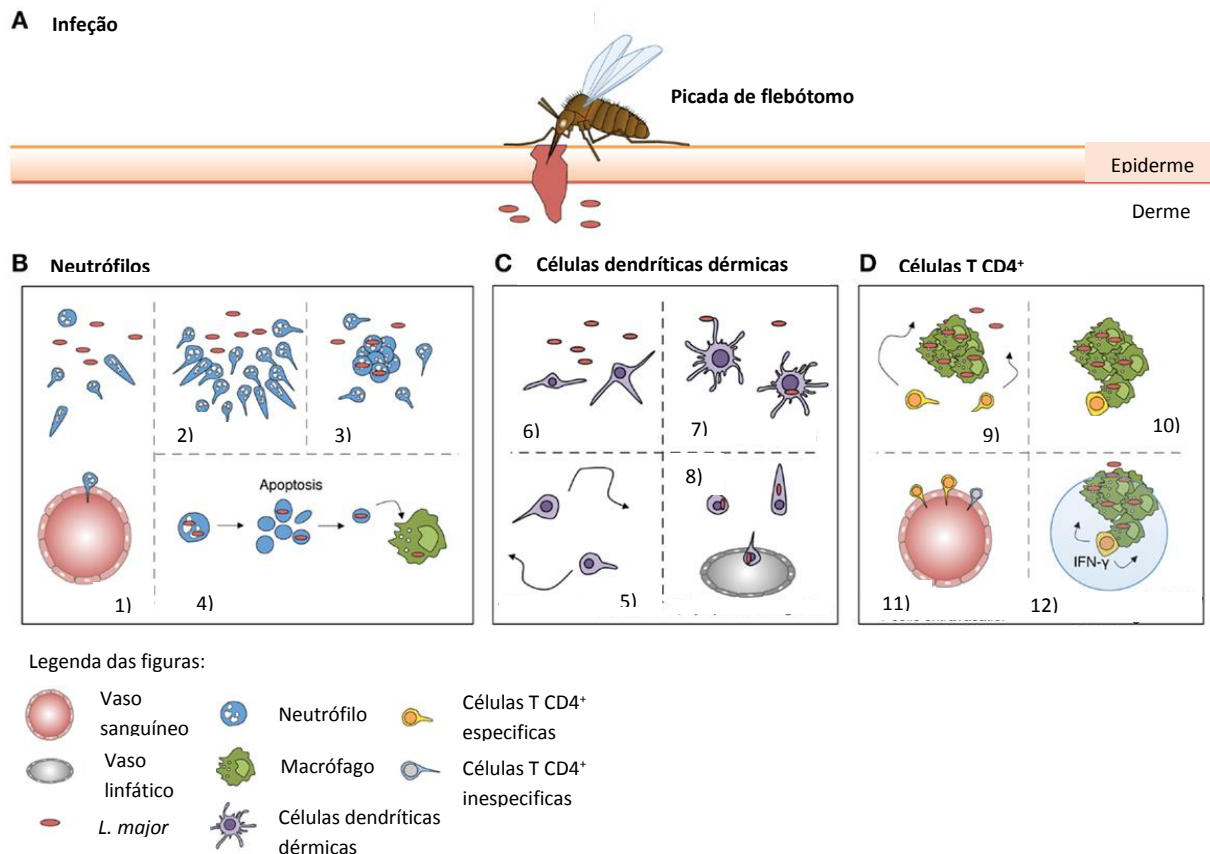


Figura 5 - Esquematisação da relação que se estabelece entre *Leishmania* e a resposta imunitária do hospedeiro. 1) Recrutamento de células polimorfonucleares (neutrófilos); 2) Amplificação; 3) Estabilização; 4) Modelo infeccioso "Cavalo de Troia"; 5) maturação e ativação; 6) Células dendríticas tornam-se sésseis; 7) Extensão das dendrites; 8) Migração para os gânglios linfáticos; 9) Apresentação antigénica aos linfócitos T; 10) Roliferação de linfócitos T específicos; 11) Migração para o local de infecção; 12) Ativação do macrófago e consequente destruição do parasita. Adaptado de Chong, Evrard, & Ng (2013)

1.5.1 Mecanismos de ativação do sistema complemento

O sistema complemento é uma parte integrante da resposta imunitária e atua como ponte para a imunidade inata e adquirida. É formado por várias proteínas plasmáticas que reagem entre elas com a finalidade de tornar os agentes patogénicos mais suscetíveis à fagocitose e induzir uma série de respostas inflamatórias que auxiliam na

luta contra a infecção. Estas proteínas que, são na sua maioria sintetizadas no fígado, existem no plasma e na superfície de células como zimogeniões, ou seja, precursores inativos. Os zimogeniões são ativados localmente através de uma cascata enzimática e desencadeiam vários eventos inflamatórios que incluem a ligação ao agente patogénico, opsonização e lise (Janeway, Travers, Walport & Shlomchik, 2001; Nesargikar, Spiller & Chavez, 2012). Existem três vias distintas através das quais o complemento pode ser ativado na superfície de alguns agentes patogénicos: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas.

A via clássica é ativada pela produção de IgM ou IgG que se ligam ao fator do complemento C1, mais especificamente a C1q, a primeira proteína da cascata do complemento, diretamente na superfície do agente patogénico, servindo como um meio de sinalização de elementos estranhos ao indivíduo. C1q ativa as proteases de serina, C1r e C1s que clivam C4 e C2 para gerar os fragmentos C4a, C4b, C2a e C2b. C4b e C2a constituem o complexo C4b2a, originando a C3 convertase (Janeway, Travers, Walport & Shlomchik, 2001; Goto & Sanchez, 2013).

A via alternativa não é desencadeada por anticorpos, como ocorre na via clássica mas pela deposição da proteína de complemento C3 na superfície do agente patogénico, originando o C3b. Após a ligação ao fator B, forma-se C3bB. O fator D cliva o fator B em Ba e Bb que se associa ao C3b para formar C3bBb que constitui a C3 convertase da via alternativa. Uma vez que a via é iniciada pela ligação de C3b, esta via pode atuar como um circuito de amplificação das três vias (Janeway, Travers, Walport & Shlomchik, 2001; Goto & Sanchez, 2013).

A via das lectinas utiliza uma proteína similar a C1q para ativar a cascata do complemento, a lectina ligante manose (MBL). Esta liga-se a açúcares organizados em padrão que recobrem superficialmente muitos agentes patogénicos. A MBL ativa MASP-1 e MASP-2 que clivam C4 e C2 levando à formação de C3 convertase (Janeway, Travers, Walport & Shlomchik, 2001; Goto & Sanchez, 2013).

A C3 convertase cliva a proteína C3 em C3a que atua como anafilotoxina, e em C3b que participa no circuito de auto-ativação do complemento pela via alternativa. A C3b também interage com C3 convertase para formar C5 convertase que por sua vez origina os fatores C5a e C5b. A interação entre C5b e C6, C7, C8 e C9 leva à formação do

complexo de ataque à membrana (MAC). O MAC insere-se na membrana formando poros que conduzem lise celular (Nesargikar, Spiller & Chavez, 2012). Quando a cascata do sistema complemento é ativada através das três vias e culmina na clivagem de C3-C3b, o fator C3b liga-se ao alvo para ajudar na ativação de outros componentes da via do complemento. Os microrganismos opsonizados com C3b e C3bi são reconhecidos pelos recetores de complemento (CR) 1 (CD35) e CR3 (CD11/CD18) e são rapidamente fagocitados (Isnard, Shio & Olivier, 2012).

1.5.2 Sistema complemento e *Leishmania* spp.

No contexto da leishmaniose, a deposição de C3b na superfície do parasita é relevante na ativação da cascata do complemento, podendo prosseguir com a formação da C5 convertase originando consequentemente o complexo de ataque à membrana C5b-C9 implicada na lise do parasita ou com a sua inativação por meio da geração iC3b (Goto & Sanchez, 2013). A gp63, molécula abundante da superfície de *Leishmania*, foi identificada como fixadora de C3. Dentro do inseto, quando os promastigotas passam a formas metacíclicas ficam mais resistentes à lise pelo complemento. Esta resistência à lise é atribuída à modificação do glicosilfosfatidilinositol (GPI) que dificulta a ligação do MAC à membrana do parasita. A gp63 que tem também a sua expressão aumentada na membrana da forma metacíclica acelera a conversão do C3n em iC3b (forma inativa que impede a progressão da cascata do complemento), impedindo a formação de MAC. Um outro fator, a proteína-quinase C, apresenta aumento da expressão na forma metacíclica e fosforila componentes do sistema complemento, como C3, C5, C9, bloqueando a ativação das vias clássica e alternativa (Brittingham et al., 1995; Goto & Sanchez, 2013).

Por outro lado, *Leishmania* também desenvolveu mecanismos de evasão à atividade do sistema imunitário do hospedeiro vertebrado que facilitam a sobrevivência do parasita. A fusão de fagossomas e lisossomas é inibida e a diferenciação das formas promastigotas de amastigotas é favorecida por GLP que também sequestra os radicais hidroxilo e superóxido. A lise parasitária pelas enzimas lisossômicas é impedida por gp63, os fatores secretados e as proteinases de cisteína do parasita. A diminuição da

produção de espécies reativas de oxigênio observada em macrófagos infectados também favorece a sobrevivência do parasita (Goto & Sanchez, 2013).

Durante a fase inicial da infecção, a ativação da cascata do complemento pode conduzir à destruição maciça de parasitas extracelulares. No entanto, os componentes do sistema complemento que funcionam na opsonização do parasita e promovem o reconhecimento pelos macrófagos e aceleram a fagocitose, contribuem para a invasão e asseguram a sobrevivência do parasita, favorecendo a progressão da infecção e o desenvolvimento da doença (Goto & Sanchez, 2013).

1.6. Metaloproteases em tripanossomídeos

As proteases são enzimas degradativas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas em proteínas macromoleculares e peptídeos oligoméricos (Santos, Branquinha & D'Avila-Levy, 2006) e que diferem em processos químicos catalíticos, estrutura, especificidades, estados oligoméricos. Estas enzimas são agrupadas em famílias e classes de acordo com os diferentes esquemas de classificação como por exemplo as bases de dados MEROPS, SCOP e CATH (Carvalho, Roque, Iranzo & Branco, 2015). Dependendo do local de ação são subdivididas em dois grandes grupos, as endopeptidases e as exopeptidases. As endopeptidases são classificadas de acordo com os resíduos catalíticos essenciais nos centros ativos (metaloproteases, proteases de ácido glutâmico, treonina, cisteína e ácido aspártico). Por sua vez, as exopeptidases clivam a ligação peptídica proximal ao terminal amino (NH_2) ou carboxilo (COOH) do substrato proteico. Com base no terminal de ação, são classificadas como amino- ou carboxipeptidases. As carboxipeptidases podem ser divididas em três grupos principais: serina- metalo- e cisteína- com base no grupo funcional presente no centro ativo da enzima (Santos, Branquinha & D'Avila-Levy, 2006).

As metaloproteinases (MMPs) são uma família de endopeptidases zinco-dependente que, promovem a degradação da matriz extracelular. Todos os membros dessa família são secretados como proenzimas. Essas proenzimas são liberadas por neutrófilos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e, além disso, também podem ser secretadas pelas

células tumorais em resposta a uma variedade de estímulos (Araújo, Silva, Melo-Júnior & Porto, 2011). A família das MMPs inclui cerca de 25 proteínas, as quais podem ser divididas em: collagenases (MMP-1, 8 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelinas (MMP- 3, 7 e 10), matrilisinas (MMP-7 e 26), MMPs tipo membrana (MMP-14, 15, 16, 17 e 24), entre outras (Araújo, Silva, Melo-Júnior & Porto, 2011).

1.6.1 gp63 em *Leishmania* spp.

Durante o seu ciclo de vida o parasita é exposto a diferentes ambientes, pelo que a superfície do parasita sofre alterações visto que é no interior dos hospedeiros, tendo assim um papel importante nas suas interações com o hospedeiro (Santos, Branquinha & D'Avila-Levy, 2006). A espécie *Leishmania* pode recorrer a várias proteínas de superfície, reconhecidas como potenciais fatores de virulência [por exemplo, fosfolípidos de glicosilação (GIPL), lipofosfoglicano (LPG), proteases de cisteína e gp63], que neutralizam a ação do sistema de defesa do hospedeiro, assegurando a sobrevivência do parasita e a progressão no ambiente hostil do fagolisossoma (Isnard, Shio & Olivier, 2012).

Gp63 (**Fig. 6**) é uma metaloprotease de zinco sintetizada através do retículo endoplasmático e secretada pelas vesículas. Tem um peso molecular de cerca de 63 kDa que pode variar devido aos seus estados de glicosilação (Isnard, Shio & Olivier, 2012).

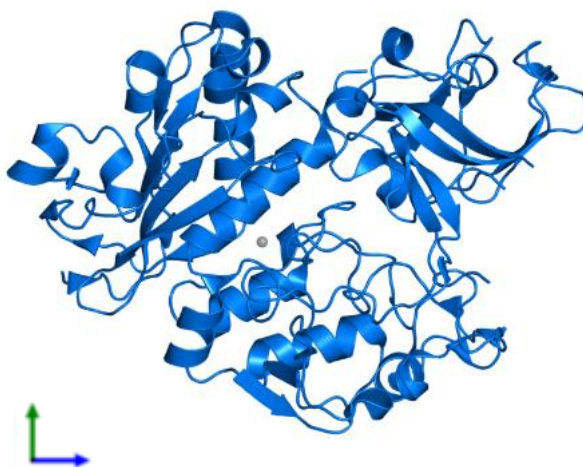


Figura 6-Estrutura tridimensional de gp63 baseada na sequência da gp63 de *Leishmania* major. Imagem obtida no Protein Data Bank (PDB).

É uma molécula compacta constituída predominantemente por estrutura secundária de folha β com dimensões de $45 \times 50 \times 70$ Å. É formada por três domínios: o N-terminal, domínios centrais e C-terminal (**Fig. 7**) (Schlagenhauf, Etges & Metcalf, 1998). Contém uma região ativa HEMAH que é homóloga a HExxH, sequência da superfamília zincinas, grupo de metaloproteínases de zinco onde o aminoácido Glu participa na catálise da ligação peptídica do substrato e o aminoácido His está envolvido na coordenação da região ativa de zinco (Macdonald, 1995).

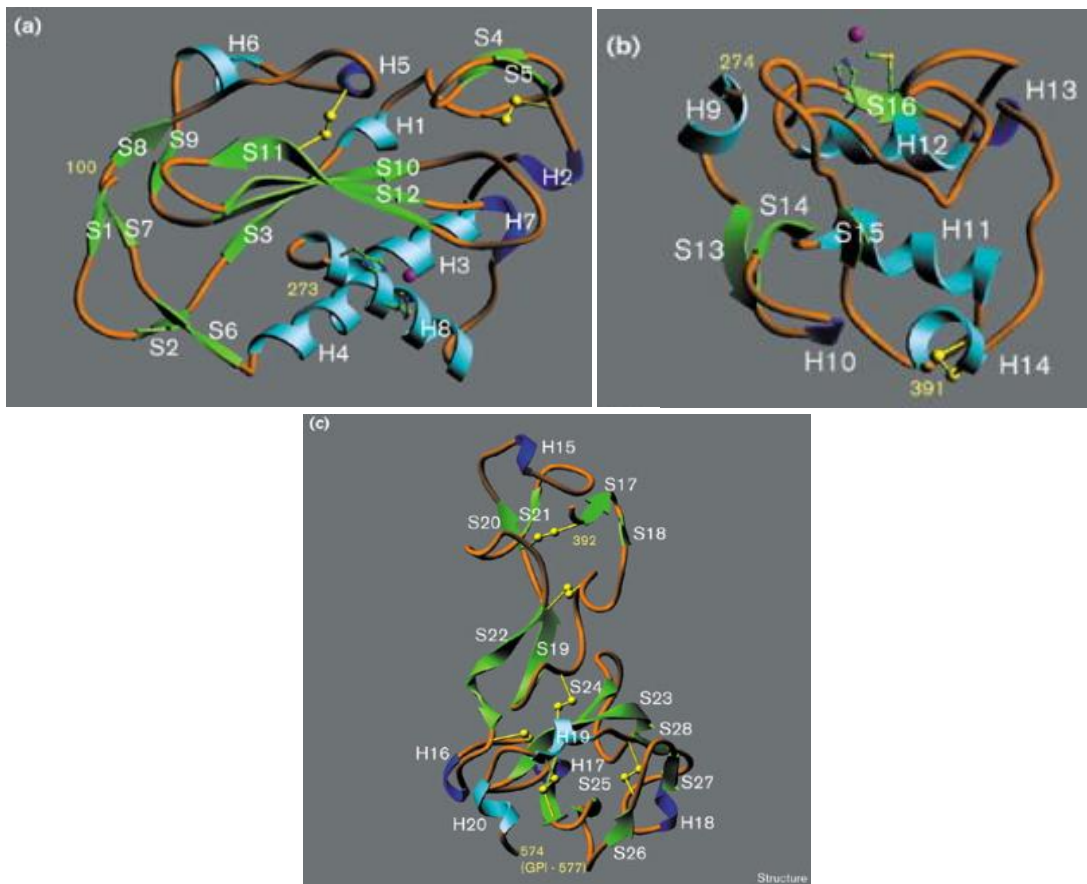


Figura 7- Domínios da gp63. (a) Domínio N-terminal que contém a hélice do local ativo H8 com HEXXH; (b) Domínio central onde resíduos no ciclo anterior H12 contribuem para o sítio ativo, o átomo de zinco é mostrado como uma esfera magenta; (c) Domínio C-terminal, local ativo de histidina, resíduos de glutamato e metionina, e ligações de dissulfeto (em amarelo). (Schlagenhauf, Etges & Metcalf, 1998)

Pertence à classe de enzimas EC 3.4.24.36 e à família de endopeptidases M8, partilhando várias características com metaloproteases de matriz de mamíferos. Existe abundantemente na superfície de promastigotas de diversas espécies de *Leishmania* atingindo o seu auge em promastigotas metacíclicos e em amastigotas de *L. major*, *L.*

mexicana e *L. amazonensis* (Joshi, Sacks, Modi & McMaster, 1998; Yao, 2010). É ligada por via de uma âncora de GPI. A clivagem da âncora GPI através de fosfolipase C provoca dispersão constante de gp63 para o espaço extracelular. Além disso, a gp63 é também segregada diretamente a partir do parasita através da bolsa flagelar (Hassani, Shio, Martel, Faubert & Olivier, 2014). Antes da entrada do parasita nos macrófagos, a gp63 contribui para a resistência à lise mediada pelo complemento e facilita a internalização dos promastigotas pelos macrófagos. Dentro do macrófago parasitado, a gp63 é responsável pela ativação da proteína tirosina fosfatase (PTPs; SHP-1, PTP1B e TCPTP) que leva à alteração das vias cinase JAK, MAPK e IRAK-1, (Isnard, Shio & Olivier, 2012) uma vez que as PTPs regulam negativamente as vias de sinalização. Por conseguinte, a sua ativação em conjunto com a alteração de outras moléculas de sinalização de macrófagos resulta na inibição de funções inflamatórias e leishmanicidas (Hassani, Shio, Martel, Faubert & Olivier, 2014). Foi demonstrado que gp63 purificada pode clivar C3 do sistema complemento e este papel foi reforçado usando gp63 em níveis mais elevados ou gp63 mutante sem atividade. Assim, a gp63 em níveis mais elevados foi capaz de aumentar a conversão de C3b em C3bi e de reduzir a fixação de componentes do complemento terminal no parasita, aumentando a resistência à lise mediada pelo complemento comparativamente ao parasita com níveis elevados de gp63 inativa (Isnard, Shio & Olivier, 2012). A gp63 também é capaz de regular negativamente a síntese de proteínas de macrófagos hospedeiros, alterando a sinalização dependente de mTORC1. Ao inativar fatores de transcrição nucleares, tais como AP-1 e NF- κ B, favorece a sobrevivência e propagação do parasita (Isnard, Shio & Olivier, 2012).

2. Objetivos

Para este trabalho foi estabelecido como objetivo principal analisar *in vitro* a interação de *Leishmania* com eritrócitos humanos. Para alcançar os objetivos principais foram estabelecidos os seguintes objetivos parciais:

1. Caracterizar os perfis proteicos e enzimáticos de *Leishmania* spp.
2. Analisar o efeito das membranas eritrocitárias na atividade das enzimas proteolíticas de *Leishmania*
3. Avaliar a capacidade hemolítica de extratos proteicos de *Leishmania*
4. Determinar o efeito do complemento na capacidade hemolítica dos extratos

3. Materiais e Métodos

3.1 Culturas dos parasitas

Para o este estudo foram utilizadas quatro estirpes de *Leishmania*, *L. amazonensis* (estirpe isolada de flebótomo e estirpe isolada de um ser humano – *L. amazonensis* (HOM) - com leishmaniose cutânea), *L. guyanensis* e *L. shawi*. Estas espécies foram gentilmente cedidas pelo Prof. F. Passero da Universidade S. Paulo (USP), SP, Brasil e as formas promastigotas encontram-se criopreservadas em azoto líquido, nas instalações do IHMT. As formas parasitárias foram descongeladas e centrifugadas a 1800 ×g durante 10 min, para separar os parasitas do crio conservante visto que é tóxico devido à presença de dimetilsulfóxido (DMSO, *Dimethyl sulfoxide*). De seguida descartou-se o sobrenadante e os parasitas foram mantidos numa estufa a 24°C em frascos de cultivo celular (*T-flask*) onde se introduziu meio *Schneider's Drosophila* com 10% de FBS. À medida que os parasitas atingiram elevada densidade, visível em microscópio invertido (Olympus CKX41), parte deles eram transferidos para novos frascos de cultivo duplicando sucessivamente o volume das culturas.

Meio *Schneider's Drosophila* com 10% de FBS

O meio é constituído por L-glutamina (Sigma-Aldrich, Alemanha) suplementado com 0,4 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃, Sigma-Aldrich), 10% de soro fetal bovino (FBS) inativado (FBS, Sigma-Aldrich), 1,2% de cloreto de cálcio (CaCl₂, Sigma-Aldrich), 5mM de HEPES (Sigma-Aldrich) e 0,5% de penicilina/streptomicina (Sigma-Aldrich) (combinação de 10.000 U/ml de penicilina com 10.000 µg/ml de streptomicina) a pH 7,2.

3.2 Preparação dos extratos

As culturas de *Leishmania* (~120 ml) foram centrifugadas a 1500 ×g, a 4 °C durante 15 min, provocando a lise parasitaria obtendo uma solução de proteínas parasitárias (extratos proteicos). Os sobrenadantes das culturas foram retirados e conservados a -80

°C até à sua utilização. O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de PBS conservado a -80 °C até à sua utilização.

3.3 Constituição de soluções utilizadas nas experiências realizadas ao longo do trabalho

3.3.1 Solução de Alsever

A solução é constituída por 4,2 g de cloreto de sódio (NaCl, Sigma-Aldrich) 20,5 g de D-glucose (Sigma-Aldrich), 8 g de citrato de sódio, 0,55 g de ácido cítrico em 100 ml de água destilada. A solução foi conservada a 4 °C até à sua utilização.

3.3.2 Veronal Buffer solution – Tampão VBS⁺⁺

O tampão é constituído por 0,017 g de cloreto de cálcio (CaCl₂, Sigma-Aldrich), 8,24 g de cloreto de sódio (NaCl, Sigma-Aldrich), 0,102 g de cloreto de magnésio (MgCl₂, Sigma-Aldrich), 0,9g de ácido barbitúrico (Merck, Alemanha) e 1 g da gelatina (Gelatin from bovine skin, Sigma-Aldrich) em 1 l de água destilada. O pH foi acertado com hidróxido de sódio para 7,3 e 7,5 e a solução foi conservada a 4 °C até à sua utilização.

3.3.3 Sample Buffer 2x -Tampão de amostra para SDS-PAGE

O tampão foi constituído por 1,25 ml de 0,5M Tris-HCl (a pH 6,8), 2,5 ml de glicerol (Sigma-Aldrich), 2 ml de SDS 10% (Sigma-Aldrich), 200 µl de azul de bromofenol 0,5% (Sigma-Aldrich) e 50 µl de beta-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) em 3,55 ml de água destilada. O tampão foi mantido a -20 °C até à sua utilização.

3.3.4 Zymogram Sample Buffer 3x – Tampão para Zimografia

O tampão foi constituído por 6,25 ml de Tris-HCl (a pH 6,8), 12,5 ml de glicerol (Sigma-Aldrich), 2 ml de SDS 10% (Sigma-Aldrich), 1ml de azul de bromofenol 0,5% (Sigma-Aldrich) em 50 ml de água destilada. Foi conservado em temperatura ambiente.

3.4 Preparação de eritrócitos e soro humanos para os estudos da metaloproteinases e ensaios hemolíticos

O sangue recolhido para a obtenção de eritrócitos e o soro provém de indivíduos saudáveis. Logo após a colheita, o sangue foi diluído em igual volume de solução de Alsever que atua como anticoagulante, tendo sido conservado a 4 °C para obtenção de uma concentração de eritrócitos. O concentrado foi usado apenas no espaço de uma semana após a sua preparação para que não perdesse a sua qualidade.

Para a obtenção de soro, o sangue foi incubado durante 30 min a 37 °C e seguidamente a 4 °C durante 30 min. O sangue foi posteriormente centrifugado a 3000 ×g durante 10 min. e assim obtido o soro. O soro foi extraído para tubos *ependorf* e conservado a -20 °C até à sua utilização.

Para a realização dos ensaios, os eritrócitos humanos foram utilizados com concentrações de 2, 5, 10 e 15%. O concentrado de eritrócitos diluído em 20 ml de VBS⁺⁺ foi lavado três vezes a 2000 ×g durante 5 min para eliminar vestígios de hemólise. Os eritrócitos foram ressuspendidos em 20 ml de VBS⁺⁺.

3.5 Quantificação de proteínas totais dos extratos proteicos de *Leishmania spp.*

O método de Bradford foi utilizado para ser determinada a concentração dos extratos. Em primeiro lugar para obter uma curva padrão foi colocada, numa placa de microtitulação (BRANDplates®, BRAND, Alemanha), em triplicado, diluições sucessivas (3:4, 1:2; 3:8, 1:4, 1:8 e 1:16) da solução *stock* de 2 mg/ml de BSA (*bovine serum albumina*, Sigma-Aldrich) diluída em PBS, na faixa de 0,125 a 2 mg/ml. Foi adicionado 250µl de reagente de Bradford (Quick Start™ Bradford 1× Dye Reagent,

Bio-Rad, EUA) em cada poço juntamente com 5 µl do padrão (**Quadro 2**) correspondente ao respetivo poço. Cada amostra, à semelhança dos padrões, foi testada em triplicado, tendo sido diluída 1:5 e 1:10.

Tubo	BSA (mg/ml)
1	2
2	1,5
3	1
4	0,75
5	0,5
6	0,250
7	0,125

Quadro 2- Constituição da curva padrão para a quantificação do extrato

As placas ficaram a incubar à temperatura ambiente por 15 min e as absorvâncias foram lidas num leitor de placas (Model 680 Microplate Reader, Bio Rad) no comprimento de onda de 570 nm. A concentração proteica de cada extrato foi determinada recorrendo às densidades óticas (D.O.) da reta de regressão linear.

3.6. Determinação do perfil eletroforético de extratos de *Leishmania* spp. por eletroforese em gel de poliacrilamida

A técnica de eletroforese identifica e caracteriza propriedades dum produto de um modo simples, rápido e bastante sensível. A separação das proteínas por eletroforese é baseada no facto de que as moléculas migram pela matriz através de um campo elétrico fornecido por eléctrodos imersos. Neste caso a amostra corre em gel de poliacrilamida que serve como matriz de suporte e que é comumente usado para separar proteínas

(Hames, 1998). Para se obter o perfil proteico total dos extratos foi realizada uma eletroforese em gel de acrilamida a 10%. Começou por se preparar o gel de corrida e o gel de empacotamento de acordo com a **tabela 1**.

	Running gel (10% acrilamida)	Stacking gel (4% de acrilamida)
Água destilada	4,1ml	2,5ml
Acrilamida (30% acrilamiada (m/v) (Sigma-Aldrich) + 0,8% Bis-Acrilamida (v/v) (Sigma-Aldrich))	3,3ml	450µl
1,5M Tris-HCl (Trizma - Sigma-Aldrich)	2,5ml	-
Tris-HCl 0,6M (Trizma - Sigma-Aldrich)	-	333µl
Dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich) a 10% (m/v)	100µl	100µl
APS Persulfato de amónia (Sigma-Aldrich)	50µl	50µl
TEMED tetrametiletilenodiamina (Sigma-Aldrich)	5µl	2,5µl

Tabela 1- Composição do gel de acrilamida (10%)

Primeiramente, o running gel foi colocado no molde dos géis e por cima água destilada para manter a superfície do gel sem irregularidades. Depois do gel ter polimerizado, a água foi retirada e o stacking gel foi adicionado. O pente de 15 poços foi inserido e o gel foi deixado a polimerizar.

As concentrações das amostras foram obtidas após a quantificação de proteínas. As amostras foram preparadas para uma concentração final de 500 µg/ml, em que cada extrato e sobrenadante foi diluído em tampão de amostra para SDS-PAGE (**Tabelas 2 e 3**).

Parasita	Volume de sedimento	Volume de tampão de amostra SDS
<i>L. amazonensis</i>	543,48 µl	556,52 µl
<i>L. amazonensis</i> (HOM)	295,33 µl	704,67 µl
<i>L. guyanensis</i>	343,4 µl	656,6 µl
<i>L. shawi</i>	365,5 µl	634,5 µl

Tabela 2 – Preparação de amostras dos sedimentos de parasitas (500 µg/ml)

Como na quantificação não foi possível chegar à conclusão da concentração dos sobrenadantes, utilizaram-se os seguintes volumes:

Parasitas	Volume de sobrenadante	Volume de tampão de amostra SDS
<i>L. amazonensis</i>	500 µl	500 µl
<i>L. amazonensis</i> (HOM)		
<i>L. guyanensis</i>		
<i>L. shawi</i>		

Tabela 3 – Preparação de amostras de sobrenadante das culturas de parasitas

As amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. Num dos poços de cada gel foi colocado 7 µl do marcador de massa molecular (HyperPAGE Prestained Protein Marker, Biorline, Reino Unido) e nos poços seguintes foram colocadas 20 µl e 10 µl de cada amostra de sedimento e 30 µl, 20 µl, 15 µl e 10 µl de cada amostra de sobrenadante.

Os géis foram submersos num tampão condutor de corrente [25 M de Tris, 0,19 M de glicina (Sigma-Aldrich) e 0,1% de SDS] e submetidos a uma corrente elétrica constante de 100 V durante aproximadamente 1,5 h até a frente de corrida se aproximar do seu limite inferior.

Para a coloração dos géis, foi usado o corante azul de *Coomassie* (*Coomassie Brilliant Blue* R-250, Bio-Rad, EUA) onde foram imersos os géis durante cerca de 15 min e de seguida imergiu-se da mesma forma com uma solução descorante (10% de metanol e 5% de ácido acético glacial). Uma outra coloração testada foi a coloração por nitrato de prata (Silver Staining Kit, Protein, PlusOne™, UE) dada a sua elevada sensibilidade.

3.7 Determinação da atividade enzimática do extrato proteico de *Leishmania* spp.

A zimografia é uma técnica electroforética utilizada para identificar a atividade proteolítica das enzimas separadas em géis de poliacrilamida sob condições não redutoras. É uma técnica que faz uma análise qualitativa das espécies presentes na gelatinase (Kleiner & Stetlerstevenson, 1994).

Para este procedimento foram utilizados géis de poliacrilamida preparados de acordo com a **tabela 1** com a exceção que a água destilada continha diluída 10% de gelatina (*gelatin from bovine skin*, Sigma-Aldrich). As amostras foram mais uma vez preparadas para uma concentração final de 500 µg/ml e o tampão utilizado foi o *Zymogram Sample Buffer 3x*. Os géis foram submersos no tampão condutor de corrente e submetidos a uma corrente elétrica constante de 90 V, durante aproximadamente 4 a 5 h até a frente de corrida se aproximar do seu limite inferior. Depois de retirados os géis, foram submersos em *Zymogram Renaturation Buffer* [2,5 % (v/v) Triton X-100] durante 1 h a 37 °C e deixou-se de um dia para o outro em *Zymogram Development Buffer* a 37 °C. A coloração dos géis foi feita com *Coomassie Brilliant Blue* durante 15 min e a descoloração com a solução descorante, ambos utilizados na técnica de SDS-Page descrita anteriormente.

3.8 Atividade da metaloproteinase na membrana do eritrócito

3.8.1 Preparação da suspensão de eritrócitos humanos não sensibilizados

Como primeiro passo deste procedimento, foram preparadas suspensões de eritrócitos a 1%, 2%, 5% e 10%. A sua preparação consistiu na diluição do concentrado de eritrócitos humanos em VBS⁺⁺ seguida de três lavagens, a 2000 ×g durante 5 min, no diluente, de modo a eliminar vestígios de hemólise. Posteriormente, cada suspensão de eritrócitos foram lavados 5 vezes com VBS⁺⁺, restando na fase final um sedimento constituído por eritrócitos. De seguida, foi adicionado 1 ml de água destilada refrigerada (+ 4°C) a cada suspensão com o objetivo de causar a hemólise de todos os eritrócitos. As suspensões foram centrifugadas a alta rotação (10000 ×g a 5°C durante 15 min), tendo sido obtido sedimentos constituídos por membranas de eritrócitos (*ghost*). Foram efetuadas mais duas lavagens a alta rotação de modo que os sobrenadantes estivessem livres de hemoglobina. As membranas dissolvidas em 30 µl de *Zymogram Sample Buffer 3 x* foram aplicadas no gel de zimografia.

3.8.2 Preparação da suspensão de eritrócitos humanos sensibilizados

Em cada tubo foi colocado 1 ml de VBS⁺⁺, 1 ml de suspensão de 10% de eritrócitos e várias concentrações de (500, 250, 125 e 62,5 µg/ml) de extrato de *Leishmania* spp. Os tubos foram a incubar durante 1 h a 37 °C. No final da incubação, as amostras foram lavadas com VBS⁺⁺ até o sobrenadante ficar límpido. O sobrenadante foi descartado e o sedimento dissolvido em 30 µl de *Zymogram Sample Buffer 3x*.

3.9.3 Controlos

Como controlos positivos, foram utilizados 30 µl de extrato de *Leishmania* spp. e 30 µl do preparado de eritrócitos humanos não sensibilizados ambos diluídos em 30 µl de *Zymogram Sample Buffer 3x*. No final todas as amostras foram aplicadas no gel de zimografia.

3.9 Avaliação da interação das metaloproteinases de *Leishmania* spp. com eritrócitos humanos e possível atividade hemolítica mediada pelo sistema complemento

3.9.1 Sensibilização dos eritrócitos humanos

Para a realização dos ensaios foram utilizados pequenos frascos de vidro onde foram colocados 1,5 ml de extrato proteico de *Leishmania* spp. diluído em VBS⁺⁺, nas concentrações finais de 500, 250 e 125 µg/ml. Aos tubos foi ainda adicionado 1,5 ml de uma suspensão de 2% de eritrócitos humanos, perfazendo o volume total de 3 ml. Os frascos foram encubados a 37 °C durante 1 h. No final da incubação, a suspensão celular foi lavada 3 vezes com VBS⁺⁺ (3 000 ×g durante 5 min) No final, o sedimento obtido foi ressuspendido em 1,5 ml de VBS⁺⁺, mantendo desta forma a concentração dos eritrócitos a 2%.

3.9.2 Estudo da lise dos eritrócitos sensibilizados mediada pelo complemento

Para estudar o efeito do sistema complemento quando entra em contacto com eritrócitos sensibilizados com os extratos parasitários foram realizadas incubações em placas de microtitulação de fundo cónico. A suspensão de eritrócitos foi incubada em 50% de soro humano normal ativado ou inativado. O soro foi inativado a 56 °C durante 1 h. Como controlo negativo foi utilizado 100 µl de VBS⁺⁺ e 100 µl de eritrócitos sensibilizados. O controlo positivo foi constituído por 100 µl de água destilada utilizada como tampão de lise e 100 µl de eritrócitos sensibilizados. No final as amostras em estudo continham 50 µl de VBS⁺⁺, 50 µl de soro humano normal ativado ou inativado e 100 µl de eritrócitos sensibilizados (**Quadro 3**).

	VBS ⁺⁺	Soro humano normal (SHN)	Água	Eritrócitos a 2% sensibilizados (Eh)
Controlo-	100µl			100µl
VBS⁺⁺ + SHN + Eh sensibilizados	50µl	50µl		100µl
Controlo+			100µl	100µl

Quadro 3- Concentrações das amostras colocadas na placa de microtitulação

O branco referente ao controlo negativo é constituído por 200 µl de VBS⁺⁺ e o referente ao controlo positivo 200 µl de água destilada. O branco da amostra com soro humano normal é constituído por 50 µl de soro humano normal e 150 µl de VBS⁺⁺.

Após incubação a 37 °C durante 1 h, a placa foi centrifugada a 5 000 ×g durante 5 min. As amostras (150 µl) foram transferidas para uma placa de microtitulação de fundo raso e a absorvância lida a 415 nm num leitor de placas (Model 680 Microplate Reader, Bio Rad).

3.9.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa Graphpad Prism 6. Para comprovar a ocorrência de diferenças estatisticamente significativas na hemólise dos eritrócitos humanos sensibilizados ou não com extratos proteicos de *Leishmania*, com ou sem o sistema complemento ativado recorreu-se ao teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras emparelhadas. Inicialmente, foi comprovado que a amostra utilizada não segue a distribuição de Gauss através do teste Kolmogorov-Smirnov.

Resultados e discussão

4.1 Perfil proteico total de *Leishmania*

Os perfis proteicos dos extratos de promastigotas das espécies cutâneas de *Leishmania* analisadas e dos sobrenadantes das respectivas culturas foram obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida corado com azul de *Coomassie* (Fig. 8).

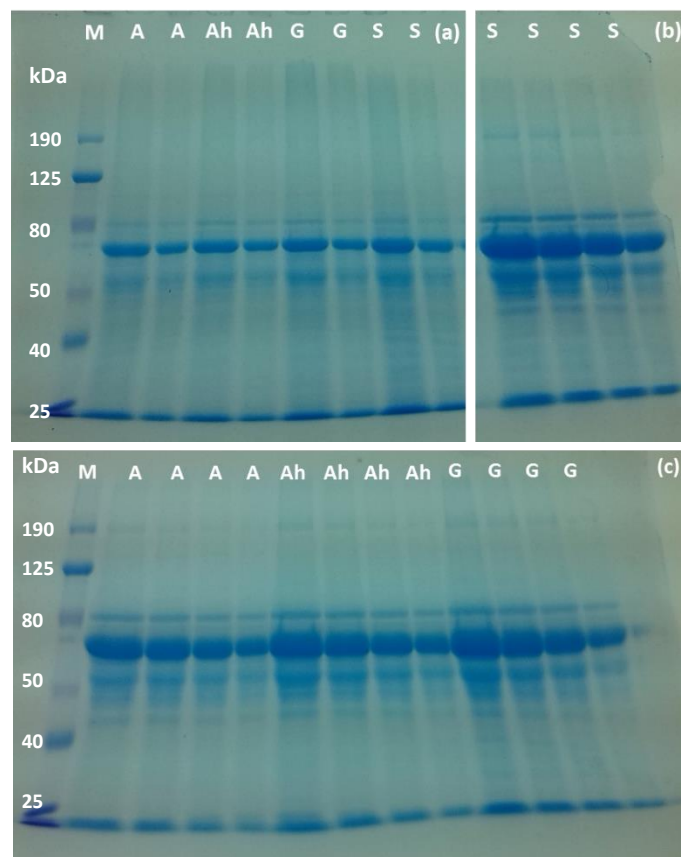


Figura 8- Perfil proteico total dos extratos (a) e sobrenadantes (b) e (c) de *Leishmania*. Os extratos (500 $\mu\text{g/ml}$) de promastigotas de espécies cutâneas de *Leishmania* foram sujeitos a eletroforese em gel de poliacrilamida corado com azul de *Coomassie*. M – Marcador de peso molecular; A – *L. amazonensis*; Ah – *L. amazonensis* (HOM); G- *L. guyanensis*; S- *L. shawi*

É observável, tanto nos extratos como nos sobrenadantes, bandas individualizadas. As bandas mais bem individualizadas e facilmente identificadas estão concentradas entre os 50 e os 80 kDa. Nos extratos (**Fig. 8a**) observam-se três bandas principais que correspondem a (i) proteínas com massa de cerca de 80 kDa, (ii) banda proteica larga com pouco mais de 50 kDa e (iii) e numa posição intermédia, uma banda proteica larga e bastante intensa que aparenta ter massa de cerca de 70 kDa. Estas bandas poderão corresponder à metaloproteinase gp63. Está descrito que esta glicoproteína de 63 kDa que se encontra em grande quantidade na superfície dos promastigotas das espécies analisados (Isnard, Shio & Olivier, 2012). Para além disso, a gp63 pode exibir diferentes pesos moleculares, próximos de 63 kDa, consoante o seu estado de glicosilação (Isnard, Shio & Olivier, 2012). As bandas presentes podem também ser referentes à albumina, proteína de 66 kDa, principal constituinte do FBS usado como suplemento nas culturas parasitárias (Schnitzer, Carley & George, 1988).

Curiosamente, os sobrenadantes (**Fig. 8b e 8c**) apresentam as banda proteicas idênticas às dos extratos o que sugere que estas proteínas são libertadas ou eventualmente excretadas para o meio. Um quarta banda proteica com massa de cerca de 45 kDa também é visível que pode indicar a presença da metaloprotease MMP-2 (Toth & Fridman, 2001).

Tendo em conta que foi observado um número restrito de bandas proteicas, recorreu-se à mesma técnica mas com coloração por nitrato de prata para identificar outras bandas de menor expressão. A electroforese em gel de poliacrilamida corada com nitrato de prata (**Fig. 9**) apresenta elevada sensibilidade e possibilita a deteção de bandas proteicas mais ténues (Chevallet, Luche, & Rabilloud, 2006). Para além de confirmar a maior intensidade de bandas proteicas na área entre os 50 e 80 kDa, são identificadas outras bandas de maior e menor massa molecular. Contudo, tal como verificado nos géis corados com azul de *Coomassie*, esta técnica não parece ter sensibilidade para diferenciar as espécies de *Leishmania* analisadas.

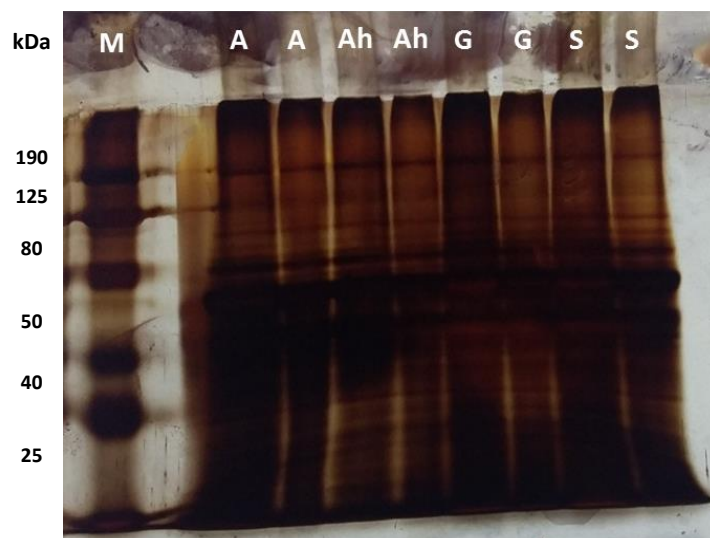


Figura 9 - Perfil proteico total dos extratos de de *Leishmania*. Os extratos (500 µg/ml) de promastigotas de espécies cutâneas de *Leishmania* foram sujeitos a electroforese em gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata. M – Marcador de peso molecular; A – *L. amazonensis*; Ah – *L. amazonensis* (HOM); G - *L. guyanensis*; S - *L. shawi*

4.2 Atividade enzimática dos extratos proteicos de *Leishmania* spp.

No presente estudo, a zimografia em géis de gelatina dos extratos permitiu a identificação de uma banda proteica com massa molecular de cerca de 80 kDa com atividade proteolítica (Fig. 10). Os sobrenadantes das culturas dos parasitas não mostraram atividade enzimática. No seu conjunto estes resultados indicam que os extratos parasitários contêm a enzima proteolítica gp63. Apesar de poder ser segregada/libertada para o exterior pelos parasitas (McGwire, O'Connell, Chang & Engman, 2002), a não existência de atividade proteolítica na banda correspondente, previamente identificada nos sobrenadantes, levanta as hipóteses de não se tratar da gp63 parasitária ou, no caso de ser realmente a gp63 esta ter perdido a sua atividade enzimática. A gp63 é uma metaloproteína que necessita de possuir duas moléculas de zinco no seu centro ativo para evidenciar atividade enzimática (McCall, Huang & Fierke, 2000).

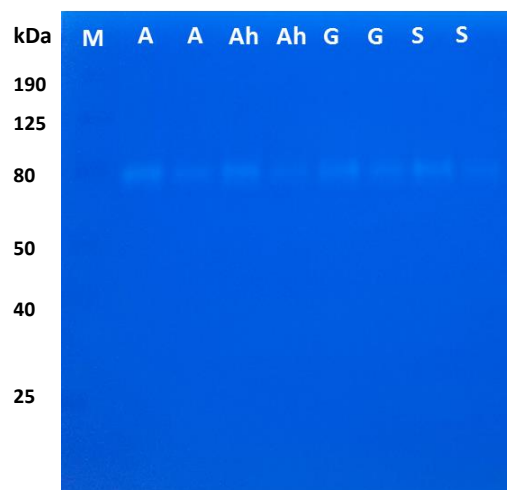


Figura 10 - Atividade enzimática dos extratos de *Leishmania*. Os extratos (500 µg/ml) de promastigotas de espécies cutâneas de *Leishmania* foram sujeitos a electroforese em gel de poliacrilamida com gelatina. M – Marcador de peso molecular; A – *L. amazonensis*; Ah – *L. amazonensis* (HOM); G - *L. guyanensis*; S - *L. shawi*

4.3 Atividade da metaloproteinase na membrana do eritrócito

A integridade estrutural dos eritrócitos humanos e dos restantes mamíferos é sustentada por um número de diferentes proteínas do citoesqueleto. A existência de alterações estruturais e bioquímicas que causem alterações nesta rede de proteínas pode levar à sensibilização do eritrócito e por consequência à sua degradação e lise (Samanta et al., 2012). Para observar diferenças na membrana dos eritrócitos em contacto com o parasita, foram realizadas duas zimografias que demonstram a atividade da metaloproteinase na membrana.

Nas amostras contendo as membranas de eritrócitos com diferentes concentrações (1%, 2%, 5% e 10%) não foi observada a presença de bandas, pelo que não foi possível observar atividade enzimática.

No gel (**Fig. 11**), as amostras constituídas por 10% de eritrócitos sensibilizados com várias diluições de extrato proteico de *Leishmania* evidenciaram a existência de bandas com atividade proteolítica. As bandas perto dos 190 kDa poderão ser referentes à forma inativada de gp63 que apresenta um peso molecular mais elevado que a forma ativada da enzima por ainda conter o pró-peptídeo (Isnard, Shio & Olivier, 2012). As bandas entre 80 e 50 kDa poderão corresponder à forma ativada da gp63, demonstrando a presença da gp63 quando os parasitas estão em contacto com as membranas dos

eritrócitos humanos. A atividade enzimática da enzima parece ser mais evidente quando a concentração de extrato é maior, sobretudo no caso da banda de gp63.

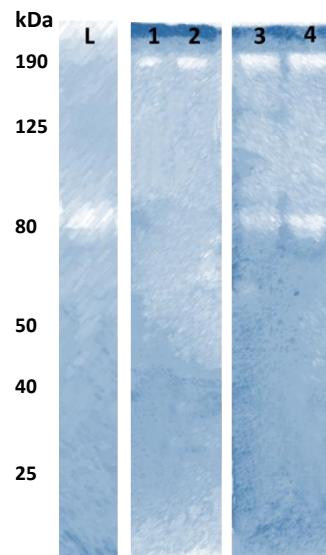


Figura 11- Atividade da metaloproteinase em eritrócitos de sensibilizados com extrato proteico de *Leishmania*. M- Marcador; E- Eritrócitos humanos (10%); L – Extrato proteico de *Leishmania*; Eritrócitos sensibilizados com 62,5 µg/ml (1), 125 µg/ml (2), 250 µg/ml (3) e 500 µg/ml (4) respectivamente.

4.4 Avaliação da interação das metaloproteinases de *Leishmania* spp. com eritrócitos humanos e possível atividade hemolítica mediada pelo sistema complemento

Uma vez que a sensibilização do eritrócito pelo parasita pode levar à lise da célula, este pode interagir diretamente com antígenos expressos à superfície da célula eritrocitária ou a sensibilização pode ser mediada pelo sistema complemento. Deste modo o parasita poderá ligar-se ao eritrócito ao ser opsonizado pelo fator C3b do complemento (Mosser & Brittingham, 1997).

Nos ensaios hemolíticos realizados pretendeu-se estudar o efeito da interação dos extratos proteicos de *Leishmania* com os eritrócitos humanos na presença do sistema complemento. Considerando que a lise de hemólise é diretamente proporcional à lise

dos eritrócitos, a sensibilização destas células pelos extratos foi avaliada de forma indireta através do nível de hemólise. Para poder conferir se o soro realmente desencadeia a lise dos eritrócitos sensibilizados, acrescentou-se ao ensaio amostras em que os eritrócitos foram colocados em contacto com o sistema complemento inativado (**Fig. 12**).

Os controlos positivo e negativo obtiveram diferenças de valores estatisticamente significativas ($p < 0,0001$). Nas amostras que entraram em contacto com o soro humano com o sistema de complemento intacto ocorreu uma significativa ($p = 0,0005$) lise dos eritrócitos quando comparado com o controlo negativo, podendo ser referente à ação do sistema complemento nos eritrócitos sensibilizados por extratos de *Leishmania*. Nas amostras que entraram em contacto com o soro humano inativado, a lise eritrocitária foi consideravelmente ($p = 0,0005$) menor em comparação aos eritrócitos incubados com o sistema complemento ativo. Com estes dados concluindo-se que a hemólise se deve ao sistema complemento e não a outros componentes que poderão estar presentes no soro uma vez que o sistema complemento não estava a atuar. A hemólise eritrocitária é independente das concentrações de extrato utilizadas. Nas amostras sem extrato proteico de *Leishmania*, a lise dos eritrócitos em contacto com o sistema complemento tanto ativado como inativado foi mínima. A sensibilização dos eritrócitos com os extratos parasitários parece ser decisivo para que ocorra hemólise pelo complemento. Estes resultados encontram-se de acordo com Gurung & Kanneganti (2015), mostrando que o sistema complemento tem um papel importante no controlo da infeção por *Leishmania*. Adicionalmente, Brittingham et al (1995) demonstram que as metaloproteases de *Leishmania*, como é o caso da gp63, são ativadoras eficientes do sistema complemento humano.

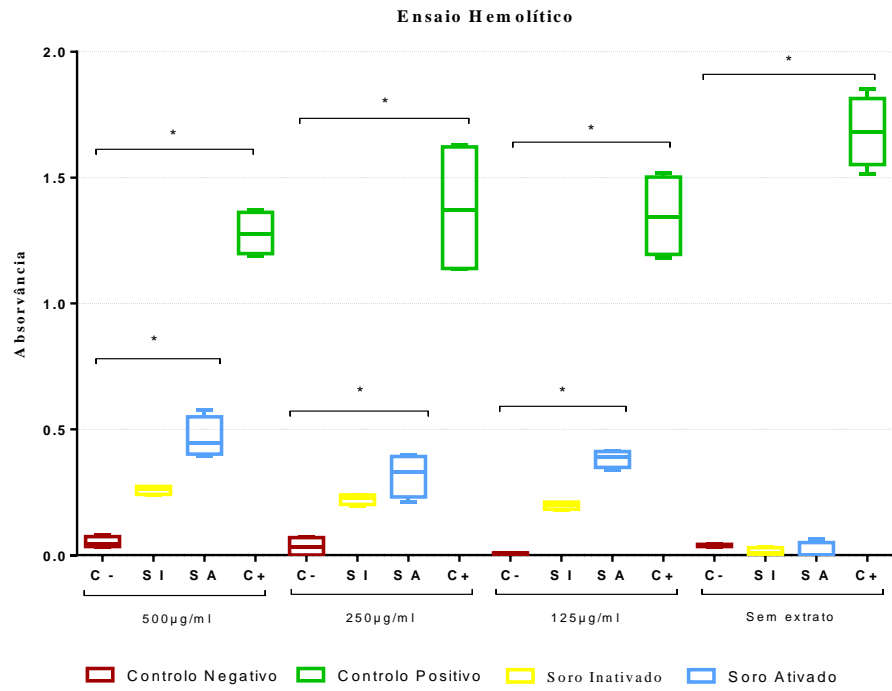


Figura 12 - Efeito do complemento ativado e inativado em 2% de eritrócitos sensibilizados com 500, 250, 125 e 0 µg/ml de extrato proteico de Leishmania. O teste não paramétrico Wilcoxon foram utilizados para comparar estatisticamente as diferentes condições com o controle negativo. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as amostras.

4. Conclusão

1. Através da utilização de técnicas com géis de gelatina corados com azul de *Coomassie* e nitrato de prata é possível verificar-se o perfil proteico total dos extratos proteicos de *Leishmania*. Porém, esta metodologia não apresenta sensibilidade suficiente para diferenciar as espécies utilizadas.
2. É também através de géis de colagénio corados com azul de *Coomassie* que foi avaliada atividade enzimática dos extratos proteicos, inclusive em membranas eritrocitárias sensibilizadas. Esta última técnica foi otimizada, podendo vir a ser útil em futuros trabalhos.
3. Nos ensaios hemolíticos realizados é reforçada a importância das metaloproteases de *Leishmania spp.* na sensibilização de eritrócitos e a lise mediada pelo sistema complemento presente no soro humano.
4. Uma vez que é importante a caracterização dos perfis de expressão proteicos e enzimáticos de parasitas como *Leishmania* e a sua interação com os mecanismos biológicos humanos, os resultados deste trabalho contribuem para a expansão de conhecimentos nesta área, podendo vir a ser utilizados na identificação de novos alvos terapêuticos crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que permitam a erradicação desta doença parasitária.

5. Bibliografia

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.*, 10(3): e0004349.
- Araújo, R., Silva, F., Melo-Júnior, M., & Porto, A. (2011). Metaloproteinases: Aspectos Fisiopatológicos Sistêmicos e sua Importância na Cicatrização. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 1: 1677-5090.
- Bañuls, A.-L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007). Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology*
- Beattie, L., & Kaye, P. (2011). *Leishmania*–Host Interactions: What Has Imaging Taught Us? *Cellular Microbiology*, 1659-1667.
- Bern, C., Maguire, J., & Alvar, J. (2008). Complexities of Assessing the Disease Burden Attributable to Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(10): e313.
- Brittingham, A., Morrison, C. J., McMaster, W. R., McGwire, B. S., Chang, K. P., & Mosser, D. M. (1995). Role of the *Leishmania* Surface Protease gp63 in Complement Fixation, Cell Adhesion, and Resistance to Complement-Mediated Lysis. *J. Immunol.*, 155(6): 3102-3111.
- Carvalho, H., Roque, A., Iranzo, O., & Branco, R. (2015). Comparison of the Internal Dynamics of Metalloproteases Provides New Insights on Their Function and Evolution. *PLoS One*, 10(9): e0138118.
- CDC. (2016). *Parasites - Leishmaniasis*. Retrieved from Centers of Disease Control and Prevention: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> Acedido em 20-10-2016
- Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Nat Protoc*, 1(4): 1852–1858.
- Chong, S., Evrard, M., & Ng, L. (2013). Lights, Camera, and Action: Vertebrate Skin Sets the Stage for Immune Cell Interaction with Arthropod-Vectored Pathogens. *Front. Immunol.*
- d'Avila-Levy, C., Altoé, E., Uehara, L., & Santos, A. (2014). gp63 Function in the Interaction of Trypanosomatids with the Invertebrate Host: Facts and Prospects. *Sub-cellular biochemistry*, 74: 253-270.
- Dostálová, A., & Volf, P. (2012). *Leishmania* Development in Sand Flies: Parasite-Vector Interactions Overview. *Parasit Vectors*, 5: 276.
- Feasey, N., Wansbrough-Jones, M., Mabey, D. C., & Solomon, A. W. (2009). Neglected Tropical Diseases. *Br Med Bull*.

- Gómez, E., Valdés, A., Piñero, D., & Hernández, R. (1991). What Is a Genus in the Trypanosomatidae Family? Phylogenetic Analysis of Two Small rRNA Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 8(2), 254-259.
- Gontijo, B., & Carvalho, M. (2003). Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 1.
- Goto, H., & Sanchez, M. (2013). Does the Complement System Work for or Against the Host during Parasite Infections. *International Trends in Immunity*, 2.
- Grimaldi Jr., G., & Tesh, R. B. (1993). Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clinical Microbiology Reviews* 3; 230-250.
- Gupta, G., Oghumu, S., & Satoskar, A. (2013). Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol.*, 82: 155–184.
- Gurung, P., & Kanneganti, T.-D. (2015). Innate Immunity against *Leishmania* Infections. *Cell Microbiol.*, 17(9): 1286–1294.
- Hames, B. (1998). *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*. Oxford University Press.
- Hassani, K., Shio, M., Martel, C., Faubert, D., & Olivier, M. (2014). Absence of Metalloprotease gp63 Alters the Protein Content of *Leishmania* Exosomes. *Plos One*, 9(4): e95007.
- Isnard, A., Shio, M. T., & Olivier, M. (2012). Impact of *Leishmania* Metalloprotease gp63 on Macrophage Signaling. *Front Cell Infect Microbiol.*, 2: 72.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York.
- Joshi, P., Sacks, D., Modi, G., & McMaster, W. (1998). Targeted Gene Deletion of *Leishmania* major Genes Encoding Developmental Stage-Specific Leishmanolysin (gp63). *Molecular Microbiology*, 519–530.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Elsevier Science Inc.*, 279–289.
- Kleiner, D., & Stetler-Stevenson, W. (1994). Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases. *Analytical Biochemistry*, 218; 325-329.
- Lakhal-Naouar, I., Slike, B., Aronson, N., & Marovich, M. (2015). The Immunology of a Healing Response in Cutaneous Leishmaniasis Treated with Localized Heat or Systemic Antimonial Therapy. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(10): e0004178. .
- Macdonald, M. (1995). Analysis and Expression of *Leishmania* Surface Proteinase and Glycoproteins. The University of British Columbia.
- McCall, K., Huang, C.-c., & Fierke, C. (2000). Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *J. Nutr.*, 1437S-1446S.
- McGwire, B., O'Connell, W., Chang, K.-P., & Engman, D. (2002). Extracellular Release of the Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* Surface Metalloprotease, gp63, Is

- Independent of GPI Phospholipolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277; 8802-8809.
- Mosser, D., & Brittingham, A. (1997). *Leishmania*, Macrophages and Complement: a Tale of Subversion and Exploitation. *Parasitology*, 115: 9-23.
- Nesargikar, P., Spiller, B., & Chavez, R. (2012). The Complement System: History, Pathways, Cascade and Inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2(2): 103–111.
- Reis, L., Brito, M., Souza, M., & Pereira, V. (2006). Mecanismos Imunológicos na Resposta Celular e Humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista de Patologia Tropical*, 2: 103-115.
- Reithinger, R., & Dujardin, J.-C. (2007). Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *J. Clin. Microbiol.*, 45: 21-25.
- Samanta, S., Ghoshal, A., Saha, B., Walden, P., Manda, C., & Bhattacharya, K. (2012). Sialoglycosylation of RBC in Visceral Leishmaniasis Leads to Enhanced Oxidative Stress, Calpain-Induced Fragmentation of Spectrin and Hemolysis. *PLoS One*, 7:e42361.
- Santos, A., Branquinha, M., & D'Avila-Levy, C. (2006). The Ubiquitous gp63-like Metalloprotease from Lower Trypanosomatids: in the Search for a Function. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(4), 687-714.
- Schlagenhauf, E., Etges, R., & Metcalf, P. (1998). The Crystal Structure of the *Leishmania major* Surface Proteinase Leishmanolysin (gp63). *Structure*, 1035–1046.
- Schnitzer, J., Carley, W., & George, E. (1988). Albumin Interacts Specifically with a 60-kDa Microvascular Endothelial Glycoprotein. *Cell Biology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 6773-6777.
- Sundar, S., & Rai, M. (2002). Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*, 5 951-958.
- Sundar, S., Agrawal, S., Pai, K., Chance, M., & Hommel, M. (2005). Detection of Leishmanial Antigen in the Urine of Patients with Visceral Leishmaniasis by a Latex Agglutination Test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73(2):269-271.
- The Australian Society for Parasitology Inc. (2016). *Leishmania*. Retrieved from <http://parasite.org.au/para-site/text/leishmania-text.html> Acedido em 20-10-2016
- Toth, M., & Fridman, R. (2001). Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography. *Methods Mol Med.*, 57: 10.1385/1-59259-136-1:163.
- WHO. (2015) (a). *Control of Neglected Tropical Diseases*. Retrieved from http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ Acedido em 20-10-2016
- WHO. (2015) (b) . Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. *Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases*.
- WHO. (2016). *Leishmaniasis*. Retrieved from World Health Organization: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/> Acedido a 20-10-2016

Yao, C. (2010). Major Surface Protease of Trypanosomatids: One Size Fits All? *Infect Immun.*, 78(1): 22–31.

Yao, C., & Wilson, M. (2016). Dynamics of Sterol Synthesis During Development of *Leishmania* spp. Parasites to Their Virulent Form. *Parasit Vectors*, 9: 200.