

Joana Patrícia Carreira Vindeirinho

As Proteases como novos alvos terapêuticos no tratamento de leishmanioses

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Maria do Céu Sousa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Joana Patrícia Carreira Vindeirinho, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010315, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade Estágio Curricular. Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de Julho de 2014

AGRADECIMENTOS

A concretização desta monografia não teria sido possível sem o estímulo, ajuda e colaboração de um grupo restrito de pessoas, pelo que gostaria de expressar o meu mais sincero obrigado a todas aquelas que, de uma forma ou de outra contribuíram para o mesmo.

Em primeiro lugar gostaria de dirigir um agradecimento especial à minha orientadora, Dr^a Maria do Céu Sousa, pela disponibilidade, pela paciência e pela compreensão sempre demonstrada.

Um grande obrigado aos meus amigos pela compreensão, pela paciência, pela maneira como nas horas de maior sofrimento, me conseguiram acalmar e me mostraram o melhor caminho a seguir.

Aos meus pais e irmã pela dedicação, compreensão, paciência e pelo apoio nas horas de longo trabalho e de desespero.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS.....	2
ÍNDICE DE IMAGENS.....	2
ABREVIATURAS	3
RESUMO	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	6
3. Manifestações Clínicas.....	7
4. Tratamento das leishmanioses	8
5. Enzimas proteolíticas.....	9
6. Cisteíno-proteases em <i>Leishmania</i>	12
7. Metaloprotease GP63 em <i>Leishmania</i>	15
7.1. Acção de GP63 na sobrevivência de amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i>	16
7.2. Alteração da sinalização do macrófago pela acção da GP63	16
7.3. Influência de GP63 nos factores de transcrição do macrófago	18
8. Serino-proteases em <i>Leishmania</i>	20
9. Inibidores das proteases	22
9.1. Inibidores da dipeptidilcarboxipeptidase de <i>L. donovani</i> (LdDCP)	24
9.2. Kunitz (SHPI-I).....	26
10. CONCLUSÃO	27
11. BIBLIOGRAFIA	28

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais tipos de proteases	12
Tabela 2. Cisteíno-proteases e inibidores de cisteíno-proteases de <i>Leishmania</i> . Nomenclatura por Clans e família.	14
Tabela 3. Inibidores de proteases usados nas leishmanioses	25
Tabela 4. Eficácia <i>in vitro</i> dos compostos nas formas amastigotas e promastigotas	28

ÍNDICE DE IMAGENS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp	8
Figura 2. Forma promastigota de <i>Leishmania</i>	9
Figura 3. Forma amastigota de <i>Leishmania</i>	9
Figura 4. Diagrama esquemático de como CPB de <i>L. mexicana</i> pode influenciar a resposta imunitária	16
Figura 5. Factores de virulência de <i>Leishmania</i>	17
Figura 6. GP63 de <i>Leishmania</i> medeia a activação de PTPs	20
Figura 7. Efeito da temperatura na quantidade de exossomas que recobrem a superfície de <i>L. mexicana</i>	21
Figura 8. Localização subcelular das serino-proteases de <i>L. amazonensis</i>	23
Figura 9. Efeitos da Bza e TPKC nas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	24

ABREVIATURAS

ACE: Enzima Conversora da Angiotensina	LSP: Lipopolissacarídeo
BPT-I: Inibidora da Tripsina Pancreática Bovina	LT: Leishmaniose Tegumentar
Bza: Benzamidina	LV: Leishmaniose Visceral
CDRI: Central Drug Research Institute	MARCKS: Myritylated Alanine-rich C Kinase Substrate
CP: Cisteíno Protease	MHC: Complexo Major de Histocompatibilidade
DCP: Dipeptidilcarboxipeptidase	MRP: MARCKS Related Proteins
DSFS: Dual Specificity Fosfatases	NF-KB: Factor Nuclear Kappa B
EM: Microscopia Electrónica	NO: Óxido Nítrico
EcDCP: Dipeptidilcarboxipeptidase da <i>E.coli</i>	PKC: Proteína Cinase C
FR: Receptores da Fibronectina	PMSF: Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
GP63: Glicoproteína 63	PTP: Proteína Tirosina Fosfatase
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana	ROS: Espécies Reactivas de Oxigénio
IC₅₀: Concentração inibitória a 50%	SAPK: Stress-activated Protein Kinases
IFN-γ: Interferão gama	ShPI-I: Inibidor de <i>Stichodactyla helianthus</i>
IRAK-I: Interleukin-1 Receptor-associated Kinase I	SI: Índice de Segurança
JAK 2: Janus Kinase 2	STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription
Ki: Constante de Inibição	STR: Serina/Treonina Fosfatases
LC: Leishmaniose Cutânea	TGF-β: Transforming Growth Factor Beta
LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa	TLCK: N-tosil-lisina chlorometil cetone
LdDCP: Dipeptidilcarboxipeptidase de <i>L. donovani</i>	TLR: Toll Like Receptor
LPs: Lipopolissacarídeos	TPCK: N-tosil-fenilalanina clorometil cetona
LM: Leishmaniose Mucocutânea	

RESUMO

Leishmania é um parasita que causa infecções viscerais e tegumentares no Homem, sendo estas denominadas de leishmanioses. Apesar de ser uma patologia com uma elevada incidência em todo o mundo, estimando-se que possa vir a aumentar ainda mais, esta continua a ser uma patologia negligenciada, muito porque a maioria dos países afectados estão em desenvolvimento.

Actualmente as terapêuticas disponíveis são deficitárias, sendo terapêuticas com custos elevados, de elevada toxicidade e de baixa eficácia. Por todos os factores mencionados, a procura de novos alvos torna-se imprescindível.

Estudos realizados demonstraram que as proteases, um dos factores de virulência de *Leishmania*, eram bons alvos terapêuticos, sendo susceptíveis à acção de inibidores específicos. As proteases subdividem-se em cisteíno-proteases, serino-proteases, metaloproteases e aspártico-proteases.

Nesta monografia pretende-se demonstrar o importante papel que as proteases desempenham como factor de virulência, bem como a sua importância no desenvolvimento de novas terapêuticas, fazendo-se uso de inibidores específicos.

Palavras-chave: Terapêuticas; *Leishmania*; Proteases; Inibidores.

ABSTRACT

Leishmania is a parasite that causes in man visceral and tegumentares infections denominated leishmaniasis. Although it is a pathology with a high incidence all over the world and with estimations indicating it can increase even more, this pathology keeps being neglected, mostly because the majority of affected countries are in development.

Nowadays available therapeutics are deficient, presenting high costs, high toxicity and low efficacy. Due to all the factors aforementioned, searching for new targets has become indispensable.

Studies reveal that proteases, one of the virulence factors of *Leishmania*, were good therapeutic targets and they were susceptible to the action of specific inhibitors. Proteases sub-divide in cysteine proteases, serine proteases, metalloproteases and aspartate proteases.

In this monograph it is pretended to demonstrate the important role proteases play as a virulence factor, as well as its importance in developing new therapeutics, making use of specific inhibitors.

Key-words: Therapeutics; *Leishmania*; Proteases; Inhibitors.

I. INTRODUÇÃO

Protozoários do género *Leishmania* são responsáveis por um amplo espectro de doenças tropicais e subtropicais do Homem e de outros animais nas regiões quentes do Velho e do Novo Mundo. As leishmanioses são patologias endémicas em 88 países com estimativa de 12 milhões de novos casos no mundo. A leishmaniose é considerada uma das mais importantes patologias negligenciadas, estimando-se que 350 milhões de pessoas estejam em risco de ficarem infectadas. É uma doença associada à pobreza, mudanças ambientais (deflorestação, urbanização) e também à migração de pessoas não imunes à doença para áreas endémicas^{1,2}.

A prevenção da transmissão do parasita é realizada através da utilização de insecticidas, protecção individual, eliminação de animais domésticos infectados, detecção e tratamento precoce de casos humanos. No entanto, devido à grande diversidade biológica dos parasitas, há existência de muitas espécies que funcionam como vectores e de mamíferos que podem actuar como reservatórios de infecção, bem como factores socioeconómicos das populações afectadas, medicamentos de elevado custo e com grande toxicidade para o hospedeiro, torna-se difícil o controlo da transmissão do parasita. Aliada a esta não contenção de transmissão, está o forte aumento do número de casos da doença devido à disseminação do parasita em bancos de sangue e a sua co-infecção em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Humana (HIV)². Todos estes factores fazem com que seja necessário conhecer melhor a biologia e bioquímica de *Leishmania* de forma a encontrar novos alvos para o desenvolvimento de fármacos que possam efectivamente impedir a transmissão do parasita.

Em teoria, o novo alvo deveria estar ausente no organismo hospedeiro ou pelo menos, deveria ser substancialmente diferente. Mais ainda, o possível alvo deveria ser absolutamente necessário para a sobrevivência do agente patogénico. É importante ter em conta a fase do ciclo de vida do parasita durante o qual há expressão da proteína-alvo. As proteases de *Leishmania* participam na invasão das células do hospedeiro, na assimilação dos aminoácidos como fonte nutricional ou para a síntese de substâncias orgânicas, no metabolismo de proteínas ou peptídeos biologicamente activos, na diferenciação e no escape ao sistema imune do hospedeiro, ou ainda, na resistência do parasita à terapia medicamentosa³.

2. Ciclo de vida de *Leishmania*

A infecção humana é causada por cerca de 21 de 30 espécies de *Leishmania* que infectam os mamíferos. As espécies são morfologicamente iguais, podendo ser diferenciadas através de métodos moleculares⁴. A leishmaniose é transmitida através da picada do vector, fêmeas de flebotomíneos, com a forma infectante – **promastigota** (Fig.1). As formas promastigotas (Fig.2) são fagocitadas pelos macrófagos e transformam-se na forma amastigota (Fig.3) que se multiplica por divisão simples, lisa o macrófago e infecta novas células do sistema mononuclear macrófágico.

Os flebotomíneos são infectados pela ingestão de sangue contaminado durante a picada e a forma amastigota transforma-se no intestino médio na forma promastigota. Estes multiplicam-se e são envoltos por uma membrana peritrófica, secretada pelas células do insecto. Com a probóscida bloqueada pelos parasitas, o vector tem dificuldade em alimentar-se e portanto quando pica regurgita os promastigotas para o interior da pele do hospedeiro vertebrado, inoculando-os no local da picada, ocorrendo assim a transmissão^{2,4}.

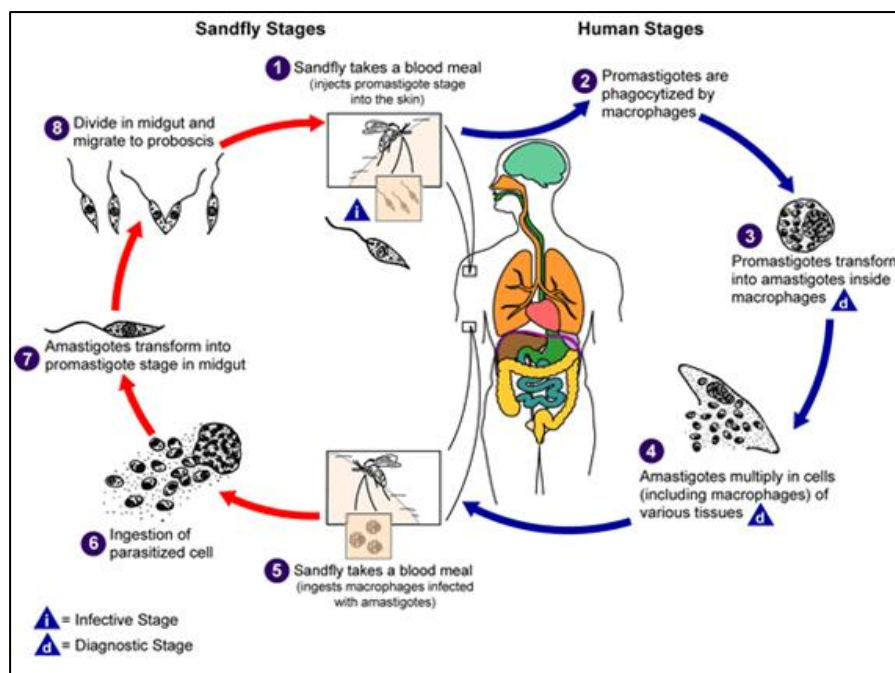


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* sp.⁴.



Figura 2. Forma promastigota de *Leishmania*.

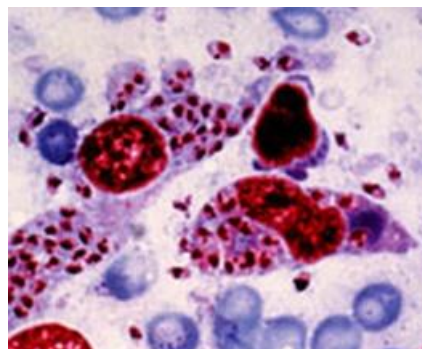


Figura 3. Forma amastigota de *Leishmania*.

3. Manifestações Clínicas

As leishmanioses humanas apresentam amplo espectro clínico e podem ser classificadas em **leishmanioses tegumentares** e **leishmanioses viscerais**. Estas são causadas por diferentes espécies do género *Leishmania*. A leishmaniose tegumentar (LT) pode manifestar-se através de três formas clínicas: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucocutânea (LM) e Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD). A LC é a forma clínica mais frequente e é classicamente dividida nas formas do Novo e do Velho Mundo. A LC do Novo Mundo é endêmica nas Américas do Sul e Central e é primariamente causada por membros do complexo *mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*) e do complexo *braziliensis* (*L. braziliensis*, *L. paramensis*, *L. guyanensis*). O espectro da patologia varia de uma úlcera cutânea simples e localizada na LC e nódulos disseminados na LCD ao envolvimento mucocutâneo, como na LMC. Na LC localizada, a lesão inicial aparece geralmente de 2-8 semanas após a picada do insecto e progride até uma úlcera que pode persistir durante meses a anos. A LC pode evoluir para LCD e começa tipicamente como pápulas localizadas e não ulceradas na face e extremidades. A doença tem progressão lenta e pode persistir por toda a vida do hospedeiro. Na LMC, lesões nas mucosas do nariz, boca, faringe e laringe podem aparecer ao fim de meses a anos após a cura de úlceras cutâneas primárias. A LMC pode ser responsável por lesões mutilantes com perda do septo nasal, mandíbula e parte da face. Tem sido reportado que de 8 a 16% dos portadores de LMC não exibem prévia doença cutânea.

A leishmaniose visceral (LV) ou Calazar é comumente causada por *L. donovani* na Índia e África, *L. infantum* no Mediterrâneo e *L. chagasi* na América latina. Os reservatórios para *L. chagasi* incluem cães, raposas e o Homem. Nesta forma de doença, ocorre o envolvimento generalizado do sistema retículo endotelial. Existe, no entanto, o outro

extremo em que os indivíduos são assintomáticos ou possuem infecções relativamente leves, que se resolvem por si só².

A coinfeção *Leishmania*/HIV é considerada uma nova e preocupante doença emergente e que apresenta importantes implicações clínicas, diagnósticas, quimioterapêuticas e epidemiológicas. A grande maioria dos casos de coinfeção com HIV é observada em portadores de LV e em indivíduos que usam drogas injectáveis nos países da Bacia Mediterrânea e África. Em indivíduos HIV positivos, o tratamento para leishmanioses geralmente falha, devido à imunodeficiência e à grande abundância de parasitas no trato digestivo, pele, pulmões e cérebro. Dentro das infecções oportunistas que acometem os portadores de HIV, a coinfeção com *Leishmania* é considerada a mais grave, evoluindo mais rapidamente para casos fatais².

4. Tratamento das leishmanioses

Desde o início do século XX que os compostos antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}) têm sido utilizados no tratamento das leishmanioses humanas, continuando a ser os fármacos de escolha para o tratamento da leishmaniose cutânea e visceral. Inicialmente a forma trivalente (Sb^{3+}) era o utilizado. No entanto, este possuía grande toxicidade para o hospedeiro, bem como a sua administração era de difícil execução. Mais tarde surgiu o estibogluconato de sódio (Pentostan, um derivado do ácido estibónico complexado ao Sb^{5+}) sendo utilizado por via intramuscular, reduzindo os efeitos secundários e a toxicidade. O mecanismo de acção destes compostos em amastigotas é a inibição das enzimas da via glicolítica e da β -oxidação. No entanto, sendo um metal pesado, é possível que interfira noutras vias metabólicas de *Leishmania*, bem como do hospedeiro, tornando-se um problema. Podem ainda inibir a topoisomerase II, efeito observado em *L. panamensis* e *L. donovani*. Além das dificuldades de administração e do alto custo, os compostos antimoniais pentavalentes apresentam fortes efeitos adversos que incluem mialgias, artralgias, aumento sérico das enzimas hepáticas, pancreatite, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, arritmias, pancitopenia e cardiotoxicidade. A cura clínica não é acompanhada de cura parasitológica, uma vez que têm sido observados parasitas na cicatriz de indivíduos clinicamente curados após tratamento.

Em caso de resistência aos compostos antimoniais, os fármacos alternativos são a **anfotericina B**, a **pentamidina**, o **miltefosina** e a **paramomicina**. No entanto, os resultados terapêuticos são diminutos e apresentam relevantes efeitos adversos. A **anfotericina B** é um antibiótico que se liga ao ergosterol (principal esteroide presente nas

membranas plasmáticas do parasita), causando alterações de permeabilidade da membrana e do equilíbrio osmótico do parasita. É utilizada em casos graves de leishmanioses resistentes ao tratamento com os compostos antimoniais. O seu uso é restrito, devido aos efeitos tóxicos que apresenta².

A **pentamidina** é uma diamina aromática que apresenta importante actividade antifúngica, antitripanossomatídea, antibacteriana, antiviral e antitumoral. Os resultados obtidos são positivos em doentes com leishmaniose e imunodepressão. A pentamidina interfere na síntese de poliaminas, inibindo a utilização de S-adenosil-L-metionina por enzimas como ornitina descarboxilase, impedindo a síntese de moléculas importantes para a manutenção da vida do parasita. O **miltesofina** é outro antibiótico que estimula a cascata das caspases, induzindo a apoptose e a morte do parasita. É indicado como a melhor alternativa para o tratamento da LV e para doentes imunodeprimidos, uma vez que o fármaco pode ser administrado por via oral. A **paramomicina**, um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus*, inibe a síntese proteica, pela ligação às proteínas ribossómicas. Esta pode apresentar nefro e ototoxicidade, afectando também o controlo motor e o equilíbrio².

Todos os fármacos mencionados apresentam uma série de problemas, desde resistência do parasita à indução de efeitos colaterais, que limitam a utilização e, principalmente a eficácia. Além disso, todos os fármacos são de administração parenteral, exigindo a colaboração do doente, o que por vezes pode contribuir para a não adesão à terapêutica. Com o objectivo de desenvolver fármacos mais eficazes, de baixo custo e com efeitos adversos menos agressivos para o hospedeiro, novos alvos quimioterapêuticos em *Leishmania* têm sido investigados e novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos devem ser consideradas.

5. Enzimas proteolíticas

Tradicionalmente, as proteases ou peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas, libertando peptídeos de tamanho variável ou aminoácidos livres¹.

Na nomenclatura internacional de classificação de enzimas, as proteases pertencem à classe 3 e subclasse 3.4, que está ainda subdividida em **exopeptidases** e **endopeptidases**¹.

As exopeptidases clivam ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas, sendo denominadas de aminopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente. As aminopeptidases actuam nas extremidades aminoterminais, libertando

um simples resíduo de aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo e são, respectivamente denominadas de aminopeptidases, dipeptidilpeptidases e tripeptidilpeptidases. As carboxipeptidases que libertam um dipeptídeo são denominadas de peptidil-peptidases¹.

As endopeptidases actuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, e as proximidades dos grupos N ou C terminais têm um efeito negativo na actividade enzimática.

A classificação quanto à natureza química do local catalítico aponta para quatro principais tipos de peptidases: **serino-proteases**, **cisteíno-proteases** e as **aspártico-proteases** que possuem, respectivamente, resíduo de aminoácido serina, cisteína e ácido aspártico no sítio activo, que está envolvido na catálise enzimática. Existem ainda as **metaloproteases** que utilizam um ião metálico para actividade catalítica (Tabela I).

Para sabermos efectivamente que estamos perante determinada peptidase recorre-se à utilização de inibidores específicos. São exemplos o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) para inibição de serino-proteases; L-3-carboxi-trans-2,3-epoxipropil-leucilamido (4-guanidino) butano para as cisteíno-proteases; pepstatina para as aspártico-proteases; 1,10-fenantrolina para as metalo-proteases (Tabela I).

Tabela I. Principais tipos de proteases²

Classes de proteases	Resíduos catalíticos no sítio activo	Faixa de pH óptimo	Exemplos mais típicos	Exemplos de inibidores específicos
Serino-proteases	Ser, Asp, His	7,0-11,0	Tripsina, quimiotripsina, factores de coagulação e do complemento	Benzamidina, Leupeptina
Cisteíno-proteases	Cys, Asp, His	4,0-5,5	Papaína	E-64
Aspártico-proteases	Asp	1,0-3,0	Pepsina	Peptastina
Metaloproteases	metal	7,0-9,0	Colagenases	EDTA, 1,10-fenatrolina

O mecanismo mais comum de clivagem das ligações peptídicas pelas proteases de diferentes classes é o ataque nucleofílico da ligação carbono-oxigénio, pela doação de um

protão ao nitrogénio da ligação peptídica. Determinados aminoácidos desempenham a função de agentes nucleofílicos, enquanto que outros actuam como dadores de protões. É de salientar que as proteases podem ainda ser classificadas de acordo com a faixa de pH óptimo na qual actuam. As aspártico-proteases actuam na faixa de pH ácido; as cisteíno-proteases actuam na faixa de pH levemente ácido e as metaloproteases em pH neutro a básico.

A proteólise é um mecanismo muito comum em todas as células e pode ser dividida em duas categorias distintas: **proteólise limitada**, na qual é clivada apenas uma ligação peptídica ou um número limitado destas numa proteína específica; e **proteólise não limitada** que compreende a completa degradação da proteína alvo através da hidrólise de múltiplas ligações peptídicas. Enquanto que a proteólise não limitada tem por objectivo a completa eliminação de uma proteína para regulação dos seus níveis intracelulares, a proteólise limitada tem por objectivo funções regulatórias, não destruindo o substrato, mas modificando as suas propriedades e funções biológicas¹.

Os principais locais celulares de proteólise são o citoplasma e os lisossomas, podendo também ocorrer nas mitocôndrias, lúmen do retículo endoplasmático e endossomas. As proteínas citosólicas de curta duração parecem ser degradadas no citoplasma por um mecanismo ubiquitina-dependente, enquanto que a maioria das proteínas de longa duração é captada pelos lisossomas por autofagia e as proteínas extracelulares podem ser degradadas nos lisossomas por heterofagia².

A proteólise não lisossomal, ocorre em grande parte no citoplasma e é mediada principalmente pela **ubiquitina**, que é uma pequena proteína globular universalmente presente nas células eucarióticas e que, através do resíduo de glicina da extremidade carboxi-terminal, se conjuga à proteína alvo, formando uma ligação isopeptídica com ϵ -NH₂ do resíduo de lisina da proteína alvo, que é poliubiquitinada. Uma vez formada, a proteína alvo é degradada no citosol por um complexo multicatalítico de proteases de alto peso molecular, o **proteossoma** (\approx 1000 KDa) composto por pelo menos 24 cadeias polipeptídicas arranjadas em estrutura cilíndrica. Este complexo localiza-se no núcleo e citoplasma de todas as células eucarióticas, possui principalmente proteases neutras e corresponde a 1% da proteína celular. É um sistema proteolítico dependente de ATP e possui coeficiente de sedimentação de 26S, proteossoma 26S, que é formado por um núcleo catalítico no formato de um cilindro oco, o proteossoma 20S, e uma porção 19S, onde se localizam as ATPases responsáveis pelo “desenrolar” das proteínas a serem degradadas pelas proteases em 20S.

Além disso, na subunidade 19S ocorre a ligação das cadeias de poliubiquitina, que marca a proteína para degradação².

6. Cisteíno-proteases em *Leishmania*

As cisteíno-proteases são as enzimas proteolíticas mais investigadas em *Leishmania* e muitas delas já possuem as sequências genômicas sequenciadas e disponíveis em bancos de dados. Até ao momento, a maior parte dos estudos realizados sobre a actividade das cisteíno-proteases de *Leishmania* concentravam-se em algumas enzimas pertencentes ao clã A e à família das proteases semelhantes à papaína (família C1) como a CPA, CPB e CPC. No entanto, a análise completa do genoma de *Leishmania major* que os genes codificavam aparentemente sessenta e cinco CPs agrupadas em quatro clãs e treze famílias (segundo a base de dados MEROPS)⁵ (Tabela 2).

Tabela 2. Cisteíno-proteases e inibidores das cisteíno-proteases de *Leishmania*. Nomenclatura por Clans e família⁵.

Clan	Family	Number	Gene	Peptidase/inhibitor	Features
CA	C1	1	<i>CPA</i>	CPA	Cathepsin L-like, lysosomal
	C1	8	<i>CPB</i>	CPB	Cathepsin L-like, lysosomal
	C1	1	<i>CPC</i>	CPC	Cathepsin B-like, lysosomal
	C2	27	–	Contain calpain-like domain	Some calcium-dependent
	C12	2	–	Ubiquitin C-terminal hydrolase	Ubiquitin pathway
	C19	15	–	Ubiquitin hydrolase	Ubiquitin pathway
	C48	1	–	SUMO-like	Ubiquitin pathway
	C51	2	–	D-alanyl-glycyl endopeptidase-like	CHAP domain. Function unknown
	C54	2	<i>ATG4.1</i> <i>ATG4.2</i>	ATG4	Autophagy
	C65	1	–	Otubain	Ubiquitin pathway
CD	C13	1	<i>GPI8</i>	GPI:protein transamidase	GPI protein anchor biosynthesis
	C14	1	<i>MCA5</i>	Metacaspase	Caspase-like protein, function unknown
	C50	1	–	Separase	Thought to control sister chromatid separation during mitosis
CF	C15	1	<i>PGP</i>	Pyroglutamyl-peptidase I	Hydrolyses N-terminal glutamyl residues of proteins
PC(C)	C56	1	<i>PFPI</i>	PfPI	Similar to intracellular protease of <i>Pyrococcus</i> , function unknown
I-	I42	1	<i>ICP</i>	Inhibitor of cysteine peptidases	Inhibits Clan CA, family C1 cysteine peptidases

Estudos realizados demonstraram importantes funções desempenhadas pelas cisteíno-proteases, como a virulência, a manutenção da viabilidade e da morfologia do parasita, invasão do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro e a modulação da resposta imune.

Vários estudos demonstraram que um dos maiores factores de virulência em espécies de *L. mexicana* é a protease CPB⁶. Nesses estudos usaram-se ratos BALB/c

infectados com parasitas de *Leishmania* geneticamente modificados nos genes *CPA*, *CPB* e *CPC* (delecção Δcpa , Δcpb e Δcpc , respectivamente). Os resultados obtidos demonstraram que a capacidade infecciosa do parasita era fortemente diminuída e as lesões causadas eram menores e que a delecção do gene *CPB* afectava a sobrevivência do parasita de uma forma superior comparativamente à delecção dos genes *CPA* e *CPC* ⁶.

Existem ainda evidências de sinergismo entre a actividade das várias CPs em *L. mexicana*. Os parasitas mutantes, com supressão dos genes *CPB* e *CPA* ($\Delta cpb/\Delta cpa$), apresentaram uma actividade infecciosa inferior quando comparados com a ausência de um dos genes isoladamente, indicando a complementaridade da actividade destas enzimas⁵.

A virulência de *L. mexicana* em ratos BALB/c tem sido associada com a capacidade da CPB induzir a produção de Il-4 e uma resposta Th2 (Fig.4). Quando o parasita é geneticamente modificado na forma Δcpb não há produção de Il-4 e conseqüentemente a resposta Th1 desenvolve-se e a lesão desaparece. Quando há re-inserção do gene *CPB*, há o restauro da produção de Il-4 e da virulência do parasita⁵.

O papel da protease CPB de *L. mexicana* na inibição da produção de Il-12 foi também observada em macrófagos e células dendríticas⁵. Este papel foi demonstrado através do uso de amastigotas Δcpb , que demonstraram maior eficiência na inibição da expressão da Il-12 induzida por lipopolissacarídeo. A CPB parece estar envolvida na clivagem do factor nuclear kappa B (NF- κ B) e dos seus inibidores (I κ B α e β), levando à inibição da expressão de interleucinas (Fig.4). Este mecanismo parece ser o responsável pela inibição da expressão de Il-12, pois nem as formas amastigotas Δcpb nem alguns tipos de formas promastigotas (que expressam baixos níveis de CPB) demonstraram ter esta actividade⁶. A influência de CPB de *L. mexicana* na actividade de outros factores de transcrição foi demonstrada, nomeadamente na STAT-1 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), AP-1 e no NF- κ B, impedindo a sua translocação para o núcleo, não havendo assim produção de óxido nítrico (NO) que seria induzido pelo IFN- γ . Nos amastigotas vai haver degradação completa da subunidade p65, enquanto que nos promastigotas, vai haver clivagem da subunidade p65 que passa a subunidade p35⁶. Outro efeito da CPB no balanço da resposta Th ocorre através da clivagem das proteínas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) (Fig.4). Existem evidências de que a CPB de *L. amazonensis* e *L. mexicana* é capaz de clivar proteínas do complexo MHC II dentro do vacúolo parasitóforo, inibindo a apresentação do antígeno. Conseqüentemente, a resposta imunitária do hospedeiro poderá ser particularmente inibida, ou, alternativamente, poderá ser mediada através de outras vias, como MHC I⁵.

Estudos indicam que as proteases CPC desempenham um papel relevante como factor de virulência em *Leishmania*. No entanto, as formas amastigotas de *L. mexicana* com depleção do gene *CPC* (Δcpc) foram aptas para infectarem macrófagos. Adicionalmente, existem evidências de que a CPC contribui para alguma actividade imunoregulatória em *L. chagasi*, sendo exemplo a capacidade para indução da expressão de TGF- β em células humanas⁶.

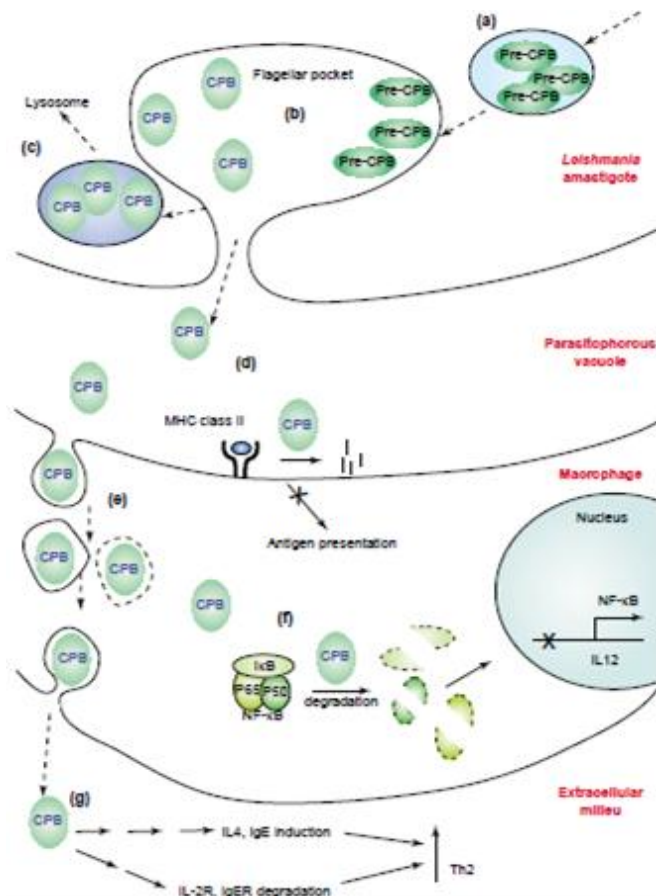


Figura 4. Diagrama esquemático de como CPB de *L. mexicana* pode influenciar a resposta imunitária. **a)** Precursor CPB é transportado até à bolsa flagelar através do lisossoma. **b)** CPB é activada na bolsa flagelar e dentro de vesículas nos amastigotas são transportadas até aos lisossomas, **c)** através da via da bolsa flagelar até ao vacúolo parasitóforo, onde tem sido demonstrado que degrada moléculas de MHC II **e)** CPB degrada NFκB e IκB no citoplasma do macrófago, **f)** modulando a transdução e transcrição de IL-12 no hospedeiro. **g)** CPB tem sido encontrada em abundância no meio extracelular, onde tem sido associada à indução da resposta Th2⁵.

Outra família muito estudada do clã CD, são as caspases, enzimas que desempenham um papel central na apoptose de muitas células de metazoários. Fenómenos de apoptose celular têm sido verificados em *Leishmania* e associados às proteases CPs. No entanto, os genes das caspases (*MCAS*) não estão presentes no genoma, o que confirma que a morte celular de *Leishmania* é caspase-independente. Zangger et al (2002)⁷ propuseram que a

morte celular pode ocorrer via lisossomas, com a ruptura da membrana e liberação de enzimas para o citoplasma, nomeadamente CPs e outras hidrolases. Como consequência e em conjunto com as catepsinas dos macrófagos, os antígenos serão expressos sob a forma de pequenos fragmentos, sendo que a sua apresentação à superfície do macrófago será diminuta. Tudo o que foi referido terá como efeito uma maior sobrevivência dos restantes parasitas de *Leishmania*.

O papel de inibidores endógenos das CPs em *Leishmania* (ICPs) na modulação da resposta imune tem sido também estudado. Os mutantes de *L. mexicana* que sobre-expressam os ICPs levaram à diminuição de anticorpos e à diminuição da produção de Il-4, com aumento dos níveis de IFN- γ . Estes inibidores mostraram ser bons inibidores do clã CA, família C1 CPs, como é o caso da CPB⁶.

7. Metaloprotease GP63 em *Leishmania*

A metaloprotease dependente do zinco de *Leishmania*, denominada de glicoproteína 63 (GP63) ou por leishmanolisina é descrita como o maior antígeno expresso na superfície da forma promastigota das várias espécies (Fig.5), tendo vários substratos como a caseína, gelatina, albumina e fibrinogénio⁸.

A GP63 pertence à classe metzincina, possuindo os membros desta classe um pro-peptídeo N-terminal que inactiva a pro-enzima durante a translação para o núcleo. Posteriormente, durante a maturação é removido, tornando-se a protease activa. GP63 é abundante nas formas promastigotas, existindo em menor quantidade nas formas amastigotas⁸.

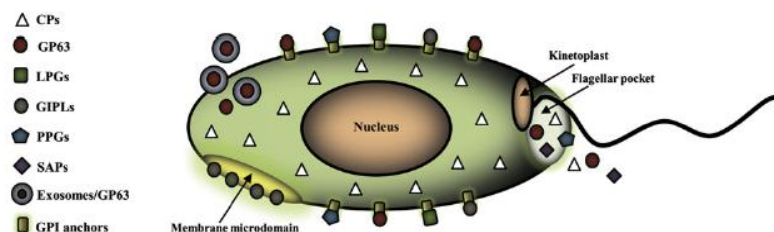


Figura 5. Factores de virulência de *Leishmania*⁸.

Dependendo do estado de maturação do parasita, GP63 desempenha funções diferentes. Em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. major* foi observado que GP63 cliva C3b em IC3b, tornando ineficaz a via do complemento. IC3b pode também actuar como

opsonina, facilitando a interacção do parasita com os macrófagos através de receptores I e 3 do complemento, favorecendo a internacionalização dos promastigotas. Foi também demonstrado que GP63 interage com receptores da fibronectina (FR) aumentando a aderência do parasita aos macrófagos. Foi ainda verificado que a GP63 degrada componentes extracelulares, favorecendo a rápida migração dos promastigotas de *L. mexicana* até à matriz celular do tecido subcutâneo⁸.

7.1. Acção de GP63 na sobrevivência de amastigotas intracelulares de *Leishmania*

Uma vez internacionalizada pelos macrófagos, *Leishmania* sobrevive e multiplica-se sob a forma amastigota dentro dos fagolisossomas. Vários estudos demonstraram que a GP63 tem uma actividade protectora da degradação de *Leishmania* pelo fagolisossoma. Um dos estudos, Seay et al (1996)⁹, verificou que a diminuição da taxa de sobrevivência das estirpes atenuadas estava associada a uma redução de 20-50% na expressão da GP63. Um outro estudo demonstrou que proteínas incorporadas em lipossomas revestidos por GP63 de *L. mexicana* eram protegidas da acção fagocítica de macrófagos⁸. Após a desnaturação da GP63 a acção fagocítica foi observada, corroborando assim a acção protectora de GP63 na fagocitose⁸.

7.2. Alteração da sinalização do macrófago pela acção da GP63

Leishmania é particularmente efectiva na alteração da sinalização dos macrófagos bem como na sinalização antimicrobiana. GP63 está directamente envolvida neste mecanismo de escape.

As primeiras moléculas envolvidas na sinalização do macrófago e afectadas pela presença da GP63 são a MARCKS (*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*) e MRP (*MARCKS related proteins*), ambas substratos de proteino-cinases em diversos tipos de células, incluindo macrófagos.

Uma das acções atribuídas à GP63 é a hidrólise de MARCKS/MRP. Estudos verificaram que macrófagos infectados por *L. major* apresentavam uma expressão anormal de MRPC e que na presença de inibidores de GP63 a degradação de MRP era inexistente⁸.

Proteína cinase (PKC) é uma serina/treonina cinase envolvida na transdução de sinais associados com a proliferação, diferenciação e apoptose celular. Nos macrófagos infectados por *Leishmania*, verificou-se que a PKC é muito afectada sendo responsável pela inibição de agentes antimicrobianos, como espécies reactivas de oxigénio (ROS)⁸.

As vias de sinalização JAK2/STAT1- α , responsáveis pela produção de muitos agentes antimicrobianos, apresentaram-se também bastante alteradas em células infectadas com *Leishmania*. Os estudos demonstraram que um possível mecanismo responsável por esta alteração da via seria a acção da proteína tirosina fosfatase (PTP), SHP-1 (Fig.6). Quando o macrófago é infectado por *Leishmania* há uma rápida activação de SHP-1, activação esta mediada pela GP63. A activação leva a um aumento da interacção entre JAK2 e SHP-1, o que por sua vez leva à inactivação de JAK2 e consequentemente a uma não expressão do IFN- γ . Estudos in vivo utilizando ratos com deficiência em SHP-1, confirmaram que SHP-1 desempenha um importante papel na sobrevivência do parasita dentro do macrófago⁸.

Usando *L. major* deficiente em GP63, evidenciou-se que esta era efectivamente responsável pela activação de três PTPs, SHP-1, PTP1B e TCPTP e que a activação foi mediada através da clivagem da porção c'terminal das PTPs⁸.

Uma outra consequência da GP63 sob a activação de PTP foi a demonstração de que células infectadas com *Leishmania* resistiam à estimulação de lipopolissacarídeo (LPS) devido à interferência com a via de sinalização TLR (*Toll Like Receptor*). SHP-1 rapidamente cliva e inactiva *interleukin-1 receptor-associated kinase 1* (IRAK-1), uma cinase central na via de TLR. Consequentemente, a inactivação de IRAK-1 é reflectida na quase completa incapacidade do LPS estimular a formação de compostos da resposta imune, nomeadamente TNF α , NO e IL-12.

Em adição às JAKs e IRAK-1 cinases, as três maiores proteínas cinases com funções mitogénicas (MAPK; ERK1/2 e SAPK/JNK) são desactivadas pelas PTPs, mas também por Serina/Treonina fosfatases (STR) e *dual specificity fosfatases* (DSPs). Até ao momento tem sido verificado que PTPs inibem a cinase ERK1/2 dos macrófagos infectados por *L. amazonensis* e *L. donovani*⁸. Verificou-se que SHP-1 tem sido responsável pela desfosforilação de ERK1/2 e SAPK/JNK, que ocorre durante a infecção causada por *Leishmania*⁸. Embora não se tenha provado o impacto directo de GP63 na inactivação de MAPK, a sua acção sobre a activação de SHP-1 está mais que provada. De facto, existem evidências de que a cinase JNK é clivada por GP63⁸.

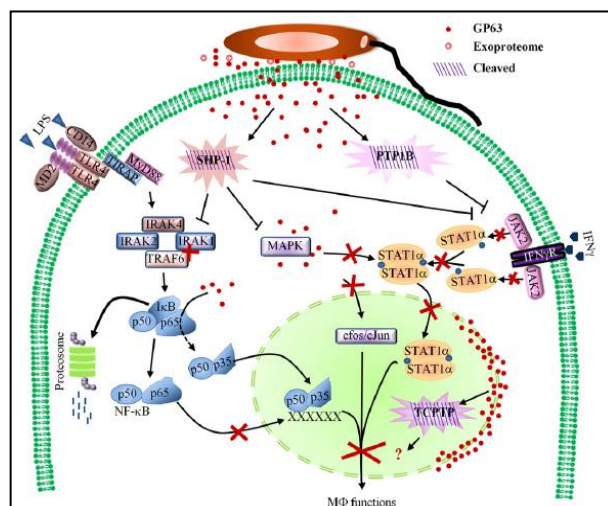


Figura 6. GP63 de *Leishmania* medeia a activação de PTPs⁸.

7.3. Influência de GP63 nos factores de transcrição do macrófago

Vários factores de transcrição estão envolvidos na regulação da expressão de genes do macrófago, como é o caso de NF-κB, STAT1 e AP-1. A família de NF-κB intervém na expressão de genes envolvidos nas muitas funções do macrófago e os membros da família STAT desempenham uma importante função na via de sinalização das citocinas.

Quando há infecção do macrófago por *Leishmania* vai ocorrer a indução da clivagem da sub-unidade NF-κB p65RelA no citoplasma, fazendo com que p35RelA migre para o núcleo onde se liga ao DNA sob a forma de um heterodímero (NF-κBp50). A clivagem, anteriormente mencionada, é dependente da GP63 sendo crítica na indução da expressão de quimocinas.

O factor de transcrição AP-1 é bastante afectado aquando da infecção, havendo alteração na produção de NO, mediada por IFN γ . AP-1 é formado por homodímeros de membros da família de Jun (c-Jun, JunB e JunD) ou por heterodímeros de membros da família de Jun e Fos (c-Fos, FosB, Fra 1 e Fra 2). Um aumento da quantidade de ceramida é responsável pela alteração da via de sinalização PKC e ERK1/2 nos macrófagos, levando à inactivação de AP-1. Outros estudos mostraram que aquando da infecção, ocorre uma alteração da transdução do sinal *upstream* de c-Fos e c-Jun, inibindo ERK, JNK e p38MAP cinases, resultando na redução da translocação de AP-1 para o núcleo⁸. O contributo da GP63 na inactivação de AP-1 e degradação das suas sub-unidades tem sido objecto de vários estudos. A GP63 atinge rapidamente o citoplasma do macrófago e posteriormente alcança o compartimento nuclear onde degrada e cliva c-Jun e as outras sub-unidades constituintes de AP-1, alterando a integridade do factor de transcrição. AP-1 é um factor de transcrição que

está fortemente envolvido na activação da resposta inflamatória inata. A sua rápida inactivação favorece a sobrevivência do parasita, pelo atraso da resposta inflamatória inicial pelos macrófagos e por outras células fagocíticas⁸.

Vários autores propuseram que vesículas excretadas por *Leishmania*, os exossomas, poderiam fundir-se no compartimento fagolisossomal do macrófago e libertarem o seu conteúdo na célula infectada⁸. Os exossomas são vesículas de 40-100nm existindo numa grande variedade de células eucarióticas, incluindo o grupo protozoa. Vários grupos de proteínas têm mostrado serem enriquecidas em exossomas, nomeadamente proteínas da superfície e transmembranares, chaperonas, entre outras. Foi também reportado que os exossomas contêm factores de virulência, como GP63 e CPs e que estes factores poderão “entrar” nos macrófagos através da fusão dos exossomas com a membrana do macrófago. Mimetizando a entrada de promastigotas de *Leishmania* em células do hospedeiro, demonstrou-se que ocorre um aumento rápido (4h) na quantidade de proteínas e exovesículas libertadas aquando do aumento de temperatura (Fig.7)⁹. As exovesículas, contendo exoproteases de *L. mexicana*, induziam uma alteração na via de sinalização do macrófago⁸. Observou-se que o exoproteossoma de *L. mexicana* clivava/activava PTPs e inibia a translocação de factores de transcrição para o núcleo⁸. Observou-se que os exossomas de *L. donovani* inibiam IFN- γ , como também reduziam a expressão de CD80 e HLA-DR em monócitos maduros derivados de DCs⁸.

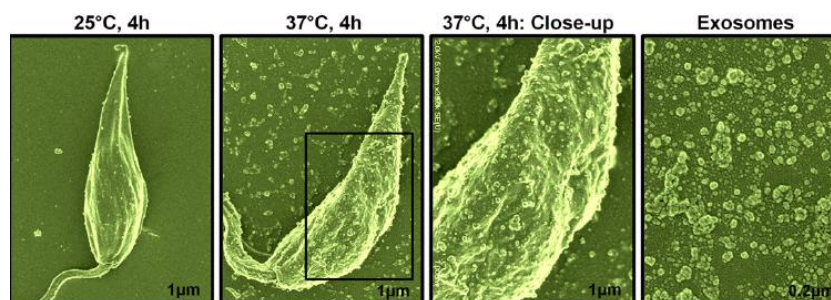


Figura 7. Efeito da temperatura na quantidade de exossomas que recobrem a superfície de *L. mexicana*⁸.

Apesar dos macrófagos serem as primeiras células a serem infectadas pelas formas amastigotas, outras células estão também envolvidas e as suas funções são também muito afectadas pela protease GP63. Demonstrou-se que o IFN- γ produzido por células NK era afectado pela GP63 de *L. major*, tendo um grande impacto no desenvolvimento da resposta Th1. As células NK não são fagocíticas, pelo que GP63 apenas conseguirá entrar através de vesículas de exossomas⁸.

Outros estudos demonstraram haver formas amastigotas nos fibroblastos⁸. A capacidade dos fibroblastos em eliminar parasitas através da produção de NO ou de outros agentes antimicrobianos é baixa. Estas formas podem actuar como reservatórios, favorecendo a persistência de *Leishmania* nas células hospedeiras. Foi reportado que p130CAS e PTP PEST, ambos envolvidos no rearranjo da actina do citoesqueleto, eram clivados tornando-se inactivos para a realização das suas acções regulatórias, tornando assim os fibroblastos num excelente ambiente para as formas amastigotas.

Neutrófilos incubados com GP63 de *L. major* perderam a capacidade quimiotáctica e também a capacidade de produção de ROS⁸.

8. Serino-proteases em *Leishmania*

As serino-proteases são as enzimas mais estudadas da natureza e estão presentes em todos os organismos vivos. São encontradas no interior das células bem como nos seus produtos de secreção. Existem quarenta e cinco famílias de serino-proteases, estando elas agrupadas em treze clãs de ancestrais comuns, por exemplo, o clã B (SB) agrupa famílias que possuam origens comuns com a subtilisina, o clã C (SC) com a carboxipeptidase C, o clã E (SE) com a peptidase A d-ala-d-ala de *Escherichia*².

As serino-proteases estão envolvidas numa grande diversidade de processos fisiológicos essenciais para a sobrevivência de todos os organismos vivos e nos parasitas, de modo especial, estão envolvidas na degradação do tecido conjuntivo do hospedeiro, para facilitar a sua invasão e disseminação; assimilação de aminoácidos e reciclagem de proteínas; na transição de um estágio morfológico para outro; activação de enzimas ou de outras moléculas biologicamente activas².

Estas proteases são expressas tanto em formas promastigotas como em formas amastigotas, mas em localizações de alguma forma distintas. Nas formas promastigotas as serino-proteases estão localizadas predominantemente na bolsa flagelar e em estruturas subcelulares da via endocítica/exocítica (Fig.8). Nos amastigotas, as enzimas foram detectadas não somente em estruturas subcelulares similares às formas promastigotas, como a bolsa flagelar e vesículas citoplasmáticas, mas também nos megassomas (Fig.8). O facto de as serino-proteases se localizarem nos megassomas, onde as cisteíno-proteases também se encontram, indicam que as serino-proteases podem contribuir, em associação com as cisteíno-proteases, na manutenção do ciclo de vida e patogenicidade de *Leishmania*, representando estas proteases um novo alvo molecular no tratamento de *Leishmania*^{2,3}.

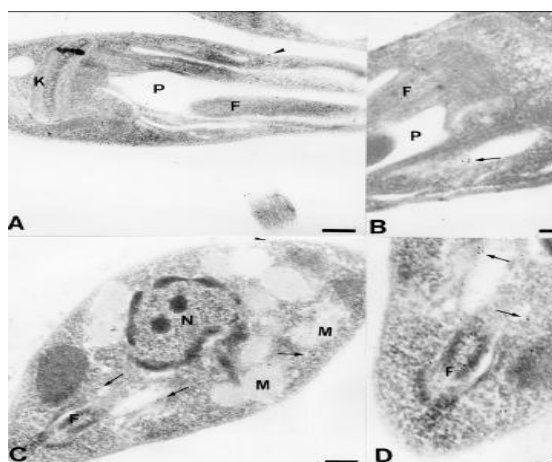


Figura 8. Localização subcelular das serino-proteases de *L. amazonensis*: promastigota (A, B); amastigota (C, D). Bolsa flagelar (P), flagelo (F), cinetoplasto (K), megassoma (M) e núcleo (N) (Silva-Lopez e tal, 2004)³.

Os estudos sobre a importância das serino-proteases em *Leishmania* foram realizados recorrendo-se ao uso de inibidores clássicos deste tipo de proteases e também de um novo inibidor (Kunitz) obtido de uma anêmona, *Stichodactyla helianthus* (ShPI-I), observando-se os efeitos na viabilidade e morfologia do parasita¹⁰.

Os inibidores clássicos utilizados foram N-tosil-fenilalanina clorometil cetona (TPCK), N-tosil-lisina clorometil cetona (TLCK) e benzamidina (Bza). As serino-proteases alvos destes inibidores foram de três tipos: uma serino-protease dimérica de 110 kDa, denominada LSPI; uma protease monomérica de 68 kDa denominada LSPII e uma serino-protease dimérica, denominada LSPIII. Estudos de localização subcelular usando microscopia electrónica (EM) demonstraram que a LSPII estava maioritariamente nos compartimentos intracelulares, enquanto que LSPIII estava localizada nos megassomas, bolsa flagelar e em estruturas morfológicamente similares aos compartimentos envolvidos nas vias endocíticas/exocíticas dos mamíferos¹⁰.

A TPCK e Bza demonstraram ser importantes inibidores das serino-proteases de *L. amazonensis*¹⁰. TPCK, na mesma concentração de TLCK, reduziu a viabilidade do parasita em 63% após 8 horas de incubação e ao fim de 16 e 32 horas a viabilidade do parasita foi reduzida em 82 e 93%, respectivamente. Após incubação com Bza, os efeitos na viabilidade do parasita foram mais pronunciados quando comparados ao TPCK.

As alterações morfológicas induzidas por Bza (10^{-3}M) e TPCK (10^{-4}M) foram estudadas em microscopia electrónica (Fig. 9). As alterações com Bza foram ao nível da região da bolsa flagelar (cerca de 95%), com alterações da membrana e aparecimento de várias protuberâncias. Em relação ao TPCK, as alterações foram semelhantes, mas mais pronunciadas.

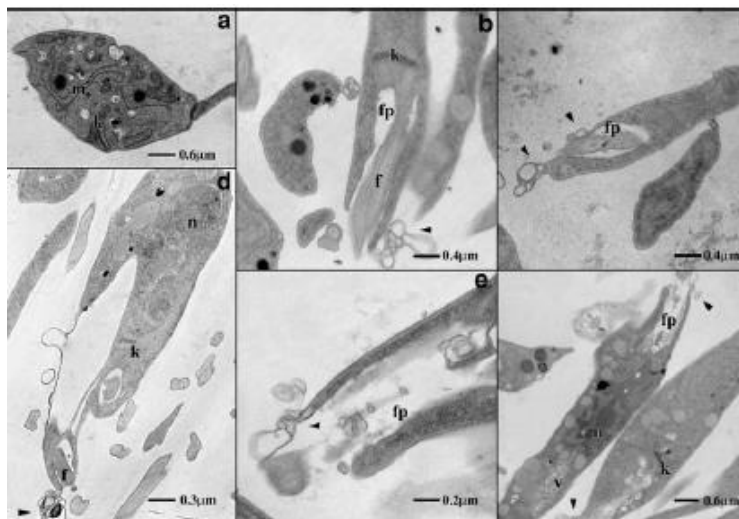


Figura 9. Efeitos da Bza e TPCK nas formas promastigotas de *L. amazonensis*: a) incubação do parasita com meio; b), c) 10^{-3}M de Bza; d), f) 10^{-4}M de TPCK. n (núcleo); m (mitocôndria); f (flagelo); fp (bolsa flagelar); k (cinetoplasto); v (corpo vesicular)¹⁰.

9. Inibidores das proteases

Como já anteriormente mencionado, a leishmaniose é uma patologia que afecta cerca de trezentos e cinquenta milhões de pessoas, prevalecendo em oitenta e oito países, sendo registados cerca de dois milhões de novos casos por ano. Apesar dos números referidos, as terapêuticas existentes são diminutas e com alguns problemas inerentes, como custos elevados, ineficácia das moléculas e toxicidade associada. Como as pessoas mais afectadas por esta patologia vivem em países pobres, com escassos recursos económicos, os investigadores bem como as indústrias farmacêuticas têm pouco interesse no desenvolvimento/procura de novas moléculas com actividade anti-*Leishmania*.

No entanto, nas duas últimas décadas, o desenvolvimento de novas moléculas intensificou-se devido a diversos factores como a sequenciação do genoma de várias espécies de *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis*), aumentando o conhecimento acerca da fisiologia e vias bioquímicas do parasita. Mais ainda, a análise do genoma completo do parasita, fez com que se pudesse compará-lo com o genoma da espécie hospedeira,

identificando-se sequências únicas no genoma do parasita, seleccionando-se como novos alvos potenciais¹¹.

Para que se possa considerar determinada molécula como alvo, ela terá que ter determinadas características: ser essencial numa determinada via biológica; alvo presente no parasita e ausente no hospedeiro; eventualmente a proteína deverá ser indispensável para a sobrevivência do parasita ou vital para o controlo de determinada via biológica³.

As proteases enquadram-se neste conjunto de condições, sendo assim consideradas alvos potenciais, tendo a grande vantagem de existirem anos de análises bioquímicas, incluindo o estudo de substratos, mecanismos de catálise, correlação entre estrutura e função. De facto, muitas considerações já foram feitas acerca da estrutura e funcionamento bioquímico destas enzimas. Mais ainda, inibidores das proteases têm sido correntemente usados como fármacos no tratamento da hipertensão e infecção por HIV, bem como em programas de tratamento da diabetes, cancro e osteoporose¹¹.

Dentro dos vários grupos de proteases que funcionam em *Leishmania* como factores de virulência, existem já inibidores identificados e utilizados como formas de tratamento. Por exemplo, a benzamidina é um inibidor de serino-proteases de *L. amazonensis*, inibindo o crescimento e induzindo alterações morfológicas. Mais inibidores foram identificados e demonstrada a sua eficácia (Tabela 3)¹¹.

Tabela 3. Inibidores de proteases usados nas leishmanioses¹¹.

Protease alvo	Inibidores	<i>Leishmania</i> spp.	Funções
Cisteino-proteases	Cistatina	<i>L. donovani</i>	Induz resposta protectora na leishmaniose visceral
	ICP	<i>L. mexicana</i>	Protege o parasita contra o ambiente hidrolítico do vacúolo parasitóforo do macrófago hospedeiro
	E-64	<i>L. mexicana</i>	Induz resposta IgE
	Leupeptina	<i>L. donovani</i>	Causa apoptose em <i>Leishmania</i>
	Aziridina-2,3-dicarboxilatos	<i>L. major</i>	Induz a morte celular, caracterizada pela redução do potencial transmembranar mitocondrial e aumento da fragmentação do DNA. Aumento

			ainda dos níveis de IL-12 e TNF- α .
	Inibidor da catepsina B (CA074, CLIK-60)	<i>L. mexicana</i>	Supressão da resposta Th1
	Derivado da Tetromicina	<i>L. major</i>	Inibição da catepsina B
Serino-proteases	Benzamidina (Bza)	<i>L. amazonensis</i>	Alterações morfológicas e inibição do crescimento de amastigotas.
	Aprotinina	<i>L. amazonensis</i>	Alterações morfológicas e inibição do crescimento de promastigotas.
	Kunitz	<i>L. major</i>	Inibição da viabilidade do parasita, alterações estruturais em todas as partes do parasita e em último caso, a morte da célula, através da formação de vacúolos de autofagia.
Metaloproteases	Inibidores péptidos	<i>Leishmania spp.</i>	Redução significativa da infecção por <i>Leishmania</i> , bloqueando a actividade proteolítica de GP63
	Inibidores peptidomiméticos das metaloproteases	<i>L. major</i>	Inibição do crescimento celular com inibição da actividade endógena das metaloproteases.

9.1. Inibidores da dipeptidilcarboxipeptidase de *L. donovani* (LdDCP)

O desenvolvimento de novas moléculas com acção anti-*Leishmania* tornou-se numa prioridade. A dipeptidilcarboxipeptidase de *L. donovani* (LdDCP) tem sido caracterizada e estabelecida como um novo alvo molecular no tratamento da leishmaniose¹².

A dipeptidilcarboxipeptidase (DCP) foi primeiramente descrita em *Escherichia coli*, clivando dipéptidos c-terminais de vários péptidos e proteínas. Nos mamíferos esta função é desempenhada pela peptidil dipeptidase A, também conhecida como enzima conversora da angiotensina (ACE). O LdDCP pertence à família M3 das mono-zinco peptidases que clivam *N-benzoyl-L-glicil-histidyl-L-leucine* (Hip-His-Leu, HHL), um substrato de ACE, libertando ácido hipúrico.

Em *Leishmania* a diferenciação da forma promastigota em forma amastigota é acompanhada por um aumento da actividade das proteases, que é sustentada mesmo após o término da diferenciação. Estas proteases actuam numa grande variedade de proteínas,

libertando pequenos péptidos, que posteriormente podem ser processados pela DCP. A LdDCP tem um importante papel no estado de diferenciação do parasita, sendo espectável que tenha também um igual papel, ainda que indirecto, na nutrição e patogenicidade. Verificou-se que o captopril, inibidor da enzima ACE, inibiu a actividade enzimática de LdDCP, bem como a replicação *in vitro* do parasita¹².

Por meio de modelos comparativos baseados na estrutura cristalina da DCP de *E.coli* (EcDCP), foi gerado um modelo de três dimensões da LdDCP.

Para identificação de potenciais moléculas candidatas, com capacidade de se ligarem a LdDCP inibindo-a, aplicou-se um *screening* de aproximação virtual¹². Esta estratégia envolve um *screening* computacional hierarquizado da database do *Central Drug Research Institute* (CDRI), usando a comparação molecular. O inventário de CDRI contém aproximadamente 15 000 moléculas, incluindo estruturas sintéticas e naturais. Esta técnica é entendida como uma aproximação complementar para o *screening* experimental e quando conjugado com estruturas biológicas, pode aumentar a probabilidade de sucesso de descoberta de uma nova molécula.

Realizado o *screening* das 15 000 moléculas, foram identificados quatro com elevada actividade inibitória sobre LdDCP (na ordem da concentração de μM). Destes quatro compostos, três (I, II, III) pertenciam a (2Z,2'Z)-3,3'-(ethane-1,2-diybis(azanediy))bis(1-(4-halopenhenyl))-6-hydroxyhex-2en-1-one), enquanto que o quarto (IV) pertencia à série 3,5-disubstitutedisoxazole. Todos os compostos em análise demonstraram ter um modo competitivo de acção. O composto IV demonstrou ser o inibidor mais potente de LdDCP com constante de inibição (K_i) na ordem dos 20 ηM , menor que a do captopril (35.8 ηM).

Procedeu-se ainda à avaliação da selectividade das moléculas em relação à ACE dos mamíferos. Todos os compostos inibiam a ACE dos mamíferos, no entanto, as K_i foram na ordem dos μM , 1000 vezes maior que as concentrações necessárias para inibir a ACE do parasita. Os resultados demonstraram que os compostos seleccionados exibiam selectividade em relação à ACE do parasita, não tendo uma acção significativa sobre a ACE dos mamíferos¹².

De acordo com o estudo realizado verificou-se que todos os compostos inibiram a multiplicação das formas promastigotas e amastigotas (Tabela 4). O composto IV foi o que exibiu menor valor de concentração inibitória a 50% (IC_{50}) e foi o que apresentou maior índice de segurança (SI)¹².

Tabela 4. Eficácia *in vitro* dos compostos nas formas amastigotas e promastigotas¹².

Compostos	IC ₅₀ (µg/mL)		Índice SI
	Promastigota	Amastigota	
I	21.77	14.29	2.7
II	12.44	8.41	6.2
III	16.02	16.29	4.0
IV	3.17	3.97	11.9

9.2. Kunitz (SHPI-I)

Como já mencionado anteriormente, num dos estudos sobre a função desempenhada pelas serino-proteases, recorreu-se ao uso de inibidores, nomeadamente a um pertencente ao grupo de Kunitz e isolado da anémone do mar *Stichodactyla helianthus* (SHPI-I), com elevado peso molecular. Apesar de SHPI-I inibir outras peptidases, demonstrou ter uma grande especificidade para as serino-proteases¹⁰. Esta afirmação é corroborada pelo baixo valor de K_i obtido, comparando-o com os valores de K_i obtidos com as cisteino e aspártico-proteases. Mais ainda, a grande especificidade demonstrada por SHPI-I para as serino-proteases pode ser explicada pelo facto do inibidor ter uma estrutura molecular semelhante com o inibidor da tripsina pancreática bovina (BPTI) um importante inibidor de serino-protease dos mamíferos. Por fim, SHPI-I foi purificada através de cromatografia de afinidade, usando tripsina, uma conhecida serino-protease pancreática¹⁰.

Quando as formas promastigotas foram incubadas com SHPI-I com concentrações na ordem dos 10^{-6} M e 10^{-5} M verificou-se que a viabilidade do parasita foi fortemente afectada. Na concentração de 10^{-5} M e com 16 horas de incubação a viabilidade do parasita era apenas de 5%. Verificaram-se, ainda, alterações morfológicas na bolsa flagelar, na membrana com a formação de vesículas¹⁰.

10. CONCLUSÃO

O emprego de inibidores de proteases no tratamento das leishmanioses ainda não é uma realidade, como é para o tratamento do Síndrome da Imunodeficiência Humana e para doenças como o enfisema pulmonar, hipertensão arterial, alguns tipos de cânceres e trombose. São necessários estudos mais extensos para se entender melhor o papel que as proteases têm na fisiologia do parasita, bem como na patogênese das leishmanioses.

Inibidores específicos da actividade hidrolítica das proteases, sejam de origem sintética ou natural, constituem uma ferramenta essencial para esse estudo, mas também para o desenvolvimento de novas moléculas que inibam proteases essenciais na fisiologia de *Leishmania*, bem como nos processos patológicos por ela provocados.

É também importante conhecer o quão distintas essas proteases são das proteases do hospedeiro, para que se possa minimizar os vários efeitos adversos provocados pelas terapias mais convencionais.

Nos vários estudos aqui mencionados verificou-se que efectivamente muitos dos inibidores das proteases têm efeitos anti-*Leishmania*. No entanto, é necessário realizar estudos clínicos de modo a perceber-se quais os efeitos que estas moléculas causam no Homem.

II. BIBLIOGRAFIA

1. Melos, J. E. (2012). Sistemas enzimáticos de tripanossomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos. *Rev.Virtual Quim.* , 4, 374-392.
2. Silva-López, R. E. (2010). Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. *Quim.Nova* , 1541-1548.
3. Silva-López, R. E. (2012). *Immunocytochemistry of Proteases in the Study of Leishmania Physiology and Host-Parasite Interaction*. Intech.
4. <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/publications.html> (acedido a 16 de Maio de 2014).
5. Jeremy C Mottram, G. H. (2004). Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Current Opinion in Microbiology* , 7, 375-381.
6. Mariana Silva-Almeida, B. A.-G. (2012). Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasites & Vectors* , 5, 1-10.
7. Zangger H, M. J. (2000). Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: Programmed cell death or necrosis? *Cell death Differ* , 1126-1139.
8. Martin Olivier, V. D. (2012). *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *14*, 1377-1389.
9. M.B.Seay, P. G. (1996). Surface Zn proteinase as a molecule for defense of *Leshmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect.Immun* , 64, 5129-5137.
10. E.E.Silva Lopez, J.-D. M.-D.-S. (2007). Effects of serine protease inhibitors on viability and morphology of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* promastigotes. *101*, 1627-1635.
11. Phartha Das, M. N. (2013). Protease Inhibitors in potencial Drug Development for Leishmaniasis. *Idian Journal of Biochemistry & Biophysics* , 50, 363-376.
12. Sonali Gangwar, M. S. (2012). Identification of Novel Inhibitors of Dipeptidylcarboxypepidase of *Leishmania donovani* via Ligand-Based Virtual. *Chem Biol Drug Des*, 79, 149-156.