

PROTEASES DE *Leishmania*: NOVOS ALVOS PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

Raquel Elisa da Silva-López

Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, 21045-900 Rio de Janeiro - RJ, Brasil

Recebido em 7/6/09; aceito em 22/3/10; publicado na web em 29/6/10

Leishmania PROTEASES: NEW TARGETS FOR RATIONAL DRUG DEVELOPMENT. *Leishmania* causes tegumental and visceral diseases called leishmaniasis. Disease control is possible interrupting the transmission cycle, but HIV co-infection, chemotherapy toxicity and lack of a vaccine are paramount difficulties. So, is necessary to study new *Leishmania* molecules and investigate the possibility to develop rational drugs using these molecules as targets. *Leishmania* express many peptidases during their life, and cysteine are the most abundant protease and many inhibitors were developed but failed to kill parasites. On the other hand, inhibitors of serine proteases killed promastigotes, indicating the possibility of these enzymes to be important targets in the development of anti-*Leishmania* drugs.

Keywords: proteases; *Leishmania*; chemotherapy.

INTRODUÇÃO

Protozoários do gênero *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 endêmicas em 88 países com estimativa de 12 milhões de casos no mundo.¹ Em teoria, seu controle é possível pela interrupção do ciclo de transmissão da *Leishmania*. A utilização de inseticidas, a proteção individual, a eliminação de animais domésticos infectados, a detecção e o tratamento precoce de casos humanos representam algumas das estratégias usadas para prevenir a transmissão. Entretanto, as dificuldades no controle se devem à grande diversidade biológica dos parasitos; à existência de muitas espécies de vetores e de mamíferos que podem atuar como fontes de infecção; aos fatores sócio-econômicos das populações afetadas; às diferentes formas clínicas da doença, incluindo aquelas formas graves e resistentes à quimioterapia; medicamentos de alto custo e com grande toxicidade para o hospedeiro e, ainda, à inexistência de uma vacina eficaz.² As investigações sobre controle e tratamento das leishmanioses devem ser metas prioritárias na saúde pública, pois tem sido observado o aumento do número de casos da doença, a disseminação do parasito em bancos de sangue e sua coinfeção em pacientes com HIV.³ Logo, é necessário que sejam identificadas novas moléculas na *Leishmania* para melhor compreender sua interação com os hospedeiros, e investigar a possibilidade do emprego destas moléculas como alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. As proteases de parasitos têm sido bastante estudadas, pois participam da invasão ao hospedeiro, da assimilação dos aminoácidos como fonte nutricional ou para síntese de substâncias orgânicas, no metabolismo de proteínas ou peptídeos biologicamente ativos, na diferenciação e no escape ao sistema imune do hospedeiro, ou ainda, na resistência do parasito à terapia medicamentosa.⁴

ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Tradicionalmente as proteases ou peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas ou peptídeos, liberando peptídeos de tamanho variável ou aminoácidos livres. Na nomenclatura internacional de classificação de enzimas

(EC), as peptidases pertencem à classe 3 e subclasse 3. 4, que ainda está dividida em dois grandes grupos: as exo e as endopeptidases. As exopeptidases clivam ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas e podem ser denominadas de aminopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente. As aminopeptidases atuam nas extremidades aminoterminais, liberando um simples resíduo de aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo e são, respectivamente, denominadas de aminopeptidases, dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases. As carboxipeptidases que liberam um dipeptídeo são denominadas de peptidil-peptidases. Já as omega peptidases são exopeptidases que removem resíduos terminais que são substituídos, ciclizados ou unidos por ligações isopeptídicas. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, e as proximidades dos grupos N ou C terminais têm um efeito negativo na atividade enzimática. As oligopeptidases são endopeptidases que atuam em oligopeptídeos ou em substratos menores que proteínas.⁵

A classificação quanto à natureza química do sítio catalítico aponta para quatro principais tipos de peptidases: as serino-proteases, as cisteíno-proteases e as aspártico-proteases que possuem, respectivamente, resíduo de aminoácido serina, cisteína e ácido aspártico no sítio ativo, que estão envolvidos na catálise enzimática. Existem ainda as metaloproteases que utilizam um íon metálico para atividade catalítica.⁶ Os inibidores específicos são ferramentas valiosas para a identificação destes principais tipos de peptidases. Em relação às serino-proteases, o inibidor mais específico é o fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), para as cisteínas proteinases, o L-3-carboxi-*trans*-2,3-epoxipropil-leucilamido (4-guanidino) butano (E-64); para as aspártico-proteases o inibidor de escolha é a pepstatina e para as metaloproteases a 1,10-fenantroline ou o etilenodiaminotetracético (EDTA). Algumas enzimas apresentam variações no padrão de inibição como, por exemplo, existem serino-proteases que não são inibidas fortemente por PMSF, mas sim por outros inibidores de específicos de serino-proteases como *N*-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) ou *N*-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK).⁷ Estas variações podem indicar que são membros de famílias evolucionárias diferentes e embora apresentem estruturas pouco semelhantes, utilizam-se do mesmo tipo de mecanismo catalítico. O mecanismo mais comum de clivagem das ligações peptídicas pelas proteases de diferentes classes é o ataque nucleofílico da ligação carbono-oxigênio assistido pela doação de um próton ao nitrogênio da ligação peptídica. Determina-

Tabela 1. Principais tipos de proteases. Adaptada da ref. 7

Classes de proteases	Resíduos catalíticos no sítio ativo	Faixa de pH ótimo	Exemplos mais típicos	Exemplos de inibidores específicos
Serino-proteases	Ser, Asp, His	7,0 – 11,0	Trypsina, quimi tripsina, fatores da coagulação e do complemento	Aprotinina, Benzamidina, Leupeptina, TPCK ^a , TLCK ^b , PMSF, SBTI ^c
Cisteíno-proteases	Cys, Asp, His	4,0 – 5,5	Papaína	E-64
Aspártico-proteases	Asp e Asp	1,0 – 3,0	Pepsina, HIV1-protease	Pepstatina
Metaloproteases	metal	7,0 – 9,0	Colagenases	Amastatina, EDTA, 1-10 fenatrolina

^aTLCK- *N*-tosil-lisil clorometil cetona; ^bTPCK, *N*-tosil-fenilalanil clorometil cetona; ^cSBTI, Inibidor de tripsina da soja.

dos aminoácidos desempenham a função de agentes nucleofílicos, enquanto que outros, de doadores de prótons. Cada classe de proteases tem seu conjunto particular de aminoácidos catalíticos.^{5,6,8} As proteases podem também ser classificadas de acordo com a faixa de pH ótimo na qual atuam (Tabela 1). As aspártico-proteases atuam na faixa de pH ácido, as cisteína na faixa de pH levemente ácido, as metaloproteases em pH neutro a básico; já as serino-proteases atuam na faixa de pH alcalino. A dependência do pH pode indicar o compartimento celular no qual a proteinase atuará.^{7,8}

A proteólise é um mecanismo muito comum em todas as células e pode ser dividida em duas categorias distintas: proteólise limitada - na qual são clivadas apenas uma ligação peptídica ou um número limitado delas numa proteína específica e, proteólise não limitada - que basicamente compreende a completa degradação da proteína alvo através da hidrólise de múltiplas ligações peptídicas. Enquanto que a proteólise não limitada tem por objetivo a completa eliminação de uma proteína para regular seu níveis intracelulares, a proteólise limitada se presta a funções regulatórias, não destrói o substrato, mas modifica suas propriedades e funções biológicas⁸ e, portanto, a hidrólise das ligações peptídicas media funções essenciais na vida de qualquer organismo vivo.

Os principais sítios celulares de proteólise são o citoplasma e os lisossomas, mas também podem 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 que proteínas extracelulares podem ser degradadas nos lisossomas por heterofagia.⁹ Os lisossomas são organelas vesiculares e possuem uma grande variedade de enzimas hidrolíticas capazes de hidrolisar proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos e outros substratos. Uma grande variedade de endoproteases denominadas de catepsinas e outras exopeptidases lisossomais são ativas em valores de pH ácidos.¹⁰ A proteólise não-lisossomal, como mencionado anteriormente, 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. O resultado produz uma modificação pós-traducional na proteína alvo, que é poliubiquitinada. Uma vez que esta cadeia é formada, a proteína alvo é degradada no citosol por um complexo multicatalítico de proteases de alto peso molecular, os proteasomas, (~1000 kDa), composto por pelo menos 24 cadeias polipeptídicas arranjadas em uma estrutura cilíndrica.¹¹ Possui principalmente proteases neutras e corresponde a 1% da proteína celular. É encontrado no núcleo e no citoplasma de todas as células eucarióticas. Estas partículas possuem três ou quatro diferentes atividades peptidásicas que clivam após aminoácidos básicos, hidrofóbicos ou ácidos.¹² É um sistema proteolítico dependente de ATP e possui coeficiente de sedimentação de 26S, proteassoma 26S, que é formado por um núcleo catalítico, no formato de um cilindro oco, o proteassoma 20S e uma porção 19S

onde se localizam as ATPases responsáveis pelo desenovelamento 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 ao qual está ligada para a degradação (Figura 1).^{11,12}

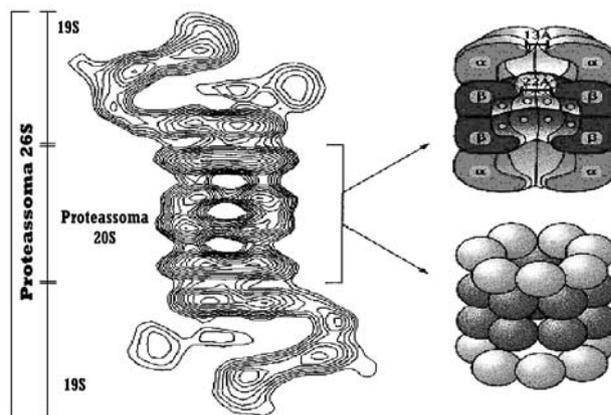


Figura 1. Estrutura do proteassoma 26S, constituído por um complexo catalítico central 20S, estabilizado em suas duas extremidades laterais a complexos regulatórios 19S. O complexo 20S é formado por 2 anéis α e 2 anéis β na sequência $\alpha\beta\beta\alpha$, cada um formado por 7 subunidades distintas, sendo os anéis α estruturais e os β catalíticos. Diferentes subunidades β realizam diferentes clivagens e as subunidades α estabilizam a ligação ao complexo 19S. Este tem formato de tubo, com duas entradas nas extremidades 19S, um subcomplexo 19S que ancora a proteína poliubiquitinada, e se liga à superfície de 20S, usando energia para desdobrar a proteína e preparando o canal que leva à câmara proteolítica de 20S. Adaptada das refs. 11 e 12

A *Leishmania*

Protozoários do gênero *Leishmania* apresentam duas formas durante o seu ciclo evolutivo, as amastigotas que não possuem flagelo livre e são parasitos intracelulares obrigatórios preferencialmente do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros vertebrados, onde se dividem por divisão binária simples e nas formas flageladas promastigotas que são encontradas no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados (Figura 5). Em microscopia ótica, as amastigotas são corpos ovais ou arredondados e seu cinetoplasto localiza-se adjacente ao núcleo e ao flagelo, onde é encontrado o DNA mitocondrial.¹³ A microscopia eletrônica mostra um flagelo rudimentar circundado pela bolsa flagelar. Já as promastigotas possuem o cinetoplasto anteriormente à porção livre do flagelo, que tem o mesmo comprimento do corpo. Outras organelas peculiares em tripanossomatídeos são os glicosomas e os megasomas, que são encontradas em ambas as formas. Os glicosomas compartimentalizam as enzimas da via glicolítica, enquanto que em eucariotos normalmente estão localizados no citoplasma.¹³ Os megasomas são corpúsculos arredondados com pH ácido onde estão localizadas, dentre outras enzimas, as cisteíno-proteases e são abundantes nas formas amastigotas. Estes parasitos pertencem à ordem *Kinetoplastida*, família

Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. As *Leishmanias* diferem nos padrões de desenvolvimento nos hospedeiros invertebrados naturais, o que foi usado de base para a revisão proposta por Lainson e Shaw, permitindo a divisão do gênero *Leishmania* em dois grupos: o subgênero *Viannia* e o subgênero *Leishmania*. As principais espécies do subgênero *Viannia* estão distribuídas apenas no Novo Mundo e são *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. colombiensis*, *L. equatorensis*. Já as espécies do subgênero *Leishmania* distribuídas no Novo Mundo são *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. chagasi*, *L. venezuelensis*, *L. pifanoi*, *L. hertigi*, *L. enriettii*, *L. deanei*, *L. aristidei*, *L. garnhami*, *L. forattinii*, e as espécies do Velho Mundo são *L. donovani*, *L. tropica*, *L. infantum*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. arabica* e *L. turanica*.¹⁴

A diferenciação entre as várias espécies de *Leishmania* dentro de um subgênero inclui a morfologia na microscopia ótica e eletrônica, o comportamento nos hospedeiros, a identificação tanto por anticorpos monoclonais como por isoenzimas e a análise de DNA.¹⁴ Os hospedeiros invertebrados parecem estar limitados estritamente a insetos hematófagos. Os dípteros do gênero *Lutzomya* são os vetores de transmissão de *Leishmanias* nas Américas e os dípteros do gênero *Phlebotomus* estão envolvidos com a transmissão no Velho Mundo. Os hospedeiros vertebrados pertencem a uma grande variedade de mamíferos. Mais de 20 espécies de *Leishmania* têm sido identificadas como causadoras de doenças em humanos e cada uma apresenta fontes de infecção específicas.¹³

A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do vetor pica um vertebrado infectado durante o repasto sanguíneo e, juntamente com o sangue, ingere macrófagos parasitados. Durante o trajeto pelo trato digestivo, os macrófagos se rompem liberando as amastigotas que se transformam em promastigotas, multiplicam-se ainda no sangue ingerido que é envolto pela membrana peritrófica secretada pelas células do estômago do inseto. Após a digestão do sangue, a membrana peritrófica se rompe e as formas promastigotas ficam livres, dividem-se intensamente e transformam-se em promastigotas metacíclicas sem a capacidade de divisão binária, migrando então para a probóscida do inseto. Com a probóscida bloqueada pelas *Leishmanias*, o inseto tem dificuldade de se alimentar e, quando pica, regurgita os parasitos para o interior da pele do hospedeiro vertebrado, inoculando-os no local da picada, ocorrendo assim a transmissão. Os flagelados inoculados são fagocitados por macrófagos teciduais do hospedeiro formando, assim, o vacúolo parasitóforo. Rapidamente os promastigotas diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se no interior destes vacúolos, até que o macrófago se rompe, liberando amastigotas no tecido, sendo novamente fagocitadas, iniciando no local um novo ciclo intracelular e causando, assim, as leishmanioses.¹⁶

AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses afetam 12 milhões de pessoas no mundo e estão distribuídas em 88 países, dentre os quais, Itália e Espanha. A incidência anual mundial de novos casos é de cerca de 2 milhões, sendo 1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea (LC) e 500 mil da leishmaniose visceral (LV) e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de casos de leishmaniose não relatados é aproximadamente 5 vezes maior do que os números oficiais.¹ As leishmanioses humanas constituem um complexo de enfermidades que acometem vísceras e pele, apresentando amplo espectro clínico e podem ser classificadas em visceral e tegumentar. São causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* e a maioria das infecções humanas está relacionada com hábitos e atividades de indivíduos que exploram ou que habitam matas ou florestas.³ Recentemente tem ocorrido um aumento significativo dos casos de leishmaniose em áreas urbanas e peri-urbanas das grandes cidades do Brasil.¹⁷

Leishmaniose tegumentar

A leishmaniose tegumentar (LT) pode manifestar-se em três formas de expressão clínica: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Figura 2). 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. panamensis*, *L. guyanensis*).¹⁸ No Brasil, as principais espécies que causam a leishmaniose tegumentar são *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*.¹⁹ Surto endêmico têm ocorrido quando grandes áreas de floresta são desmatadas ou quando os indivíduos entram nas áreas endêmicas. O espectro da doença varia de uma úlcera cutânea simples e localizada na LC (Figura 2A) e nódulos disseminados na LCD (Figura 2B) ao envolvimento mucocutâneo como na LMC (Figura 2D) e até mesmo ao envolvimento visceral (Figura 2C). Na LC localizada, a lesão inicial aparece geralmente de 2 a 8 semanas após a picada do inseto e progride até uma úlcera que pode persistir de meses até anos.²⁰ A LC do Velho Mundo é frequentemente causada por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* e ocorre nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia menor, na Bacia do Mediterrâneo, Índia, China e África. A lesão clássica é única, crônica e ulcerativa.²⁰ A LC pode evoluir para LCD e começa tipicamente como pápulas localizadas e não ulceradas e as amastigotas disseminam-se pela pele e produzem nódulos cutâneos na face e extremidades. É uma forma rara, variante anérgica da LC e, no Brasil, tem sido associada com as infecções causadas por *L. amazonensis*. A doença tem progressão lenta e pode persistir por toda a vida do hospedeiro.²¹ Na LMC, lesões mucosas desfigurantes do nariz, boca, faringe e laringe, podem aparecer de meses a anos após a cura de úlceras cutâneas primárias. As espécies de *Leishmania* geralmente envolvidas são *L. brasiliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*. A LMC pode desenvolver lesões mutilantes com perda de nariz, mandíbula e parte da face. Tem sido reportado que de 8 a 16% os portadores de LMC não exibem prévia doença cutânea.¹⁸

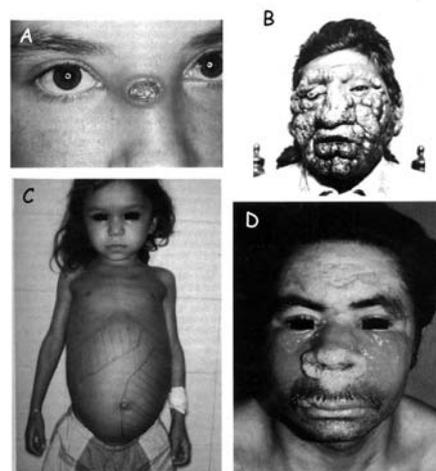


Figura 2. Documentação das formas clínicas da leishmaniose humana: leishmaniose cutânea (A), leishmaniose cutânea difusa (B), leishmaniose visceral (C) - nota-se a hepatoesplenomegalia como delineado e leishmaniose mucocutânea (D) - nota-se a destruição do nariz, septo nasal e lábios. Adaptada das refs. 20 e 23

Leishmaniose visceral

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. Ocasionalmente, espécies causadoras da LC (*L. amazonensis*, *L. mexicana* e *L. major*) são isoladas em pacientes com a forma visceral clássica. Os reservatórios para *L. chagasi* incluem cães, raposas e humanos.²² Nesta forma da doença, ocorre o envolvimento generalizado do sistema retículo endotelial (Figura 2C). Outro extremo são indivíduos assintomáticos ou com infecções relativamente leves que resolvem a infecção sem tratamento.²³ Após o reestabelecimento da LV, podem aparecer lesões de pele crônicas denominadas de leishmaniose dermal pós-calazar (LDPK), que se apresenta como pápulas ao redor da boca e eventualmente se espalha por grandes áreas do corpo.²⁴

A coinfeção de *Leishmania*/HIV é considerada uma nova e preocupante doença emergente e apresenta importantes implicações clínicas, diagnósticas, quimioterapêuticas e epidemiológicas.³ A grande maioria dos casos de coinfeção com HIV é observada em portadores de LV e em usuários de drogas injetáveis nos países da Bacia Mediterrânea e África.^{1,3,25} A infecção com *Leishmania* aumenta a replicação viral em soropositivos e leva a uma ativação da resposta imune do tipo Th2 com aumento das interleucinas 4, 6 e 10, produzindo uma imunodeficiência cumulativa.²⁵ Em indivíduos HIV positivos, o tratamento para leishmaniose geralmente falha, devido à imunodeficiência e a grande abundância de parasitos no trato digestivo, pele, pulmões e cérebro. Dentre as infecções oportunistas que acometem os portadores do HIV, a coinfeção com *Leishmania* é considerada como a que evolui mais rapidamente para casos fatais.²⁶ No nordeste do Brasil é observada a transmissão do parasito entre indivíduos, através de sangue contaminado, em bancos de sangue e unidades hospitalares.²²

TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DAS LEISHMANIOSES

Os antimoniais pentavalentes (Sb5+) têm sido utilizados no tratamento das leishmanioses humanas desde o início do século XX e continuam sendo as drogas de escolha para a doença cutânea e visceral.²⁷ Foram usados pela primeira vez pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, na sua forma trivalente (Sb3+), o chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio), obtendo bastante sucesso, pois naquela época 90% dos casos evoluíam para o óbito por não haver tratamento adequado.²⁸ No entanto, esta formulação apresentava grande toxicidade para o hospedeiro, além de sua difícil administração. Em 1937, o estibogluconato de sódio (**A**, Pentostan[®]), um derivado do ácido estibônico complexado ao Sb5+) foi utilizado, também por via intramuscular, reduzindo os efeitos colaterais e a toxicidade e no Brasil, atualmente, o fármaco utilizado é o antimoníato de meglumina (**B**, Glucantime[®])²⁹ (Figura 3). O mecanismo de ação destes compostos é a inibição das enzimas da via glicolítica e da β -oxidação em amastigotas, mas sendo um metal pesado, acredita-se que interfira em outras vias metabólicas da *Leishmania*, bem como com a do hospedeiro.^{27,28} Também foi observado que são capazes de inibir a topoisomerase II de *L. panamensis* e de *L. donovani*.³⁰ Além das dificuldades de administração e do alto custo, os antimoniais pentavalentes apresentam importantes efeitos colaterais que incluem mialgia, artralgia, aumento sérico das enzimas hepáticas, pancreatite, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, pancitopenia, insuficiência renal reversível e cardiotoxicidade.²⁹ A cura clínica não é acompanhada de cura parasitológica, pois têm sido observados parasitos na cicatriz de indivíduos clinicamente curados após tratamento.³¹

A anfotericina B (**C**), a pentamidina (**D**), o miltefosine (**E**) e a paramomicina (**F**) (Figura 3) têm sido as drogas alternativas nos casos de resistência aos antimoniais, mas não possuem um índice terapêutico tão favorável e também apresentam importantes reações adversas. A anfotericina B é um antibiótico poliênico que possui

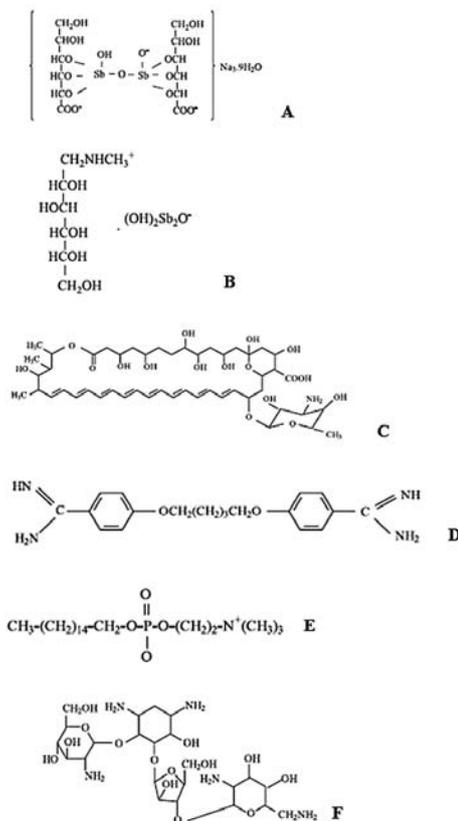


Figura 3. Estrutura dos principais quimioterápicos usados no tratamento das leishmanioses. 1- Estibogluconato de sódio (Pentostan[®]), 2- Antimoníato de meglumina (Glucantime[®]), 3- Anfotericina B (Fungizone[®]), 4- Isetionato de pentamidina (Lomidina[®]), 5- Miltefosine e 6- Paramomicina⁷¹

atividade antifúngica e leishmanicida. A *Leishmania* e os fungos possuem ergosterol como principal esteroide nas membranas plasmáticas, logo, a anfotericina liga-se ao ergosterol, causando alteração da permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasito.³² Seu uso clínico é recomendado para os casos graves de leishmaniose não responsiva ao tratamento convencional e é bastante restrito devido aos inúmeros efeitos tóxicos que apresenta. Sua administração em lipossomas é particularmente útil no tratamento de LV, pois direciona a droga para os macrófagos infectados do fígado, baço e medula óssea, aumentando assim o índice terapêutico, embora seu custo ainda seja muito alto.³² A pentamidina é uma diamidina aromática, que apresenta importante atividade antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral.¹⁷ Apresenta bons resultados em pacientes com leishmaniose e imunodepressão. As diamidinas interferem na síntese de poliaminas, inibindo a utilização de *S*-adenosil-L metionina por inibir enzimas como a ornitina descarboxilase e a espermidina sintetase, impedindo, assim, a síntese de moléculas importantes para a manutenção da vida do parasita. Além disso, ligam-se em regiões ricas em sequências A-T do DNA.³² O miltefosine é um outro antibiótico com estrutura de alquilfosfocolina, que estimula a cascata das caspases, induzindo a apoptose e a morte do parasito.³³ É apontado como a melhor alternativa para o tratamento da LV e para pacientes imunodeprimidos, uma vez que o fármaco pode ser administrado por via oral. Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* mostraram a eficácia deste fármaco para o tratamento de infecções por *L. donovani*.³⁴ A paramomicina, um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus*, inibe a síntese proteica, pela ligação às proteínas ribossômicas. Ela difere da neomicina B pela substituição da hidroxila por amina e possui um espectro de atividade parasitária, que não é apresentada por outro aminoglicosídeo. A administração

oral de paromomicina é recomendada para a LV. Entretanto, pode apresentar nefro e ototoxicidade, afetando também o controle motor e do equilíbrio.³⁵

Como mencionado anteriormente, existem semelhanças no metabolismo de esteróis entre fungos e *Leishmania*, os quais diferem significativamente do metabolismo dos mamíferos hospedeiros.³⁵ Por este motivo, foi sugerida a utilização de antifúngicos no tratamento das leishmanioses. As diferentes espécies de *Leishmania* possuem diferentes graus de susceptibilidade aos inibidores da síntese dos esteróis como, por exemplo, cetoconazol e itraconazol oral, que são efetivos nos tratamentos das lesões causadas por *L. mexicana* e *L. major*; e o clotrimazol pode ser efetivo quando usado topicamente. Já a *L. brasiliensis* é resistente ao cetoconazol e susceptível quando ele é usado em combinação com terbinafina.^{35,36} O alopurinol, um análogo estrutural da hipoxantina, é hidrolizado a alopurinol ribose, que é então incorporado nos ácidos nucleicos da *Leishmania*, interferindo assim na síntese de proteínas do parasito. Sua administração oral tem sido reportada como alternativa terapêutica para as leishmanioses do Novo Mundo, mas os resultados terapêuticos ainda são muito ambíguos.³⁷

Tais fármacos apresentam uma série de problemas, que incluem resistência do parasito e indução de efeitos colaterais, que limitam a utilização e, principalmente, a eficácia. Além disso, todos os fármacos que estão disponíveis atualmente são de administração parenteral, o que exige colaboração do paciente e infelizmente, muitos abandonam o tratamento, fator que favorece o aparecimento de cepas resistentes.³⁸ Com o objetivo de desenvolver drogas mais eficazes, de baixo custo e com reações adversas menos agressivas para o hospedeiro, novos alvos quimioterápicos da *Leishmania* têm sido investigados e novas abordagens para o desenvolvimento de fármacos devem ser consideradas.

PROTEASES DE *Leishmania*

O estudo das proteases de micro-organismos tem demonstrado que estas enzimas desempenham importantes funções na fisiologia destes organismos, bem como na patologia por eles causada e que a inibição destas enzimas por inibidores específicos pode constituir uma importante estratégia para a produção de potentes agentes antimicrobianos.³⁹ O exemplo mais notável é o desenvolvimento de inibidores baseados na estrutura de uma aspártico-protease de HIV, que são eficientes inibidores da replicação viral³⁶ e têm sido utilizados clinicamente como medicamentos contra AIDS.^{40,41}

A atividade proteolítica em parasitos do gênero *Leishmania* foi primeiramente reportada por Pupkins e Coombs⁴² em promastigotas de *Leishmania mexicana* e as cisteíno-proteases foram as principais proteases detectadas, embora também tenham sido observadas atividades proteolíticas em frações sensíveis a inibidores de outras classes de proteases como pepstatina (inibidor de aspártico-protease), 1,10 fenantrolina (inibidor de metaloprotease), antipaina, leupeptina e TLCK que são inibidores de serino-proteases.

As cisteíno-proteases são as enzimas proteolíticas mais investigadas em *Leishmania* e muitas delas possuem suas sequências depositadas em bancos de dados e seus genes isolados. São enzimas que pertencem ao Clã A e superfamília das proteases semelhantes à papaína. A papaína é uma cisteíno-protease com cadeia polipeptídica única com 212 aminoácidos e três pontes de enxofre, isolada no mamão papaya – *Carica papaya*. As cisteíno-proteases distribuem-se ainda em entre a família C1 (semelhantes à papaína) e subfamílias das catepsinas L e B, e também na família C2 (semelhantes às calpains).⁴³ As cisteíno-proteases de *Leishmania*, ocorrem em grandes quantidades em volumosos lisossomas, denominados de megassomas, que são particularmente abundantes em amastigotas, mas podem ser

encontradas em outros compartimentos intracelulares.⁴⁴ Estas enzimas desempenham importantes funções na *Leishmania* como virulência, manutenção da viabilidade e da morfologia do parasito, invasão do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro e a modulação de sua resposta imune,^{45,46} constituindo assim atrativos alvos quimioterápicos no tratamento das leishmanioses. Estudos baseados no desenho de inibidores de cisteíno-proteases por modelagem molecular dos sítios ativos das enzimas catepsinas L e B de *Leishmania* têm sido desenvolvidos.^{45,46} Infelizmente a inibição destas enzimas por inibidores específicos em modelos murinos tem demonstrado grande toxicidade para as células hospedeiras. Além disso, é necessário um inibidor de cisteíno-protease com amplo espectro de ação, visto que existem três famílias de genes que codificam para pelo menos seis tipos de catepsinas diferentes de *Leishmania* e, a inibição de apenas um tipo de cisteíno-protease é insuficiente para bloquear a replicação do parasito.^{45,47,48}

Leishmanolisina ou glicoproteína de 63 kDa (gp63), uma metaloprotease zinco-dependente, é uma das principais moléculas de superfície presente em todas as espécies de *Leishmania*, especialmente em promastigotas, e representa mais de 1% da proteína total do parasito. Esta enzima cliva o componente C3b do Sistema Complemento em C3bi, facilitando assim a fixação da *Leishmania* ao macrófago⁴⁹ e a ligação às células *natural killer* (células NK) inibindo sua proliferação e facilitando assim a infecção parasitária.⁵⁰ Devido à grande importância da gp63 na virulência da *Leishmania*, postulou-se que a inibição da sua atividade poderia interferir no curso da infecção. Com isso, inibidores de metaloproteases foram utilizados em culturas de promastigotas de *L. major*, mas tais compostos não demonstraram o efeito citotóxico esperado.⁵¹ Além disso, a gp63 tem sido empregada em vários estudos de imunização experimental contra diferentes espécies de *Leishmania* e tem conferido proteção efetiva em camundongos suscetíveis.⁵² Entretanto, outros animais também susceptíveis à infecção por *Leishmania*, como algumas espécies de cães e macacos, não desenvolvem resposta imune protetora quando estimulados por diferentes formulações contendo leishmanolisina.^{53,54} Estudos continuam sendo conduzidos para estudar a melhor formulação e administração da gp63 que confira mais imunoproteção, e sua possível utilização em vacinas contra leishmanioses.

A análise do genoma de *L. major* (consulte o MEROPS – <http://merops.sanger.ac.uk> que é uma base de dados de sequências de DNA e de aminoácidos de proteases e de seus respectivos inibidores peptídicos) previu que este parasito possuía aproximadamente 154 peptidases (incluindo aspártico, cisteíno, metalo e serino-proteases), representando aproximadamente 1,8% do seu genoma (Figura 4). Estes achados também foram confirmados quando os genomas de *L. infantum* e *L. braziliensis* foram completamente sequenciados, mostrando que todas as três espécies apresentam semelhança arranjo de peptidases.⁵⁵ Estes estudos indicaram que a *Leishmania* possui apenas duas enzimas do tipo aspártico-protease. Uma delas apresenta similaridade de sequência com a presenilina 1, que hidrolisa proteínas de membrana do tipo I e sugere-se que esteja envolvida na autofagia. Já a segunda enzima apresenta identidade de sequência com uma peptidase (SPP) que cliva peptídeos sinais no interior das membranas e tem distribuição ubíqua em eucariotos. Embora a atividade destas enzimas ainda não tenha sido isolada em *Leishmania*, estudos estão sendo conduzidos para confirmar os achados obtidos pelo sequenciamento do genoma destes parasitos. Apesar da atividade de aspártico-protease ter sido observada a mais de 20 anos atrás,⁴² apenas recentemente foi caracterizada cineticamente a atividade de uma aspártico-protease em extratos solúveis de promastigotas de *L. mexicana*,⁵⁶ contudo, como neste trabalho a enzima não foi purificada, e nem sua estrutura primária resolvida, não sabemos se a enzima estudada é a presenilina 1 ou a SPP. Em contraste com as

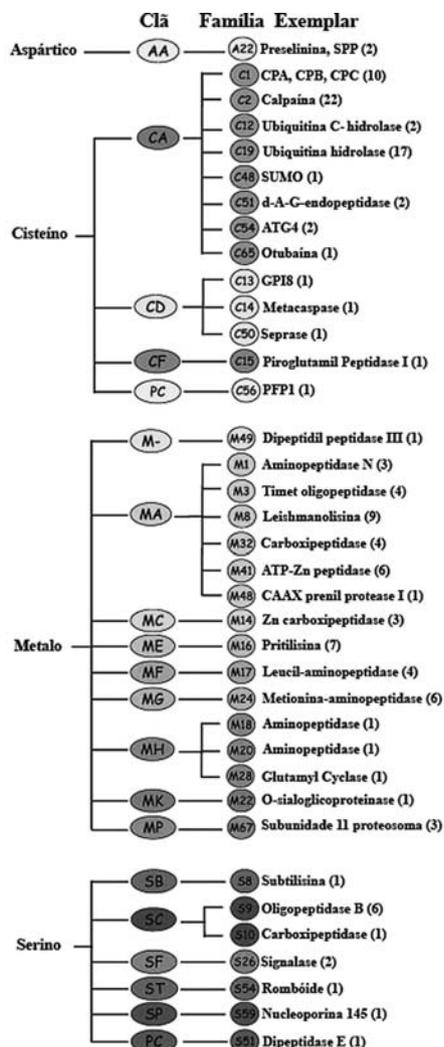


Figura 4. Clãs e famílias de *L. major* peptidases. A nomenclatura é baseada no banco de dados MEROPS. Os números entre parênteses representam uma estimativa dos exemplares de cada família de peptidase. Adaptada da ref. 55

aspártico-proteases, semelhantes à pepsina, como a plasmepsina de *Plasmodium*,⁵⁷ serem abundantes em outros protozoários e helmintos,⁵⁸ aparentemente elas não são muito expressivas 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 em seus produtos de secreção. Tais proteases estão envolvidas numa grande diversidade de processos fisiológicos essenciais para a sobrevivência de todos os organismos vivos⁵⁹ e em parasitos, de modo especial, estão envolvidas na degradação do tecido conjuntivo do hospedeiro, para facilitar sua invasão e disseminação; assimilação de aminoácidos, com conseqüente síntese de proteínas, peptídeos ou outros produtos derivados de aminoácidos e a reciclagem de proteínas; remodelagem do parasito durante a transição de um estágio morfológico para outro e ativação de enzimas ou de outras moléculas biologicamente ativas.^{60,61} Seus representantes mais conhecidos são a tripsina e a quimiotripsina, que estão envolvidas nos processos de assimilação de aminoácidos em organismos superiores e pertencem à maior família de proteases, a S01. Contudo, nenhum membro desta família parece estar presente em *Leishmania*. As 45 famílias de serino-proteases estão agrupadas em 13 clãs de ancestrais comuns como, por exemplo, o clã B (SB) agrupa famílias que possuem origens comuns com a subtilizina, o clã C (SC) com a carboxipeptidase C, o clã E (SE) com a peptidase A d-ala-d-ala de

Escherichia e o clã F (SF) com o repressor do LexA.^{5,6} De acordo com estudos genômicos foi estimado que *L. major* possua pelo menos treze diferentes serino-proteases, distribuídas pelas famílias S8, S9, S10, S26, S51, S54 e S59 (Figura 5).⁵⁵ A atividade desta classe de peptidases em *Leishmania* foi primeiramente purificada em um extrato intracelular hidrossolúvel de promastigotas de *L. amazonensis* e caracterizada como uma oligopeptidase de 101 kDa⁶² e só mais tarde caracterizada como pertencente à família da oligopeptidase B.⁶³ Na mesma espécie de *Leishmania* foram purificadas e caracterizadas três serino-proteases, que ao contrário da oligopeptidase anterior, exibem importante atividade hidrolítica contra substratos protéicos e peptídicos.⁶⁴⁻⁶⁶ As enzimas foram purificadas de três extratos distintos: um intracelular hidrossolúvel, um intracelular solúvel em detergente e um extrato extracelular, e todas apresentam características cinéticas e bioquímicas distintas entre si, sugerindo que por conta destas diferenças, estas proteases possam desempenhar funções distintas na *Leishmania*. Estas serino-proteases são expressas tanto em promastigotas, quanto em amastigotas e são encontradas na bolsa flagelar, em vesículas da via endocítica/exocítica, nos megassomas, na superfície celular e na membrana de organelas.^{67,68} A Figura 5 mostra a localização das serino-proteases em promastigotas *L. amazonensis* através da técnica de imunocitoquímica, utilizando anticorpos específicos contra as enzimas de *L. amazonensis* e um anticorpo secundário marcado com ouro coloidal.⁶⁷



Figura 5. Microfotografia mostrando a localização das serino-proteases de *L. amazonensis*. A) Amastigotas exibindo marcação na superfície do parasito, bolsa flagelar, megassomas, em vesículas da via endocítica/exocítica, nos megassomas, na superfície celular e na membrana de organelas – barra de 3,2 μm; B) região anterior de promastigota com marcação na superfície do parasito, bolsa flagelar e membrana de organela (cabeça de seta) – barra de 2,0 μm. F-flagelo, K-cinetoplasto, M-megassoma, N-núcleo, P-bolsa flagelar. Adaptada da ref. 67

A atividade de serino-proteases também foi detectada em diferentes extratos (intra e extracelulares) de promastigotas de *L. braziliensis* e foi observado que tais enzimas compartilham semelhanças bioquímicas com as serino-proteases de *L. amazonensis*,⁶⁹ indicando que estas proteases são conservadas no gênero *Leishmania* e que possivelmente desempenhem as mesmas funções em ambos os parasitos. Inibidores específicos sintéticos da atividade das serino-proteases de *L. amazonensis* foram utilizados em culturas de promastigotas e demonstrou-se que a inibição de tais enzimas leva o parasito à morte, sendo assim, tais enzimas são essenciais

para a manutenção da sobrevivência da *Leishmania*.⁷⁰ Além disso, a inibição destas proteases interfere na morfologia do parasito, causando importante deformação da bolsa flagelar e a formação de vesículas intracelulares (Figura 6B e C).⁷⁰ Um inibidor de serino-proteases purificado de anêmona do mar *Stichodactyla helianthus* (ShPI-I) também foi empregado neste estudo e, além de ser um inibidor mais potente da atividade das serino-proteases de *L. amazonensis*, demonstrou induzir alterações semelhantes às dos outros inibidores, pois os alvos quimioterápicos são os mesmos, porém exibiu efeitos muito mais marcantes nos parasitos, inclusive foi observada a presença de vacúolos autofágicos, responsáveis pela morte da *Leishmania* (Figura 6D).⁷⁰ Logo, a inibição das serino-proteases de *Leishmania* pode representar uma valiosa abordagem para o desenvolvimento racional de fármacos para o tratamento das Leishmanioses, produzindo drogas que possivelmente apresentem menos efeitos adversos para o hospedeiro e que tenham melhor índice terapêutico do que as drogas de uso corrente. Portanto, estudos adicionais são necessários para comprovar esta possibilidade.

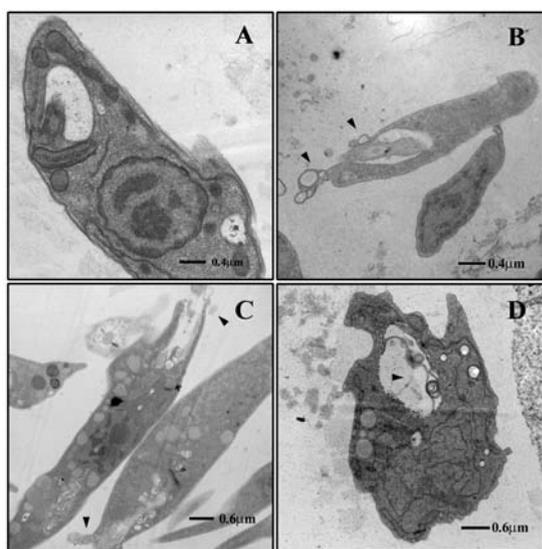


Figura 6. Efeitos ultraestruturais de inibidores de serino-proteases em promastigotas *L. amazonensis*. Os parasitos foram incubados apenas com meio de cultura (A), 10^{-3} M de Benzamidina (B), 10^{-4} M de TPCK (C) e (D) 10^{-5} M de ShPI-I por 6 h. A) Microfotografia mostrando promastigota controle sem alterações morfológicas, B e C) promastigotas com alterações na membrana da bolsa flagelar com formação de vesículas e a presença de corpos vesiculares no citoplasma e D) promastigota exibindo alterações na forma do corpo do parasito e vesiculação na bolsa flagelar, a seta indica os vacúolos autofágicos na região anterior do protozoário.⁷⁰ F- Flagelo, K cinetoplasto, M megasoma, N núcleo, P bolsa flagelar. Adaptada da Ref. 70

CONCLUSÃO

O emprego de inibidores de proteases no tratamento das leishmanioses ainda não é uma realidade como é para o tratamento da AIDS e para outras doenças como enfisema pulmonar, hipertensão arterial, alguns tipos de cânceres e trombose, pois estudos mais extensivos são necessários para se entender melhor o papel das proteases na fisiologia do parasito, bem como na patogênese das leishmanioses. Os inibidores específicos da atividade hidrolítica destas enzimas, sejam de origem sintética ou natural, constituem-se em ferramentas essenciais para este estudo e também para o desenvolvimento de novas moléculas que inibam proteases essenciais na fisiologia da *Leishmania* parasito, bem como nos processos patológicos por ela provocados. Além disso,

é importante reconhecer o quão distintas estas proteases são das proteases do hospedeiro para minimizar os tantos efeitos adversos induzidos pela terapia convencional.

AGRADECIMENTOS

À FIOCRUZ, especialmente ao Instituto Oswaldo Cruz e a Farmanguinhos e à FAPERJ pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. http://www.who.int/neglected_diseases/en/, acessada em Abril 2009.
2. Sundar, S.; Olliaro, P. L.; *Ther. Clin. Risk Managem.* **2007**, *3*, 733.
3. Desjeux, P.; Alvar, J.; *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **2003**, *97*, 4.
4. McKerrow, J. H.; Caffrey, C.; Kelly, B.; Loke, P.; Sadij, M.; *Annu. Rev. Pathol. Dis.* **2006**, *1*, 497.
5. Barret, A. J.; *Meth. Enzymol.* **1994**, *244*, 1.
6. Barret, A. J.; Rawlings, N. D.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *318*, 247.
7. Rawling, N. D.; Barret, A. J.; *Meth. Enzymol.* **1994**, *244*, 19.
8. Wolf, D. H.; *Experientia* **1992**, *48*, 117.
9. Sorkin, A.; Goh, L. K.; *Exp. Cell Res.* **2009**, *315*, 683.
10. van der Goot, F. G.; Gruenberg, J.; *Trends Cell Biol.* **2006**, *16*, 514.
11. Finley, D.; *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 477.
12. Tanaka, K.; *Proc. Jpn. Acad. Ser. Phys. Biol. Sci.* **2009**, *85*, 12.
13. Lainson, R.; Shaw, J. J.; *J. Braz. Ass. for Advance. Sci.* **1992**, *44*, 94.
14. Lainson, R.; *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **1983**, *5*, 569.
15. Rey, L.; *Parasitologia*, 4ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008.
16. Volf, P.; Hostomska, J.; Rohousova, I.; *Parasite* **2008**, *15*, 237.
17. Berman, J. D.; *Indian J. Med. Res.* **2006**, *123*, 289.
18. Berman, J. D.; *Clin. Infect. Dis.* **1997**, *24*, 684.
19. Grimaldi, G. J.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1995**, *90*, 220.
20. Pearson, R. D.; Queiroz-Souza, A. Em *Principles and Practice of Infectious Diseases*; Mandell, G. L.; Bennet, J. E.; Dolin, R., eds.; Churchill Livingstone: New York, 1995, cap 12.
21. Silveira, F. T.; Moraes, M. A. P.; Shaw, J.; Lainson, R.; *Acta Parasitol. Tur.* **1997**, *21*, 97.
22. Jeronimo, S. M. B.; Duggal, L. P.; Ettinger, N. A.; Nascimento, E. T.; Monteiro, G. R.; Cabral, A. P.; Pontes, N. N.; Lacerda, H. G.; Queiroz, P. V.; Maia, C. G.; Pearson, R. D.; Blackwel, J. M.; Beaty, T. H.; Wilson, M. E.; *Clin. Infec. Dis.* **2007**, *196*, 1261.
23. Wilson, M. E.; Jeronimo, S. M. B.; Pearson, R. D.; *Microb. Pathog.* **2005**, *38*, 147.
24. Caldas, A. J. M.; Costa, J. M. L.; Silva, A. A. M.; Vinhas, V.; Barral, A.; *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *95*, 1.
25. Alvar, J.; Aparicio, P.; Aseffa, A.; Den Boer, M.; Cañavate, C.; Dedet, J. P.; Gradoni, L.; Ter Horst, R.; López-Vélez, R.; Moreno, J.; *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 334.
26. Tripathi, P.; Singh, V.; Naik, S.; *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2007**, *51*, 229.
27. Hererwaldt, B. L.; *Lancet* **1999**, *354*, 1191.
28. Davison, R. N.; *Drugs* **1998**, *56*, 1009.
29. Sundar, S.; Olliaro, P. L.; *Ther. Clin. Risk Manag.* **2007**, *3*, 733.
30. Lucimi, A.; Robledo, S. B.; Gama, V.; Saravia, N. G.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1990.
31. Schubach, A.; Marzochi, M. C.; Cuzzi-Maya, T.; Oliveira, A. V.; Araujo, M. L.; Pacheco, R. S.; Momen, H.; Coutinho, S. G.; Marzochi, K. B.; *Am. J. Trop. Med Hyg.* **1998**, *58*, 824.
32. Bray, P. G.; Barre, M. P.; Ward, S. A.; Koning, H. P.; *Trends Parasitol.* **2003**, *19*, 232.
33. Paris, C.; Looiseau, P. M.; Bories, C.; Bréard, J.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 852.
34. Veerareddy, P. R.; Vobalaboina, V.; Ali, N. J.; *Drug Target* **2009**, *17*, 140.

35. Mishra, J.; Saxena, A.; Singh, S.; *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1153.
36. Nishi, K. K.; Antony, M.; Mohanan, P. V.; Anilkumar, T. V.; Loiseau, P. M.; Jayakrishnan, A.; *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 971.
37. Manna, L.; Reale, S.; Vitale, F.; Picillo, E.; Pavone, L. M.; Gravino, A. E.; *Vet. J.* **2008**, *177*, 279.
38. Soares-Bezerra, R.; Leon, L.; Genestra, M.; *Braz. J. Pharm. Sci.* **2004**, *139*, 221.
39. Coombs, G. H.; Mottram, J. C.; *Parasitology* **1997**, *114*, S61.
40. Bierman, W. F.; van Agtmael, M. A.; Nijhuis, M.; Danner, S. A.; Boucher, C. A.; *AIDS* **2009**, *23*, 279.
41. Carr, A.; Amin, J.; *AIDS* **2009**, *23*, 343.
42. Pupkins, M. F.; Coombs, G. H.; *J. Gen. Microbiol.* **1984**, *130*, 2375.
43. Sadij, M.; McKerrow, J. H.; *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, *120*, 1.
44. Ueda-Nakamura, T.; Attias, M.; De Souza, W.; *Parasitol. Res.* **2001**, *87*, 89.
45. Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Alexander, J.; *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, *7*, 375.
46. Selzer, P. M.; Pingel, S.; Hsieh, I.; Ugele, B.; Chan, V. J.; Engel, J. C.; Bogyo, M.; Russell, D. G.; Sakanari, J. A.; Mc Kerrow, J. H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 11015.
47. Shah, P. P.; Myers, M. C.; Beavers, M. P.; Purvis, J. E.; Jing, H.; Grieser, H. J.; Sharlow, E. R.; Napper, A. D.; Huryn, D. M.; Cooperman, B. S.; Smith, A. B.; Diamond, S. L.; *Mol. Pharmacol.* **2008**, *74*, 34.
48. Hide, M.; Bañuls, A. L.; *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *102*, 105.
49. Jaffe, C. L.; Dwyer, D. M.; *Parasitol Res.* **2003**, *91*, 229.
50. Lieke, T.; Nylén, S.; Eidsmo, L.; McMaster, W. R.; Mohammadi, A. M.; Khamesipour, A.; Berg, L.; Akuffo, H.; *Clin. Exp. Immunol.* **2008**, *153*, 221.
51. Bangs, J. D.; Ransom, D. A.; Nimick, M.; Christie, G.; Hooper, N. M.; *Mol. Biochem. Parasitol.* **2001**, *114*, 111.
52. Jaafari, M. R.; Badiie, A.; Khamesipour, A.; Samiei, A.; Soroush, D.; Kheiri, M. T.; Barkhordari, F.; McMaster, W. R.; Mahboudi, F.; *Vaccine* **2007**, *25*, 6107.
53. Rodríguez-Cortés, A.; Ojeda, A.; López-Fuertes, L.; Timón, M.; Altet, L.; Solano-Gallego, L.; Sánchez-Robert, E.; Francino, O.; Alberola, J.; *Vaccine* **2007**, *25*, 7962.
54. Olobo, J. O.; Anjili, C. O.; Gicheru, M. M.; Mbatia, P. A.; Kariuki, T. M.; Githure, J. I.; Koech, D. K.; McMaster, W. R.; *Vet. Parasitol.* **1995**, *60*, 199.
55. Besteiro, S.; Willians, R. A. M.; Coombs, G. H.; Mottram, J. C.; *Int. J. Parasitol.* **2007**, *37*, 1063.
56. Valdivieso, E.; Dagger, F.; Rascón, A.; *Exp. Parasitol.* **2007**, *116*, 77.
57. Ersmark, K.; Samuelsson, B.; Hallberg, A.; *Med. Res. Rev.* **2006**, *26*, 626.
58. Koehler, J. W.; Morales, M. E.; Shelby, B. D.; Brindley, P. J.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2007**, *102*, 83.
59. Rao, M. B.; Aparna, M. T.; Ghatge, M. S.; Deshpande, V. V.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 597.
60. Rhoads, M. L.; Fetterer, R. H.; *Parasitol. Today* **1997**, *13*, 119.
61. Rosenthal, P. J.; *Adv. Parasitol.* **1999**, *43*, 105.
62. Andrade, A. R.; Santoro, M. M.; Melo, N. M.; Mares-Guia, M.; *Exp. Parasitol.* **1998**, *89*, 153.
63. Matos Guedes, H. L.; Duarte Carneiro, M. P.; Oliveira Gomes, D. C.; Rossi-Bergmann, B.; De Simone, S.G.; *Parasitol Res.* **2007**, *101*, 865.
64. Silva-López, R. E.; De Simone, S. G.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2004**, *59*, 590.
65. Silva-López, R. E.; De Simone, S. G.; *Exp. Parasitol.* **2004**, *107*, 173.
66. Silva-López, R. E.; Pinto-Coelho, M. G.; De Simone, S. G.; *Parasitology* **2005**, *131*, 85.
67. Silva-López, R. E.; Morgado-Díaz, J. A.; Alves, C. R.; Côrte-Real, S.; De Simone, S. G.; *Parasitol. Res.* **2004**, *93*, 328.
68. Morgado-Díaz, J. A.; Silva-López, R. E.; Alves, C. R.; Soares, M. J.; Corte-Real, S.; De Simone, S. G.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2005**, *100*, 377.
69. Guedes, H. L.; Rezende, J. M.; Fonseca, M. A.; Salles, C. M.; Rossi-Bergmann, B.; De-Simone, S.G.; *Z. Naturforsch.* **2007**, *62*, 373.
70. Silva-López, R. E.; Morgado-Díaz, J. A.; Chávez, M. A.; De Simone, S. G.; *Parasitol. Res.* **2007**, *101*, 1627.
71. Rath, S.; Trivelin, L. A.; Imbrunito, T. R.; Tomazela, D. M.; Jesús, M. N.; Marzal, P. C.; *Quím. Nova* **2003**, *26*, 550.