



**Universidade de Brasília**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular**  
**Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro**

**Estudo funcional da prolil oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* e  
*Leishmania infantum*: nocaute gênico, inibição enzimática e processos  
infectivos**

**Tese de doutorado**  
**Camila Lasse Silva**

**Brasília, 30 de Outubro de 2018**



Camila Lasse Silva

Estudo funcional da prolil oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*: nocaute gênico, inibição enzimática e processos infectivos

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos Charneau

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina para obtenção do título de Doutora em Patologia Molecular

Brasília-DF

2018



Silva, Camila Lasse.

**Estudo funcional da prolil oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*: nocaute gênico, inibição enzimática e processos infectivos.**

Brasília, 2018

p. : il.

Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular.

Universidade de Brasília-UnB, Brasília.

1.*Trypanosoma cruzi*. 2.*Leishmania infantum* 3.Prolil oligopeptidase. 4.Nocaute gênico 5. Infecção em macrófagos



Universidade de Brasília-UnB  
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

Estudo funcional da prolil oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* e  
*Leishmania infantum*: nocaute gênico, inibição enzimática e processos  
infectivos

Camila Lasse Silva

Tese de Doutorado submetida ao Programa de pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília-UnB, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutora em Patologia Molecular, área de concentração Mecanismos Básicos e Processos Biológicos em Saúde.

Aprovado por:

---

Izabela Marques Dourado Bastos Charneau, Doutora (UnB)  
Orientadora

---

Ildinete Silva Pereira, Doutora (UnB)

---

Beatriz Dolabela de Lima, Doutora (UnB)

---

Juliana Alves Parente Rocha, Doutora (UFG)

---

Marcos Rodrigo Alborghetti, Doutor (UnB)

Brasília-DF, 30 de outubro de 2018.



*Dedico este trabalho a minha  
filha, Sophia, por ter compreendido  
todas as minhas ausências. Amo você!*

## AGRADECIMENTOS

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Izabela Marques Dourado Bastos Charneau, por sua dedicada orientação, por todo auxílio nos momentos de dificuldades, sejam eles na bancada ou na vida. Obrigada por me confiar este projeto fantástico e, acho que sou tão apaixonada por ele quanto você. Obrigada por me incentivar a ser melhor sempre, com certeza hoje sou uma pessoa muito melhor e mais forte. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Jaime Santana, por sua experiência e conhecimentos compartilhados. Sua exigência me fez querer ser melhor.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Carla Araújo, por me ajudar a realizar alguns experimentos que foram essenciais para a conclusão desta tese. Obrigada também pelo carinho e paciência.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Flávia Nader, pelo seu conhecimento e experiência para a realização do projeto. Obrigada por sua amizade e cuidado.

Ao Prof. Dr. Sébastien Olivier Charneau, pela receptividade e auxílio sempre que precisei.

As minhas amigas Clênia Azevedo e Milene Andrade, por todo o conhecimento compartilhado, por toda a participação neste trabalho, contribuindo de forma riquíssima para ele. Obrigada por todas as broncas, pelos cafés na copa, pelos lanches, enfim, obrigada meninas pela companhia e apoio de sempre.

Aos amigos do LIPH, Allan Mascarenhas, Kaio Bentes, Marcelle Caminha, Yanna Reis, Amanda Rocha, Natália Alves e Natália Gil, por todo o apoio, carinho, ajuda e reflexões. Obrigada pelos almoços, pelas risadas e momentos de descontração, vocês fizeram meus dias mais felizes e mais leve.

Aos alunos de Iniciação científica pela contribuição dada ao trabalho. Em especial a Ana Carolina Domingues, Letícia Leite e Maycon Veiga que participaram ativamente deste projeto.

As minhas amigas da época escolar Karoline, Danielle, Roseane, Michelle, Evelyn e Karen, pela torcida, carinho e compreensão. Aos amigos Eduardo e Carlos Guilherme por me ouvir e incentivar, não me deixando permanecer no desânimo.

A um casal de amigos mais que especial, que me apoiaram de formas inimagináveis e me confortaram nos momentos mais difíceis. Heloísa e Sérgio,

obrigada por tudo, do fundo do coração. Com certeza vocês são parte fundamental da minha formação.

Aos meus pais, Iara e Antônio, por me apoiarem, por me lembrarem sempre que está foi a decisão certa. Obrigada pelo amor, carinho e atenção que é dado a mim, aos meus irmãos e às netinhas. Por me ajudarem com a Sophia. Sem vocês nada disso seria possível. A presença e dedicação de vocês são o que me move. Amo vocês!

Aos meus queridos irmãos, Sandro, June e a minha irmã do coração, Rita, por estarem sempre presentes na minha vida, por me impulsionarem a ser melhor e nunca desistir. Obrigada pela amizade que nos une! Amo vocês.

As minhas sobrinhas, Laura, Lívia, Lorena por me trazerem as maiores alegrias.

A minha filha Sophia, por aceitar minha ausência e entender que isso é para o nosso crescimento. Obrigada por seu amor imenso, pelo seu carinho e por alegrar os meus dias. Amo você mais que tudo!

A toda a minha família, tios, primos, avós por acreditarem em mim e me incentivarem. Obrigada pela referência familiar e por todo o suporte oferecido.

Ao CNPq, CAPES, FAPDF, FINATEC e DPP por financiarem este trabalho permitindo possível sua realização.

A Deus, por estar presente na minha vida, por me fortalecer diariamente e por me conceder a oportunidade de realizar este projeto incrível. Obrigada pela missão que me foi concedida e pelas pessoas que colocou no meu caminho. Obrigada pela Sua benção e por iluminar o meu caminho. Por me mostrar que o sofrimento e as dificuldades é que nos conduz para uma vida melhor, pois são eles que nos tornam melhores e que permitem nossa evolução.



*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”*

*Marie Curie*

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMC	7-amino-4-metil-cumarina
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
DAKO	<i>Fluorescence Mounting Medium</i>
DAPI	4'6-diamidino-2-fenilindole
DKO	Duplo nocaute
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTN	Doença Tropical Negligenciada
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-64	L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
G418	Geneticina
GE	<i>Healthcare Life Sciences</i>
GnRH	Hormônio Gonadotrofina
HAT	Tripanossomíase africana humana
HCl	Ácido clorídrico
HDR	Reparo por Homologia Direta ( <i>Homology Directed Repair</i> )
HEPES	Ácido (2-hidroxietil)-piperazina-etanosulfônico
HX1	Região intergênica
IC50	Concentração inibitória de 50%
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de potássio dibásico
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodalton
K <sub>i</sub>	Constante de inibição
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis-Menten
KO	Nocaute
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral

LIT	<i>Liver Infusion Trytone</i>
MES	2-(N-morfolino) etanosulfônico
MMEJ	Junção Final Mediada por Microhomologia ( <i>Microhomology-Mediated End Joining</i> )
NaCl	Cloreto de sódio
NBT	Nitro-azul-tetrazólico
NHEJ	Junção Final Não-Homóloga ( <i>Non-Homologous End Joining</i> )
NTD	Doença Tropical Negligenciada
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
rPOPLi	Prolil oligopeptidase recombinante de <i>Leishmania infantum</i>
rPOPTc80	Prolil oligopeptidase recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Sb5+	Antimoniais pentavalentes
SDS/PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SKO	Simplex nocaute
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TLCK	1-cloro-3-tosilamido-7-amino-2-heptanona
TPCK	Tosil fenilalanil-clorometilcetona
TRH	Hormônio Tireotrofina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TUB	$\beta$ -Tubulina
UTR	Região não-traduzida
V/V	Volume/Volume
WHO/OMS	Organização Mundial de Saúde

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ciclo de vida *Trypanosoma cruzi*.
- Figura 2. Evolução clínica da doença de Chagas.
- Figura 3. Distribuição global da doença de Chagas.
- Figura 4. Ciclo de vida do parasito *Leishmania*.
- Figura 5. Distribuição global das leishmanioses.
- Figura 6. Modelo tridimensional da POPTc80.
- Figura 7. Participação da POP em processos infectivos.
- Figura 8. Hidrólise de colágeno pela POPTb.
- Figura 9. CRISPR/Cas9.
- Figura 10. Análise de restrição para digestão de DNA genômico.
- Figura 11. Análise da purificação da POPTc80 recombinante.
- Figura 12. Análise da purificação da POPTc80 com novas condições de eluição.
- Figura 13. Análise da produção de soro anti-POPTc80 em extratos proteicos de epimastigotas.
- Figura 14. Análise da produção de soro anti-POPTc80 em extratos proteicos de epimastigotas.
- Figura 15. Obtenção das sondas para confirmação nocaute do gene da POPTc80.
- Figura 16. Desenho esquemático da hibridização das sondas no gene alvo.
- Figura 17. Identificação do gene *poptc80* por hibridização.
- Figura 18. Amplificação das sequências gênicas para confirmação do nocaute.
- Figura 19. Confirmação simples nocaute a *poptc80*.
- Figura 20. Identificação dos níveis de expressão da POP no extrato total de parasitos selvagem e nocauteados.
- Figura 21. Identificação da POPTc80 em extrato de parasito mutante e selvagem.
- Figura 22. Reconhecimento de diferentes proteínas em parasitos mutados.
- Figura 23. Análise da metaciclogênese em parasitos *poptc80*-/+.

Figura 24. Cassete para deleção do alelo Esmeraldo-Like do gene *poptc80*.

Figura 25. Geração do cassete *poptc80-hx1-hyg-tub*.

Figura 26. Confirmação do duplo nocaute do gene *poptc80*.

Figura 27. Confirmação do simples nocaute do gene *poptc80* por imunofluorescência.

Figura 28. Detecção de parasitos duplo nocaute.

Figura 29. Curva de crescimento parasitos simples nocaute.

Figura 30. Curva de crescimento parasitos DKO.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados na construção do cassete para deleção do alelo *Esmeraldo Like*

## Sumário

<b>Resumo</b> .....	xvii
<b>Abstract</b> .....	xviii
Introdução .....	1
Doença de Chagas.....	1
Leishmanioses .....	6
Proteases como potenciais alvos de drogas .....	9
Proteases de patógenos .....	10
Edição gênica por CRISPR/Cas9.....	18
Justificativa.....	21
Objetivo.....	22
Material e Métodos .....	23
Cultura de células .....	23
Expressão e Purificação da POPTc80 .....	23
Produção de soro anti-rPOPTc80 .....	24
Identificação dos níveis de expressão da POPTc80 por <i>Western blot</i> .....	24
Construção de cassetes para o nocaute do <i>POPTC80</i> .....	25
Desenho de sgRNA e síntese do sgRNA <i>in vitro</i> .....	27
Nocaute do alelo Non-Esmeraldo Like <i>POPTc80</i> .....	27
Nocaute do alelo Esmeraldo-Like <i>POPTc80</i> .....	28
<i>Southern blot</i> .....	28
Curva de crescimento .....	30
Metaciclogênese .....	31
Inibição da metaciclogênese .....	31
Imunofluorescência .....	32
Resultados .....	34
Purificação da proteína recombinante POPTc80 e obtenção de anticorpo policlonal .....	34



Geração de sonda.....	37
Nocaute do gene POPTc80 .....	38
Confirmação do nocaute do alelo Non-Esmeraldo Like da <i>poptc80</i> por <i>immunoblotting</i> .....	42
Inibição da Metaciclôgenese .....	45
Construção do cassete POPTc80 alelo Esmeraldo-like .....	47
Deleção alelo Esmeraldo-like.....	49
Deteção e colocalização da POPTc80 em parasitos selvagens e nocautes .....	50
Avaliação do crescimento dos parasitos mutantes e controles.....	53
Discussão.....	54
Conclusão .....	59
<i>Identification and Characterization of Leishmania infantum Prolyl Oligopeptidase as a Potential Candidate for Novel Drug Design Against Leishmaniasis</i> .....	60
Abstract.....	60
Introduction .....	61
Materials and Methods.....	63
Parasites .....	63
Heterologous expression of POPLi .....	63
Enzymatic Assays .....	64
Substrate specificity .....	64
pH dependence.....	64
Optimal buffer.....	65
Temperature.....	65
Enzymatic parameters.....	65
Inhibition test .....	66
Activity of POPLi from parasite extracts .....	66



Western blotting .....	67
Immunofluorescence .....	67
Inhibition of macrophage infection by <i>L. infantum</i> .....	68
Statistical analysis .....	69
Results .....	69
Expression and purification of rPOPLi .....	69
Enzymatic characterization of rPOPLi .....	70
Kinetics studies and IC50 values of rPOPLi inhibition .....	72
Effect of various protease inhibitors on rPOPLi activity .....	73
POPLi localization and activity in parasite extract .....	74
POPLi is distributed near the inner membrane in the developmental forms of <i>L. infantum</i> .....	75
POP specific inhibitors decrease <i>L. infantum</i> macrophage infection ..	77
Discussion .....	78
Funding .....	81
References .....	81
Perspectivas .....	86
Referências Bibliográficas .....	87
ANEXOS .....	98

## Resumo

A prolil oligopeptidase (POP) é uma serino protease que cliva peptídeos de até 30 aminoácidos, porém já foi observada sua capacidade de hidrólise de colágeno, fibronectina e componentes da matriz extracelular. Participa de importantes processos biológicos e está envolvida em diversas doenças neurológicas e inflamatórias. Estudos recentes apontaram a POP de *Trypanosoma cruzi* (POPTc80) como importante alvo contra a doença de Chagas por meio do desenvolvimento de vacina contra a proteína. Este trabalho teve como objetivo analisar o envolvimento da POP na patogenia de duas doenças: a doença de Chagas e a Leishmaniose visceral. A prolil oligopeptidase de *T. cruzi* (POPTc80) foi analisada por meio de nocaute físico do gene *POPTC80* com a deleção do alelo *Non-esmeraldo like* pela integração do cassete contendo o gene *NEO*, que confere resistência a geneticina (G418), sendo observado diferenças de expressão da proteína tanto entre os diferentes clones quanto comparado a cultura selvagem. O clone B2 apresentou uma divisão celular a cada 47 h e o clone C6 a cada 52h, e a imunomarcação mostrou uma redução na intensidade do sinal de fluorescência. O nocaute do alelo *Esmeraldo-like* para realizar o duplo nocaute, foi com reparo por homologia direta (RHD) e inserção do cassete que confere resistência a marca de seleção higromicina. O duplo nocaute (*poptc80*<sup>-/-</sup>) foi confirmado pela amplificação do gene higromicina fosfotransferase e corroborado pela imunofluorescência (IF) com ausência de marcação da POPTc80 nos parasitos. A POP de *L. infantum* (POPLi) foi avaliada quanto a sua capacidade infectiva em macrófagos murinos sob presença de inibidores específicos da POP, S 17092 e Z-Pro-Prolinal, indicando 50% de redução da taxa de infecção, o que também foi observado quando os parasitos foram incubados com a proteína recombinante e o anticorpo. A POPLi foi observada expressa na fração de membrana e citoplasmática do parasito e este resultado foi corroborado pelo ensaio de IF. A análise funcional da POP de *T. cruzi* e *L. infantum*, nos permite avançar na busca por novos alvos quimioterápicos para o tratamento de ambas as doenças tropicais negligenciadas.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, prolil oligopeptidase, leishmaniose, doença de Chagas, nocaute, infecção, inibidor.

## Abstract

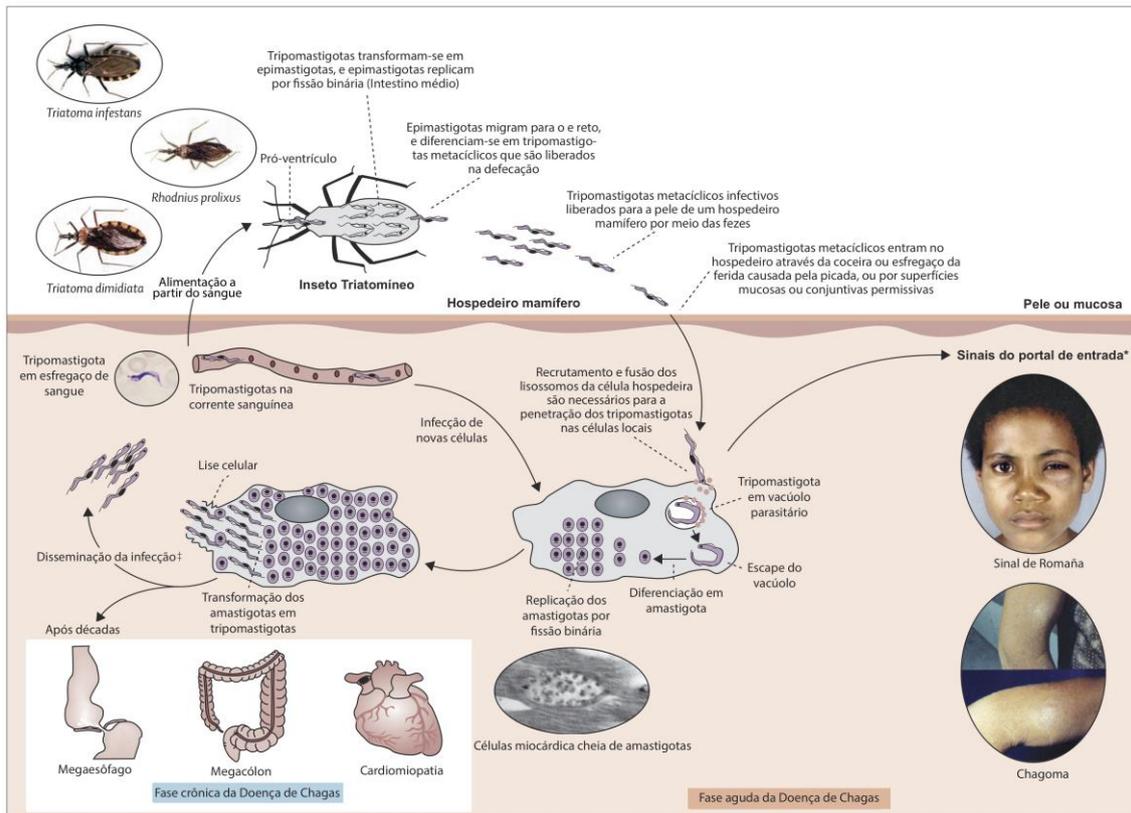
Prolyl oligopeptidase (POP) is a serine protease that cleaves peptides of up to 30 amino acids, but its ability to hydrolyze collagen, fibronectin and extracellular matrix components has already been observed. It participates in important biological processes and is involved in several neurological and inflammatory diseases. Recent studies have pointed to POP of *Trypanosoma cruzi* (POPTc80) as an important target against Chagas' disease through the development of a vaccine against the protein. This work aimed to analyze the involvement of POP in the pathogenesis of two diseases: Chagas disease and visceral leishmaniasis. The *T. cruzi* prolyl oligopeptidase (POPTc80) was analyzed by physical knockout of the *POPTC80* gene with the deletion of the *Non-Esmerald* allele allele by the integration of the *NEO* gene-containing cassette that confers resistance to geneticin (G418), with differences expression of the protein both among the different clones and compared to the wild type. Clone B2 showed a cell division every 47 h and clone C6 every 52 h, and immunoblotting showed a reduction in fluorescence signal intensity. The knockout of the Esmeraldo-like allele to perform the double knockout was with direct homology repair (RHD) and insertion of the cassette that confers resistance to the hygromycin selection marker. The double knockout (*poptc80* - / -) was confirmed by amplification of the hygromycin phosphotransferase gene and corroborated by immunofluorescence (IF) with no labeling of POPTc80 in the parasites. The POP of *L. infantum* (POPLi) was evaluated for its infective capacity in murine macrophages in the presence of specific inhibitors of POP, S 17092 and Z-Pro-Prolinal, indicating a 50% reduction in infection rate, which was also observed when the parasites were incubated with the recombinant protein and the antibody. POPLi was observed expressed in the membrane and cytoplasmic fraction of the parasite and this result was corroborated by the IF assay. The functional analysis of the POP of *T. cruzi* and *L. infantum* allows us to advance in the search for new chemotherapeutic targets for the treatment of both neglected tropical diseases.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, prolyl oligopetidase, leishmaniasis, Chagas' disease, knockout, infection, inhibitor.

## Introdução

### Doença de Chagas

A doença de Chagas, descoberta pelo médico Carlos Chagas em 1909, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, protozoário que pertence à ordem Kinetoplastida e à família *Trypanosomatidae*. O *T. cruzi* é um parasito flagelado que apresenta quatro formas principais durante seu ciclo de vida alternando entre o hospedeiro mamífero e o vetor invertebrado (1). A principal forma de transmissão ocorre por insetos triatomíneos, conhecidos popularmente como barbeiro, que no momento do repasto sanguíneo deposita suas fezes contaminadas com o parasito. No intestino médio do vetor, as formas epimastigotas se replicam por divisão binária e antes de serem eliminada pelas excretas são diferenciadas para a forma infectiva tripomastigota metacíclica. Para que ocorra a invasão na célula hospedeira, o parasito recruta lisossomos em direção ao local de adesão à membrana plasmática formando o vacúolo parasitóforo. Devido principalmente à acidez desse ambiente, ocorrerá o gatilho molecular para diferenciação na forma amastigota que se dá após a lise enzimática da membrana do vacúolo. Agora no citoplasma, as formas amastigotas se multiplicam por divisão binária e, após cerca de nove ciclos de divisão, o *T. cruzi* diferencia-se em tripomastigota sanguíneo, rompem a célula e retornam para circulação do hospedeiro (2,3), estabelecendo assim o processo infeccioso. O ciclo se encerra quando as formas sanguíneas são novamente ingeridas pelo barbeiro e diferenciam para epimastigotas (Figura 1)(4).

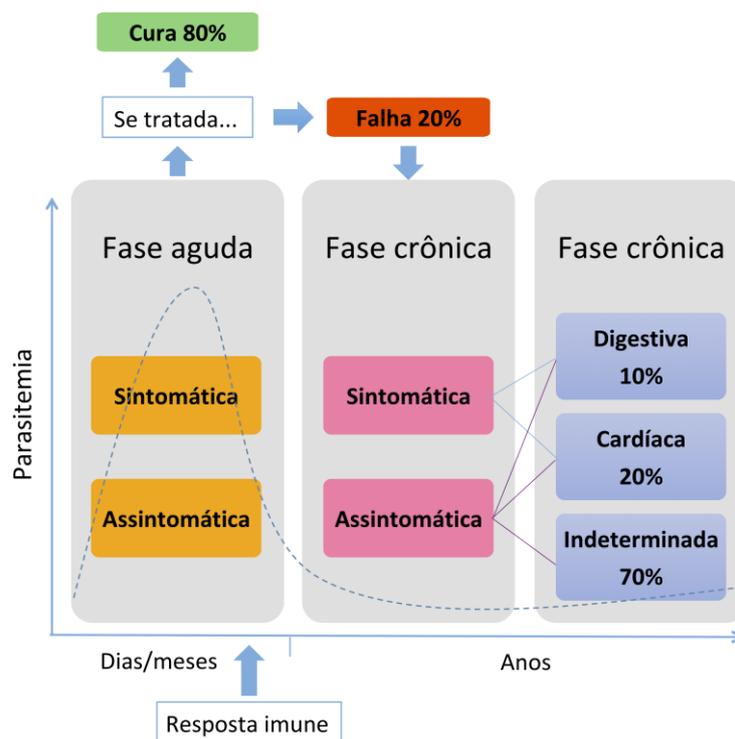


**Figura 1 – Ciclo de vida *Trypanosoma cruzi*.** No vetor, formas epimastigotas migram para o intestino e para o reto, onde diferenciam para tripomastigota metacíclico. No momento do repasto, o barbeiro deposita as fezes contaminadas com o parasito na pele do hospedeiro e através da ferida alcançam a corrente sanguínea, onde são fusionados ao lisossomo e infectam as células de defesa. Os parasitos diferenciam-se em amastigotas e replicam por fissão binária e, transformando-se novamente em tripomastigotas, que lisam a célula e vão para a corrente sanguínea. Novas células são infectadas, estabelecendo assim a infecção. Quando ocorre outra alimentação, o vetor ingere o sangue contaminado e a forma tripomastigota diferencia para epimastigota replicativo, completando o ciclo. Fonte: (4)

Existem ainda outras formas de transmissão da doença tais como via oral pela ingestão de alimentos contaminados, via transfusão sanguínea, acidentes laboratoriais, transplante de órgãos e via congênita. A infecção oral acontece principalmente na Região Norte do Brasil, onde o consumo de alimentos não processados, como o açaí, são mais frequentes (5,6), enquanto que os outros meios de transmissão ocorrem, principalmente, nos países não endêmicos (7,8).

A doença de Chagas possui duas fases e a manifestação clínica varia de indivíduo para indivíduo. A fase aguda se apresenta nos primeiros dias após a picada com uma alta parasitemia e sintomas não específicos como febre, mal-

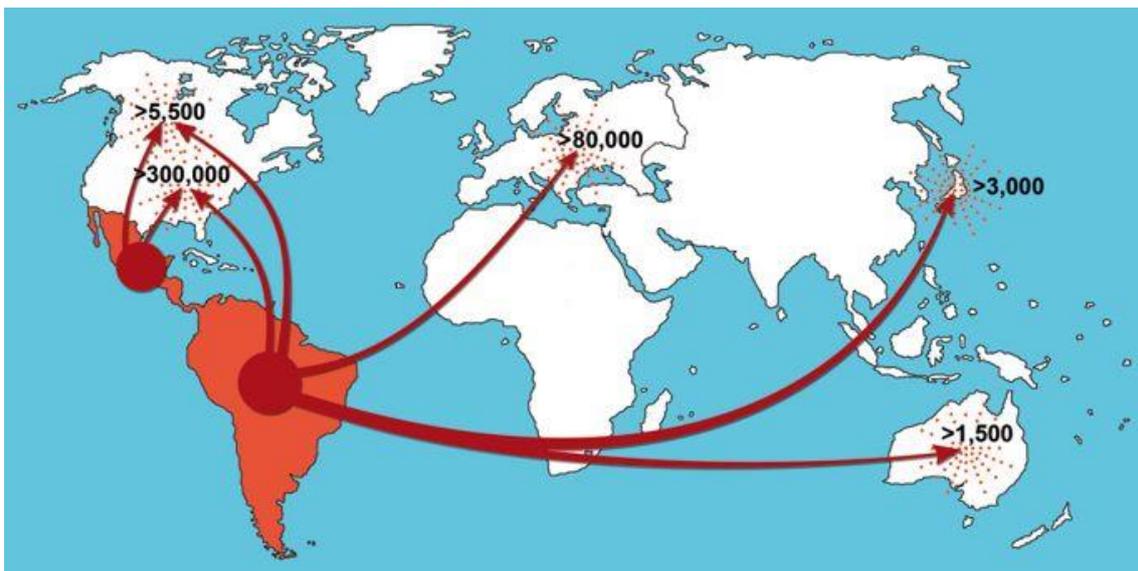
estar, falta de apetite, aumento do fígado, dor muscular e em 1% dos indivíduos, geralmente as crianças, podem apresentar inflamação do coração. O sintomas mais característicos observados nesta fase da doença é a inflamação no local da picada, conhecido como sinal de Romaña, que é o inchaço da pálpebra e/ou o chagoma de inoculação, o inchaço no local da ferida (9,10). Entretanto, uma diminuição da parasitemia pode ocorrer permitindo que a doença permaneça assintomática durante vários anos e sua manifestação ocorrer somente quando o coração ou os órgãos do sistema digestivo estiverem gravemente comprometidos pela quantidade de parasitos localizados nos músculos, causando cardiomiopatis e a síndrome dos mega, esôfago e cólon, caracterizando assim a fase crônica da doença (11,12). Muitos pacientes podem permanecer numa fase indeterminada e não apresentar nenhum sintoma da infecção com o parasito após a fase aguda (Figura 2) (9,13,14).



**Figura 2- Evolução clínica da doença de Chagas.** A fase aguda é caracterizada por uma alta parasitemia e pode apresentar sintomas inespecíficos ou ser assintomática. Na fase crônica sintomática é observada as síndromes dos megas, cólon e esôfago e o inchaço do coração. Entretanto, a doença pode permanecer assintomática durante toda a vida, classificando esses pacientes indeterminados. Adaptado de (9)

Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas pelo parasito e cerca de 70 milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença em todo o mundo (15). O maior número de casos registrados são na América Latina, onde a doença é endêmica em 21 países e os vetores de transmissão estão presentes e amplamente distribuídos (13). A doença de Chagas é classificada como Doença Tropical Negligenciada (DTN) por atingir a população de baixa renda, principalmente as que vivem nas áreas rurais em países subdesenvolvidos (16), e por não haver investimento de recursos destinados ao desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e benéficos aos pacientes, ou ao seu controle.

Entretanto, com o crescimento populacional, a expansão de cidades para as áreas próximas ao habitat natural dos insetos transmissores e a imigração de indivíduos para países não-endêmicos (17), os casos da doença tem aumentado mundialmente (Figura 3). Além do impacto da morbidade e mortalidade, a globalização da doença de Chagas tem impactado a economia mundial visto que o investimento no tratamento e controle da doença gera um enorme custo anual (18). Em 2008, a Colômbia teve um gasto estimado de aproximadamente US\$ 267 milhões (19) o que acarretou um grande peso na economia global, sendo este estimado em US\$ 7 bilhões por ano (11).



**Figura 3 - Distribuição global da doença de Chagas.** Devido ao grande fluxo migratório de indivíduos de países da América Latina, endêmicos para a doença de Chagas, houve uma globalização da doença com destaque para EUA,

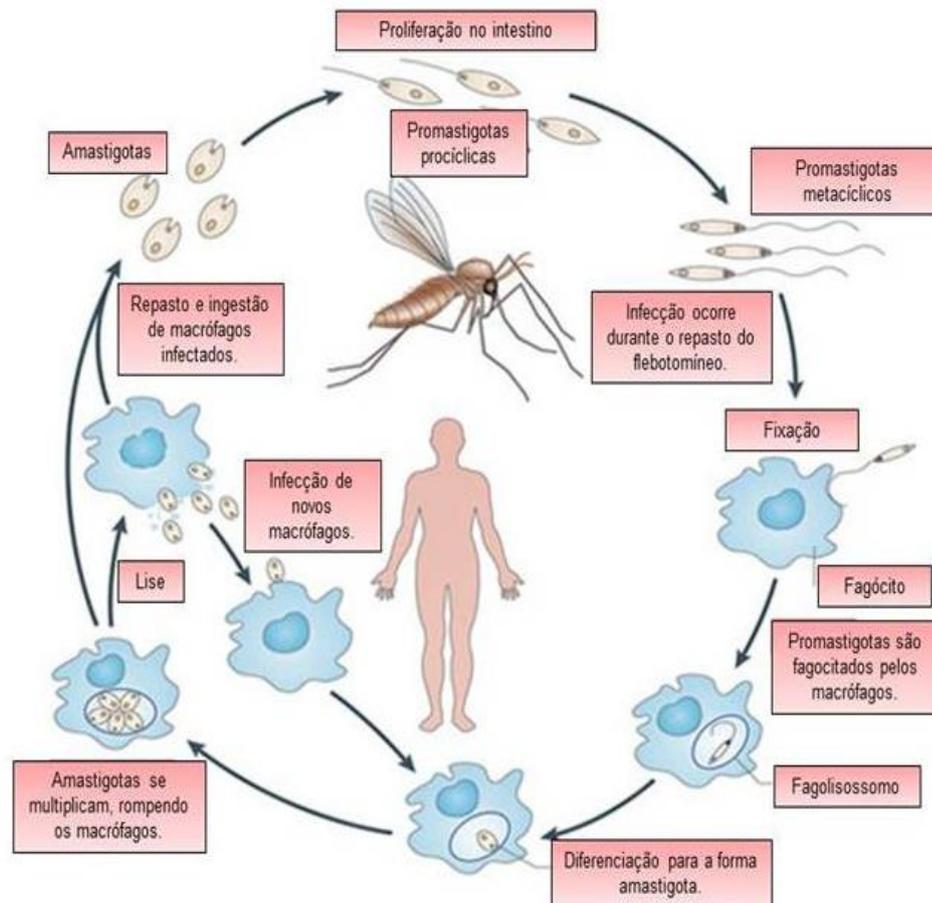
Canadá, países Europeus, Japão e Austrália. Não há dados de outros países asiáticos e africanos. Fonte: (20)

O tratamento não promove a cura da doença na fase crônica e é agressivo para o organismo devido à toxicidade dos medicamentos utilizados que são o benznidazol e Nifurtimox. Ambos são eficazes no tratamento da fase aguda quando a doença é identificada (cerca de 80% de sucesso), porém o uso indevido e recorrente além de gerar resistência ao parasito pode causar efeitos colaterais abusivos nos pacientes e nenhum tratamento disponível promove a cura (14,21).

## Leishmanioses

Junto com a doença de Chagas, a leishmaniose é uma das sete Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) mais importantes, com uma ampla distribuição geográfica, estando presente em 98 países da América, África, Ásia e Europa (22,23). O agente etiológico é o parasito do gênero *Leishmania*, com mais de 20 espécies que causam diferentes manifestações da doença. O parasito é transmitido pela picada do flebotomíneo fêmea infectada, da família Psychodidae e subfamília Phlebotominae, sendo descritas 98 espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* como transmissores da doença (22–24). Segundo a Organização Mundial da Saúde (24), anualmente surgem entre 700.000 mil a 1 milhão de novos casos da doença com uma estimativa de 20.000 a 30.000 mortes, atingindo mais de 12 milhões de pessoas ao redor do mundo (25).

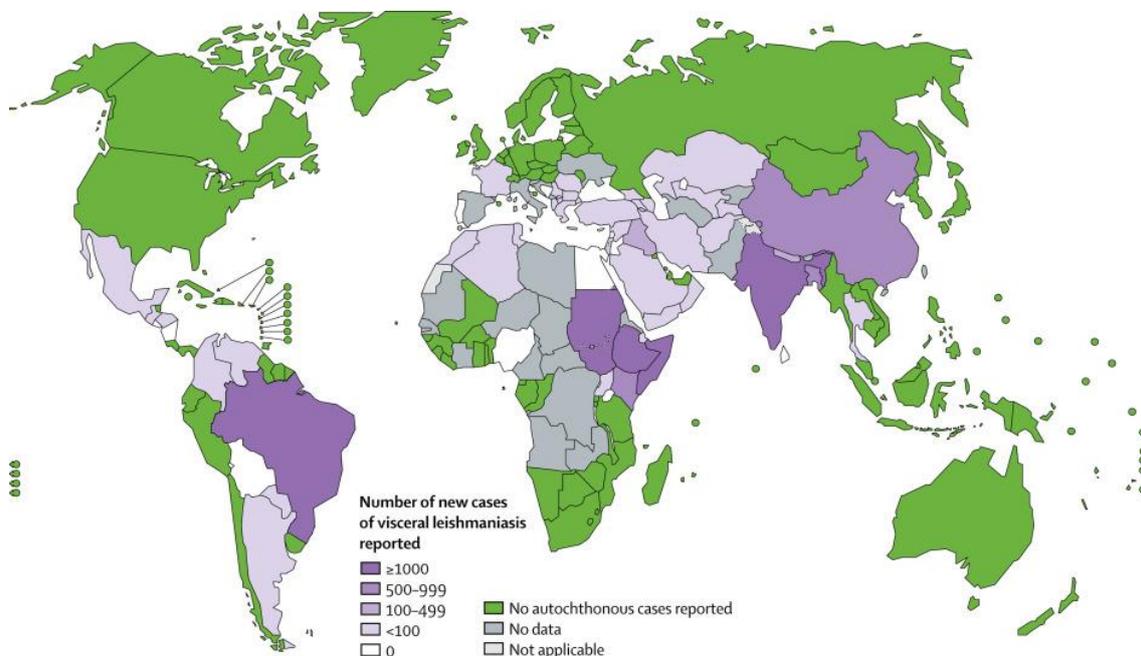
O parasito possui um ciclo de vida dividido em duas etapas, uma que ocorre no vetor e outra no hospedeiro vertebrado e a *Leishmania* se apresenta em formas distintas em cada um. No momento do repasto, o flebotomíneo fêmea deposita na pele do hospedeiro a forma promastigota metacíclica que possui um flagelo para auxiliar na locomoção e ao adentrar na corrente sanguínea são fagocitados pelas células do sistema imunológico, macrófagos e neutrófilos e se diferenciam para a forma amastigota, que possui o flagelo atrofiado. A forma amastigota é replicativa intracelular e encontra no fagolisossomo dos macrófagos, as condições ideais para a multiplicação por fissão binária, causando assim a lise dos macrófagos e retornando para a circulação sanguínea infectando novas células. Quando ocorre uma nova alimentação, o mosquito ingere macrófagos infectados e a forma amastigota diferencia para promastigota procíclico, que está presente no intestino médio do vetor (26). Por fim, estes se dividem e migram, já na forma promastigota metacíclica, para a probóscide do flebotomíneo, reiniciando o ciclo, como podemos ver na figura 4 (27,28).



**Figura 4 - Ciclo de vida do parasito *Leishmania*.** O esquema representa o momento do repasto realizado pela fêmea do flebotomíneo que inicia o ciclo ao depositar formas promastigotas metacíclicas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Os parasitos são fagocitados pelos macrófagos e, no fagolisossomo, diferenciam-se para a forma amastigota e multiplicam-se até romperem os macrófagos, que liberam os parasitos novamente na circulação e infectam outros macrófagos. Quando ocorre novo repasto, macrófagos infectados são ingeridos pelo flebotomíneo e diferenciam para promastigotas procíclicas, reiniciando o ciclo. Fonte: Adaptado de (29).

A leishmaniose manifesta-se em três formas clínicas diferentes e de acordo com a espécie que causou a infecção, são elas: cutânea, mucocutânea e visceral (30). A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum, estando presente na Ásia, Sudeste da Europa, África, América Latina, México e Sudeste dos Estados Unidos (22) e sua manifestação é na forma de úlceras espalhadas nas regiões mais expostas do corpo, como rosto, pernas e braços (31), sendo as principais espécies envolvidas no processo de infecção: *L. major*, *L. amazonensis* e *L. mexicana*. A forma mais disseminada na América Latina é a

leishmaniose mucocutânea (LMC), que afeta as membranas da mucosa da boca e do aparelho respiratório superior, destruindo o lábio e palato, podendo causar deformação no rosto; é causada, principalmente, pelas espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis*. A leishmaniose visceral (LV) é a manifestação mais agressiva da doença por atingir órgãos vitais como o baço e a medula óssea e levando a 95 % de óbito, se não for tratada. É encontrada na África, Ásia, Sudeste da Europa e América Latina (Figura 5) e a transmissão ocorre pelas espécies do parasito *L. infantum*, *L. donovani* e *L. tropica*, caracterizada por febre, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e anemia (22,30,32).



**Figura 5 - Distribuição global das leishmanioses.** Casos de leishmaniose visceral registrado ao redor do mundo, indicando a maior incidência no Brasil, algumas regiões da África e Índia Fonte: (26)

O principal tratamento para as leishmanioses é realizado por meio dos antimoniais pentavalentes (Sb5+), entretanto outras drogas têm sido eficientes no controle da doença quando os parasitos adquirem resistência aos antimoniais. Os medicamentos utilizados são: o antifúngico Anfotericina B lipossomal, miltefosina, paromomicina e pentamidina (33,34), e mesmo com

tratamentos alternativos disponíveis, é comum haver falha terapêutica. Os efeitos colaterais decorrentes do tratamento podem ser agressivos e tóxicos aos pacientes, dentre eles podemos citar náuseas, alterações cardíacas, nefrite, distúrbios gastrointestinais e respiratórios que contribuem para o abandono e falha do tratamento (22,34).

Diante deste quadro, tem-se a necessidade de um estudo minucioso da biologia molecular do *T. cruzi* e de *Leishmania* para a melhor compreensão dos seus mecanismos de virulência e de escape do sistema imune que garantem o sucesso da infecção e, desta forma buscar potenciais alvos quimioterápicos para um melhor tratamento da doença de Chagas e leishmanioses. Dentre os possíveis alvos, propomos a prolil oligopeptidase, uma serino-protease que será contextualizada a seguir.

### **Proteases como potenciais alvos de drogas**

Proteases são enzimas que clivam ligações peptídicas de proteínas ou peptídeos podendo agir em um sítio específico ou não, ou ser limitado a uma ou a diversas regiões de clivagem (35). As proteases ou peptidases são essenciais todos os organismos vivos e aos vírus e estão envolvidas nos mais diversos processos biológicos como a modulação do sistema imunológico, a digestão de peptídeos, a localização e a ativação de muitas proteínas o que contribui para o processamento de informação celular, transdução de sinal, proliferação e diferenciação celular, transcrição e replicação do DNA, angiogênese, neurogênese, ovulação, senescência, necrose e apoptose celular, dentre outros. Estão envolvidas também em doenças cardíacas, câncer, desordens neurológicas, processos inflamatórios (36,37). As proteases são divididas em exopeptidases e endopeptidases de acordo com a posição do sítio de clivagem. As exopeptidases clivam ligações peptídicas próximo as regiões C e N-terminal, enquanto que as endopeptidases hidrolisam as ligações internas ou distante dos finais da cadeia polipeptídica (38). As proteases são classificadas de acordo com a clivagem do sítio catalítico e a presença do resíduo de aminoácido sendo distribuídas nos grupos aspártico, cisteíno, metaloprotease, treonina, glutâmico, asparagina e serino proteases (38–40).

## Proteases de patógenos

Estudos tem mostrado que proteases além de serem essenciais para a viabilidade de patógenos estão envolvidas na patogenia de muitas doenças causadas por eles. Um estudo recente da protease otubaína-like de *Leishmania infantum* (OtuLi) indica que essa enzima induz *in vitro* a secreção da interleucina-6 (IL-6) e secreção do TNF- $\alpha$ , podendo contribuir para uma atividade pró-inflamatória no desenvolvimento da leishmaniose (37). A catepsina L, uma protease pertencente a classe das cisteíno, teve seu papel sugerido na sobrevivência da *Leishmania* presente nos macrófagos, com altos níveis de expressão identificados na forma amastígota. Em *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), a catepsina L está relacionada virulência, auxiliando o parasito a atravessar a barreira do cérebro para a corrente sanguínea, enquanto que no *T. cruzi* está envolvida em diferentes funções, como metabolismo, diferenciação, invasão da célula hospedeira e evasão do sistema imunológico; e é conhecida como cruzipaína, uma papaína tipo catepsina L-Like (37,41). As cisteíno protease são de grande importância no estabelecimento da infecção causada pelo *Plasmodium*, visto que são implicadas na hidrólise da hemoglobina, com o envolvimento da falcipaína-2, falcipaína-3 e dipeptidil aminopeptidase. Essas proteases estão envolvidas na ruptura dos eritrócitos, o que é corroborado pela inibição destas enzimas acarretando no bloqueio da ruptura por esquizontes maduros (37).

Outra classe de protease que está envolvida com patógenos auxiliando na progressão de muitas doenças, é a das serino-proteases. No parasito *T. cruzi*, a oligopeptidase B está envolvida na sinalização do cálcio e, o nocaute do seu gene, o parasito mostrou que não era capaz de invadir a célula hospedeira e, conseqüentemente, não foi eficiente em estabelecer a infecção (41). De forma oposta, o nocaute de um alelo do gene *DPP8TC*, que codifica outra serino protease, apresentou uma redução no crescimento dos parasitos, porém num ensaio de infecção *in vitro* se mostraram mais infectivos quando comparados aos parasitos selvagens (42). Este aumento da infecção pode ter o ocorrido pela ação de proteases que clivam no mesmo sítio e assim compensam a perda do alelo da *DPP8TC*.

Diante da importância das proteases no desenvolvimento de patologias causadas por protozoário, a peptidase que é objeto de estudo deste trabalho pertence ao grupo das serino proteases e possui grande interesse devido a sua participação em diversos processos fisiológicos e envolvimento em muitas doenças: a prolil oligopeptidase.

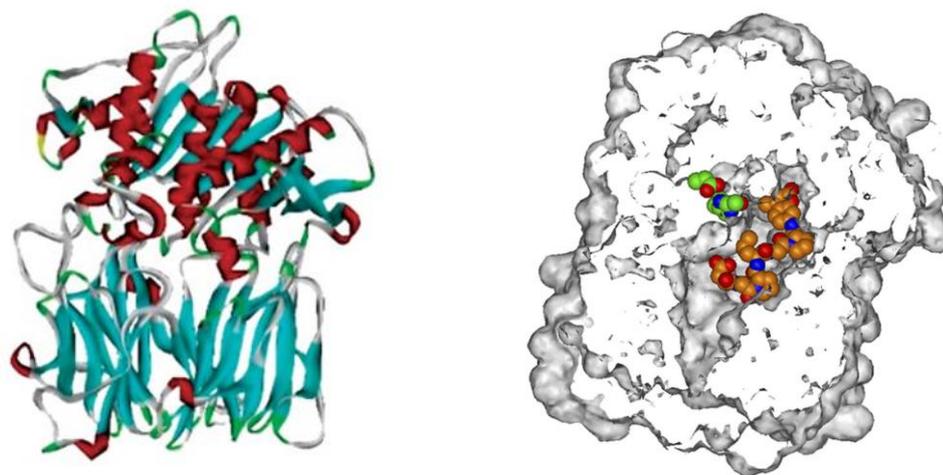
A prolil oligopeptidase (POP) é uma serino protease, pertencente à família S9 do clã SC (43) e tem como característica a capacidade de clivar peptídeos de até 30 aminoácidos na região carboxi-terminal pós prolina e com menos eficiência após alanina (28,44) Seu peso molecular pode variar de 70 kDa, como a POP de *Pyrococcus furiosus* (45), a aproximadamente 80 kDa, como por exemplo a POPTc80 (46).

No homem, a POP está presente em nos tecidos e tipos celulares específicos bem como em células do cérebro, onde é altamente expressa (47,48). Foi primeiramente descrita no útero humano como uma proteína capaz de inativar o hormônio oxitocina que está envolvido nas contrações musculares do útero (49). A POP é descrita principalmente como citosólica, entretanto estudos apontam sua presença na membrana plasmática e na forma de ligante de membrana no retículo endoplasmático rugoso e no aparelho de Golgi (48) e suas funções biológicas variam de acordo com a célula em que se encontra e se a sua localização é extracelular ou intracelular. Sua especificidade em clivar pequenos peptídeos torna a POP essencial para diversos processos fisiológicos e entre suas funções conhecidas estão a degradação e a maturação de peptídeos hormonais e neuropeptídeos como a substância P, neurotensina, tirotropina e angiotensina que estão envolvidos não somente nos processos de memória e aprendizagem, mas também em várias doenças neurológicas (44,50–53). Um estudo realizado com feto de camundongos indicou um aumento da atividade enzimática e dos níveis de RNA mensageiro no cérebro logo no estágio inicial da embriogênese, sugerindo assim que a POP está envolvida na neurogênese e na proliferação celular (53). Níveis anormais da atividade da POP foram encontrados em tecidos neurais de pacientes com amnésia, Alzheimer, transtorno bipolar e depressão e, ainda está envolvida na modulação de inositol fosfato e, conseqüentemente, na via de sinalização celular, fato que tem sido mostrado em estudos da patogenia de doenças neurodegenerativas (54–56).

Cada vez mais a POP vem sendo relacionada a diferentes doenças e uma das mais recentes descobertas, foi o seu envolvimento em processos inflamatórios por meio da modulação de peptídeos ativos. Os neutrófilos são células inflamatórias importantes na defesa contra patógenos e são recrutados por meio de sinais quimioatraentes liberados pelo organismo invasor. Um desses sinais é o tripeptídeo prolina-glicina-prolina (PGP), o qual a POP tem capacidade de gerar a partir de fragmentos de colágeno indicando assim seu papel nas doenças inflamatórias pulmonares como a Fibrose Cística (FC) e nas doenças inflamatórias intestinais, como a doença de Crohn (57–59).

Diante do exposto, é necessário expandir o conhecimento sobre a prolil oligopeptidase no que se refere a outras doenças, como as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) e, no presente trabalho o enfoque são a Doença de Chagas e a Leishmaniose.

A prolil oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* (POPTc80) (Figura 6) vem sendo objeto de estudo pelo nosso grupo já há alguns anos, onde foi primeiramente descrita como uma protease capaz de clivar um substrato fluorogênico N-Succinyl-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC, que representa uma sequência conservada de colágeno, bem como foi eficiente na hidrólise de colágenos humanos purificado dos tipos I e IV e colágeno nativo do tipo I presente no mesentério de rato, com atividade comparável àquela da collagenase da bactéria invasiva *Clostridium histolyticum* (60).



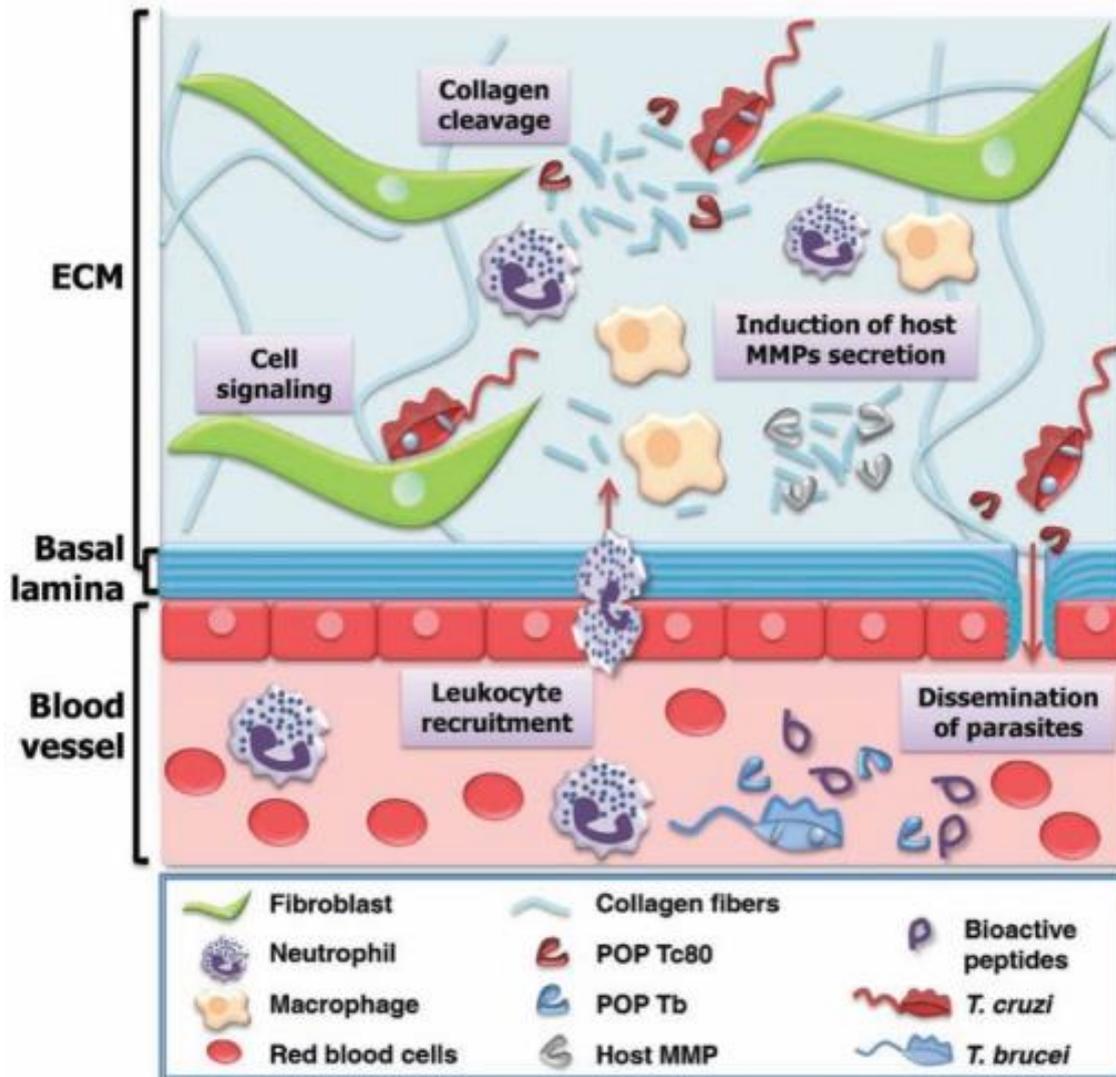
**Figura 6 - Modelo tridimensional da POPTc80.** O substrato Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC (laranja) encontra-se posicionado por *docking* próximo ao sítio catalítico Ser-Asp-His (verde). (61)

Com resultados obtidos nos estudos anteriores, foi levantada a hipótese desta protease estar envolvida na degradação de componentes da matriz extracelular e, para avaliar se de fato isto ocorre, um estudo aprofundado da enzima foi realizado e observado que esta protease também hidrolisa outro componente da matriz extra celular (MEC), a fibronectina, porém de maneira limitada (62), sugerindo assim que a POPTc80 poderia facilitar a infecção de células hospedeiras pelo *T. cruzi* por meio da destruição de fibras colágenas presentes na MEC e na membrana basal, permitindo acesso do parasito à célula (46,62). A degradação do colágeno é feita por alguns microorganismos invasores, gerando danos nos tecidos e permitindo a distribuição dos agentes patogênicos no organismo hospedeiro. Este dano tecidual induz a expressão de metalo proteases (MMPs) que apresentam uma resposta inflamatória e repara o tecido. A quebra do colágeno pelas MMPs gera fragmentos menores que podem ser clivados pela POP resultando no tripeptídeo Pro-Gly-Pro. Essa sequência de peptídeos ligados aos receptores CXCR1 e CXCR2 funcionam como quimioatrativos para neutrófilos que se dirigem para o local da infecção infiltrando e lesionando o tecido. A inibição da MMP no tecido de corações infectados pelo *T. cruzi* foi capaz de reduzir o dano no miocárdio e aumentou a taxa de sobrevivência dos animais (63,64), implicando o envolvimento da POPTc80 no estabelecimento da infecção.

O papel da POPTc80 na infecção de células hospedeiras pode ocorrer via secreção ou proteína de superfície (Figura 7) e, para esclarecer essa hipótese, um ensaio de secreção foi realizado em diferentes tempos e o resultado indicou que a atividade enzimática aumentou em relação ao tempo de secreção (60). Para melhor compreender a participação da POPTc80 na doença de Chagas, inibidores específicos foram testados em um ensaio de infecção por tripomastigotas em células L6 e foi observado que quanto maior a inibição enzimática maior foi a inibição da infecção pelo parasito. Para atestar que a POP do parasito estava sendo inibida, inibidores irreversíveis específicos foram sintetizados e modificados por química combinatória para que seu potencial

inibitório fosse avaliado sobre a capacidade infectiva do parasito (62), pois estudos apontam que esta protease é secretada pelas formas tripomastigotas, podendo assim favorecer o processo de infecção das células hospedeiras (62,65,66). Os inibidores obtidos se destacaram pela alta especificidade e seletividade para a POPTc80, uma vez que não inibe outras proteases de *T. cruzi* como oligopeptidase B, catepsina B e cruzipaina e em testes de infecção *in vitro* foi observado que o inibidor **4a** bloqueou a infecção da célula hospedeira por formas tripomastigotas com uma IC<sub>50</sub> of 15 µM (62,66).

Para analisar se a inibição com inibidores específicos da POP (67) interferem na adesão ou invasão do parasito à célula hospedeira, um ensaio com diferentes concentrações de inibidor foram testadas (10 µM, 25 µM e 100 µM) e observou-se que a quantidade de parasitos intracelulares foi inversamente proporcional à concentração dos inibidores testados, ao passo que a quantidade de parasitos extracelulares variou de maneira diretamente proporcional. Dentre todas, a concentração de 10 µM foi a mais eficiente. Esses dados indicam que a inibição interfere principalmente no processo de invasão da célula hospedeira, sugerindo, assim, a participação da POPTc80 na infecção pelo *T. cruzi* (46), bem como seu potencial alvo quimioterápico para o tratamento da doença de Chagas (62)



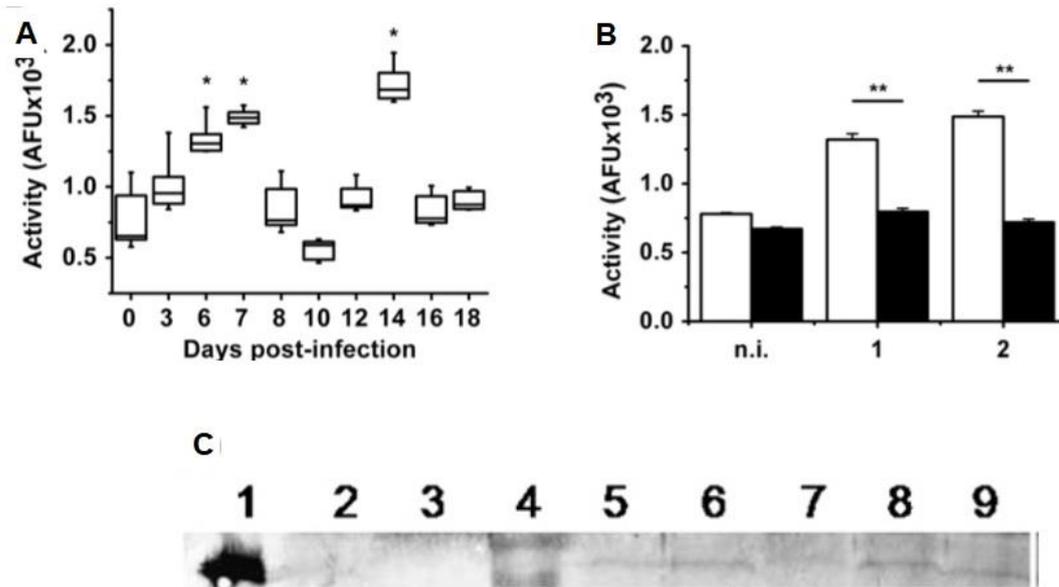
**Figura 7 – Participação da POP em processos infecciosos.** Envolvimento na clivagem de colágenos, sinalização celular, indução da secreção de MMPs do hospedeiro, disseminação dos parasitos. (63)

Através de modelagem e análise da estrutura por *screening virtual*, possíveis inibidores da POPTc80 foram desenvolvidos. Após análises *in silico*, 13 moléculas foram selecionadas para testar a capacidade inibitória da enzima recombinante e todas elas apresentaram um  $K_i$  entre 0.667 a 81.4  $\mu\text{M}$  (61). Os melhores  $K_i$  encontrados (0,667-1,009  $\mu\text{M}$ ) referiam-se aos inibidores 1, 4 e 5, que são da mesma série química e obtiveram as melhores pontuações no cálculo de encaixe a proteína (61).

A mais recente descoberta do papel desta protease na doença de Chagas foi através do desenvolvimento de uma vacina produzida a partir do soro imune contra a POPTc80 e que foi capaz de conferir proteção contra a infecção pelo *T.*

*cruzi*. Camundongos imunizados neutralizaram a infecção por tripomastigotas, o soro anti-Tc80 inibiu quase 100% da atividade enzimática e o ensaio de citotoxicidade dependente do complemento desencadeou a lise do parasito. Camundongos imunizados e infectados com a cepa subletal K98 indicou que desordens cardíacas foram evitadas na fase crônica da doença, mostrando que a vacina é eficaz também nesse estágio (68), confirmando a importância da POPTc80 e a necessidade de estudos e abordagens aprofundadas para o desenvolvimento de fármacos.

Esta protease também é estudada em outros organismos por nosso grupo de pesquisa e, assim como a POPTc80, a POP de *Trypanosoma brucei* (POPTb) também é capaz de clivar colágeno purificado humano dos tipos I e IV, sendo que na presença de inibidor específico nenhuma hidrólise é detectada. A POPTb tem um papel importante patogenicidade da doença do sono dada a capacidade desta enzima em hidrolisar peptídeos hormonais como o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Estes hormônios estão descritos como desregulados no âmbito da doença e, em um modelo experimental realizado em camundongos infectados pelo parasito *T. brucei*, foi observado que a POPTb é liberada no plasma destes animais onde permanece ativa por várias horas e devido à sua capacidade em hidrolisar colágeno, a entrada e propagação do parasito no hospedeiro pode ser facilitada. O ensaio *in vivo* realizado em camundongos infectados com o parasito *T. brucei* apresentou atividade enzimática no plasma infectado (Figura 8A) e, na presença do inibidor específico para a POPTc80, a atividade foi inibida sendo comparada a observada no plasma dos camundongos não infectados (Figura 8B). A expressão da proteína foi identificada no plasma infectado no ensaio de *immunoblotting* (Figura 8C) (69).



**Figura 8 – Detecção da POPTb no plasma de camundongos infectados por *T. brucei*.** (B) A POPTb é liberada no plasma infectado pelo parasito e sua atividade enzimática aumentou de acordo com a parasitemia. As barras representam o intervalo de dados; as caixas representam quartil inferior e superior. \*  $p < 0,05$  comparado com o início da infecção. (C) Plasma infectado ou não infectado foram inibidos com 100 nM do inibidor **4<sup>a</sup>** e a atividade foi medida com o substrato N-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC. Barras fechadas (inibidor); barras abertas (sem inibidor). (D) A POPTb está presente no plasma dos camundongos infectados. rPOPTb (linha 1), plasma de 2 camundongos não infectados (pista 2 e 3) ou 5 camundongos infectados com *T. brucei* (linha 5 a 9) foram removidos por SDS-PAGE 10%, transferidos para uma membrana de nitrocelulose e incubados com anticorpo anti-rPOPTb. Linha 4: marcador de peso molecular. (69)

Outra protease que vem sendo estudada em tripanossomatídeos por nosso grupo, é a prolil oligopeptidase de *L. infantum* (POPLi). Durante meu mestrado realizei o estudo dessa enzima. A proteína recombinante foi produzida com sucesso e a partir disto foi realizada sua caracterização bioquímica, por meio de ensaios que determinaram suas condições ótimas, como pH e o tampão de atividade para melhor hidrólise do substrato, que foi estabelecido Hepes 25 mM, NaCl 150 mM, DTT 5 mM com o pH de 7,5. Testes com diferentes substratos determinou o Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC a 20  $\mu$ M, como a melhor atividade e a clivagem foi inibida em aproximadamente 95% pelos inibidores

clássicos de serino protease, TPCK e TLCK, bem como pelo inibidor específico para POP, o Z-Pro-Prolinal (70).

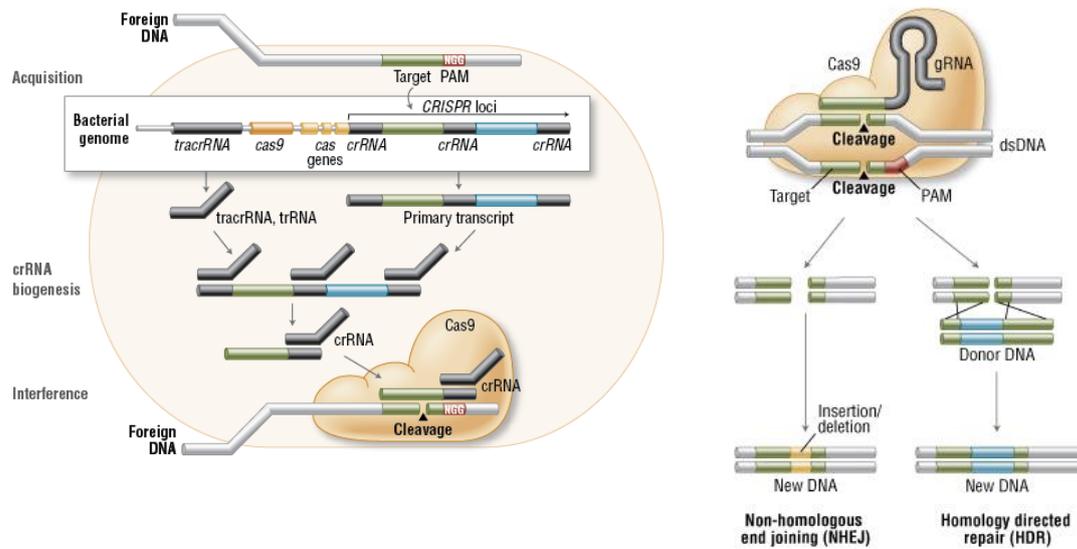
Diante do conhecimento adquirido acerca da POPLi, uma investigação aprofundada do seu envolvimento na leishmaniose foi realizada durante o doutorado através de ensaios de infecção *in vitro* e testes adicionais de inibição enzimática, que serão apresentados na segunda parte de resultados desta tese.

### **Edição gênica por CRISPR/Cas9**

O sistema CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*), derivado da bactéria *Streptococcus pyogenes*, é uma técnica desenvolvida para manipulação gênica e consiste de sequências específicas de RNA que age associada ao gene Cas9, uma endonuclease presente em bactérias e arqueas, conferindo imunidade adquirida contra vírus e DNA exógenos (71). O DNA invasor, ao ser identificado é cortado e incorporado entre sequências repetitivas e palindrônicas no *locus* CRISPR. O locus é transcrito inicialmente em um RNA precursor não-codificante (pre-crRNA) para em seguida ser processado em crRNA maduro (Figura 9). O ácido nucleico alvo é reconhecido por possuir uma sequência conservada denominada PAM (Motivo Adjacente ao Protospacer) ligada na região acima do crRNA que em conjunto com o RNA trans-ativador (tracrRNA) formam um complexo com endonuclease Cas9 (71,72). A fusão dos crRNA e tracrRNA geraram a sequência única, RNA guia (gRNA), que direciona a Cas9 para sítios específicos no genoma hibridizando o RNA-DNA, o que provoca uma quebra na dupla fita que engatilha a edição gênica (71,73,74).

**A**

**B**



**Figura 9 - CRISPR/Cas9.** Mecanismo de ação do sistema CRISPR como sistema de defesa adquirido em procariontos (A) ou na utilização como ferramenta de edição de genes (B).

O DNA pode ser reparado por 3 formas distintas, que são a Junção Final Não-Homóloga (Non-Homologous End Joining – NHEJ, Figura 9), é um mecanismo conhecido por gerar erros no momento da substituição, inserção ou deleção, que pode ser pela formação de um códon de parada no local da quebra (75). Este tipo de reparo apesar de amplamente distribuído entre os eucariotos é ausente em tripanossomatídeos (73). Outra forma é o Reparo por Homologia Direta (*Homology Directed Repair – HDR*), que na presença de uma sequência de DNA doador homóloga induz o reparo por recombinação causando mutações precisas na base (72,74). A Junção Final mediada por microhomologia (*Microhomology-Mediated End Joining – MMEJ*), reparo que substitui o NHEJ em tripanossomatídeos (73), pode gerar inversão ou duplicação por recombinação trans-alélica entre duas quebras da dupla fita, com reparo por homologia direta; a inversão é feita através de repetições curtas invertidas que são inseridas e, este mecanismo tem alta eficiência na modificação gênica (74–76).

O sistema CRISPR/Cas9 possui aplicações na pesquisa, medicina e biotecnologia, sendo atualmente uma das principais ferramentas para a descoberta de tratamentos de várias doenças, principalmente as doenças

genéticas. Seu uso pode ser na geração de transgênicos, seleção de genes embrionários, estudo funcional de genes envolvidos em patologias, como no caso das tripanossomíases (73,74,76).

Neste trabalho, a aplicabilidade da engenharia gênica CRISPR/Cas9, foi na deleção do alelo *Esmeraldo-like* do gene prolil oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* (*poptc80*) para um melhor entendimento da sua participação da patogenia da doença de Chagas. O nocaute reparado por homologia direta, com a integração de um cassete contendo o gene higromicina fosfotransferase e regiões de homologia ao gene alvo.

## Justificativa

A doença de Chagas e a Leishmaniose, são classificadas como Doenças Tropicais Negligenciadas (DNT) por atingirem, principalmente a população de baixa renda de países subdesenvolvidos, embora este fato esteja mudando dada a imigração populacional para países da Europa e América do Norte. Os tratamentos disponíveis são agressivos, tóxicos e não garantem a cura da doença, principalmente no que tange a doença de Chagas. Neste contexto, investimento em pesquisa básica e aplicada que focalizem na busca de alvos terapêuticos e desenvolvimento de novos fármacos deveria ser uma prioridade mundial dado o caráter emergente dessas doenças.

Os resultados prévios obtidos nos últimos anos em estudos sobre a POP de tripanossomatídeos, principalmente pelo nosso grupo de pesquisa, revela o potencial dessa enzima como alvo terapêutico. Para corroborar esse potencial em relação ao *T. cruzi*, optamos por aprofundar o estudo funcional, por meio de nocaute físico e de edição gênica por CRISPR-Cas9 de *POPTC80*, e assim obter informações da sua relevância na viabilidade e virulência do parasito e conseqüentemente do impacto na doença de Chagas.

Após uma caracterização bioquímica inicial da POP de *L. infantum* um estudo aprofundado para melhor compreender a sua importância para o parasito se faz necessário, além disso, estabelecer a sua participação no processo de infecção pela *L. infantum* em macrófagos assim, os resultados obtidos podem contribuir para o desenvolvimento de potenciais alvos terapêuticos

## Objetivo

O objetivo geral deste trabalho foi aprofundar o estudo funcional da prolil oligopeptidase de *T. cruzi* e de *L. infantum*, por meio de:

### 1. *Trypanosoma cruzi*

- 1.1 - Nocaute gênico de ambos alelos da *POPTC80* tanto por metodologia clássica quanto usando o sistema CRISPR/Cas9.
- 1.2- Análise funcional dos mutantes *in vitro*, quanto à sua viabilidade, taxa de crescimento;
- 1.3- Análise do nível de expressão da *POPTc80*, de outras proteases da família POPs e proteases capazes de clivar pós-prolina;
- 1.4- Avaliação da metaciclo gênese nos parasitos mutantes e selvagens.
- 1.5- Avaliação *in vitro* dos efeitos dos inibidores de *POPTc80* na infecção do *T. cruzi* em células hospedeiras.

### 2. *Leishmania infantum*

- 2.1 - Avaliação dos efeitos de inibidores específicos de POP, Z-Pro-Prolinal e S 17092, na infecção de *L. infantum* em macrófagos diferenciados de medula óssea;
- 2.2- Avaliação da taxa de inibição da infecção com o anticorpo policlonal anti-rPOPLi;
- 2.3 - Determinação da localização de POPLi em *L. infantum* por meio de *Western blot* e imunofluorescência confocal.

## Material e Métodos

### Cultura de células

Epimastigotas de *T. cruzi* da cepa CL-Brener foram cultivados em meio Liver Infusion Triptose (LIT) suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino inativado (SFB) adicionado de 150 µg/mL de gentamicina, a 28°C. Para seleção de epimastigotas mutados, a cultura do parasito foi mantida na concentração de 20 % SFB, inicialmente e conforme a cultura foi estabelecida, a concentração foi reduzida gradualmente a 5%; além do antibiótico gentamicina, foi adicionado o antibiótico de seleção G418 a 200 µg/mL. As formas tripomastigotas foram obtidas por infecção de células L6, cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com 10% de Soro Fetal Bovino Inativado e 150 µg/mL de gentamicina, a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### Expressão e Purificação da POPTc80

A POPTc80 foi expressa e purificada de acordo com protocolo já estabelecido em um trabalho anterior (46). Uma colônia derivada da transformação em *E. coli* cepa BL21 DE3 com o vetor pET15b-*poptc80*, foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) na presença de ampicilina na concentração de 100 µg/mL, até atingir a densidade óptica (O.D) de 0,4. Em seguida, a cultura foi induzida com 0,05 mM de IPTG durante 5h a 18°C, centrifugada a 2.000 x g por 20 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspenso em tampão de ligação (Tris 50 mM e NaCl 400 mM, pH 8,0) e lisado com BugBuster™ contendo 20 µg/ml de RNase, sob agitação por 20 min. O sobrenadante da amostra lisada foi submetida a uma coluna com matriz de níquel – agarose, previamente equilibrada com tampão de ligação, onde a proteína recombinante que contém uma cauda com seis histidinas se liga ao níquel da coluna. O extrato foi lavado com 30 volumes (da matriz) com tampão de lavagem (Tris 50 mM, NaCl 400 mM e Imidazol 5 mM pH 8,0) e eluído com tampão de eluição em três diferentes concentrações de imidazol: 20 mM, 50 mM

e 80 mM. Foram realizadas eluições no volume de 500 µl estando a proteína pronta para o uso.

### **Produção de soro anti-rPOPTc80**

Seis camundongos BALB/C foram imunizados com aplicação intradérmica de 10 µg de proteína purificada em quatro aplicações. Na primeira imunização foi usado o adjuvante completo de Freund e, nas seguintes, o adjuvante incompleto, havendo um intervalo de 15 dias entre as imunizações. O soro foi coletado 7 dias após a última imunização por punção cardíaca e incubado à temperatura ambiente por 1h e, em seguida, centrifugado 3000 g por 5 min para separação do soro. Foi adicionado igual volume de glicerol e o soro foi estocado a -20°C.

### **Identificação dos níveis de expressão da POPTc80 por *Western blot***

Para testar os soros produzidos, extrato proteico solúvel e insolúvel de formas epimastigotas, na quantidade de  $5 \times 10^7$  cels/mL, foi obtido após 3 ciclos de congelamento/ descongelamento, na presença de coquetel de inibidores de protease. O extrato foi centrifugado a 16.000 g por 15 min, para separação das frações solúvel e insolúvel e, ambas, foram fervidas por 5 min, 95 °C em tampão Laemmli (2% de SDS, 10% de glicerol, 5% de 2-mercaptoetanol, 0,002% de azul de bromofenol, 125 mM de Tris HCl, pH 6.8) (Laemmli, 1970). A POPTc80 recombinante, fervida na presença de tampão Laemmli e na concentração de 60 ng, foi usada como controle na reação com soro e as amostras foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 10%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences) usando tampão de transferência 1X (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol; 0,1% SDS) durante 1h com a amperagem constante de 350 mA. O bloqueio da membrana foi feito com TBS (Tris-buffered saline) na presença de 5% leite desnatado (p/v) por 30 min e, em seguida, foi incubada durante 1 h, em temperatura ambiente com o anticorpo anti-rPOPTc na diluição de 1:100 em TBS-Tween 0,1% e leite 1% (p/v). Para incubação com o segundo anticorpo anti-mouse/peroxidase (1:30.000), a membrana foi lavada 7 vezes com TBS-Tween 0,1% (v/v). A incubação ocorreu

durante 1 h. Para revelação, a membrana foi lavada nas mesmas condições descritas anteriormente e incubadas com o substrato peroxidase Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) para detecção do complexo antígeno anticorpo, com revelação por quimioluminescência no aparelho ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences).

### **Construção de cassetes para o nocaute do *POPTC80***

A estratégia de deleção do alelo *Esmeraldo Like* do gene *poptc80* foi por CRISPR/Cas9. Para a construção do cassete, uma análise da sequência genômica do alelo *Esmeraldo-Like* da prolil oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* (TcCLB.506247.230- <http://www.genedb.org>) e das enzimas de restrição que seriam utilizadas nos sítios de clonagem foi realizada. Para compor o cassete, uma sequência de 91 bases no sentido 5' e outra no sentido 3' foram selecionadas para a indução por homologia direta no *locus* da *poptc80*, denominada ultrâmero. Os ultrâmeros possuem em suas regiões iniciais e finais primers que reconhecem a região intergênica HX1 e  $\beta$ -Tubulina (TUB), para serem ligados ao cassete. O gene higromicina fosfotransferase, que confere resistência ao antibiótico higromicina foi usada como marca de seleção para selecionar os parasitos, e a sequenciada utilizar foi a contida no plasmídeo pLESXY HYG. Primers para amplificação de cada gene foram desenhados, de forma que os sítios de restrição fossem compatíveis para clonagem do gene *higromicina fosfotransferase* entre as regiões HX1 e TUB. Para iniciar a construção, o gene HX1, foi amplificado com o iniciador 1 com sítio de restrição para *Nhe I* e o iniciador 2, com os sítios *Xho I+Xba I+Hind III*; a sequência do gene TUB foi obtida pelos iniciadores 3 (*Xho I+Xba I+Hind III*) e 4 (*EcoRV+ClaI*). Os dois fragmentos foram ligados por uma nova PCR utilizando os primers 1 e 4, mantendo entre as duas sequencias os sítios de clonagem compatíveis com o gene de *hyg*, que foi amplificado pelos iniciadores 5 e 6, com sítios de restrição *Hind III* e *Xho I*, respectivamente, e os produtos foram clonados em sistema pGEM-T *easy vector* gerando os clones *pgem-hx1tub* e *pgem-hyg* (Tabela 1).

**Tabela 1 – Iniciadores utilizados na construção do cassete para deleção do alelo Esmeraldo Like.**

	Iniciador	Sequência
1	HX1 Senso	5' GCTAGCGAAACATTTTCACGCACGAAA 3'
2	HX1 Antisenso	5'CTCGAGCTCTAGAGAAGCTTACAAGACAACCTTATAGAGCAAA 3'
3	TUB Senso	5'AAGCTTCTCTAGAGCTCGAGGTCGCACCATGTGTAGGTTT 3'
4	TUB Antisenso	5' ATCGATGATATCACTATTTTCTTTGATGAAAGGG 3'
5	HYG Senso	5' AAGCTTATGAAAAAGCCTGAACTCACCG 3'
6	HYG Antisenso	5' CTCGAGCTATTCCTTTGCCCTCGGAC 3'
7	ULTPOPTc80 Senso	5TAACCCAGTTATATTAACGGGCACTATTATTATTACCATAACTCTGGCCTGCAGA ACCAGAGTGTTTTGTGCGCGCAACGAGTCTCACCGAAACATTTTCACGCACGAAA
8	ULTPOPTc80 Antisenso	GCCTCACATGATACGCTGCCAGTCACTGCCCTTATCGCTGAGACTGTAGGCCAGCA TTGACTCGTCTTCACTCCAGGCGGTGGCTTTTAACTATTTTCTTTGATGAAAGGG

O clone *pgem-hx1tub* foi digerido com as enzimas de restrição *Hind III* e *Xho I*, no sítio de clonagem para ligação do clone *pgem-hyg*, que foi liberado do vetor com as mesmas enzimas e inserido na região de interesse por meio da enzima T4 DNA ligase.

O cassete *pgem-hx1-hyg-tub*, foi digerido do plasmídeo para que sua amplificação com os ultrâmeros *poptc80* fosse realizada ocorrendo a integração do cassete no *locus* gênico de interesse. O cassete completo foi amplificado e clonado no mesmo vetor, gerando o clone *pgem-ultpoptc80+hx1-hyg-tub+ultpoptc80*, que foi digerido do plasmídeo para transfeção. O cassete final foi sequenciado.

Em todos os passos de clonagem foram realizadas transformações em célula competente *Escherichia coli* (*E. coli*) TOP10, seguindo protocolo de rotina do nosso laboratório (77). A transformação foi plaqueada em meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL, IPTG 5 mM e X-gal 40 µg/mL e as colônias positivas foram selecionadas e confirmadas por PCR de colônia, preparação plasmidial e digestão. Foram feitas midiprep de todos os cassetes com o PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fischer Scientific) e as amostras foram digeridas do pGEM-T *easy vector*, cada qual com suas enzimas de restrição. Para transfeção nos parasitos, os cassetes digeridos foram purificados do gel de

agarose 0,8% de acordo com as orientações do fabricante do QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

### **Desenho de sgRNA e síntese do sgRNA *in vitro***

O RNA guia foi confeccionado no site de desenho de sgRNA (disponível em: <http://grna.ctegd.uga.edu/>) descrito por Tarleton e Peng (78). Foi determinada a sequência de interesse do gene *poptc80* para o direcionamento da enzima endonuclease Cas9 e correta clivagem na região de inserção do cassete, para que a deleção do gene seja bem-sucedida. Posteriormente, os primers contendo a sequência do crRNA usado para amplificação completa do sgRNA foi enviado para síntese *in vitro* em uma empresa especializada (IDT).

O sgRNA foi amplificado por reação de PCR com os primers específicos e o produto gerado foi purificado usando QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo. A amostra purificada, foi submetida a transcrição *in vitro* durante 5 horas a 37°C, seguida de nova purificação com miRNeasy Mini Kit (Qiagen). O material purificado foi pasteurizado no termociclador a 65°C, por 30 min.

### **Nocaut do alelo Non-Esmeraldo Like *POPTc80***

Em um trabalho anterior, a construção do cassete para a deleção do alelo Non-Esmeraldo Like, foi realizada de forma que o mesmo se integrava entre as regiões 5' e 3' UTR do gene (79). Para transfecção do cassete contendo o gene de resistência *neo*, formas epimastigotas de *T. cruzi* na concentração de  $5 \times 10^7$  parasito/ mL, foram lavadas duas vezes com PBS estéril gelado e uma vez com o tampão de transfecção CITOMIX (120 mM KCl, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 mM HEPES pH 7,4, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>), por fim, o precipitado foi ressuspendido em 500 µL de CITOMIX. Os parasitos foram colocados em cubetas de 0,4 mm de espessura juntamente com 25 µg do cassete e receberam dois pulsos de 500 µF, 400 kV e resistência (Ω) ao infinito utilizando o *Bio-Rad Gene Pulser*<sup>TM</sup>; o grupo controle foi transfectado somente com CITOMIX. Imediatamente após a eletroporação, os parasitos foram transferidos para

frascos contendo 5 mL meio LIT condicionado com 20% de SFB e 150 µg/mL de gentamicina e incubados a 28 °C. Após 24 h, a cultura foi diluída para um volume final de 50 mL e o antibiótico de seleção genética (G418) foi adicionado na concentração de 200 µg/mL e transferidas para duas placas de 24 poços onde ocorreu a seleção e clonagem dos parasitos mutantes. Aproximadamente quatro semanas pós transfecção, as culturas foram expandidas e congeladas em meio LIT (60% v/v) contendo 30% de SFB e 10% de glicerol.

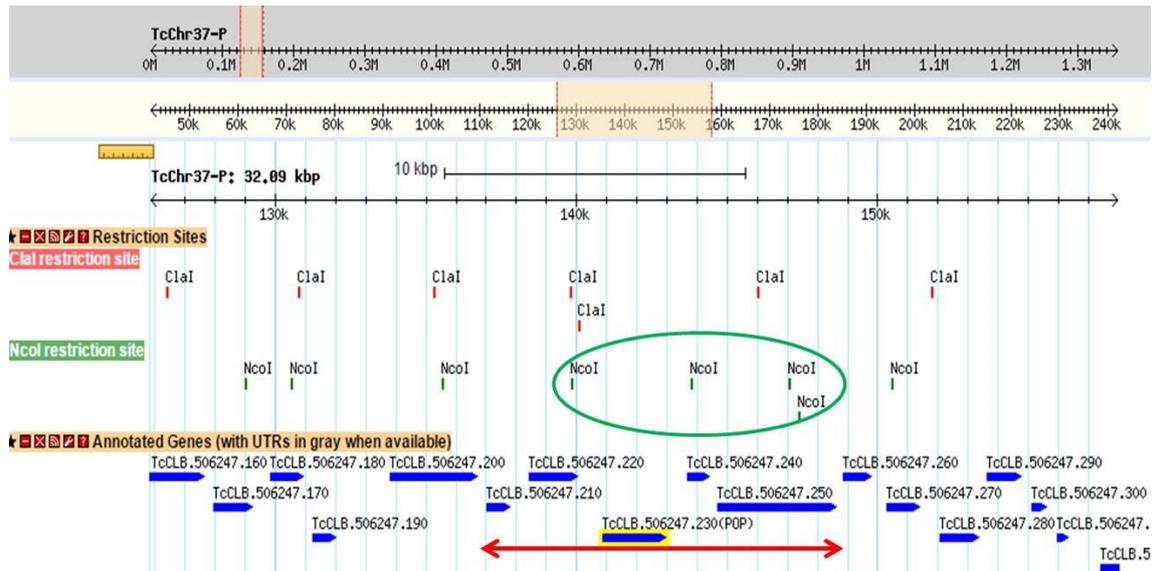
### **Nocaute do alelo Esmeraldo-Like *POPTc80***

Para nocautear o alelo restante, a técnica realizada foi CRISPR-Cas9. A cultura *POPTc80* KO<sup>+</sup>-clone B2, nocauteada no alelo *Non-Esmeraldo Like* e com resistência a neomicina, foi selecionada para transfecção com o cassete *ultpoptc80+hx1-hyg-tub+ultpoptc80* (5 µg de DNA) e com o RNA guia (15 µg) em uma cultura simples nocaute. A transfecção foi feita com o uso do aparelho Nucleofector 2b (Lonza) e de acordo com as instruções do Basic Parasite Nucleofector™ Kit 1 (Lonza). Formas epimastigotas na concentração de 5x10<sup>6</sup> p/mL foram ressuspensas em tampão Nucleofector e transferidas para cubeta de eletroporação, acrescidas dos fragmentos a serem inseridos no genoma do parasito. A cultura foi mantida em 5 mL de meio LIT com 20% de SFB e 150 µg/mL de gentamicina. Após 48 h, a cultura foi dividida igualmente em dois frascos; uma foi diluída 10 vezes e clonada em placa de 24 poços e a outra mantida sem nenhuma alteração, com exceção dos antibióticos de seleção (higromicina 100 µg/mL e G418 200 µg/mL) que foram adicionados em ambas.

### ***Southern blot***

Uma análise de restrição *in silico* foi realizada para escolha da enzima a ser utilizada na digestão do DNA genômico, e assim calcular o tamanho do fragmento a ser reconhecido. A análise foi realizada <http://www.restrictionmapper.org> no programa utilizando a sequência (TcCLB.506247.230) e depositadas no banco de dados <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>. O gene está localizado no cromossomo 37 (CL Brener *Non-Esmeraldo Like*), e a região analisada começa na posição 137028 e

termina em 148634 (Figura 10). Após feita a análise, a enzima selecionada foi a *NcoI* que não possui sítio de restrição no gene da *poptc80* e que libera um fragmento de 3963 pares de bases, fragmento este que contém o gene de interesse. Entretanto, no gene *neo*, a *NcoI* corta na posição 570, gerando assim uma banda de 1,6 kb se o cassete tiver sido integrado na posição correta.



**Figura 10 – Análise de restrição para digestão de DNA genômico.** Análise da região cromossômica onde está localizado o gene da prolil oligopeptidase indicando a enzima de restrição escolhida e as posições em que ocorre a digestão. Fonte:

<http://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/gene/TcCLB.506247.230>

Para confirmar o nocaute dos alelos da POPTc80, o DNA das linhagens selvagem e mutantes foram extraídos conforme protocolo utilizado no laboratório. O DNA extraído foi digerido com a enzima de restrição *NcoI* (Jena Bioscience) a 37°C por 18h e em seguida submetido a eletroforese de DNA em gel 0,8% agarose. Após a corrida do gel, foi realizada a transferência por capilaridade para uma membrana de nylon e em seguida o *cross-link* foi feito por meio da exposição à luz ultravioleta, com três pulsos de 1 minuto cada e 2 minutos de intervalo entre cada um. A membrana foi incubada por quatro horas a 65°C em solução de pré-hibridação (5 x SSC, 1 x solução *Denhardt's*, 0,5% SDS, 0.2 mg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado) para bloquear ligações não específicas e, decorrido este tempo, foi adicionado na mesma

solução a sonda desnaturada na concentração de 25 ng/ml para a marcação da amostra. Duas sondas foram produzidas para marcar o fragmento de DNA desejado e foram geradas por PCR seguindo especificações do *PCR Dig Probe Synthesis Kit* da Roche. Uma foi desenhada para reconhecer a região 5' da *poptc80* do alelo *Non-Esmeraldo Like* e a outra para o gene *neo* e a marcação é através de um dUTP-digoxigenina inserido na sonda e, ao reagir com um anticorpo específico indica a sequência de DNA desejada. A hibridização com a sonda de interesse ocorreu overnight a 65°C. Decorrido este tempo, a membrana foi lavada duas vezes com tampão de lavagem composto de SSC (Citrato de Sódio Salino) 0.2 e SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) 0,05%, contendo baixa concentração de sal para remover o background de interações falsas ligadas ao fragmento de DNA. Para detecção e revelação do DNA hibridizado, foi seguido o protocolo do *Dig Luminescent Detection Kit* (Roche) e o resultado foi obtido por quimioluminescência.

Após detecção do DNA por meio da sonda que reconhece a região 5' da POPTc80, foi feita uma nova sonda que detectaria o cassete inserido no genoma do parasito. Então, a nova sonda foi amplificada usando os iniciadores de *neo*, gene de resistência a G418 contido no cassete. A membrana foi desibridizada seguindo protocolo do Kit Dig Luminescent Detection (Roche) e novamente pré-hibridizada e hibridizada, entretanto, desta vez usando a sonda *neo*. Para revelar a membrana, foi realizado o mesmo protocolo anterior e a detecção do sinal foi por quimioluminescência.

## Curva de crescimento

A curva de crescimento teve início com de  $1 \times 10^5$  parasitos/mL (selvagem ou mutantes). Os parasitos foram cultivados em meio LIT com 20% de soro fetal bovino inativado (SFB) e gentamicina 150 µg/ml, sendo acrescido na cultura nocauteada o antibiótico de seleção geneticina (G418). O crescimento ocorreu durante 10 dias com contagem realizada diariamente no mesmo horário e em triplicata. Os clones avaliados e comparados ao parasito selvagem, foram o SKOPOPTc80 B2, SKOPOPTc80 C6 e DKOPOPTc80 B2.

## Metaciclogênese

Os parasitos selvagens e clones SKOPOPTc80 B2 e SKOPOPTc80 C3, foram incubados na concentração de  $5 \times 10^4$  parasitos/mL em placas de 6 poços. As culturas foram centrifugadas a 1000 xg por 10 minutos a 28°C e lavadas três vezes com PBS 1X estéril, nas mesmas condições de centrifugação já descrita. Após lavagem, os parasitos foram incubados durante 1h em meio TAU, ocorrendo a aderência no fundo da placa. Decorrida a incubação, o meio foi descartado e a cultura mantida em meio TAU3AAG por um período de 96h, ocorrendo assim a metaciclogênese dos parasitos. O sobrenadante foi centrifugado e os parasitos ressuspensos e fixados em formaldeído 4%, foram depositados em uma placa de 24 poços e corados com panótico *Instant prov stain* (NewProv). Foram contados 100 parasitos por poço e obtida a porcentagem de tripomastigotas metacíclicos em cada cultura. O experimento foi realizado em triplicata.

## Inibição da metaciclogênese

Culturas clones e selvagens foram submetidas a metaciclogênese na presença do inibidor Z-Pro-Prolinal em duas concentrações diferentes, 10  $\mu$ M e 50  $\mu$ M e o controle foi tratado com DMSO na mesma concentração final contida no inibidor. O teste foi realizado em placa de 6 poços e com triplicata para cada condição, sendo avaliado a inibição da diferenciação e o tempo em que esta ocorreria no período de 5 dias (96 h). No quinto dia de metaciclogênese, o sobrenadante foi recolhido, centrifugado e fixado com metanol na placa de 24 poços seguida de coloração com panótico *Instant prov stain* (NewProv), para a contagem de tripomastigotas metacíclicos (TM). Os parasitos que ficaram aderidos na placa de 6 poços receberam o mesmo tratamento já descrito e, novamente foram contados 100 parasitos por poço, no microscópio óptico Nikon Eclipse Ti.

## Imunofluorescência

O protocolo utilizado para imunofluorescência foi o obtido no guia Lab. Mottram (<http://www.mottramlab.org/resources>). Foram submetidas à análise, formas epimastigotas das culturas selvagem, os clones simples nocaute C6, B2, C3 e o duplo nocaute B2. As culturas foram centrifugadas e o pellet lavado 2x em PBS e submetidas ao protocolo de fixação.

As lâminas foram higienizadas com metanol (100%) e tratadas com poli-L-lisina. Os parasitos foram colocados em poços desenhados (com a caneta DakoPen - dakocytomation pen) nas lâminas e o bloqueio foi feito TB (PBS com 0,1% de Triton X-100 e 0,1% de BSA) por 5 min. O anticorpo primário utilizado foi anti-rPOPTc80 produzido em camundongos, diluídos em TB na concentração 1:100 e incubação de 1 h. As lâminas foram lavadas com PBS e incubados durante 1 h no anticorpo secundário Alexa Fluor 488, em câmara escura. Nova lavagem das lâminas foi feita e adicionado DAPI na concentração 10 µg/mL por 5min. As lâminas foram montadas com a solução de montagem DABCO (50% glicerol, 2,5%) e estocadas a 4°C.

Para analisar a diferença na fluorescência entre as culturas, dez campos aleatórios foram selecionados e a intensidade de fluorescência foi medida através do programa FIJI. O resultado obtido foi analisado no programa Graphpad Prism 6.

## Análises estatísticas e gráficos

A ferramenta utilizada para análise estatística e montagem dos gráficos foi o Graphpad Prism 6. Os resultados das infecções em macrófagos que visavam a comparação individual das amostras em relação ao controle, foi aplicado o teste T. Para analisar a variância em grupos amostrais com número maior que 2, foi aplicado One wayAnova seguido do teste com múltiplas comparações de *Tukey*. O valor de indicação de significância foi  $p < 0.05$ .



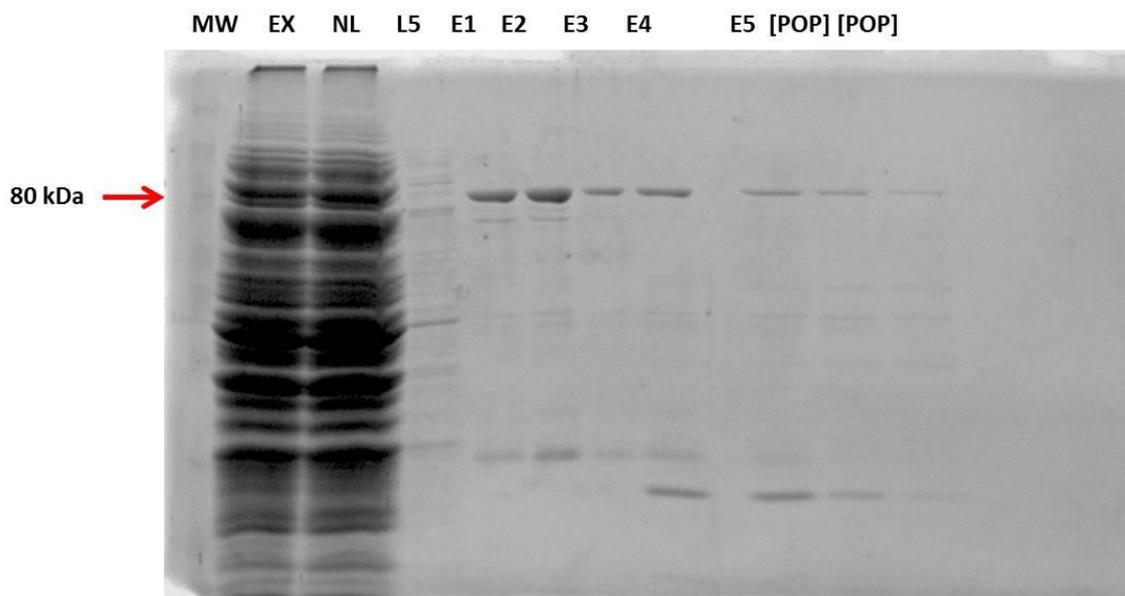
## **Comitê de Ética**

Os experimentos realizados com animais tiveram aprovação pelo comitê de ética da Universidade de Brasília, sob o processo nº 27764/2016.

## Resultados

### Purificação da proteína recombinante POPTc80 e obtenção de anticorpo policlonal

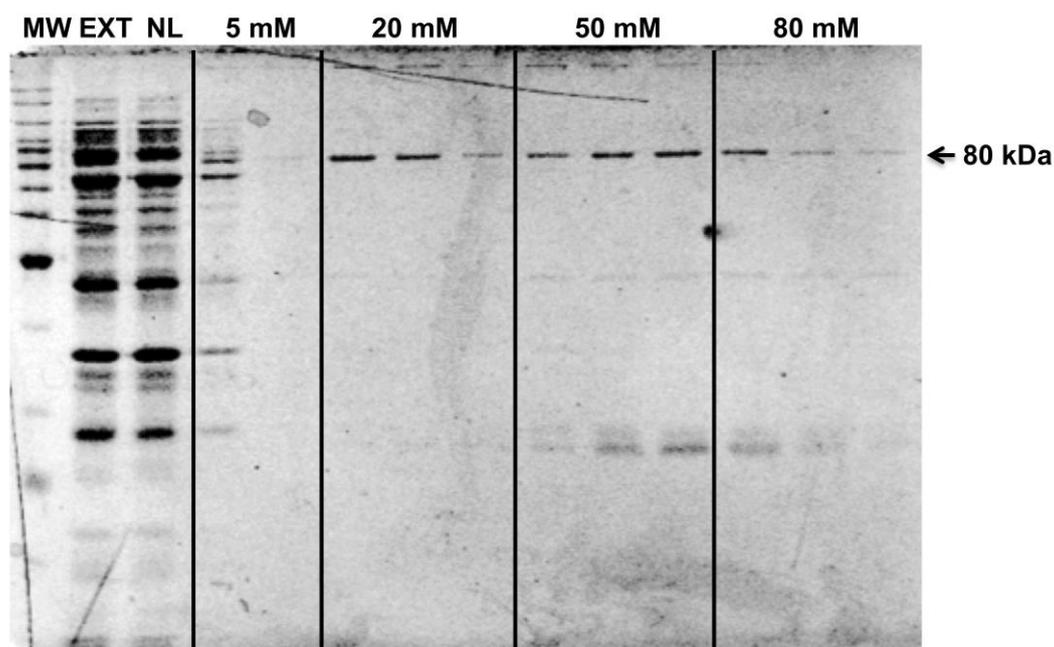
Em um trabalho anterior (80), o gene que codifica a prolil oligopeptidase de *Trypanosoma cruzi* (POPTC80) foi clonado em pET -15B e o protocolo de expressão, indução e purificação da proteína já havia sido estabelecido. Neste protocolo, a concentração de imidazol no tampão de eluição variava entre 10 a 400 mM, obtendo assim a melhor pureza da proteína. A amostra de 400 mM foi dialisada e concentrada com Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (MILLIPORE) e adicionada igual volume de glicerol, para evitar o congelamento da proteína. Todas as frações foram recolhidas e submetidas a gel SDS-PAGE 10% e teste de atividade para medir a catálise enzimática, para análise da purificação (Figura 11).



**Figura 11 – Análise da purificação da POPTc80 recombinante.** A análise foi realizada em SDS-PAGE 10% corado com azul de Coomassie. Extrato total de bactéria induzida (Ex), fração não ligada à coluna (NL), lavagem 5 mM de

imidazol (L5), 10 mM eluição 1 (E1), 20 mM eluição 2 (E2), 50 mM eluição 3 (E3), 80 mM eluição 4 (E4), 400 mM eluição 5 (E5), POP concentrada [POP].

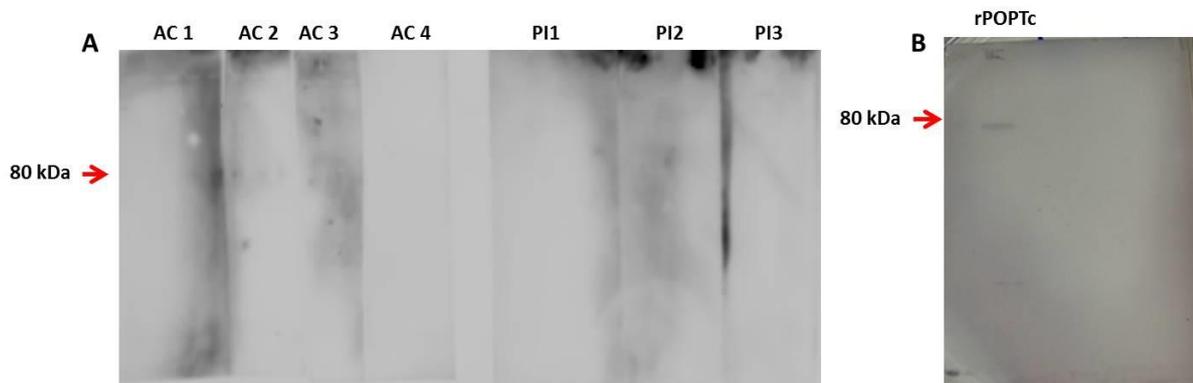
Após análise do gel SDS-PAGE, foi visto que as melhores condições de eluição da proteína é nas concentrações de 10 mM e 20 mM de imidazol, devido a isso uma nova expressão e indução foi realizada para purificar a proteína com as novas condições de eluição. A proteína foi eluída com 20 mM, 50 mM e 80 mM de imidazol, sendo as duas últimas concentrações para certificar que não restou proteína na coluna. As amostras foram submetidas a novo gel SDS 10% para verificar a qualidade da purificação e foram obtidas proteínas em todas as eluições (Figura 12). Essas amostras não foram mantidas em glicerol, pois foram usadas apenas para produção de anticorpo.



**Figura 12 – Análise da purificação da POPTc80 com novas condições de eluição.** Foram testadas baixas concentrações de imidazol nas frações eluídas. Marcador molecular (MW), extrato protéico (EXT), 5 mM de imidazol (5 mM), 20 mM de imidazol (20 mM), 50 mM de imidazol (50 mM), 80 mM de imidazol (80 mM). Gel SDS 10%.

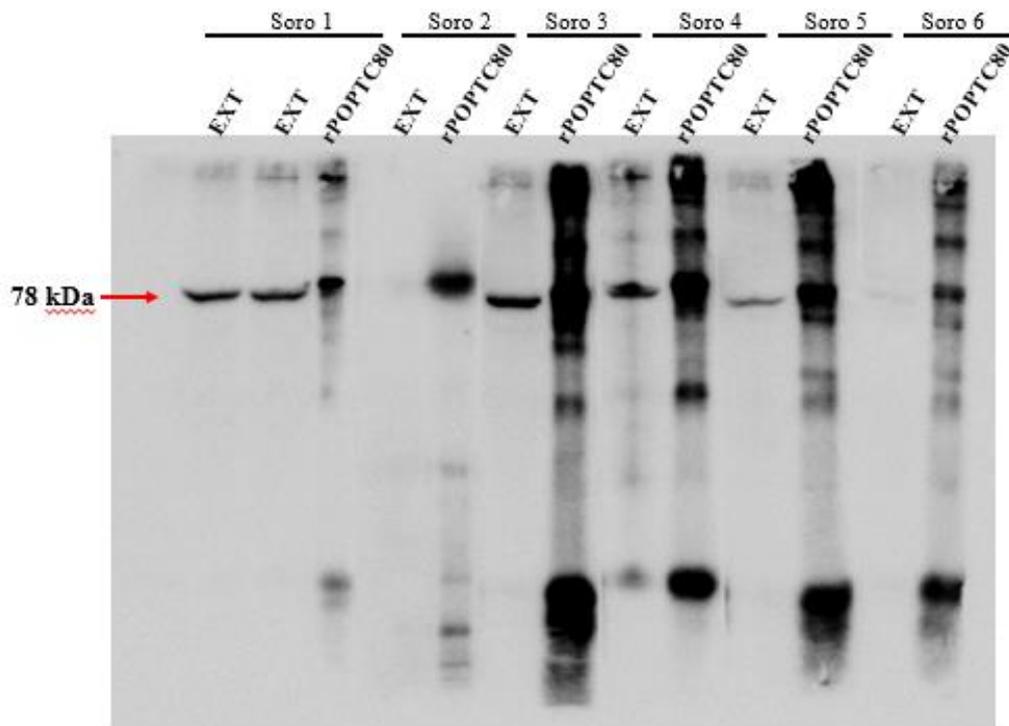
A proteína purificada foi utilizada na produção de anticorpos em camundongos. Foram feitas duas imunizações separadamente, entretanto nenhuma delas teve bom rendimento, gerando um baixo sinal no

reconhecimento da proteína no extrato do parasito (Figura 13). Desta forma, é necessário que nova imunização seja realizada para obtenção de um soro viável.



**Figura 13 – Análise da produção de soro anti-POPTc80 em extratos proteicos de epimastigotas.** O soro foi testado na diluição 1:100 (AC1, 2 e 3) bem como os respectivos soros pré-imune. Segunda imunização (A). Primeira imunização (B). Anticorpos: AC1, AC2, AC3, AC4. Soro pré-imune: PI1, PI2, PI3.

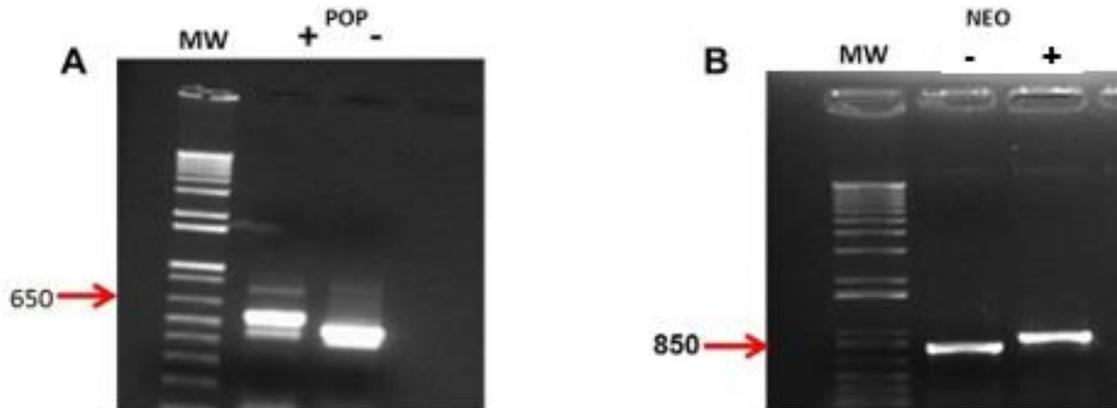
A produção de um novo anticorpo foi realizada com a proteína recombinante, alterando a concentração de 5  $\mu\text{g}$  para 10  $\mu\text{g}$  em cada aplicação. Os soros obtidos por punção cardíaca foram testados em frações solúveis de extrato de *T. cruzi* e na proteína recombinante na concentração de 60 ng, na diluição de 1:100. O soro reconheceu a proteína como uma forte marcação e com a massa molecular predita de 80 kDa na rPOPTc80, devido a cauda de seis histidinas na porção N-terminal e 78 kDa no extrato de parasito (Figura 14).



**Figura 14 – Análise da produção de soro anti-POPTc80 em extratos proteicos de epimastigotas.** Os soros produzidos usando 10 µg de proteína pura por imunização foram testados sobre a proteína nativa presente no extrato de parasito (EXT) e a recombinante (rPOPTc80).

### Geração de sonda

Para realização do *Southern blot*, duas sondas diferentes foram geradas para confirmar a integração do cassete na região esperada. A primeira sonda, com tamanho esperado de aproximadamente 600pb, foi desenhada para reconhecer a região 5'UTR do gene que codifica para *poptc80*, enquanto que segunda sonda de 850pb reconhece o gene neomicina fosfotransferase (Figura 15). As sondas foram feitas de acordo com as instruções descritas no Kit *PCR Dig Probe Synthesis* (Roche), que por meio da substituição do dTTP por dUTP-digoxigenina aumenta a massa da sonda como pode ser observada na Figura 14. Essa marcação permite detectar o DNA de forma indireta, usando o anticorpo anti-digoxigenina-AP.

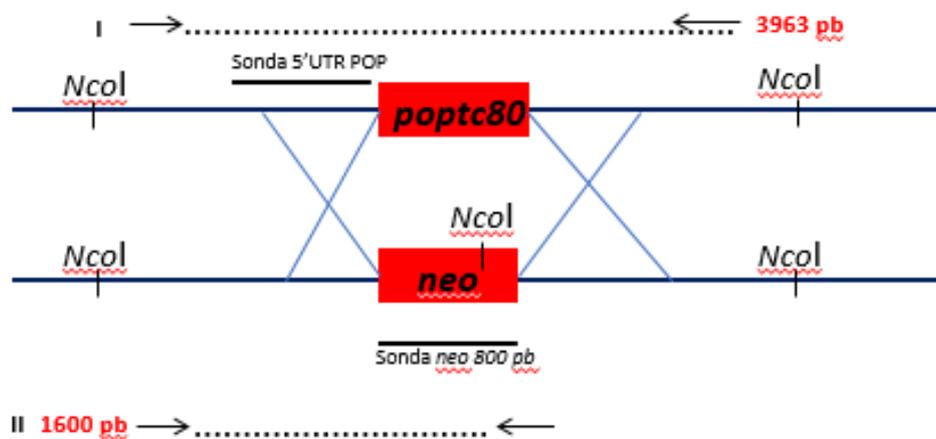


**Figura 15 – Obtenção das sondas para confirmação do nocaute do gene da *POPTc80*.** Sonda da região 5' UTR da POP com 650 pb marcada com dUTP-DIG (+) e sonda não marcada (-) como controle (A). (B) Sonda com 850 pb marcada (+) que reconhece o gene neomicina-fosfotransferase e a sonda não marcada (-).

### Nocaute do gene *POPTc80*

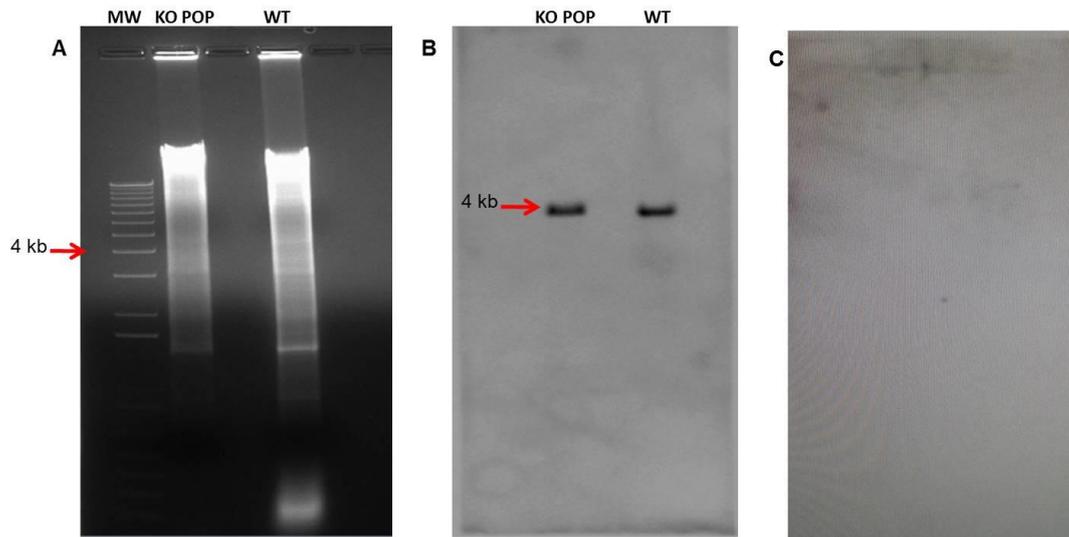
A estratégia de nocautear de genes é a ferramenta ideal para a caracterização de genes que codificam proteínas com funções preditas ou até mesmo desconhecidas no genoma do *T. cruzi*, uma vez que a técnica de RNA de interferência não é possível nesse microrganismo. Ao retomar o estudo do nocaute do gene *POPTc80*, o cassete contendo o gene *neo* flanqueado pelas regiões 5' e 3' UTR da *POPTc80* (Figura 16) foi transfectado em quatro turnos separados de transfecção. Na primeira tentativa todos os parasitos morreram durante o processo de seleção e clonagem e, a segunda transfecção apresentou contaminação por bactéria tornando assim os parasitos inviáveis para a clonagem, então a cultura foi descartada e uma nova transfecção foi realizada. Os parasitos transfectados com o cassete contendo *neo* foram selecionados, clonados e a cultura expandida, permitindo a realização de curva de crescimento, PCRs e Southern Blot (SB) que visavam a confirmação do nocaute nos parasitos. Diversas PCRs e em diferentes condições foram realizadas para otimização do protocolo, entretanto, nenhum resultado positivo foi obtido e o nocaute não foi confirmado por PCR, mesmo com a diferença de crescimento entre as culturas selvagens e mutantes, observada por meio da curva (dados não mostrados). A partir destes resultados inconclusivos, foi necessária a realização de um

experimento mais preciso e que confirmasse a ocorrência ou não do nocaute. O resultado do SB mostrou que os parasitos selvagens e nocauteados apresentaram a marcação do alelo Non-Esmeraldo Like da *poptc80* na altura correspondente ao gene integral (Figura 17A e B), indicando a não ocorrência do nocaute. Para confirmar o resultado, a membrana foi de-hibridizada e nova hibridização com a segunda sonda, que reconhece o gene *neo* e nenhuma marcação foi observada (Figura 17C). Os dados mostram que o nocaute físico não ocorreu como o esperado.



**Figura 16 - Desenho esquemático da hibridização das sondas no gene alvo.**

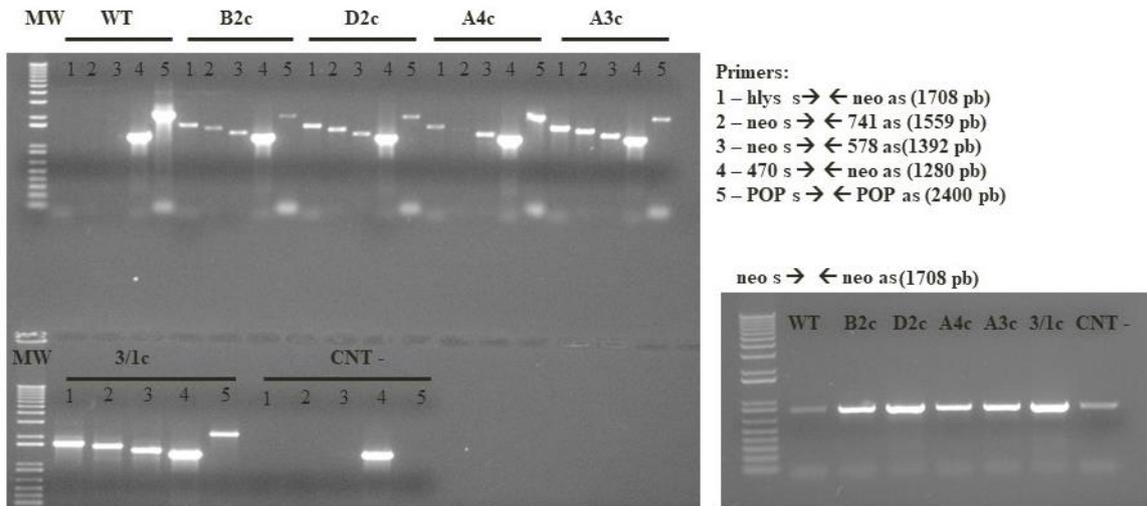
Esquema indicando as sequências das sondas geradas para identificar a integração correta do cassete que confere resistência a *neo*. A enzima de restrição *NcoI*, foi utilizada para digestão do DNA genômico. Na marcação com a sonda 5'UTR *pop*, o fragmento reconhecido é no tamanho de 3963 pb e com a sonda *neo*, o tamanho marcado é de 1600 pb.



**Figura 17– Identificação do gene *poptc80* por *Southern blot*.** Eletroforese em gel de agarose do DNA genômico dos parasitos selvagem e nocauteados após digestão com a enzima *NcoI* (A). DNA genômico de parasitos nocautes (KO *poptc80*) e WT, apresentaram a mesma marcação do gene da *poptc80* indicando que o nocaute não foi realizado (B). Ausência de marcação com a sonda *neo* que reconhece o cassete, confirmando que o mesmo não foi inserido no genoma do *T. cruzi* (C).

Uma nova tentativa de nocaute foi realizada nas mesmas condições já descritas, no que se refere ao processo de transfecção, e o processo de seleção e clonagem foram alteradas. Os parasitos foram selecionados e clonados ao mesmo tempo para que fenótipos diferentes fossem expressos e em uma concentração mais alta do antibiótico de resistência, 200 µg/mL de G418. O grupo controle (sem a inserção do cassete) morreu após um mês da transfecção e, após aproximadamente 45 dias, foram obtidos alguns clones da cultura nocaute e estes foram submetidos a ensaios para confirmar a correta integração do cassete. A primeira análise foi por amplificação de regiões específicas presentes no cassete ou adjacente a ele, por meio de iniciadores que combinados uns aos outros geram diferentes fragmentos. Para realização da PCR, DNA genômico foi extraído de cinco clones e do parasito selvagem, usado como controle. Os fragmentos amplificados estavam no tamanho esperado em todos os clones, incluindo o gene da *POPTC80*, que amplificou no tamanho correto de 2040 pb e apresentou uma redução da quantidade de DNA quando comparado ao controle (Figura 18). Este dado sugere que um alelo da *poptc80* foi deletado do genoma do parasito, porém não é o suficiente para confirma o

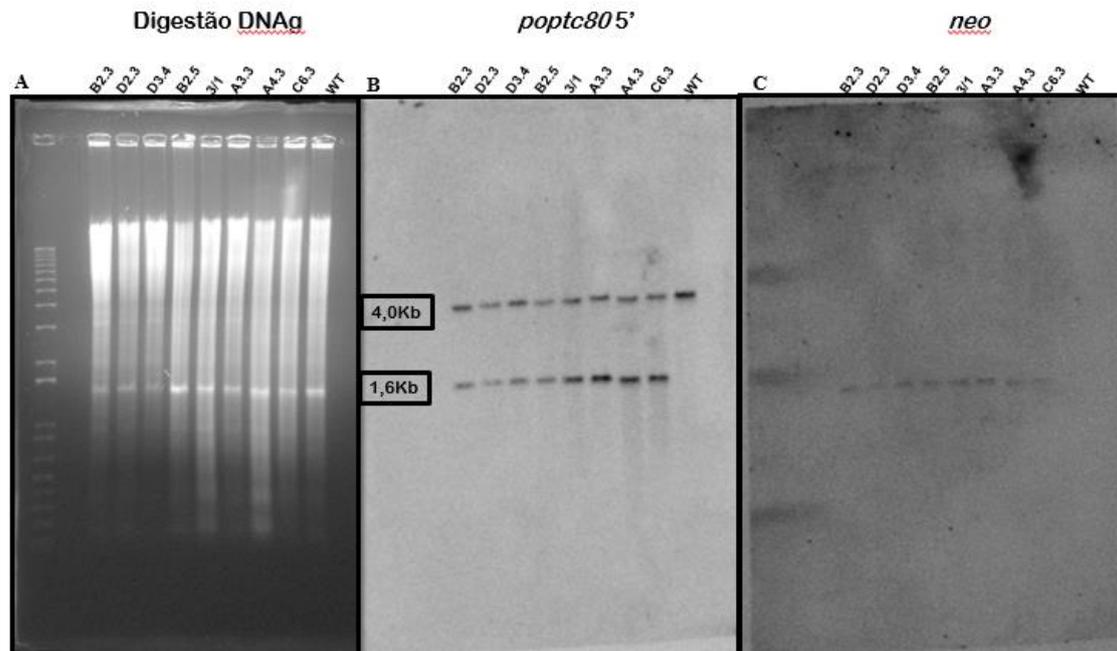
nocaute. Um ponto a ser destacado, foi a presença da banda no poço 4 do controle selvagem e do controle sem DNA (CNT-), o que ocorreu devido a contaminação do primer *neo* antisense.



**Figura 18 – Amplificação das sequências gênicas para confirmação do nocaute.** A amplificação do gene *poptc80* através de iniciadores que reconhecem diferentes regiões do cassete *poptc80-neo*, confirmando a correta integração do mesmo e a deleção do gene de interesse. Marcador molecular (MW), *wild type* (WT), clone B2 (B2c), clone D2 (D2c), clone A4 (A4c), clone A3 (A3c), clone C3 (C3), controle sem DNA (CNT).

Para confirmar o nocaute, os clones amplificados por PCR e outros quatro foram selecionados com base na diferença no tempo de crescimento e mobilidade dos parasitos, para análise por SB. Como esperado, o SB indicou o reconhecimento da *POPTC80* através da marcação da sonda que reconhece a região 5' em todas amostras, mutantes e selvagem, no tamanho esperado de 4,0 kb. O tamanho corresponde ao fragmento de DNA liberado pela clivagem da enzima de restrição *NcoI*, que se apresentou em uma marcação única no DNA *wild type* (4 kb) e com duas bandas nos clones, a de 4 kb que corresponde ao alelo integro e uma menor, no tamanho de 1.6 kb, que se dá ao fato de a enzima *NcoI* clivar dentro do gene *neo*, confirmando assim a integração do cassete e, conseqüente nocaute. Para reforçar o resultado obtido, uma nova sonda foi construída para reconhecer o gene *neo*. A membrana foi de-hibridizada e marcada com a sonda *neo*, indicando o reconhecimento das bandas no tamanho

correto de 1.6 kb somente nas culturas que contém o cassete para o gene de resistência neomicina fosfotransferase (Figura 19), confirmando novamente que a deleção do alelo *Non-esmeraldo Like* foi obtido. As culturas foram expandidas e congeladas.

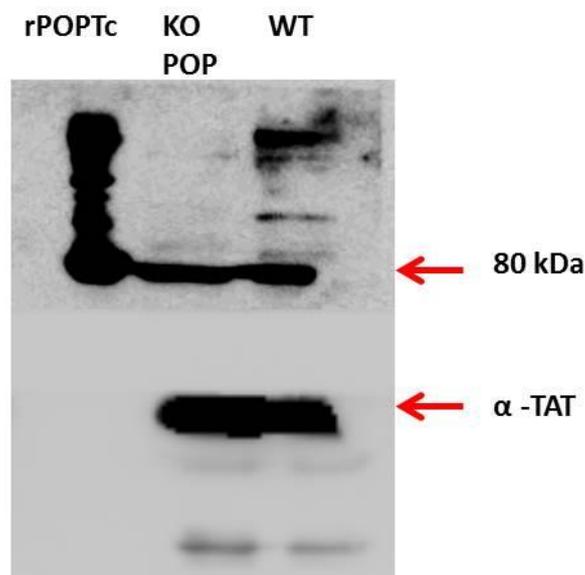


**Figura 19 – Confirmação simples nocaute a *poptc80*.** *Southern Blot* confirmando a deleção do alelo Non-Esmeraldo Like da *poptc80* por meio da detecção do DNA com marcação das sondas 5'UTR *poptc80* e *neo*. Gel Agarose indicando a digestão do DNA genômico das culturas nocauteadas e a cultura selvagem (A). Revelação do SB com a sonda que reconhece a região 5' do gene *poptc80* (B) e com a sonda que reconhece *neo* (C), confirmando que o gene que confere resistência ao antibiótico neomicina está integrado no genoma do parasito.

#### **Confirmação do nocaute do alelo Non-Esmeraldo Like da *poptc80* por *immunoblotting***

Um primeiro *Western Blot* foi realizado com extrato de formas epimastigotas (epi) de parasitos selvagens e mutantes da primeira transfecção para observar o padrão da proteína em ambos extratos e verificar se haveria diferença nos níveis de expressão. As formas epimastigotas foram preparadas como descrito anteriormente e submetidas a *immunoblotting* com o anticorpo contra a POP de *T. cruzi*, produzidos no laboratório. Apesar deste experimento

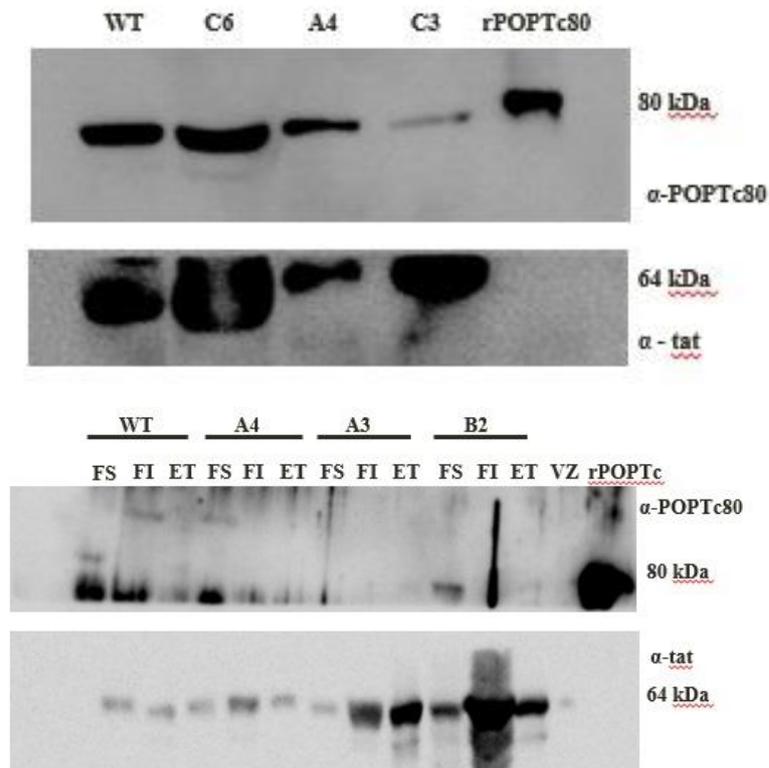
ter sido repetido diversas vezes, a enzima não foi reconhecida pelo anticorpo, indicando que foi obtida uma baixa titulação do anticorpo. Desta forma, anticorpo contra a POP *Trypanosoma brucei*, anti-POPTb (69) produzido em um trabalho anterior no laboratório e que reconhece a POPTc80, foi testado nos extratos e a proteína marcada, tanto no parasito como na recombinante (Figura 20). Entretanto, nenhuma diferença foi observada nos níveis de expressão da POPTc80 quando comparada ao controle (parasitos selvagens).



**Figura 20 – Identificação dos níveis de expressão da POP no extrato total de parasitos selvagem e nocauteados.** Fração solúvel do extrato mutante (KOPOP) e selvagem (WT), indicando níveis semelhantes na expressão da proteína. A POPTc80 recombinante (rPOPTc80) foi usada como controle positivo. A tubulina ( $\alpha$ -TAT) foi usada para normalizar o extrato.

Após realizada a nova transfecção e confirmado o nocaute por SB, novo ensaio para detecção da proteína foi realizado com as culturas mutantes e selvagem nas formas epimastigotas. A identificação foi feita com o novo anticorpo, o soro 3 na diluição de 1:100 e o *immunoblotting* mostrou que a quantidade de proteína é maior na cultura selvagem quando comparado as culturas nocautes para um alelo da *poptc80*, como podemos ver na figura 21. Há também diferença na expressão entre os próprios clones, indicando que

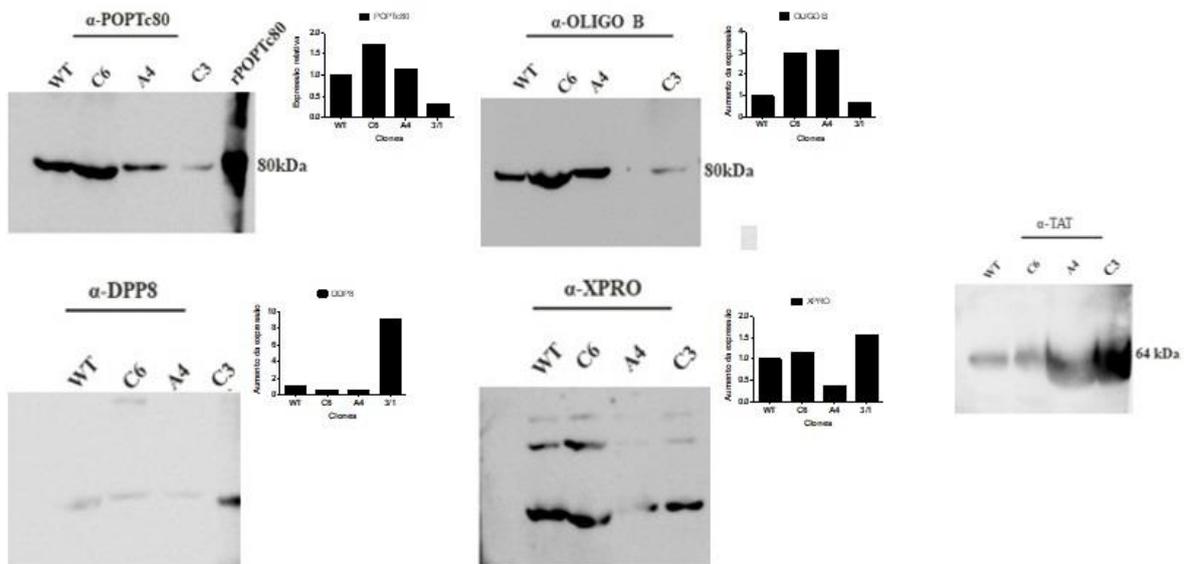
diferentes fenótipos podem ter sido obtidos durante o processo de clonagem dos parasitos.



**Figura 21 – Identificação da POPTc80 em extrato de parasitos mutantes e selvagens.** *Immunoblotting* indicando os diferentes níveis de expressão da proteína em culturas mutantes e selvagem, confirmando a redução da POPTc80 nos parasitos mutados. *Wild type* (WT), clone simples nocaute C6 (C6), clone simples nocaute A4 (A4), clone simples nocaute C3 (C3), proteína recombinante POPTc80 (rPOPTc80), clone simples nocaute A3 (A3), clone simples nocaute B2 (B2). Extrato total (ET), fração solúvel (FS), fração insolúvel (FI), vazio (VZ), anti-tubulina,  $\alpha$ -TAT.

Para identificar a expressão de diferentes serino-proteases nos extratos de parasitos selvagens e nocautes, um *Western blot* com anticorpos para oligopeptidase B (Oligo B) e dipeptidil peptidase 8 (DPP8), ambas da família de POP e X-PRO (enzima capaz de clivar após prolina) foi realizado. O resultado obtido indicou que o clone C6 incubado com o soro anti-rOligo B manteve a mesma quantidade de proteína expressa, em relação ao controle positivo, POPTc80, ao passo que na reação com o soro anti-XPro o nível da proteína foi reduzido neste clone. A expressão proteica no clone A4 aumentou com o anticorpo para oligopeptidase B, enquanto que o clone C3 apresentou resultado

similar ao controle; o contrário foi observado com anticorpo X-pro, onde o clone C3 teve mais proteína expressa. O soro anti-rDPP8 apresentou baixa titulação em todas as amostras (Figura 22).

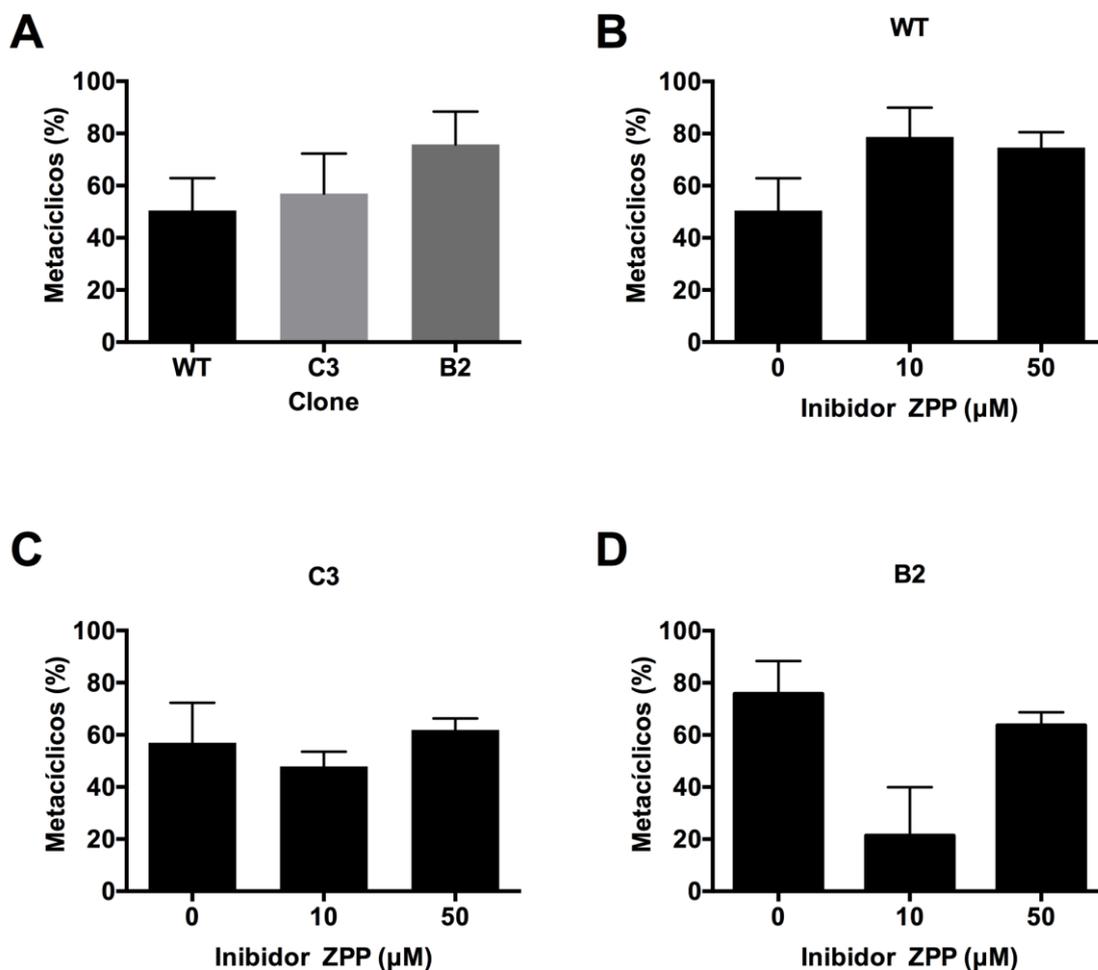


**Figura 22 – Reconhecimento de diferentes proteínas em parasitos mutados.** Extrato de parasitos selvagens e mutados no gene *poptc80* foram submetidos a *immunoblotting* com anticorpos específicos para as proteínas prolil oligopeptidase (POPTc80), oligopeptidase B (oligo B), dipeptidil peptidase 8 (DPP8), (X-Pro) e o controle tubulina (TAT). *Wild type* (WT), clone simples nocaute C6 (C6), clone simples nocaute A4 (A4), clone simples nocaute C3 (C3), proteína recombinante POPTc80 (rPOPTc80).

## Inibição da Metaciclogênese

O ensaio de metaciclogênese na ausência de inibidores indicou que há um maior número de tripomastigotas metacíclicos nas culturas simples nocaute comparado ao *wild type* (WT), embora não tenha diferença significativa. No intuito de simular e corroborar o efeito do nocaute foi utilizado o Prolil Endopeptidase Inibidor II (Z-Pro-Pro-CHO), que é um inibidor comercial de POP de mamíferos. O Z-Pro-Pro-CHO (ZPP) é um potente inibidor que contém um aldeído capaz de se ligar eficientemente com a serina ativa da POP, como foi mostrado por Wilk & Orłowski (1983), onde a POP do cérebro de camundongo foi inibida com um *K<sub>i</sub>* de 14 nM, porém sua atividade não foi totalmente

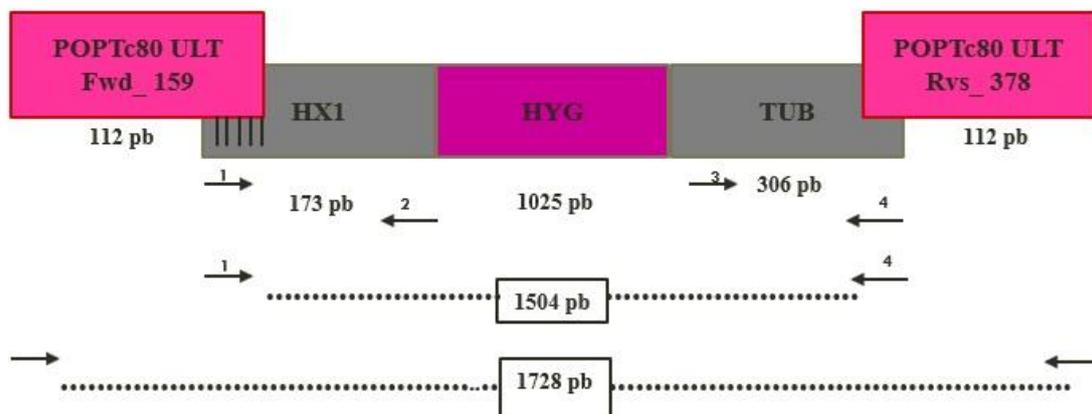
restabelecida (81,82). Com a mesma tendência observada nos mutantes, quando os parasitos foram incubados com o ZPP, houve um aumento na diferenciação dos parasitos WT em relação ao controle sem o inibidor. Entre os clones analisados, o inibidor não afetou a metaciclogênese no clone C3, conservando a quantidade de TM em todas as condições, enquanto que o clone B2 apresentou uma leve diminuição dos parasitos TM, contudo não é um dado significativo (Figura 23). Este foi um teste preliminar do efeito da POPTc80 no processo de diferenciação parasitária, sendo necessário a realização de um novo experimento para confirmar e melhor entender o resultado obtido.



**Figura 23 – Análise da metaciclogênese em parasitos *poptc80*<sup>-/+</sup>.** Efeito da deleção de um alelo de *poptc80* no *T. cruzi* (clones B2 e C3) comparados ao parasito selvagem (A). Efeito do inibidor Z-Pro-Prolinal (ZPP) na metaciclogênese nos parasitos selvagens (B), no clone C3 (C) e no clone B2 (D).

## Construção do cassete POPTc80 alelo Esmeraldo-like

Para proceder com a deleção do segundo alelo da *poptc80*, uma análise rigorosa e detalhada do alelo foi realizada para determinar quais sítios de restrição seriam utilizados na construção do cassete, visto que vários genes diferentes foram utilizados na metodologia escolhida para o nocaute. O cassete confere resistência a marca de seleção higromicina que é flanqueada por uma região intergênica *hx1* (amplificada pelos iniciadores 1 e 2) e  $\alpha\beta$ -*tub*, gerada com os primers 3 e 4. O cassete *hx1+hyg+tub* é anelado ao ultrâmero senso na região 5' *hx1* e ao ultrâmero anti-senso na região 3' do cassete *tub*. Os ultrâmeros são regiões de homologia ao gene *poptc80*, formado por 91 bases cada um e indica a posição de inserção do cassete para a deleção gênica (Figura 24).

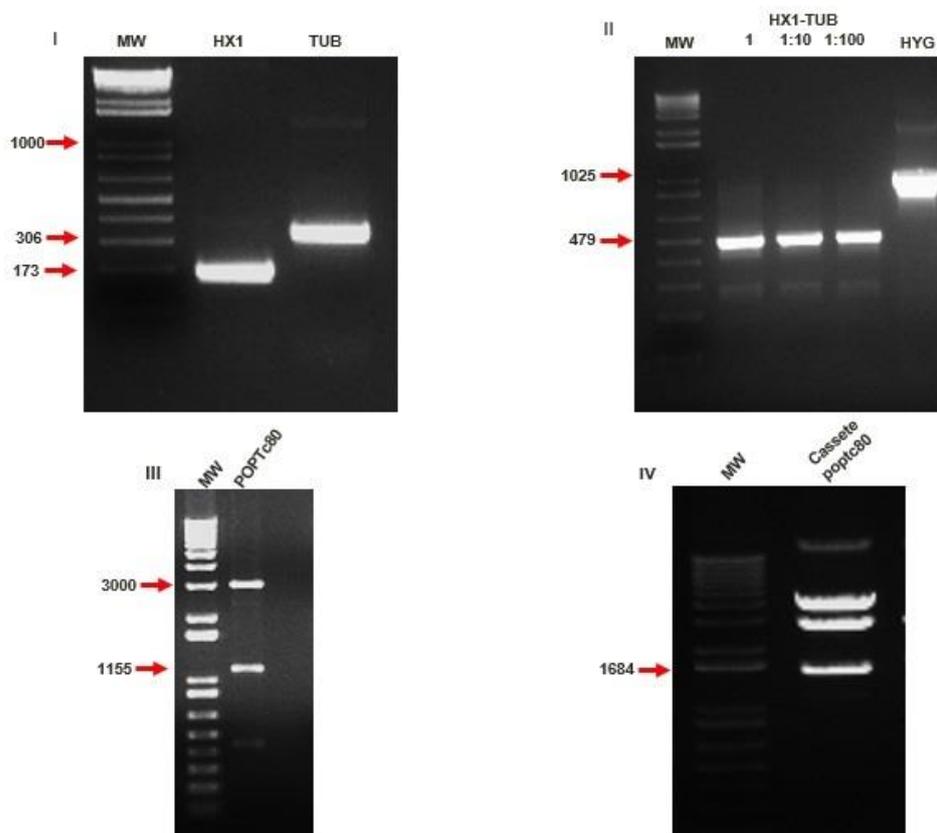


**Figura 24 – Cassete para deleção do alelo Esmeraldo-Like do gene *poptc80*.** O cassete foi desenhado para integração no gene alvo e é flanqueado por ultrâmeros, que são sequências do gene e indicam a região de integração do cassete (POPTc80 ULT Fwd e POPTc80 ULT Rvs). A marca de seleção utilizada foi higromicina, que confere resistência ao gene higromicina fosfotransferase (HYG). O antibiótico foi inserido entre a região intergênica HX1 (HX1) e a sequência  $\beta$ -Tubulina (TUB).

Desta forma, as sequências HX1 e TUB foram amplificadas por PCR com iniciadores específicos gerando amplicons nos tamanhos esperados de 173 pb para HX1 e 306 pb para TUB (Figura 25 I). Os produtos gerados foram usados para unir os dois fragmentos por PCR obtendo um amplicon de 479 pb que foi

clonado em vetor pGEM-T *easy*. Para a correta inserção do gene *hyg*, a sequência de interesse foi amplificada com iniciadores que continham os mesmos sítios de restrição que os usados na junção dos genes HX1 e TUB, para que assim, após a digestão o gene fosse integrado corretamente no cassete (Figura 25 II).

O próximo passo na construção do cassete, foi digerir o gene *hyg* do plasmídeo e ligar entre as sequências de HX1 e TUB, com a enzima T4 DNA ligase. O gene foi clonado e confirmado por PCR de colônia e digestão enzimática com *EcoRI* que corta dentro do gene higromicina fosfotransferase, na posição 244 pb, liberando um fragmento de 417 pb e outro de 1087 pb. Com a clonagem confirmada, o cassete *pgem-hx1-hyg-tub* foi digerido do plasmídeo com a enzima *NotI*, que flanqueia o sítio de clonagem no plasmídeo, e o produto foi amplificado com os ultrâmeros senso e anti-senso *popTc80*. O cassete completo foi clonado novamente em pGEM- T *easy* vector gerando o produto final *pgem-ultpopTc80+hx1-hyg-tub+ultpopTc80* e confirmado por digestão (Figura 25 III), liberando um fragmento de 1684 pb. Após confirmação da clonagem, foi feita uma midiprep, que foi digerida novamente com *NotI* liberando o cassete para transfecção nos parasitos simples nocaute (Figura 25 IV).

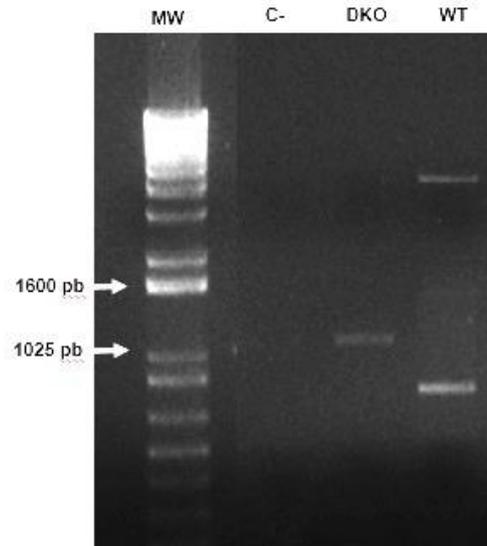


**Figura 25 – Geração do cassete *poptc80-hx1-hyg-tub*.** Amplificação dos genes *hx1* (região intergênica 173 pb) e *tub* ( $\beta$ -Tubulina 306 pb) (I). Ligaç o de *hx1* e *tub*, por PCR e amplifica o do gene *hyg* (*hygromicina fosfotransferase* 1025 pb) (II). Cassete *pgem- ultpoptc80+ hx1-hyg-tub+ultpoptc80* digerido com *EcoRI*, liberando um produto de 1684 pb (III). Libera o do cassete final do plasm deo pGEM-T *easy vector*, com a enzima de restri o *NotI* (IV).

### Dele o alelo Esmeraldo-like

Para dele o do alelo restante da *poptc80*, a cultura simple nocaute B2 foi selecionada para transfec o. Formas epimastigotas, foram ressuspendidas em tamp o Nucleofactor, adicionada o cassete pasteurizado e eletroporada com o aparelho Nucleofector-2b (Lonza). Ap s sele o e clonagem dos parasitos, a cultura foi mantida por mais tempo para expandir a quantidade de parasitos, entretanto, um crescimento mais lento comparado ao B2 foi observado. Diante deste resultado, muito testes de confirma o e caracteriza o no duplo nocaute n o foram poss veis.

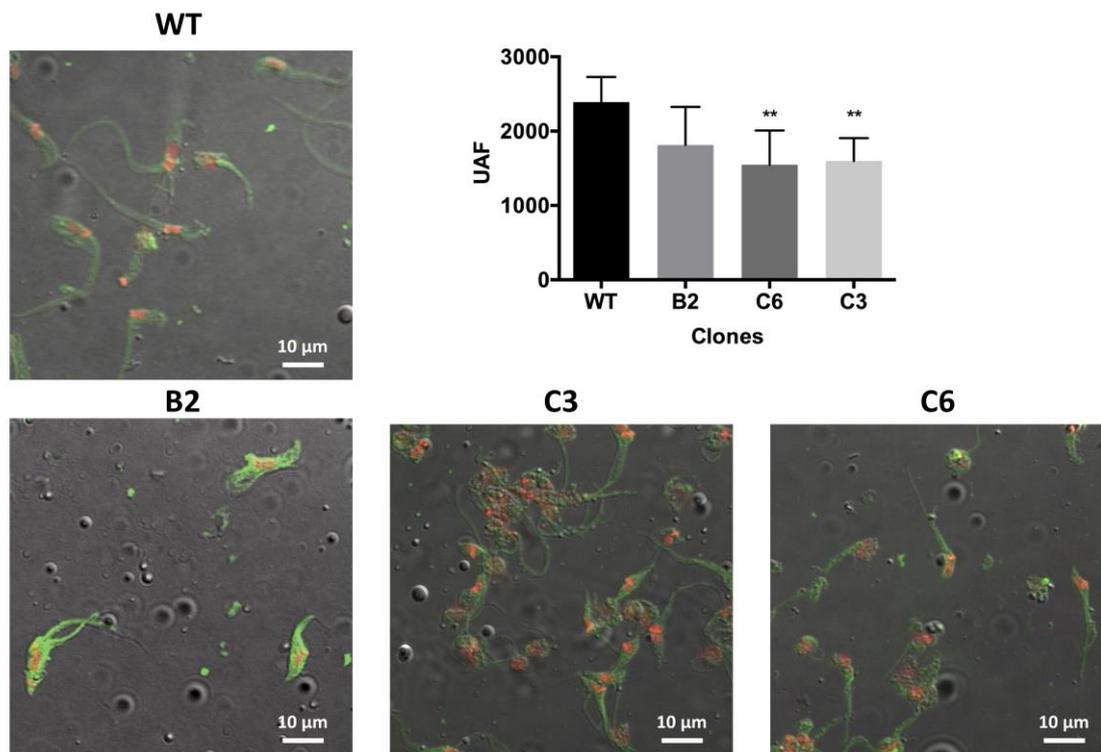
Para confirmar se o alelo Esmeraldo-like da *poptc80* foi editado no genoma do parasito, uma PCR foi realizada com DNA g nomico extra do da cultura e com pares de iniciadores que amplificam o gene de resist ncia higromicina fosfotransferase com o tamanho predito de 1025 pb. Por ter pouco material, somente esta PCR foi realizada e o resultado obtido na amplifica o indicou que o gene *hyg* foi integrado corretamente no genoma do parasito, deletando o alelo restante da *poptc80* (Figura 26). Contudo, a cultura n o expandiu e as culturas congeladas, n o resistem ao processo de descongelamento, morrendo dentro de uma semana.



**Figura 26 – Confirmação do duplo nocaute do gene *poptc80*.** Amplificação do DNA genômico com iniciadores que anelam ao gene *hyg* que está inserido no cassete, no tamanho esperado de 1025 pb. Este resultado indica a deleção do gene alvo. Marcador molecular (MW), controle sem DNA (C-), duplo nocaute para *poptc80* e *wild type* (WT).

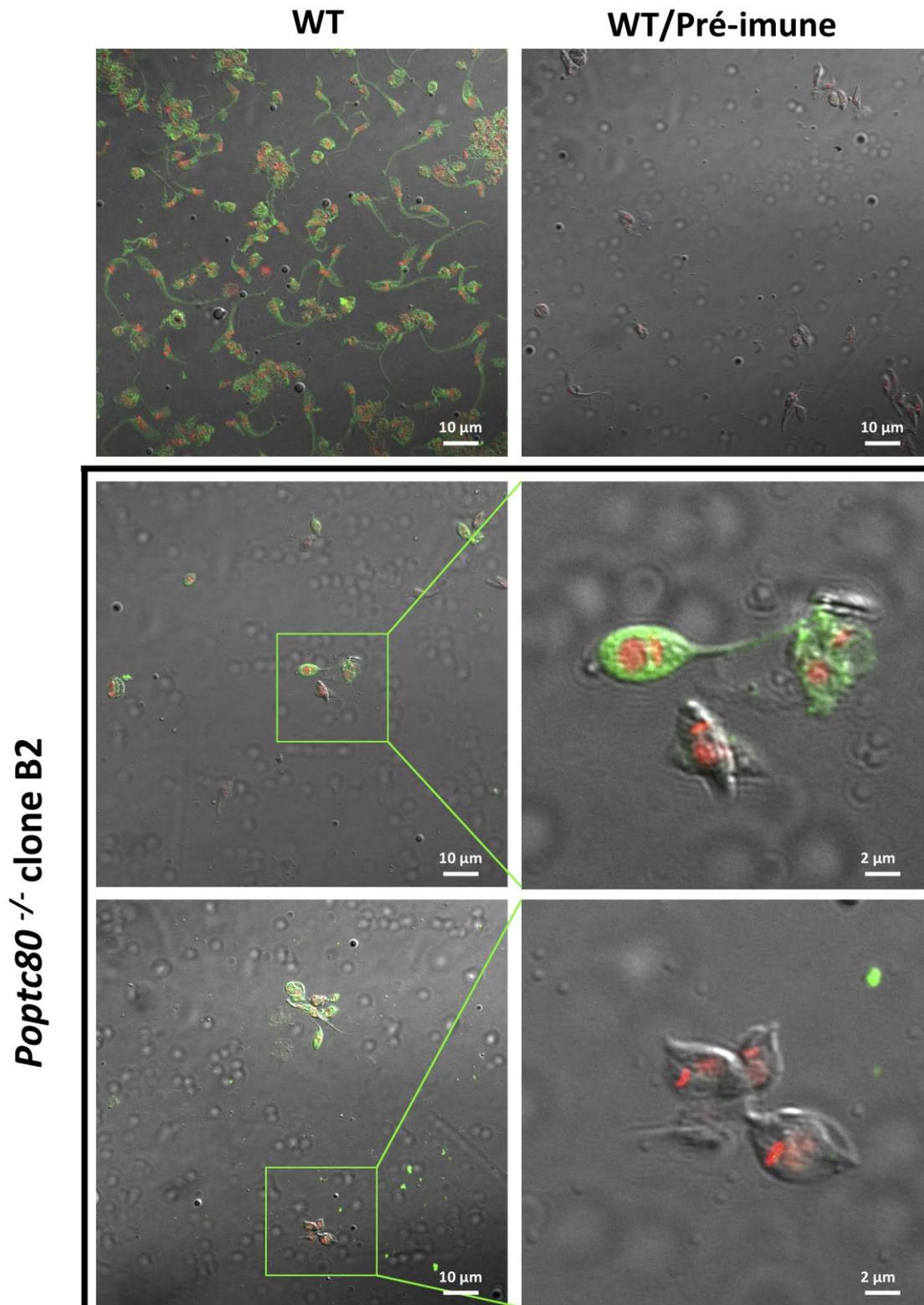
### **Deteção e colocalização da POPTc80 em parasitos selvagens e nocautes**

Com o intuito de corroborar e analisar morfologicamente o efeito do nocaute do gene da *POPTC80* os parasitos selvagens e mutantes foram submetidos a imuno marcação com o anticorpo específico contra a proteína. Para a análise dos parasitos simples nocaute (SKO), três clones (B2, C3 e C6) foram selecionados e foi possível observar uma diminuição no sinal da fluorescência comparado ao controle. Entre os clones, uma diferença na quantidade de proteína foi vista, obtendo um perfil comparativo ao encontrados nos ensaios de Western blot, com baixos níveis de expressão da POPTc80, principalmente no clone C3 (Figura 27). No entanto, nestas condições testadas, não foi observado um padrão de alteração morfológica no parasito.



**Figura 27 – Análise do simples nocaute do gene *poptc80* por imunofluorescência.** Diminuição do sinal fluorescênte nos parasitos mutados comparado ao parasitos selvagens (WT), confirmando assim a deleção de uma alelo do gene. Menor fluorescência foi observada nos clones C3 e C6 em relação ao clone B2. Verde (POPTc80); vermelho (DAPI).

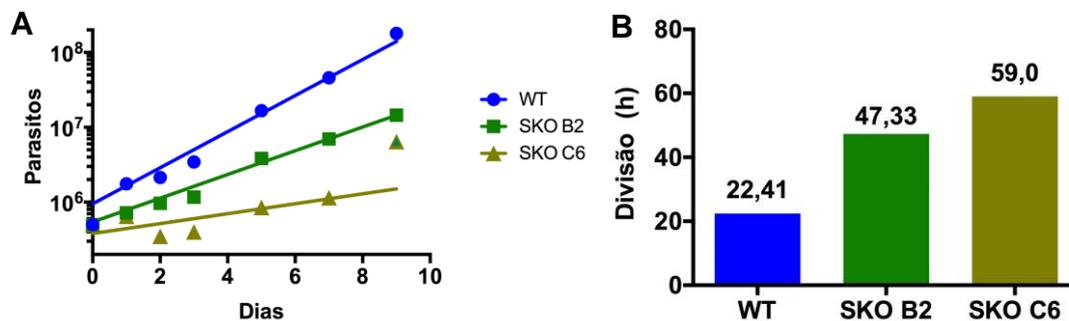
Na cultura duplo nocaute B2, foi observado claramente a presença de parasitos sem nenhuma marcação para a proteína POPTc80. Este resultado indica que ocorreu a deleção do gene *poptc80* do genoma do *T. cruzi*, contudo uma cultura homogênea com os parasitos duplo nocaute não foi obtida, como podemos ver na Figura 28. Não foi possível reproduzir o experimento, pois os parasitos não sobreviveram para estabelecer uma cultura.



**Figura 28 – Detecção de parasitos duplo nocaute.** Parasitos mutados nos dois alelos da *poptc80* (*poptc80*<sup>-/-</sup> clone B2), detalhe ampliado à direita mostrando parasitos sem marcação da proteína quando incubados com o anticorpo  $\alpha$ -rPOPTc80 o que confirmaria a deleção dos dois alelos do gene.

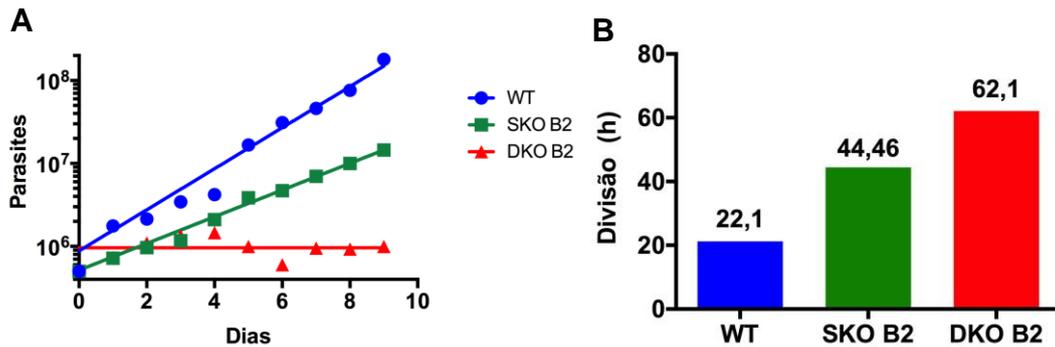
## Avaliação do crescimento dos parasitos mutantes e controles

Para verificar se o crescimento dos parasitos transfectados havia sido afetado pelo nocaute de um alelo da *poptc80*, uma curva de crescimento dos clones C6 e B2 foi realizada e comparada ao parasito *wild type* (WT), durante 10 dias para gerar um perfil avaliativo. Foi possível observar que os parasitos mutantes tiveram um crescimento lento em relação ao selvagem (Figura 29), o que já era visto diariamente no cultivo da cultura. Para se obter uma cultura na fase *log*, os parasitos nocautes demoraram cerca de 15 dias com alguma variação de tempo entre os próprios clones.



**Figura 29 – Curva de crescimento parasitos simples nocaute.** (A) A curva foi realizada em triplicata com contagem diária em câmara de Neubauer num período de 10 dias (240 h). (B) Gráfico indicando o tempo de divisão celular de cada cultura. *Wild Type* (WT); simple nocaute B2 (SKO B2); simples nocaute C6 (SKO C6).

Após a deleção do segundo alelo da *poptc80*, uma nova foi curva realizada para verificar se havia diferença no crescimento entre parasitos simples e duplo nocaute. A curva indicou que a cultura DKO B2 apresentava um crescimento ainda mais lento quando comparado ao SKO B2 (Figura 30), atingindo a concentração de  $1 \times 10^6$  parasito/mL após 10 dias de cultivo, isso representa um desenvolvimento 10 vezes menor em relação ao simples nocaute. A cultura selvagem alcançou a fase *log* em aproximadamente 120 horas (6 dias).



**Figura 30 – Curva de crescimento parasitos DKO.** (A) A cultura duplo nocaute (DKO) alcançou a concentração de  $1 \times 10^6$  p/mL em 216 h de cultivo. (B) Gráfico indicando o tempo de divisão celular de cada cultura. *Wild Type* (WT); simple nocaute B2 (SKO B2); simples nocaute C6 (SKO C6).

## Discussão

Prolil oligopeptidases são enzimas de grande relevância científica devido ao seu possível papel em doenças neurológicas tais como Alzheimer, transtorno bipolar e Parkinson (83), além de doenças inflamatórias (58) e doença de Chagas (68). A POPTc80 vem sendo estudada por nosso grupo de pesquisa há muitos anos, desde sua caracterização inicial, a ensaios de infecção e de inibição que abrange testes *in vitro* e síntese de novas moléculas (46,84–86). Uma abordagem funcional do estudo do gene é necessária para um melhor entendimento da sua participação na infecção pelo *T. cruzi*. Uma técnica importante para o estudo funcional de um gene é RNA interferente (RNAi) que permite avaliar os efeitos causados pela diminuição transitória da sua expressão (87), permitindo avaliar, sob determinadas condições, genes essenciais a um organismo. Entretanto, esta técnica não pode ser usada no parasito *T. cruzi*, por este não possuir todos os genes da maquinaria RNAi, fazendo com que o nocaute físico seja a abordagem de escolha para o estudo gênico neste microorganismo.

A deleção do alelo *Non-esmeraldo like* da *poptc80*, foi obtida por recombinação nas regiões 5' e 3' UTR, através da inserção de um cassete contendo o gene *neo* (neomicina fosfotransferase) que permitiu selecionar mutantes com geneticina. O nocaute foi obtido somente após a quarta tentativa

de transfecção, porém alguns fatores indicavam que os parasitos transfectados anteriormente tinham perdido o alelo em questão, dado ao seu lento crescimento e divisão (dados não mostrados). A cultura foi submetida a análises quanto ao nível de expressão proteico e DNA, e os níveis foram similares ao observado nos parasitos controles, confirmando a não deleção do gene. O crescimento lento da cultura pode indicar resistência ao antibiótico de seleção, pois um estudo apontou que células tratadas com o G418 podem ter seu crescimento afetado e gerar um resultado falso positivo quanto a seleção de clones (88). Desta forma, uma nova transfecção foi realizada, modificando o processo de seleção e clonagem dos parasitos para que diferentes culturas apresentassem diferentes fenótipos. Sendo assim, os parasitos transfectados foram submetidos ao processo de clonagem ao mesmo tempo em que ocorria a seleção, resultando em culturas homogêneas de clones com características diferentes quanto a taxa de crescimento, a capacidade de estabelecimento de uma cultura viável, diferença nos níveis de expressão da proteína e na diferenciação da forma epimastigota para a forma tripomastigota metacíclico (89–91).

Cerca de 5 meses foram necessários para obtenção de uma cultura SKO *poptc80* viável para que a caracterização do nocaute fosse realizada. O passo inicial foi a confirmação do nocaute por PCR, que foi positiva para todos os clones testados e com amplificações em diferentes regiões do cassete ou do genoma do parasito (Figura 18), como o amplicon gerado pelos iniciadores *hlys* senso e *neo* antisense, no tamanho esperado de 1708 pb. Histidina amônia-liase (*hlys*), é um gene adjacente a *poptc80*, e seu primer foi utilizado para confirmar a inserção do cassete *neo* no gene de interesse (79).

A técnica de *Southern Blot* é uma ferramenta importante na confirmação do nocaute gênico que ocorre pela hibridização em sequencias fragmentadas específicas do genoma analisado (92). A detecção do gene *poptc80* foi feita pela sonda que reconhece a região 5' e o cassete *neo*, inserido por recombinação, foi detectado por meio da sonda com marcação para o gene *neo*.

Em nível proteico, os extratos dos parasitos nocauteados e selvagem foram analisados por *immunoblotting* e uma diminuição da expressão da proteína POPTc80 foi vista nas amostras SKO, comparada ao controle. A quantidade de proteína expressa nos parasitos SKO, indicou uma variação entre eles, como por exemplo o clone C6 que apresentou um maior nível da proteína em relação ao

clone C3. Não foi feita a caracterização de todos os clones confirmados, mas dentre os analisados, o clone C3 foi o que apresentou os níveis mais baixos da POPTc80 em todas as frações observadas, resultado este confirmado pelo ensaio de imunofluorescência, que obteve um baixo sinal da proteína. Os extratos testados com os anticorpos para as proteases X-Pro e Oligo B, de *Trypanosoma cruzi*, apresentaram níveis diferencialmente expressos de suas proteínas dos encontrados nos clones identificados com o soro anti-rPOPTc80. Entre os clones houve variação na quantidade de proteína expressa, com uma leve diminuição no clone C6 e um aumento no clone A4 referente a Oligo B, enquanto que na protease X-Pro, uma protease que cliva pós-prolina na posição N-terminal, os extratos C6 e A4 tiveram sua expressão reduzida e o clone C3 aumentada duas vezes quando comparada ao controle rPOPTc80. Um comportamento similar no clone C3 foi observado na DPP8Tc, uma serino protease da família POP que cliva pós-prolina e podem estar compensando a ausência do alelo deletado, uma vez que este clone é o que apresenta a menor expressão da proteína no controle. Estes dados sugerem que a deleção do gene *poptc80* pode afetar a expressão destas proteases e que isto ocorre de formas diferentes entre os clones (Figura 22). A oligopeptidase B, por ser um membro da família POP e possuir características semelhantes quanto aos aminoácidos do sítio catalítico (93–95) pode ter sua expressão afetada devido a redução da taxa metabólica dos parasitos. Resultados estes que são corroborados pelos dados obtidos na curva de crescimento, que indicou uma taxa de divisão parasitária reduzida para os clones C6 e B2 de 59 h e 47 h, respectivamente, enquanto que os parasitos selvagens se dividem a cada 22 h. Os parasitos nocautes tiveram seu crescimento afetado e isto pode ter ocorrido devido a deleção do alelo *Non-Esmeraldo Like* do gene *POPTC80*.

O ensaio de metaciclogênese apresentou resultados inesperados e novos experimentos são necessários para melhor compreender o papel da POPTc80 na diferenciação do *T. cruzi*. Quando comparado os clones C3 e B2 à cultura WT, foi observado uma maior quantidade de TM nos parasitos nocauteados e, quando foi avaliada a inibição da POPTc80 nas culturas, ocorreu um aumento da diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos em parasitos selvagens. Enquanto que os clones simples nocaute *poptc80*+/+, C3 e B2, não apresentaram diferença entre o controle e os parasitos tratados com

ZPP, embora um número menor de parasitos TM tenha ocorrido no clone B2. A prolina é uma importante fonte de energia para o *T. cruzi* e altos níveis de prolina livre é detectada durante a diferenciação celular, tornando-a essencial para o parasito; outro ponto importante a ser considerado é a atividade catalítica da POPTc80, que cliva ligações peptídicas na região C-terminal pós prolina (60,62,96,97). Sendo assim, a hipótese seria que a presença de um inibidor específico de POP ou a ausência de um alelo do gene, interferisse negativamente na diferenciação do parasito. Entretanto, os dados sugerem que devido a POPTc80 estar menos ativa, ocorre uma menor produção de prolina livre e a deficiência deste aminoácido induz a célula a captar mais prolina do meio extracelular (98). Está captura pode estar acontecendo por um aumento da expressão dos receptores de prolina, que continua a auxiliar a metaciclologênese.

Estudos anteriores apontam que a POPTc80 é mais expressa nas formas amastigota e tripomastigota (80), que são a forma infectiva e replicativa intracelular, respectivamente, encontradas no hospedeiro vertebrado. A POPTc80 é secretada pela forma tripomastigota, sugerindo sua participação no processo de infecção à célula hospedeira devido a sua capacidade de clivar componentes da matriz extracelular (MEC), colágenos do tipo I e IV, fibronectina, entre outros que podem facilitar sua progressão na doença de Chagas bem como sua diferenciação celular (84). Afim de avaliar a capacidade infectiva dos parasitos nocautes para um alelo da *POPTC80*, algumas tentativas de infecção em células L6 e Vero foram realizadas, porém sem êxito alcançado. As células foram infectadas com formas epimastigotas da cultura selvagem, clone B2 e clone C3 e após 8 dias de infecção ocorria a lise celular liberando os parasitos ainda na forma amastigota. Alguns tripomastigotas eram identificados na cultura, porém não foram obtidos o suficiente para realizar o experimento de maneira adequada. O ensaio realizado, nos permitiu observar que os clones não conseguiam diferenciar da forma amastigota para tripomastigota antes da lise da célula, o que indica que a proteína POPTc80 é importante para este processo (62,63,68) e que a deleção de um alelo pode afetar a infecção do parasito em células hospedeiras. Novos testes serão realizados para melhor caracterizar o papel dos parasitos simples nocautes na infecção *in vitro* e *in vivo*.

A deleção de genes por meio da ferramenta CRISPR/Cas9, permite uma maior eficiência e rapidez na modificação gênica (73). Está técnica tem sido

utilizada no estudo das mais diversas doenças por meio da edição dos principais genes envolvidos e/ou que são alvos para o desenvolvimento de novos fármacos (99–101). Na tentativa de nocautear o alelo restante do gene *POPTC80*, um cassete construído para inserção por homologia foi transfectado na cultura SKO B2 pela ferramenta CRISPR/Cas9. O cassete confere resistência a marca de seleção higromicina e possui regiões de homologia para serem integrados no *locus* gênico de interesse, e deletar por completo o gene *POPTC80*. Após seleção e clonagem dos parasitos transfectados, uma amplificação do gene *hyg* foi feita por PCR para a confirmação do duplo nocaute, entretanto como havia um baixo número de parasitos e o rendimento do DNA foi pouco, apenas um fraco sinal confirmando a integração do cassete foi obtido no produto da PCR (Figura 26). Corroborando este resultado, temos o ensaio de imunofluorescência em que parasitos sem nenhuma marcação para a proteína POPTc80 foram identificados, indicando que, embora a cultura não esteja homogênea, uma população dos parasitos foi nocauteada nos dois alelos. Não foi possível a realização de novos testes na cultura DKO *poptc80* clone B2, pois os parasitos não foram capazes de estabelecer uma cultura viável por períodos prolongados. Após, aproximadamente 4 meses de transfecção, os parasitos morreram e a cultura que estava congelada não conseguiu se restabelecer.

## Conclusão

O foco deste trabalho foi de aprofundar o estudo funcional da POPTc80 pela estratégia de nocaute físico do seu gene correspondente. Os resultados obtidos juntamente com resultados prévios nos permitem reforçar o envolvimento desta enzima no processo de infecção e provavelmente no estabelecimento da doença de Chagas. Nós demonstramos que com apenas um alelo, o parasito apresenta um crescimento lento e a sua diferenciação é afetada quando comparamos com os parasitos controles. Foi possível observar os clones de parasitos mutados apresentaram características diferentes entre si, quanto ao estabelecimento da cultura, crescimento e quantidade de proteína expressa nas diferentes formas do parasito. A cultura duplo nocaute não sobreviveu a deleção dos dois alelos, indicando que esse gene é essencial à viabilidade do parasito e assim corroborando a sua característica de alvo potencial de drogas para a doença de Chagas.

## *Identification and Characterization of Leishmania infantum Prolyl Oligopeptidase as a Potential Candidate for Novel Drug Design Against Leishmaniasis*

### **Abstract**

*Leishmania infantum* is a flagellated protozoan and one of the main causative agents of visceral leishmaniasis. This disease usually affects the human reticuloendothelial system and causes lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, anemia, leuko- and thrombocytopenia, among other clinical manifestations, which can progress and cause death. Available therapies can lead to serious side effects and, since it is a tropical neglected disease, the incentives for the development of new drugs are insufficient. It is important to know leishmania virulence factors that contribute most to the disease in order to develop anti-virulence drugs. In the present work, we have produced *L. infantum* prolyl oligopeptidase (rPOPLi) in *Escherichia coli* cells, and investigated its biochemical properties as well as the effect of protease inhibitors on its enzymatic activity and on inhibition of *L. infantum* entry into macrophages. The optimal activity occurred at pH 7.5 at room temperature. The Michaelis constant ( $K_m$ ) and maximum reaction rate ( $V_{max}$ ) for *N*-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC were 58.57 and 4.651,16 mFU/min, respectively. rPOPLi was inhibited by TPCK, TLCK and Z-Pro-prolinal (ZPP). Based on the results obtained by immunofluorescence microscopy and plasma membrane western blot, rPOPLi is a cytoplasmic enzyme that may be directed to the parasite outer membrane. Interestingly, two POP specific inhibitors, S17092 and ZPP, prevented invasion of murine macrophages, suggesting that POPLi may be involved in the invasive process of *L. infantum*.

These data establish *POPLi* as a virulence factor that may prove potential as a target for designing new anti-leishmaniasis drugs.

**Keywords:** Leishmaniasis, protease, POPLi, virulence factor, drug target

### Introduction

Leishmaniasis is a group of diseases caused by *Leishmania*, protozoan that have more than 20 species infective to mammals, which are transmitted by the bite of female phlebotomine during blood meal (1). According to WHO, leishmaniasis are neglected tropical diseases (NTD) endemic in 97 countries of American, European, Asian and African continents, responsible for 700.000 to 1 million new cases and approximately 30.000 deaths annually (2). The biological diversity of *Leishmania* can induce different clinical manifestations ranging from skin and mucosal lesions to a more severe systemic form affecting vital organs (3). Visceral leishmaniasis, caused mostly by *L. donovani* and *L. infantum*, cause hepatosplenomegaly and lymphadenopathy associated to cellular immunity depression and can be fatal if not treated (Choi and Lerner, 2001). The available treatments for leishmaniasis are toxic, long-lasting, expensive and are affected by emerging drug resistance (10.1128/CMR.19.1.111-126.2006)(4). The identification and characterization of pathogen virulence factors as potential targets for drug and vaccine development is a rational strategy in prospection of accessible and efficient compounds with minimal side effects or protective antigens.

Proteases are potential targets for new drugs development as they play crucial roles in both physiology and infectivity of pathogens (5). Among them, prolyl oligopeptidase (POP, EC 3.4.21.26) is an ubiquitous serine-protease (6–9)

belonging to the S9 family (10) that cleaves peptides up to 30 amino acids in the carboxyl side of proline and, less efficiently, alanine residue. It is believed to play a key role in many physiological processes, as in inflammatory responses, angiogenesis, in the regulation/maturation of peptide hormones and neuropeptides. Abnormal POP activity levels were reported in neural tissue or in plasma of individuals suffering from amnesia, depression, Alzheimer's disease and bipolar disorder (8,11,12)(13–15).

Members of this family of serine-proteases have been identified in mammal pathogens. POP activity of *Mycobacterium tuberculosis* (POPMT) induces the secretion of pro-inflammatory Th1 cytokines as TNF, IL-12p70, IL-6, IL-23 and IL-1b, modulating murine macrophages and suggesting that it is involved in *M. tuberculosis* infectivity (16). Amongst Trypanosomatidae, *Trypanosoma cruzi* POP (POPTc80) is a 80 kDa protease capable to hydrolyse extracellular matrix proteins type I and IV collagens and fibronectin *in vitro* (17–21) and to degrade *in situ* collagen fibers from rat mesentery in its native state (22). Specific and selective inhibitors obtained by molecular screening and combinatorial chemistry prevent the entrance of *T. cruzi* trypomastigotes in non-phagocytic mammalian cells, suggesting that this enzyme may be involved in the parasite invasion of the host cell (20,23). Likewise, *Trypanosoma brucei* POP (POPTb) mediates the hydrolysis of denatured and native collagens (17). In *Trypanosoma evansi* infections, mice inoculated with a null mutant clone for a prolyl oligopeptidase-like were able to survive longer than those inoculated with wild-type parasites. The authors also suggested that *T. evansi* POP-like protease might play a role in immune responses by affecting interleukin concentrations in the host (24). In the blood fluke *Schistosoma mansoni*, POPSm is produced by adult worms and

schistosomula and may contribute to parasite survival by cleaving host bioactive peptides (25). Therefore, POPs have been considered as therapeutic targets (26).

Here we expressed recombinant *L. infantum* POP (rPOPLi) in bacterial cells and investigated its biochemical properties as well as the effect of specific protease inhibitors on its enzymatic activity and on inhibition of *L. infantum* entry into macrophages. We found that Z-Pro-Prolinal inhibition constant (IC 50) was 5.22 nM and that the inhibition of POPLi by both specific POP inhibitors, Z-Pro-Prolinal and S17092, results in diminished macrophage infection, suggesting it is a key player in host cell infection.

## **Materials and Methods**

### **Parasites**

*L. infantum* promastigotes were maintained in Schneider's medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 100 µg/mL gentamicin, at 28 °C. To obtain axenic amastigotes, promastigotes were transferred to M199 medium at pH 4.0 supplemented with 10% FBS and 100 µg/mL gentamicin, and maintained at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>, during three days.

### **Heterologous expression of POPLi**

The full-length *popli* gene from *L. infantum* (LinJ.36.7060) was synthesised after codon optimization and cloned into the pET15b plasmid by GenScript (New Jersey, USA). The construction was used to transform *Escherichia coli* BL21 (AI) and recombinant POPLi expression was induced by the addition of 0.5 mM isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) and 0.2 % L-arabinose at 20 °C for 4 h.

Subsequently, cells were harvested, lysed with BugBuster™ (Novagen) and soluble extract was cleared by centrifugation at 2,000 x *g* at 4 °C for 10 min. Then, the extract was submitted to a nickel-agarose affinity chromatography, washed with 30 column volumes of 50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl and 15 mM imidazole, and eluted with 50 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl and 80 mM imidazole. Purified recombinant protein was analysed by Coomassie Blue-stained 10% SDS-PAGE and stored in 50% glycerol at -20°C.

## **Enzymatic Assays**

### **Substrate specificity**

To investigate rPOPLi (40 ng/μl) substrate specificity, the fluorogenic substrates Pro-AMC, *N*-Ile-Ala-AMC, Suc-Gly-Pro-AMC, Ala-Ala-Phe-AMC, Arg-Arg-AMC, Gly-Pro-AMC and *N*- Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC (20 μM final concentration) were tested in 25 mM HEPES, 150 mM NaCl and 5 mM DTT at pH 7.5 in a final volume of 100 μL in 96-well plate. The AMC fluorescence releasing was recorded by its emission at 460 nm upon excitation at 380 nm in kinetic mode for 15 min, in a microplate fluorescence reader (Molecular Devices). Assays were performed in triplicate.

### **pH dependence**

To determine the effect of pH on rPOPLi (40 ng/μL) activity, the enzyme activity was assayed over a pH range (5.0, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 and 10.0) using 20 μM *N*- Suc-GPLGP-AMC in AGMT buffer. This buffer consisted of 25 mM acetic acid, 25 mM glycine, 50 mM MES, 75 mM Tris with 1 mM EDTA and

1 mM DTT adjusted to the different pHs. The activities were measured in triplicate as described above.

### **Optimal buffer**

To identify the ideal buffer and additives for enzyme activity, 40 ng/μL of rPOPLi and *N*-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC to 20 μM final concentration were assayed in two different buffers, 50 mM Tris or 25 mM HEPES, both at pH 7.5, in the presence or absence of additives. Additives were NaCl 150 or 300 mM or DTT 5 or 10 mM. After identification of optimal NaCl and DTT concentrations, assays with both additives in each buffer were performed.

### **Temperature**

To determine the effect of temperature on rPOPLi (40 ng/μL) activity, assays were performed at 28, 37, 40 and 45 °C. rPOPLi was pre-incubated for 5 min at each temperature before addition of *N*-Suc-GPLGP-AMC (20 μM final concentration) followed by incubation for 20 min. The reaction was stopped with 100 μL of absolute ethanol and transferred to a 96-well plate where the fluorescence was measured by endpoint. The assay was performed in triplicate.

### **Enzymatic parameters**

Different concentrations (200 - 9.37 μM) of *N*-Suc-GPLGP-AMC were tested in 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.5 with 40 ng/μL of rPOPLi with or without 5 mM DTT in order to determine the  $K_m$ . The fluorescence was measured in a kinetic assay of 30 min. The data was analysed using the method of Hanes-Woolf ( $[S]/V \times [S]$ ) and the values of  $K_m$  determined by the equation  $[S]/v = 1/V_{max} * [S] + (K_m/V_{max})$ .

### **Inhibition test**

The protease inhibitors 100  $\mu\text{M}$  4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF), 1 mM Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 100  $\mu\text{M}$  N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 1 mM L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano (E-64), 100  $\mu\text{M}$  1-cloro-3-tosilamido-7-amino-2-heptanona (TLCK), 100  $\mu\text{M}$  Leupeptin, 100  $\mu\text{M}$  Pesptatin or POP specific inhibitor Z-Pro-Prolinal (0.6-10 nM ZPP) were pre-incubated for 15 min with 40 ng/ $\mu\text{L}$  of rPOPLi diluted in 25 mM HEPES at pH 7.5. The reactions proceeded after addition of the fluorogenic substrate *N*-Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-AMC diluted to a 20  $\mu\text{M}$  working concentration for each assay.

### **Activity of POPLi from parasite extracts**

*L. infantum* promastigotes and amastigotes were washed three times with PBS (1000 x *g*, 10 min, 4 °C) and resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of 25 mM HEPES pH 7.5. Lysis was performed using BugBuster lysis reagent, according to the manufacturer's instructions, or by three cycles of freezing/thawing. After lysis by the latter, soluble and insoluble fractions were obtained by centrifugation (16.000 x *g*, 10 min, 4 °C) and the insoluble fraction was reconstituted in 25 mM HEPES pH 7.5 and 0.1% Triton X-100, centrifuged again to obtain the membrane fraction (supernatant) and the cytoskeleton fraction (pellet), which was reconstituted in 25 mM HEPES pH 7.5. The activities were measured as described above.

## Western blotting

Three male BALB/C mice were immunized with four biweekly boosts of 10 µg aliquots of purified rPOPLi, the first boost emulsified in complete Freund's adjuvant, followed by two in incomplete Freund's adjuvant and the last without adjuvant. Sera were collected after the last booster, diluted 1:1 in glycerol (v/v), aliquoted and stored at -20 °C. All animal experiments were approved by the Comissão de Ética de Uso Animal from the University of Brasilia, No. 27764/2016.

*L. infantum* promastigotes and amastigotes ( $1.0 \times 10^7$  cells/well) were used to analyse the protein level of POPLi in the parasite total extract, cytoplasmatic, membrane or cytoskeleton fractions. rPOPLi and the parasite fractions were applied on 10% SDS-polyacrilamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). After blocking non-specific binding with 5 % skimmed milk in TBS containing 0,1% Tween (TBST) for 1 h at room temperature, membranes were incubated 1 h with the primary antibody anti-rPOPLi (1:200) or anti-His tag (1:1000), followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:30000) for 1 h. Immunoreactive bands were detected using the substrate Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare).

## Immunofluorescence

*L. infantum* promastigotes were washed with PBS, fixed in 1.0 % formaldehyde for 30 min, permeabilized with 0.1 % Triton X-100 and after 10 min, glycine was added to 0.1 M and incubated for 10 min. After centrifugation, parasites were resuspended in PBS and spreaded on glass slides coated with poly-L-lysine. Cells were blocked in PBS with 0.1 % Triton X-100 and 0.1% BSA

for 15 min. Next, cells were treated with pre-immune serum (1:100) or anti-POPLi antibodies (1:100) for 1 h at room temperature, washed three times with PBS for 10 min and stained with Alexa Fluor 488-labeled secondary antibodies (1:200) for 1 h. 5 µg/mL DAPI (Sigma) were added for 10 min and washed with PBS for 5 min. Slides were mounted with Fluorescent Mounting Medium (DAKO) and observed in fluorescent microscope, ZEISS LSM 800/Airyscan.

### **Inhibition of macrophage infection by *L. infantum***

Bone marrow-derived macrophages (BMM) were obtained from femur and tibia of BALB/c mice. Briefly, hind legs were gently smashed with RPMI 1640 in a sterile mortar using a pestle. Bone marrow was filtered through a 70 µm cell strainer (Sigma Aldrich) and then centrifuged at 400 x g for 10 min at 4 °C. Bone marrow was resuspended in complete RPMI 1640 medium (20% iFBS and 100 µg/mL gentamycin sulfate) and cells counted in Neubauer chamber by Trypan Blue viability test. Cells were seeded at  $2 \times 10^5$  cells/mL in 10 mL of complete RPMI 1640 medium with 10 ng/mL M-CSF (Peprotech) in Petri dishes at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 8 days with re-feeding at day 4 with additional 10 mL complete RPMI 1640 with M-CSF. BMM purity was analyzed by phenotypic expression of specific macrophage panel (F4/80 and CD11b, Biolegend) using flow cytometer (BD FACSVerser™, BD Biosciences).

For in vitro infection, BMM were harvested and  $4 \times 10^5$  cells were seeded in 24-well plates at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 24h. The following infection assays were performed: 1) *L. infantum* infective promastigotes obtained from two successive passages in mice were incubated for 1 h with S17092 or ZPP (1 µM, 10 µM or 50 µM), specific POP inhibitors, or 0,1 % DMSO; 2) to evaluate the effect of the inhibitors on the BMM, they were previously incubated for 1 h with S17092 or

ZPP (50  $\mu$ M) before infection with *L. infantum*; 3) *L. infantum* infective promastigotes were previously incubated for 30 min with anti-rPOPLi (1:100 and 1:200); 4) infection was also evaluated in the presence of 10  $\mu$ g rPOPLi boiled or not; and 5) rPOPLi was incubated with anti-rPOPLi (1:50, 1:100 and 1:200) for 30 min before proceeding the infection assay.

Infection proceeded by incubation of *L. infantum* at 10:1 parasite-to-cell ratio. For infection synchronization, plates were quickly centrifuged at 300 x g for 20 sec and infection occurred for 2 h at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Afterward, wells were washed with PBS to eliminate extracellular parasites. Infection rate was determined by panoptic staining (Instant Prov, Newprov) and 100 macrophages were counted under light microscopy. Assays were performed in triplicate and the infection was evaluated by the percentage of infected cells compared to the control.

### **Statistical analysis**

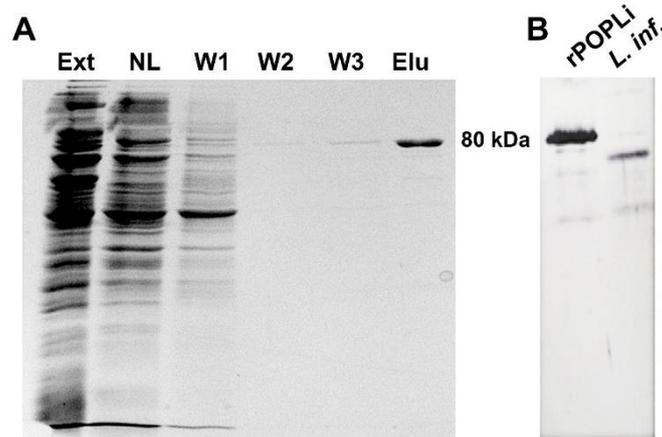
The graphics were generated using the Software GraphPad Prism 6. The results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and statistically analysed with analysis of variance (ANOVA) followed by t-Student test. The p significance level was broken down in the results.

## **Results**

### **Expression and purification of rPOPLi**

rPOPLi was produced as a recombinant protein in a bacterial system, purified and analysed by SDS-PAGE and western blotting (Fig. 1). One protein band in accordance with the predicted molecular weight of His-POPLi (80 kDa) was observed in the purification elution fraction (Fig. 1A) and in the western blot

(Fig. 1 B), suggesting rPOPLi were produced as soluble recombinant enzymes. These results demonstrate that rPOPLi are soluble, pure and could be used to perform biochemical and functional characterizations.

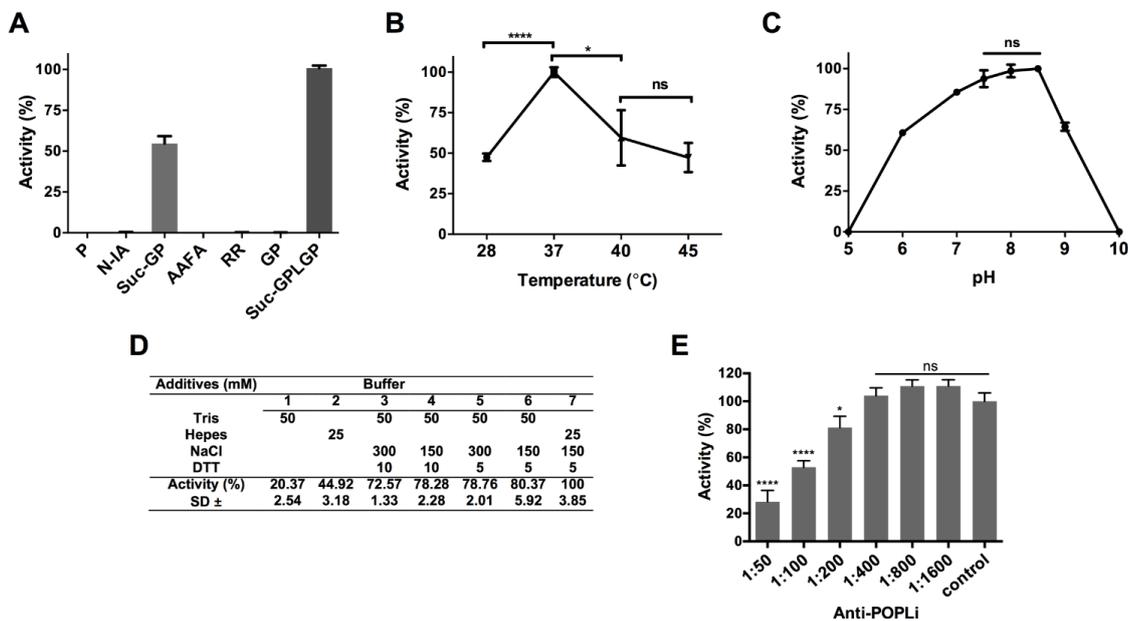


**Fig. 1. SDS-PAGE and western blot of purified rPOPLi.** Analysis of recombinant POPLi expressed in *E. coli*. (A) SDS-PAGE 10% of fractions from flow-through, wash and elution steps. The gel was subjected to Coomassie staining. Ext = total extract, NL = non-linked, W1-W3 = washes, Elu = elution fraction. (B) Western blot of purified rPOPLi and total protein extracted from *L. infantum* promastigotes reacted with anti-rPOPLi mice antibody.

### Enzymatic characterization of rPOPLi

rPOPLi was tested in enzymatic assays using initially the collagenase substrate Suc-GPLGP-AMC, which is already known to be effectively cleaved by POPTc (19). After a serial dilution, rPOPLi ideal concentration established to be used in the experiments was 40 ng. The enzyme was used to assess the activity using different substrates. The results demonstrated that rPOPLi was able to hydrolyze Suc-GP-AMC (25,27), although less efficiently, and was not able to hydrolyze GP-AMC and P-AMC, which are unblocked in the N-terminal region

(Fig. 2A). Suc-GPLGP-AMC substrate was used as reference, assuming its hydrolysis efficiency as 100%. rPOPLi exhibited maximum activity at 37 °C (Fig. 2B) that decreased to 60% at 40°C, and to approximately 45% at 28 °C and 45°C. Next, to evaluate the pH dependence, the buffer AGMT (28) was used at pH ranging between 5 to 10. The best pH for enzyme activity was 8.5 (Fig. 2C). Similar results were observed at 50 mM Tris pH 8.5 and 25 mM HEPES pH 7.5. Salt (150 mM NaCl) and reducing agent DTT (5 mM) additions to the latter buffer increased rPOPLi activity (Fig. 2D). This buffer was used to determine the kinetic parameters. Lastly, it was observed that the inhibitory activity of anti-POPLi on rPOPLi activity significantly diminished along with increased antibody serial dilution (Fig. 2E).

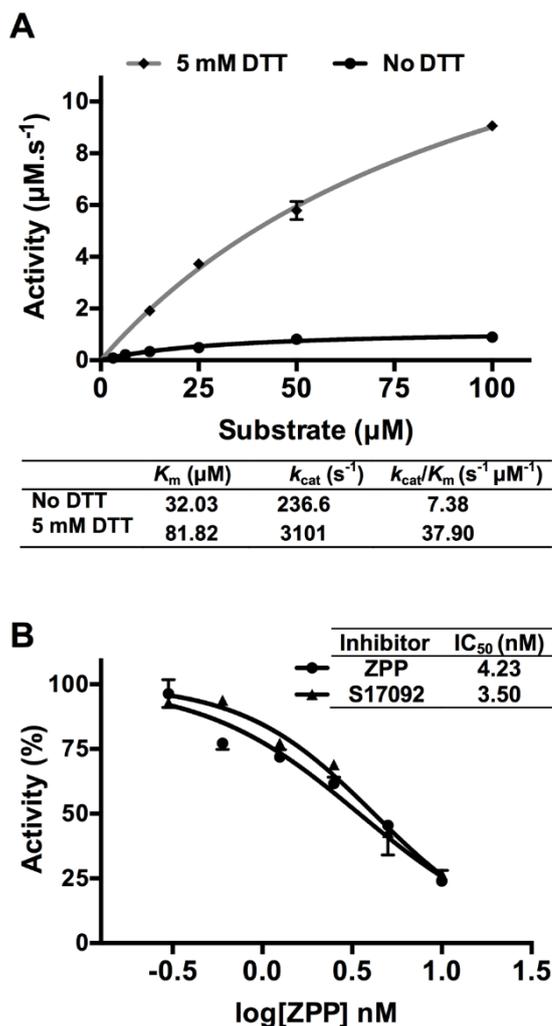


**Figure 2. Substrate specificities and the effects of pH, temperature, additives and anti-POPLi on recombinant enzyme activity.** (A) Substrates (25  $\mu$ M final concentration) were tested in 25 mM Hepes pH 7.5 containing 150 mM NaCl and 5 mM DTT. (B) Effect of temperature on rPOPLi activity. Activities were

determined in pH 7.5 with incubation temperature ranging from 28 °C to 45 °C. (C) Stability of rPOPLi at different pH. Activities were determined in 25 mM acetic acid, 25 mM glycine, 50 mM MES and 75 mM Tris (AGMT) buffer with 1 mM EDTA and 1 mM DTT, adjusted to different pHs. (D) Effect of salt (150 mM NaCl) and reducing agent DTT (5 mM) on rPOPLi activity. (E) Effect of increasing dilutions of anti-POPLi on rPOPLi activity. The assays were performed in triplicate.

### **Kinetics studies and IC<sub>50</sub> values of rPOPLi inhibition**

It was possible to determine, according to the regression of Hanes-Wolff, the  $K_m$  of 58.56 mM and  $V_{max}$  of 4651.16 MFU/min in the absence of additives and  $K_m$  233.58 mM and  $V_{max}$  23.809,52 MFU min in their presence (Fig. 3A). Inhibition of substrate hydrolysis occurred at low concentration of protease inhibitors. The amounts of ZPP or S17092 inhibitors necessary for 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) of rPOPLi were 4.23 nM and 3.50 nM, respectively (Fig. 3B).



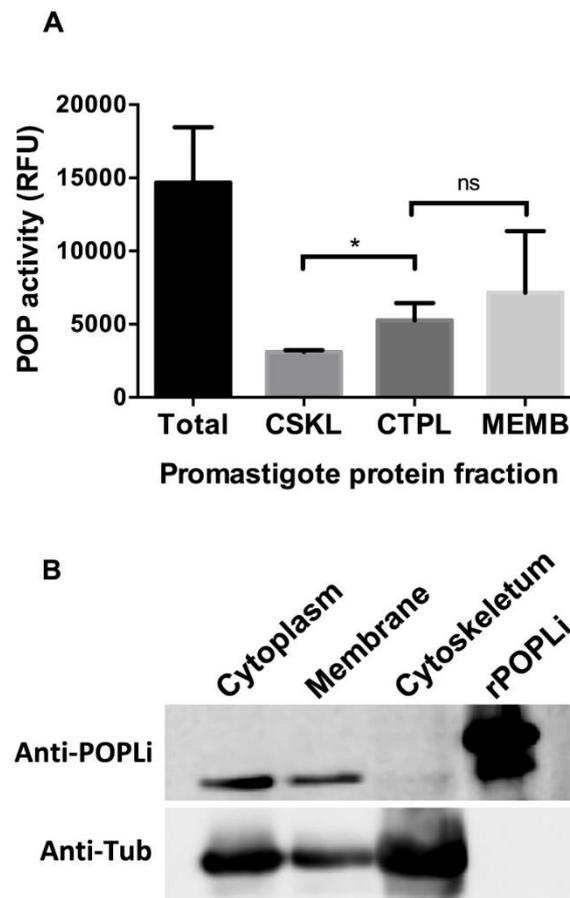
**Figure 3. Enzymatic activity and inhibition of rPOPLi.**

### Effect of various protease inhibitors on rPOPLi activity

The activity of rPOPLi in the presence of protease inhibitors was determined by incubating rPOPLi with different protease inhibitors. TLCK and TPCK were able to significantly reduce rPOPLi activity by 96.8% and 92.3%, respectively. Pepstatin A, an aspartic protease specific inhibitor (29), inhibited 33% of rPOPLi activity. In the presence of a POP specific inhibitor, Z-Pro-Prolinal (30), a modified canonical peptidomimetic compound with high specificity to the active site of POP (31), catalytic efficiency was reduced in 81 % at 10 mM and resulted in an  $\text{IC}_{50}$  of 5.22 nM.

### POPLi localization and activity in parasite extract

To verify where POPLi is localized in the parasite, the promastigotes were lysed by freeze and thaw cycles and the insoluble fraction was solubilized with Triton to release the membrane bound proteins. As expected, POPLi was observed in the cytoplasm and membrane-bound protein fractions (Fig. 4A). Highest POPLi activities were exhibited in these fractions (Fig. 4B), in agreement with the previous result.

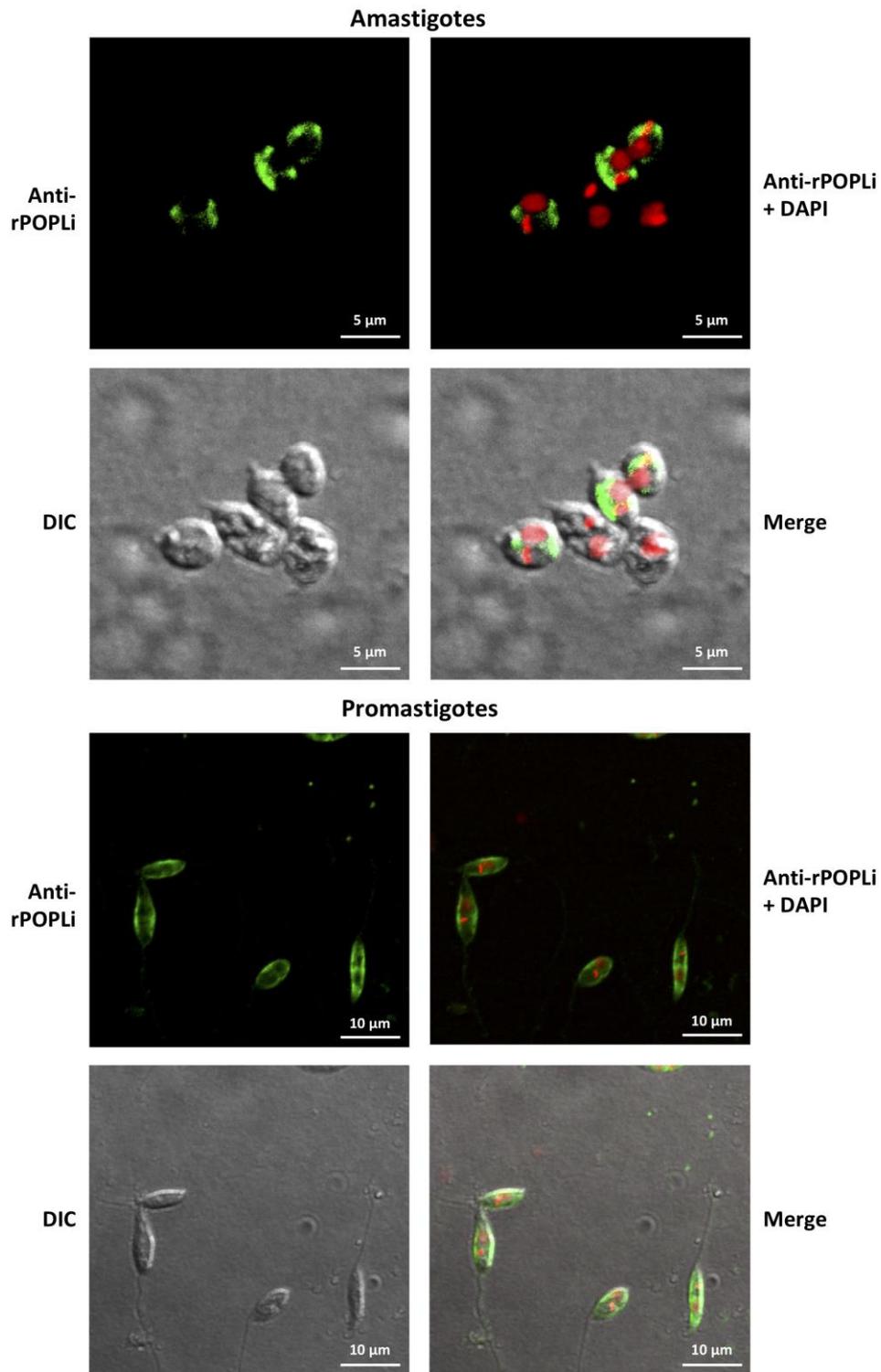


**Figure 4. POPLi localization and activity in the parasite extract fractions.** (A) *L. infantum* promastigotes were lysed and processed for western blotting by using anti-POPLi antibody followed by ECL detection. rPOPLi was loaded for reference. The same membrane was probed with anti-tubulin (anti-

Tub) antibody as loading control. (B) Enzymatic activity was measured in the soluble and insoluble fractions of BugBuster lysed extract and/or by freezing/thawing, with an increase in fluorescence in soluble detergent and insoluble frozen/thawed fractions, suggesting that POPLi is bound to the parasite membrane.  $P < 0.05$ , test t.

### **POPLi is distributed near the inner membrane in the developmental forms of *L. infantum***

The cellular localization of POPLi was determined by immunofluorescence microscopy using anti-POPLi polyclonal antiserum produced in mice against the rPOPLi. In both parasite forms, POPLi proteins were observed in the cytosol, concentrated near the inner membrane, suggesting that POPLi may be membrane-bound (Fig. 5).

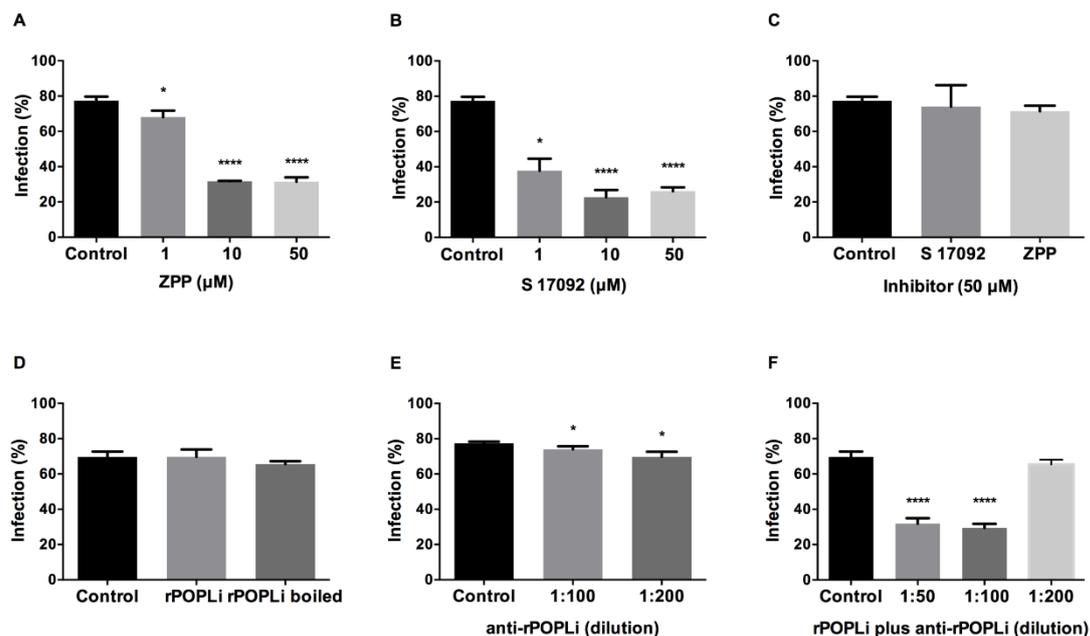


**Figure 5. Cellular distribution of POPLi in the developmental forms of *L. infantum*.** Promastigotes and amastigotes were fixed with 1% formaldehyde, permeabilized and incubated with anti-POPLi polyclonal antibodies, followed by

incubation with Alexa Fluor 488-conjugated anti-mice IgG (green). Parasite DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar, 5  $\mu$ m.

### POP specific inhibitors decrease *L. infantum* macrophage infection

To examine whether POPLi is involved in *L. infantum* internalization into murine macrophages, POP specific inhibitors were used. Pre-treatment of *L. infantum* with ZPP and S17092 markedly inhibited the percentage of infected cells (~50%) (Fig. 6A and 6B). Nevertheless, pre-treatment of murine macrophages with 50  $\mu$ M POP specific inhibitors did not affect macrophage infection by *L. infantum* (Fig. 6C). Macrophage infection in the presence of rPOPLi boiled or not was not altered (Fig. 6D), as well as following *L. infantum* pre-treatment with anti-rPOPLi (Fig. 6E). However, when rPOPLi was pre-incubated with anti-rPOPLi for 30 min before proceeding with the infection assay, significant inhibition of infected cells (~50%) was observed (Fig. 6F). These results suggest POPLi may be involved in the invasion by *L. infantum* into host cells and in the pathogenesis of leishmaniasis.



**Figure 6. POP specific inhibitors diminish infection of macrophage by *L. infantum*.** (A-B) Murine macrophages were infected with *L. infantum* promastigotes (moi=20:1) after parasite previous incubation with POP inhibitors, rPOPLi, anti-POPLi antibody or both rPOPLi and anti-POPLi. (A) Z-Pro-Prolinal (ZPP) POP inhibitor. (B) S17092 POP inhibitor. (C) Murine macrophages were incubated with POP inhibitors only. (D) rPOPLi. (E) Anti-POPLi antibody. (F) rPOPLi (10 ug) and anti-POPLi antibody. Control: no inhibitor, rPOPLi or anti-POPLi.

### Discussion

In this study, *L. infantum* prolyl oligopeptidase was expressed and characterized for the first time. The best conditions for rPOPLi production were optimized as 20 °C and induction time of 4 h, which led to shifting of expression from insoluble to a soluble and active form. rPOPLi showed maximum activity at pH 7.5 in 25 mM Hepes with 150 mM NaCl and 5 mM DTT. POPTc80 also presented an increased activity in the presence of salt and reducing agent DTT (32). This increase may be due to the property of DTT to prevent the oxidation of Cys<sup>255</sup> located near POP catalytic site (15), as observed in POPLi. Bastos et al. showed rPOPTb present maximum activity in 25 mM HEPES at pH 7.5 without salt and reducing agent (22). Similar results were found in *Thermococcus sp.*, a thermophile whose POP has higher activity at pH 7.5 (13).

In this study, similar types of substrates with AMC fluorophore were used. rPOPLi showed preference for collagenase substrates containing proline residue at position P1 of the C-terminal region, but this activity is negligible when N-terminus is free (33), as seen is the case of GP-AMC. Similar results were observed for POPTc80 and POPTb (19,22,23,32). The protease showed

maximum activity at 37 °C, differing from other trypanosomatids whose POP maximum activities were observed at 28 °C, but in agreement with the POP from gram-negative *Myxococcus xantus* (34). The optimal temperature for enzyme activity at 37 °C matches well to the environment for *Leishmania* growth in the mammalian host, while in *T. cruzi* and *T. brucei*, optimal temperature at 28 °C matches to the milieu for parasite growth in the vector. This difference was not expected and further investigation is necessary for a better understanding.

Effect of salt and reducing agent was also studied on activity of rPOPLi. NaCl and DTT remarkably increased enzyme activity, four times (233.58 µM) compared to activity tested in their absence (58.57 µM). These results indicate rPOPLi may have lower affinity for the substrate compared to POPTc80 and POPTb that presented lower  $K_m$  (~14 µM) (17,32).

Further, the effects of protease inhibitors were evaluated on rPOPLi activity. This protease was moderately inhibited by AEBSF and showed 90% inhibition in the presence of TPCK and TLCK, which inhibit a broad spectrum of serine peptidases (17,32,35). ZPP, specific POP inhibitor, reduced enzymatic activity by 81 %, and presented an  $IC_{50}$  of 5.22 nM, comparable to the POP bovine brain (36). This result suggests these enzymes might exhibit high structural similarity in the region of the catalytic pocket where the inhibitor binds. ZPP contains a CHO group at the P1 site and was shown to form a hemiacetal adduct with the serine residue in the active site, mimicking the tetrahedral transition state of the enzyme catalysed reaction (37) and leading to a slow-binding inhibition of POP (38,39).

With the purpose of knowing the localization of POPLi in the parasite, immunofluorescence was performed. The enzyme has a cytoplasmic location,

closely associated with the membrane, although it is not possible to assume it is circumscribed to the inner or outer membrane, or both. In an attempt to confirm this subcellular localization/establish the correct location of the protein, rPOPLi activity was measured in the cytoplasmic, membrane and cytoskeleton fractions of the parasite extract, being higher in the membrane fraction. Proteomic analysis of *Leishmania donovani* showed POP was present throughout the cell lysate and the exosome (40). It may be transported by exosomes to the parasite membrane supporting the results that we observed in this work. Exosomes are membranous vesicles released by the cells into the extracellular medium and are involved in many cellular processes such as cell signalling and communication. Their role in several diseases have been evidenced, specially in pathogen-host interaction through proteins releasing in the extracellular environment (41).

POPLi inhibition was also tested to understand the effect of inhibitors on vertebrate host cell infection. *L. infantum* promastigotes pre-incubation with specific POP inhibitors markedly reduced relative macrophage infection. In *T. cruzi*, POPTc80 inhibition also reduces *T. cruzi* infection of the host cell (17,18,32). Interestingly, reduced infection was also observed when infection assay was performed in the presence of immunocomplexes formed between rPOPLi and anti-rPOPLi antibodies, indicating the interaction of the immunocomplex with macrophage membrane Fc receptors might activate signalling pathways that stimulate macrophages to eliminate intracellular parasites. This study provides evidence that rPOPLi has potential as candidate for drug design aiming at therapy against *L. infantum* infection.

## Funding

This work was supported by grants and fellowships of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, grant 923/18 CAPES-COFECUB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grants 433208/2016-3 and CNPq, INCT - MCTI/CNPq/CAPES/FAPs 16/2014) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF, grant 0193.001803/2017).

## References

1. Nassif PW, Castilho-peres M, Paula A, Rosa Z, Laureano A, Mara S, et al. Major Article Clinical , laboratory , and therapeutic characteristics of American tegumentary leishmaniasis in the 15 th State Health Division , Northwest Paraná State , Southern Brazil. 2016;49(5):593–601.
2. WHO. Leishmaniasis.
3. Katara GK, Raj A, Kumar R, Avishek K, Kaushal H, Ansari NA, et al. Analysis of localized immune responses reveals presence of Th17 and Treg cells in cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. BMC Immunol [Internet]. 2013;14(1):52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24267152>
4. Roberts SC. The genetic toolbox for *Leishmania* parasites. Bioeng Bugs [Internet]. 2011;2(6):320–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22067831>
5. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande V V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 1998;62(3):597–635. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9729602>
6. Kuwabara T. ~ h ~ ract ~ r ~ ati ~ n of a prolyf ~ nd ~ p ~ ptidas ~ from spinach thylakoids. 1992;11(Ps li):0–3.
7. Kang C, Yu XW, Xu Y. Purification and characterization of a prolyl endopeptidase isolated from *Aspergillus oryzae*. J Ind Microbiol Biotechnol. 2014;
8. Kim JD, Toda C, D'Agostino G, Zeiss CJ, DiLeone RJ, Elsworth JD, et al. Hypothalamic prolyl endopeptidase (PREP) regulates pancreatic insulin and glucagon secretion in mice. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2014;111(32):11876–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25071172>
9. Kocadag Kocazorbaz E, Zihnioglu F. Purification, characterization and the use of recombinant prolyl oligopeptidase from *Myxococcus xanthus* for gluten hydrolysis. Protein

- Expr Purif [Internet]. 2017;129:101–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27693621>
10. García-Horsman JA, Männistö PT, Venäläinen JI. On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* [Internet]. 2007;41(1):1–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196652>
  11. Myöhänen TT, Tenorio-Laranga J, Jokinen B, Vázquez-Sánchez R, Moreno-Baylach MJ, García-Horsman JA, et al. Prolyl oligopeptidase induces angiogenesis both in vitro and in vivo in a novel regulatory manner. *Br J Pharmacol*. 2011;
  12. Kumar N, Nakagawa P, Janic B, Romero CA, Worou ME, Monu SR, et al. The anti-inflammatory peptide Ac-SDKP is released from thymosin- $\beta$ 4 by renal meprin- $\alpha$  and prolyl oligopeptidase. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2016;
  13. Lee HS, Kim YJ, Cho Y, Kim SJ, Lee JH, Kang SG. Characterization of prolyl oligopeptidase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. NA1. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2007;103(3):221–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17434424>
  14. Bastos I, Motta F, Grellier P, Santana J. Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas Disease, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. *Curr Med Chem* [Internet]. 2013;20(25):3103–15. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=20&issue=25&spage=3103>
  15. Szeltner Z, Juhász T, Szamosi I, Rea D, Fülöp V, Módos K, et al. The loops facing the active site of prolyl oligopeptidase are crucial components in substrate gating and specificity. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2013;1834(1):98–111. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940581>
  16. Portugal B, Motta FN, Correa AF, Nolasco DO, de Almeida H, Magalhães KG, et al. *Mycobacterium tuberculosis* prolyl oligopeptidase induces in vitro secretion of proinflammatory cytokines by peritoneal macrophages. *Front Microbiol*. 2017;
  17. Bastos IM, Motta FN, Charneau S, Santana JM, Dubost L, Augustyns K, et al. Prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma brucei* hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice. *Microbes Infect* [Internet]. 2010;12(6):457–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188209>
  18. Grellier P, Vendeville S, Joyeau R, Bastos IM, Drobecq H, Frappier F, et al. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J Biol Chem* [Internet]. 2001;276(50):47078–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598112>
  19. Martins SANTANA J, Grellier P, Schre J, L Teixeira AR. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. Vol. 324, *Biochem. J*. 1997.
  20. Grellier P, Vendeville S, Joyeau R, Bastos IMD, Drobecq H, Frappier F, et al. *Trypanosoma cruzi* Prolyl Oligopeptidase Tc80 Is Involved in Nonphagocytic Mammalian

- Cell Invasion by Trypomastigotes. *J Biol Chem*. 2001;
21. Motta FN. Prolyl Oligopeptidases de tripanossomos : aspectos estruturais e funcionais. 2010.
  22. Bastos IMD, Motta FN, Charneau S, Santana JM, Dubost L, Augustyns K, et al. Prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma brucei* hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice. *Microbes Infect*. 2010;12(6):457–66.
  23. Disch J, Caligiorne RB, Maciel F, Oliveira MC, Orsini M, Dias-Neto E, et al. Single-step duplex kDNA-PCR for detection of *Leishmania donovani* complex in human peripheral blood samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2006;56(4):395–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16935456>
  24. Kangethe RT, Winger EM, Settypalli TBK, Wijewardana V, Slaets J, Coetzer THT, et al. Prolyl oligopeptidase-like deficient *Trypanosoma evansi* parasites are associated with reduced interleukin-10 concentrations in vivo and in vitro. *Parasitol Open*. 2017 Dec;3:e17.
  25. Fajtová P, Štefanić S, Hradilek M, Dvořák J, Vondrášek J, Jílková A, et al. Prolyl oligopeptidase from the blood fluke *Schistosoma mansoni*: From functional analysis to anti-schistosomal inhibitors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;
  26. Venäläinen JI, Garcia-Horsman JA, Forsberg MM, Jalkanen A, Wallén EAA, Jarho EM, et al. Binding kinetics and duration of in vivo action of novel prolyl oligopeptidase inhibitors. *Biochem Pharmacol*. 2006;
  27. Verçosa BL, Melo MN, Puerto HL, Mendonça IL, Vasconcelos AC. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. *Vet Parasitol* [Internet]. 2012;189(2–4):162–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22694833>
  28. Szeltner Z, Juhász T, Szamosi I, Rea D, Fülöp V, Módos K, et al. The loops facing the active site of prolyl oligopeptidase are crucial components in substrate gating and specificity. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2013;
  29. Kritis A, Pourzitaki C, Klagas I, Chourdakis M, Albani M. Proteases inhibition assessment on PC12 and NGF treated cells after oxygen and glucose deprivation reveals a distinct role for aspartyl proteases. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(10):e25950. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22028798>
  30. Szeltner Z, Rea D, Renner V, Fulop V, Polgar L. Electrostatic effects and binding determinants in the catalysis of prolyl oligopeptidase. Site specific mutagenesis at the oxyanion binding site. *J Biol Chem* [Internet]. 2002;277(45):42613–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202494>
  31. Kotev M, Lecina D, Tarragó T, Giralt E, Guallar V. Unveiling prolyl oligopeptidase ligand migration by comprehensive computational techniques. *Biophys J*. 2015;
  32. Bastos IMD, Grellier P, Martins NF, Cadavid-Restrepo G, de Souza-Ault MR, Augustyns K, et al. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem J* [Internet]. 2005;388(Pt 1):29–38. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1186690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
33. Harris MN, Madura JD, Ming LJ, Harwood VJ. Kinetic and Mechanistic Studies of Prolyl Oligopeptidase from the Hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*. 2001;
  34. Kocadag Kocazorbaz E, Zihnioglu F. Purification, characterization and the use of recombinant prolyl oligopeptidase from *Myxococcus xanthus* for gluten hydrolysis. *Protein Expr Purif*. 2017;
  35. King MA, Halicka HD, Darzynkiewicz Z. Pro- and anti-apoptotic effects of an inhibitor of chymotrypsin-like serine proteases. *Cell Cycle [Internet]*. 2004;3(12):1566–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15539954>
  36. López A, Tarragó T, Giralt E. Low molecular weight inhibitors of Prolyl Oligopeptidase: a review of compounds patented from 2003 to 2010. *Expert Opin Ther Pat [Internet]*. 2011;21(7):1023–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21539473>
  37. Fülöp V, Böcskei Z, Polgár L. Prolyl oligopeptidase: an unusual beta-propeller domain regulates proteolysis. *Cell*. 1998 Jul;94(2):161–70.
  38. Bakker a V, Jung S, Spencer RW, Vinick FJ, Faraci WS. Slow tight-binding inhibition of prolyl endopeptidase by benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. *Biochem J*. 1990;271:559–62.
  39. Venäläinen JI, Juvonen RO, Garcia-Horsman JA, Wallén EAA, Christiaans JAM, Jarho EM, et al. Slow-binding inhibitors of prolyl oligopeptidase with different functional groups at the P1 site. *Biochem J*. 2004 Sep;382(Pt 3):1003–8.
  40. Matlashewski G. Adaptation of *Leishmania donovani* to cutaneous and visceral environments : in vivo selection and proteomic analysis. 2014;
  41. Araujo DS. EXOSSOMOS: DOS PROCESSOS DE INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO . EXOSOMES : PROMISING STRUCTURES FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF DISEASES AND REGULATION OF PARASITE-HOST INTERACTION PROCESSES . 2016;(March).



## Perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem compreender melhor o papel da prolil oligopeptidase nas tripanossomíases, bem como avançar no estudo para a futura obtenção de novos fármacos para o tratamento das doenças tropicais negligenciadas.

No que se refere a POPTc80, serão feitos:

- Novos testes de infecção in vitro serão realizados com os parasitos simples nocaute e, em seguida, experimentos in vivo, para avaliar a capacidade infectiva destes parasitos frente ao sistema imunológico;
- Metaciclogênese e inibição com o uso de outros inibidores específicos da POP;
- Estabelecimento e clonagem da cultura duplo nocaute para caracterização e avaliação infectiva;
- Superexpressão da POPTc80 e obtenção de possíveis ligantes à proteína.

Quanto a POPLi, serão feitos:

- Testes de infecção in vivo;
- Deleção do gene com o uso do sistema CRISPR/Cas9;
- Superexpressão da POPLi e obtenção de possíveis ligantes à proteína.

### Referências Bibliográficas

1. Brener Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. Scielo Books. 1997;24–31.
2. Dvorak JA, Hyde TP. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with vertebrate cells in vitro: I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp Parasitol.* 1973;34(2):268–83.
3. De Souza W, De Carvalho TMU, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *Int J Cell Biol.* 2010;2010.
4. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* [Internet]. 2010;375(9723):1388–402. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
5. Cardinal MV, Sartor PA, Gaspe MS, Enriquez GF, Colaianni I, Gürtler RE. High levels of human infection with *Trypanosoma cruzi* associated with the domestic density of infected vectors and hosts in a rural area of northeastern Argentina. 2018;1–13.
6. Valente VDC. ESTUDO GENOTÍPICO DE TRYPANOSOMA CRUZI: EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DO HOMEM, TRIATOMÍNEOS E MAMÍFEROS SILVESTRES DO PARÁ, AMAPÁ E MARANHÃO. 2011;(August):1521–33.
7. Messenger LA, Bern C. Congenital Chagas disease: current diagnostics, limitations and future perspectives. *Curr Opin Infect Dis.* 2018;31:415–21.
8. Basile L, Jansa JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Euro Surveill* [Internet]. 2011;16(37):1–10. Available from: [www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19968](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19968)
9. Dutra WO, Menezes CAS, Villani FNA, da Costa GC, da Silveira ABM, Reis DDÁ, et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(SUPPL. 1):208–18.
10. Bonney KM, Engman DM. Autoimmune pathogenesis of chagas heart disease: Looking back, looking ahead. *Am J Pathol* [Internet]. 2015;185(6):1537–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.12.023>

11. Kalil-Filho R. Globalization of Chagas Disease Burden and New Treatment Perspectives. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2015;66(10):1190–2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26337998>
12. Argolo AM, Felix M, Pacheco R, Costa J. Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. *Doença Chagas e seus ...* [Internet]. 2008;63. Available from: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=690417&indexSearch=ID>
13. WHO WHO. Chagas Disease (American Trypanosomiasis) [Internet]. 2018. Available from: <http://www.who.int/chagas/>
14. Francisco AF, Jayawardhana S, Lewis MD, White KL, Shackleford DM, Chen G, et al. Nitroheterocyclic drugs cure experimental *Trypanosoma cruzi* infections more effectively in the chronic stage than in the acute stage. *Sci Rep*. 2016;
15. WHO WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* [Internet]. 2015;(6):33–44. Available from: <http://www.who.int/wer>
16. CDC C for DC and P. Neglected Tropical Diseases [Internet]. 2017. Available from: <https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/>
17. Carlos Pinto Dias J, Novaes Ramos A, Dias Gontijo E, Luquetti A, Aparecida Shikanai-Yasuda M, Rodrigues Coura J, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. *Epidemiol e Serviços Saúde*. 2016;
18. Kalil-Filho R. Globalization of Chagas Disease Burden and New Treatment Perspectives. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015.
19. WHO WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) Chagas disease [Internet]. Available from: [http://www.who.int/chagas/disease/home\\_symptoms\\_more/en/](http://www.who.int/chagas/disease/home_symptoms_more/en/)
20. Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: A new worldwide challenge. *Nature*. 2010;
21. Souza AL, Faria RX, Calabrese KS, Haridoim DJ, Taniwaki N, Alves LA, et al. Temporizin and Temporizin-1 Peptides as Novel Candidates for Eliminating *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(7):e0157673. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27384541>

22. Torres-guerrero E, Quintanilla-cedillo MR, Ruiz-esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis : a review [ version 1 ; referees : 2 approved ] Referee Status : 2017;6(May):1–15.
23. Azevedo CS, Guido BC, Pereira JL, Nolasco DO, Corrêa R, Magalhães KG, et al. Revealing a Novel Otubain-Like Enzyme from *Leishmania infantum* with Deubiquitinating Activity toward K48-Linked Substrate. *Front Chem* [Internet]. 2017;5(March):1–11. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2017.00013/full>
24. WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly Epidemiol Rec*. 2016;(83):285–96.
25. WHO WHO. Leishmaniasis [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 10]. Available from: [www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis)
26. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet* [Internet]. 2018;6736(figure 2):1–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673618312042>
27. CDC C for DC and P. Parasites - Leishmaniasis [Internet]. 2013 [cited 2018 Oct 10]. Available from: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
28. Lamour SD, Choi BS, Keun HC, Müller I, Saric J. Metabolic characterization of *Leishmania* major infection in activated and nonactivated macrophages. *J Proteome Res* [Internet]. 2012;11(8):4211–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22724526>
29. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011;9(8):604–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>
30. Steverding D. The history of leishmaniasis. 2017;1–10.
31. WHO WHO. Cutaneous leishmaniasis [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 10]. Available from: [http://www.who.int/leishmaniasis/cutaneous\\_leishmaniasis/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/cutaneous_leishmaniasis/en/)
32. WHO WHO. Mucocutaneous leishmaniasis [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 10]. Available from: [http://www.who.int/leishmaniasis/mucocutaneous\\_leishmaniasis/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/mucocutaneous_leishmaniasis/en/)
33. Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American Society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). *Am J Trop Med Hyg*. 2017;96(1):24–45.
34. Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, Tomazela DM, Jesús MN De, Marzal C, et al.

- Antimoniais Empregados No Tratamento Da Leishmaniose: Estado Da Arte. *Quim Nova*. 2003;26(4):550–5.
35. Clark DP., Pazdernik NJ. *Biotechnology*. Second Edi. 2016.
  36. López-Otín C, Bond JS. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem*. 2008;283(45):30433–7.
  37. Siqueira-Neto JL, Debnath A, McCall L-I, Bernatchez JA, Ndao M, Reed SL, et al. Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2018;12(8):e0006512. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30138453><http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006512>
  38. Mótyán J, Tóth F, Tózsér J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. *Biomolecules* [Internet]. 2013;3(4):923–42. Available from: <http://www.mdpi.com/2218-273X/3/4/923/>
  39. Castro HC, Abreu PA, Geraldo RB, Martins RCA, Dos Santos R, Loureiro NIV, et al. Looking at the proteases from a simple perspective. *J Mol Recognit*. 2011;24(2):165–81.
  40. Rawlings ND, Barrett AJ, Finn R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D343–50.
  41. Ghosh A, Raha S. Proteases from Protozoa and Their Role in Infection. *Proteases in Physiology and Pathology*. 2017. 143-158 p.
  42. Figueiredo GSF. Caracterização bioquímica e estudo funcional in vitro da dipeptidil peptidase 8 de *Trypanosoma cruzi* Caracterização bioquímica e estudo funcional in vitro da dipeptidil peptidase 8 de *Trypanosoma cruzi*. 2017.
  43. Szeltner Z, Polgár L. Structure, function and biological relevance of prolyl oligopeptidase. *Curr Protein Pept Sci* [Internet]. 2008;9(1):96–107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336325>
  44. Tenorio-Laranga J, Männistö PT, Storvik M, der Veken P, García-Horsman JA. Four day inhibition of prolyl oligopeptidase causes significant changes in the peptidome of rat brain, liver and kidney. *Biochimie* [Internet]. 2012;94(9):1849–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546504>
  45. Harris MN, Madura JD, Ming LJ, Harwood VJ. Kinetic and Mechanistic Studies of Prolyl

- Oligopeptidase from the Hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*. 2001;
46. BASTOS IMD, GRELLIER P, MARTINS NF, CADAVID-RESTREPO G, de SOUZA-AULT MR, AUGUSTYNS K, et al. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem J* [Internet]. 2005;388(1):29–38. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20041049>
  47. Babkova K, Korabecny J, Soukup O, Nepovimova E, Jun D, Kuca K. Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: Attention to the most promising and clinically relevant inhibitors. *Future Medicinal Chemistry*. 2017.
  48. Myöhänen TT, Pyykkö E, Männistö PT, Carpen O. Distribution of Prolyl Oligopeptidase in Human Peripheral Tissues and in Ovarian and Colorectal Tumors. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(9):706–15.
  49. Uterine H. Leucylglycinamide by Enzyme. 1971;297(February).
  50. Uchiyama H, Inaoka T, Ohkuma-Soyejima T, Togame H, Shibanaka Y, Yoshimoto T, et al. Directed evolution to improve the thermostability of prolyl endopeptidase. *J Biochem*. 2000;
  51. Jaako K, Waniek A, Parik K, Klimaviciusa L, Aonurm-Helm A, Noortoots A, et al. Prolyl endopeptidase is involved in the degradation of neural cell adhesion molecules in vitro. Vol. 26, *Journal of Cell Science* • Advance article JCS Advance Online Article. Posted on. 2016.
  52. Kocadag Kocazorbaz E, Zihnioglu F. Purification, characterization and the use of recombinant prolyl oligopeptidase from *Myxococcus xanthus* for gluten hydrolysis. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2017;129:101–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27693621>
  53. Hannula MJ, Männistö PT, Myöhänen TT. Sequential expression, activity and nuclear localization of prolyl oligopeptidase protein in the developing rat brain. *Dev Neurosci*. 2011;33(1):38–47.
  54. Williams RSB, Cheng L, Mudge AW, Harwood AJ. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. *Nature*. 2002;
  55. Williams RSB, Harwood AJ. Lithium therapy and signal transduction. *Trends*

- Pharmacol Sci [Internet]. 2000;21(2):61–4. Available from: [http://ac.els-cdn.com/S0165614799014285/1-s2.0-S0165614799014285-main.pdf?\\_tid=e87503be-1bda-11e3-b9e8-00000aab0f26&acdnat=1379011456\\_dc15d07edcb0a5c9fd10e59f5e30ee10](http://ac.els-cdn.com/S0165614799014285/1-s2.0-S0165614799014285-main.pdf?_tid=e87503be-1bda-11e3-b9e8-00000aab0f26&acdnat=1379011456_dc15d07edcb0a5c9fd10e59f5e30ee10)
56. Schulz I, Gerhartz B, Neubauer A, Holloschi A, Heiser U, Hafner M, et al. Modulation of inositol 1,4,5-triphosphate concentration by prolyl endopeptidase inhibition. *Eur J Biochem.* 2002;269(23):5813–20.
  57. Koelink PJ, Overbeek SA, Braber S, Morgan ME, Henricks PAJ, Roda MA, et al. Collagen degradation and neutrophilic infiltration: A vicious circle in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2014;63(4):578–87.
  58. O'Reilly PJ, Hardison MT, Jackson PL, Xu X, Snelgrove RJ, Gaggar A, et al. Neutrophils contain prolyl endopeptidase and generate the chemotactic peptide, PGP, from collagen. *J Neuroimmunol.* 2009;
  59. Vliegen G, Raju TK, Adriaensen D, Lambeir A-M, De Meester I. The expression of proline-specific enzymes in the human lung. *Ann Transl Med.* 2017;
  60. Santana JM, Grellier P, Schrével J, Teixeira ARL. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J.* 1997;325 ( Pt 1):129–37.
  61. de Almeida H, Leroux V, Motta FN, Grellier P, Maigret B, Santana JM, et al. Identification of novel *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase inhibitors by structure-based virtual screening. *J Comput Aided Mol Des* [Internet]. 2016; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27770305>
  62. Grellier P, Vendeville S, Joyeau R, Bastos IM, Drobecq H, Frappier F, et al. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J Biol Chem* [Internet]. 2001;276(50):47078–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598112>
  63. Bastos I, Motta F, Grellier P, Santana J. Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas Disease, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. *Curr Med Chem* [Internet]. 2013;20(25):3103–15. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929->

- 8673&volume=20&issue=25&spage=3103
64. Gutierrez FRS, Lalu MM, Mariano FS, Milanezi CM, Cena J, Gerlach RF, et al. Increased Activities of Cardiac Matrix Metalloproteinases Matrix Metalloproteinase (MMP)–2 and MMP-9 Are Associated with Mortality during the Acute Phase of Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2008;197(10):1468–76. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/587487>
  65. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004;32(Database issue):D160-4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14681384>
  66. Joyeau R, Maoulida C, Guillet C, Frappier F, Teixeira ARL, Schrével J, et al. Synthesis and activity of pyrrolidinyl- and thiazolidinyl-dipeptide derivatives as inhibitors of the Tc80 prolyl oligopeptidase from *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Med Chem*. 2000;35(2):257–66.
  67. Bal G, Van Der Veken P, Antonov D, Lambeir AM, Grellier P, Croft SL, et al. Prolylisoxazoles: Potent inhibitors of prolyl oligopeptidase with antitrypanosomal activity. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2003;13(17):2875–8.
  68. Bivona AE, Sánchez Alberti A, Matos MN, Cerny N, Cardoso AC, Morales C, et al. *Trypanosoma cruzi* 80 kDa prolyl oligopeptidase (Tc80) as a novel immunogen for Chagas disease vaccine. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;
  69. Bastos IM, Motta FN, Charneau S, Santana JM, Dubost L, Augustyns K, et al. Prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma brucei* hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice. *Microbes Infect* [Internet]. 2010;12(6):457–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188209>
  70. Lasse CS. Caracterização bioquímica da Prolil Oligopeptidase de *Leishmania chagasi*, um potencial alvo quimioterápico para as Leishmanioses. 2014;79.
  71. Savić N, Schwank G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Transl Res* [Internet]. 2016;168:15–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2015.09.008>
  72. Okoli A, Okeke MI, Tryland M, Moens U. CRISPR/Cas9—Advancing orthopoxvirus genome editing for vaccine and vector development. *Viruses*. 2018.
  73. Peng D, Kurup SP, Yao PY, Minning TA, Tarleton RL. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *MBio*. 2015;

74. Mei Y, Wang Y, Chen H, Sun ZS, Ju X Da. Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology. *Journal of Genetics and Genomics*. 2016.
75. Genois M-M, Paquet ER, Laffitte M-CN, Maity R, Rodrigue A, Ouellette M, et al. DNA Repair Pathways in Trypanosomatids: from DNA Repair to Drug Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2014;78(1):40–73. Available from: <http://mmbbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00045-13>
76. Carolina L, Medeiros S, South L, Peng D, Bustamante JM, Wang W, et al. Rapid, Selection-Free, High-Efficiency Genome Editing in Protozoan Parasites Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoproteins. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1128/mBio.01788-17>.
77. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Maniatis Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.; 1989.
78. Tarleton R, Peng D. EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. *Microb Genomics* [Internet]. 2015;1(4):1–7. Available from: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/mgen/10.1099/mgen.0.000033>
79. Motta S. Prolil Oligopeptidases de tripanossomos : aspectos estruturais e funcionais Prolil Oligopeptidases de tripanossomos : aspectos estruturais e funcionais. 2010;
80. Bastos IMD, Grellier P, Martins NF, Cadavid-Restrepo G, de Souza-Ault MR, Augustyns K, et al. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem J* [Internet]. 2005;388(Pt 1):29–38. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1186690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
81. Wilk S, Orłowski M. Inhibition of rabbit brain prolyl endopeptidase by n-benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal, a transition state aldehyde inhibitor. *J Neurochem* [Internet]. 1983;41(1):69–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6345724>
82. Bakker a V, Jung S, Spencer RW, Vinick FJ, Faraci WS. Slow tight-binding inhibition of prolyl endopeptidase by benzyloxycarbonyl-prolyl-prolinal. *Biochem J*. 1990;271:559–62.
83. Shetty R, Vestergaard M, Jessen F, Hägglund P, Knorr V, Koehler P, et al. Discovery, cloning and characterisation of proline specific prolyl endopeptidase, a gluten degrading thermo-stable enzyme from *Sphaerobacter thermophiles*. *Enzyme Microb Technol*

- [Internet]. 2017;107:57–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.08.002>
84. Grellier P, Vendeville S, Joyeau R, Bastos IMD, Drobecq H, Frappier F, et al. Trypanosoma cruzi Prolyl Oligopeptidase Tc80 Is Involved in Nonphagocytic Mammalian Cell Invasion by Trypomastigotes. *J Biol Chem*. 2001;
  85. de Almeida H, Leroux V, Motta FN, Grellier P, Maigret B, Santana JM, et al. Identification of novel Trypanosoma cruzi prolyl oligopeptidase inhibitors by structure-based virtual screening. *J Comput Aided Mol Des*. 2016;30(12):1165–74.
  86. Martins SANTANA J, Grellier P, Schre J, L Teixeira AR. A Trypanosoma cruzi-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Vol. 324, Biochem. J*. 1997.
  87. Garcia Silva MR, Tosar JP, Frugier M, Pantano S, Bonilla B, Esteban L, et al. Cloning, characterization and subcellular localization of a Trypanosoma cruzi argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. *Gene* [Internet]. 2010;466(1–2):26–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2010.06.012>
  88. Paludan K, Duch M, Jørgensen P, Kjeldgaard NO, Pedersen FS. Graduated resistance to G418 leads to differential selection of cultured mammalian cells expressing the neo gene. *Gene*. 1989;85(2):421–6.
  89. Sanderson T, Rayner JC. PhenoPlasm: a database of disruption phenotypes for malaria parasite genes. *Wellcome Open Res* [Internet]. 2017;2:45. Available from: <https://wellcomeopenresearch.org/articles/2-45/v1>
  90. Hughes D. Pathways to understanding the extended phenotype of parasites in their hosts. *J Exp Biol* [Internet]. 2013;216(1):142–7. Available from: <http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.077461>
  91. Barbaric I, Miller G, Dear TN. Appearances can be deceiving: Phenotypes of knockout mice. *Briefings Funct Genomics Proteomics*. 2007;6(2):91–103.
  92. Macieira DB, de Menezes R de CAA, Damico CB, Almosny NRP, Messick JB. Uso da técnica de southern blot/hibridização associada à reação em cadeia da polimerase para aumentar a sensibilidade no diagnóstico das infecções por hemoplasmas em gatos domésticos. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2009;18(SUPPL.1):1–6.

93. Motta FN. Prolil Oligopeptidases de tripanossomos : aspectos estruturais e funcionais Prolil Oligopeptidases de tripanossomos : aspectos estruturais e funcionais. 2010.
94. Swenerton RK, Zhang S, Sajid M, Medzihradzky KF, Craik CS, Kelly BL, et al. The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem*. 2011;286(1):429–40.
95. Morty RE, Lonsdale-Eccles JD, Morehead J, Caler E V., Mentele R, Auerswald EA, et al. Oligopeptidase B from *Trypanosoma brucei*, a new member of an emerging subgroup of serine oligopeptidases. *J Biol Chem*. 1999;274(37):26149–56.
96. Tonelli RR, Silber AM, Almeida-de-Faria M, Hirata IY, Colli W, Alves JM. L-Proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol*. 2004;6(8):733–41.
97. Chamond N, Goytia M, Coatnoan N, Barale JC, Cosson A, Degrave WM, et al. *Trypanosoma cruzi* proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. *Mol Microbiol*. 2005;58(1):46–60.
98. Saye M, Miranda MR, Girolamo F Di, De Los Milagros Cámara M, Pereira CA. Proline modulates the *trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-Proline transporter. *PLoS One*. 2014;9(3).
99. Osborn MJ, Lees CJ, McElroy AN, Merkel SC, Eide CR, Mathews W, et al. Crispr/cas9-based cellular engineering for targeted gene overexpression. *Int J Mol Sci*. 2018;
100. Zhong FL, Robinson K, Eng D, Teo T, Tan K, Lim C, et al. Human DPP9 represses NLRP1 inflammasome and protects against auto-inflammatory diseases via both peptidase activity and FIIND domain binding. 2018;
101. Cota-Coronado A, Ramírez-Rodríguez PB, Padilla-Camberos E, Diaz NF, Flores-Fernández JM, Avila-Gonzalez D, et al. Implications of human induced pluripotent stem cells in metabolic disorders: from drug discovery toward precision medicine. *Drug Discov Today* [Internet]. 2018; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644618300874>
102. Andrade MA, Azevedo C dos S, Motta FN, Santos ML dos, Silva CL, Santana JM de, et al. Essential oils: In vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2016;16(1):1–8. Available



from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-016-1401-9>

## ANEXOS

Participação no trabalho:

- Na tentativa de obter novas alternativas para o tratamento das leishmanioses, que sejam eficientes e menos tóxicos, nosso grupo de pesquisa tem estudado compostos originários de produtos naturais. O estudo em anexo, foi desenvolvido com óleos essenciais (OEs) para identificar seus efeitos em formas promastigotas de *L. amazonensis*, através da inibição do crescimento do parasito na presença de OEs e sua toxicidade. Foi possível observar que a maioria dos OEs possuem moderada toxicidade e, dentre os testados, os óleos *Siparuna guianensis*, *Cinnamodendron dinisii*, *Matricaria chamomilla*, *Cordia verbenaceae*, *Bulnesia sarmientoi*, *Ferula galbaniflua* e *Melissa officinalis* apresentaram atividade anti-leishmanicida (102).

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition

Milene Aparecida Andrade<sup>1,2</sup>, Clênia dos Santos Azevedo<sup>1</sup>, Flávia Nader Motta<sup>1,2</sup>, Maria Lucília dos Santos<sup>3</sup>, Camila Lasse Silva<sup>1</sup>, Jaime Martins de Santana<sup>1</sup> and Izabela M. D. Bastos<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** The current chemotherapy for cutaneous leishmaniasis (CL) has a series of drug limitations such as toxic side effects, long duration, high costs and drug resistance, which requires the development of new drugs or effective alternatives to the CL treatment. Essential oils (EOs) are complex mixtures of secondary metabolites from various plants. It has been shown that several EOs, or their constituents, have inhibitory activity against protozoa. Thus, this study aims to evaluate the biological activity of different essential oils (EOs) on *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes forms, as well as their cytotoxicity on mammalian cells and chemical composition.

**Methods:** Sixteen EOs were evaluated by mean of IC<sub>50</sub>/24 h and cytotoxicity against L6 cells (CC<sub>50</sub>/24 h) using Resazurin assay. Only those EOs that presented better results for IC<sub>50</sub>/24 h were submitted to GC–MS analysis to determine their chemical constitution.

**Results:** The EO from *Cinnamodendron dinisii*, *Matricaria chamomilla*, *Myroxylon peruiferum*, *Salvia sclarea*, *Bulnesia sarmientoi*, *Ferula galbaniflua*, *Siparuna guianensis* and *Melissa officinalis* were the most active against *L. amazonensis* with IC<sub>50</sub>/24 h ranging from 54.05 to 162.25 µg/mL. Analysis of EOs by GC–MS showed mainly the presence of β-farnesene (52.73 %) and bisabolol oxide (12.09 %) for *M. chamomilla*; α-copaene (13.41 %), saffrole (8.35 %) and δ-cadinene (7.08 %) for *M. peruiferum*; linalool (28.80 %) and linalyl acetate (60.08 %) for *S. sclarea*; guaïol (48.29 %) and 2-undecanone (19.49 %) for *B. sarmientoi*; ethyl phthalate (13.09 %) and methyl-8-pimaren-18-oate (41.82 %) for *F. galbaniflua*; and neral (37.18 %) and citral (5.02 %) for *M. officinalis*.

**Conclusion:** The EO from *F. galbaniflua* showed to be effective against *L. amazonensis* promastigotes forms and presented low cytotoxic activity against L6 cells. Thus, it represents a strong candidate for future studies aiming its molecular activity on these pathogenic parasites.

**Keywords:** Secondary metabolites, Anti-*Leishmania*, Natural products, *Ferula galbaniflua*

## Background

Leishmaniasis, the third most important vector-borne diseases, is caused by a protozoan parasite of the genus *Leishmania*, which is transmitted to human by the bite of sand flies. Leishmaniasis represents a complex disease with diverse clinical manifestations and poses a public health problem since it is a neglected tropical disease

with current high worldwide incidence [1, 2]. Globally, more than 12 million individuals are infected, with another 350 million at risk of infection, and nearly 2 million new cases are reported annually worldwide [3]. The disease is prevalent in 16 developed and 72 developing countries; nevertheless 90 % of cases are reported in three regions: Sudan/Ethiopia/Kenya, India/Bangladesh/Nepal and Brazil with as many as 0.02 to 0.04 million deaths every year [3, 4].

Leishmaniasis can be divided into three forms, varying in severity from self-healing cutaneous lesions, dermatological ulcers in cutaneous leishmaniasis (CL), destructive

\* Correspondence: dourado@unb.br

<sup>1</sup>Pathogen-Host Interface Laboratory, Department of Cell Biology, The University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Bloco I, Brasília, DF CEP 70910-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



form of mucocutaneous leishmaniasis, to deadly form of visceral leishmaniasis (VL) [5]. CL is characterized by ulcers on the skin that are often formed at the site of the insect vector bite. Those ulcers can undergo metastasis of the nasopharyngeal mucosa developing to tissue destruction, depending on the species of *Leishmania* involved [6]. *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (V.) panamensis* are responsible for cases of mucocutaneous leishmaniasis in the Americas, although *L. (V.) guyanensis* and *L. (L.) amazonensis* have been identified, especially, in immuno-compromised hosts [6].

The first-line drugs for systemic treatment of leishmaniasis are parenterally administered antimonials such as the sodium stibogluconate (Pentostam®) and the N-methyl glucamine antimoniate (Glucantime®) [7, 8] generally required for the treatment of CL in the New World due to the risk of mucosal involvement [9]. This current chemotherapy presents several issues such as high cost, difficult administration and elevated toxicity, associated with serious side effects [10], for instance musculoskeletal pain, gastrointestinal disturbances, mild to moderate headache, electrocardiographic QTs interval prolongation and mild to moderate increase of liver and pancreatic enzymes [11]. Second-line drug Pentamidine and amphotericin B are not widely used due to their high toxicity and cost. Miltefosine, the first oral antileishmanial drug, is the treatment of choice for diffuse cutaneous leishmaniasis and New World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* but increasing resistance to this drug has been notified [12].

All antileishmanial drugs except miltefosine have to be administrated parenterally. Most of these drugs are toxic, requires prolonged hospitalization and close monitoring, which makes the treatment costly and beyond the reach of most patients. Consequently, the development of alternative therapies is a priority for the treatment of leishmaniasis. As a strategy, the investigation of extracts and compounds, with biological activity, isolated from plants and used in traditional medicine is a promising in the research field for compounds with potential action for the prophylaxis and chemotherapy of CL [13].

Essential oils (EOs) are complex mixtures of secondary metabolites isolated from plants. In these mixtures, there are 10–60 constituents at different concentrations, but usually only 2–3 major constituents determine the biological properties of the EO [14]. Those compounds and their constituents present a broad pharmacological spectrum, and they are used as analgesics, sedatives, anti-inflammatory, and anti-spasmodic drugs, as well as antimicrobials, antiprotozoals and antihelmintics [13, 15, 16]. It has been shown that several EOs or their constituents have inhibitory activity on protozoa, especially *Leishmania* [17–19]. For instance, Santos and colleagues demonstrated that copaiba oil from *Copaifera martii* is a safer,

shorter, less-expansive, and more easily administered antileishmanial drug [18]. Therefore, the purpose of this present work was to analyze the effect of sixteen EOs biological potential on *L. amazonensis* promastigotes forms and L6 cells and chemical constitution, by GC-MS, of those EOs that showed better leishmanicidal results.

## Methods

### Essential oils

EOs of *Litsea cubeba* fruits; *Lavandula officinalis*, *Matricaria chamomilla* and *Cananga odorata* flowers; *Elettaria cardamomum* seeds; *Cinnamomum camphora*, *Myroxylon peruiferum* and *Bulnesia sarmientoi* barks; *Ferula galbaniflua* resin; *Salvia sclarea*, *Foeniculum officinalis*, *Cordia verbenaceae*, and *Melissa officinalis* leaves; *Pelargonium graveolens* leaves and stems were purchased from QUINARI Cosmetic and Fragrances Inc. (Maringá-PR, Brazil) with lot number 0717/05209/F. EOs of *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis* leaves were obtained as described by Andrade et al. [20].

Firstly, EOs and Amphotericin B 250 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) at 100 mg/mL and 50 µg/mL, respectively. For use, the stock was diluted 5:100 in either Schneider (Sigma-Aldrich) or RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) media (sub stock). DMSO final concentration in the experiments never exceeded 0.5 %, a concentration that is not harmful to parasites and L6 cells [13]. Stocks were stored at 4 °C in the dark, to avoid degradation [21]. The sub stock was freshly prepared before use.

### Chemical composition of EOs

Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis was performed using a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph coupled with GCMS-QP2010 Plus equipped with auto sampler (model AOC-20i, Shimadzu, Columbia, MD, USA) and GC–MS Solution software. Investigation was performed with a Rtx-5MS capillary column (30 mm × 0.25 mm × 0.25 µm) at programmed temperature ranging from 60 to 250 °C at 3 °C/min. Analysis conditions were: injector temperature 250 °C, ion source interface temperature 300 °C, analysis of masses between 40–350 m/z, electron impact at 70 eV, column head pressure at constant pressure of 59 kPa, column flow 1.02 mL/min, gas linear velocity: 36.8 cm/s, carrier gas: helium, injected volume 1 µL (1:1000 in hexane) in splitless. Constituents of EOs were identified by comparing their mass spectral pattern and retention indexes (RI) relative to a standard n-alkane series (C<sub>9</sub>–C<sub>24</sub>) with those known in the literature and the Wiley W9N08 database [13, 22].

### Parasites and culture conditions

The promastigotes forms of *L. amazonensis* (strain MHOM/BR/77/LTB0016) were maintained at 28 °C in Schneider medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 100 µg/mL gentamicin, with weekly passages. For the screening of EOs biological potential, promastigotes were collected from cultures at the mid-log phase of growth (3-day-old culture). The parasite strain was obtained from Fiocruz-COLPROT (Coleção de Protozoários da Fiocruz).

### Antileishmanial activity of essential oils *in vitro*

EOs serial dilutions, from 500 to 31.25 µg/mL, were prepared on a 96-well cell culture plate. Afterwards,  $1.35 \times 10^6$  parasite/mL culture resuspended in 150 µL were added to the plates and incubated for 24 h at 28 °C. After this period, 20 µL of Resazurin solution were added to a 2 mM final concentration in all wells [23, 24]. The plates were incubated for further 4 h at 37 °C followed by the fluorescence measurement under 570 nm<sub>ex</sub>/595 nm<sub>em</sub> in the microplate reader SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

*In vitro* experiment was performed in triplicate and repeated twice independently. DMSO was used as control in the same final concentration found in each dilution. Amphotericin B was used as positive control at final concentration ranging from 312.5 to 19.56 ng/mL.

The percentage of viable promastigotes cells was determined by the equation [25]:

$$\%P = (100 \times Fa)/Fc$$

Where %P: percentage of viable promastigotes cells; Fc: control fluorescence units; Fa: fluorescence units emitted by the analyzed samples (with inhibitor).

### Cytotoxic activity of essential oils *in vitro*

Uninfected L6 cell monolayers were washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) for 5 min at 37 °C, washed with RPMI medium pH 7.4 + 2.5 % FBS, centrifuged at 200 g for 10 min at 4 °C, resuspended in the same medium and, finally, seeded into 96-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well). Plates were incubated at 37 °C for 24 h, then the medium was removed and cells were washed with PBS. Diluted EOs were added to overnight-adhered L6 cells and incubated for more 24 h at 37 °C. Cell viability was assessed by 2 mM Resazurin as described above.

The percentage of viable cells was determined by the equation [25]:

$$\%V = (100 \times Fa)/Fc$$

Where %V is the percentage of viable cells, Fc: control fluorescence units; Fa: fluorescence units emitted by the

analyzed samples (with inhibitor). The selectivity index (SI) was calculated by dividing CC<sub>50</sub> for the IC<sub>50</sub>.

### Statistical analysis

For both *in vitro* EOs biological potential, a randomized complete block design (RBD) test was used, with 5 concentrations, 3 repetitions and 2 experiments (blocks) for each sample. The statistical program used was SISVAR [26]. Data were submitted to analysis of variance and the averages compared by Scott-Knott test and regression, both 5 % probability. The adjusted equations were used to calculate the concentration needed to cripple 50 % of L6 cells (CC<sub>50</sub>) or 50 % of the parasites (IC<sub>50</sub>).

## Results

### Antileishmanial and cytotoxic activity of essential oils *in vitro*

Growth inhibitory activity by the selected EOs was performed on *L. amazonensis* promastigotes forms at concentrations ranging from 30 to 500 µg/mL. In the test, the EOs of *L. cubeba*, *E. cardamomum*, *L. officinalis*, *C. camphora* and *C. odorata* did not show activity at 500 µg/mL (Table 1). Lower concentrations of the remaining EOs were then evaluated to estimate the IC<sub>50</sub>/24 h (Table 1). The most effective EO was of the one from *S. guianensis* (48.55 ± 3.64 µg/mL), followed by *C. dinisii* (54.05 ± 4.88 µg/mL), *M. chamomilla* (60.16 ± 4.24 µg/mL), *C. verbenaceae* (64.75 ± 2.04 µg/mL), *B. sarmientoi* (85.56 ± 3.38 µg/mL), *F. galbaniflua* (95.70 ± 1.82 µg/mL), *M. officinalis* (132.02 ± 3.14 µg/mL), *M. peruiferum* (162.25 ± 1.57 µg/mL), *S. sclarea* (325.92 ± 8.58 µg/mL), *F. officinalis* (328, 28 ± 6,80 µg/mL) and *P. graveolens* (363.71 ± 6.77 µg/mL). The IC<sub>50</sub>/24 h of Amphotericin B was 0.83 ± 0.03 µg/mL (Table 1).

The cytotoxicity against L6 cells and *L. amazonensis* were compared using the selectivity index (SI) (Table 1). Higher values of SI means more promising compounds for developing antileishmanial drugs. The SI measures the compound's level of selectivity towards *L. amazonensis*. Evaluation of cytotoxicity showed that the least cytotoxic EO was that of *C. camphora* (CC<sub>50</sub>/24 h = > 500.00 µg/mL), followed by *E. cardamomum* (439.57 ± 2.27 µg/mL), *L. officinalis* (377.56 ± 8.91 µg/mL), *F. galbaniflua* (377.26 ± 2.71 µg/mL), *S. sclarea* (375.37 ± 3.62 µg/mL), *P. graveolens* (368.39 ± 3.90 µg/mL), *F. officinalis* (368.27 ± 3.81 µg/mL), *M. officinalis* (297.45 ± 1.32 µg/mL), *L. cubeba* (180.72 ± 1.37 µg/mL), *M. chamomilla* (173.04 ± 1.24 µg/mL), *B. sarmientoi* (163.46 ± 1.77 µg/mL), *M. peruiferum* (160.80 ± 1.62 µg/mL), *C. odorata* (142.80 ± 1.76 µg/mL), *C. verbenaceae* (130.00 ± 1.08 1.77 µg/mL), *C. dinisii* (106.31 ± 2.23 µg/mL) and the most cytotoxic EO was of the one from *S. guianensis* (78.02 ± 1.19 µg/mL) (Table 1).

EOs with higher selectivity indexes were those from *F. galbaniflua* (3.94), *M. chamomilla* (2.87) and *M. officinalis*

**Table 1** EOs biological potential and selectivity indexes (SI) for *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub>/24 h) promastigotes and L6 cells (CC<sub>50</sub>/24 h)

Essential oils	<i>L. amazonensis</i>	L6 cells	SI <sup>g</sup>
	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ± DP (µg/mL)	CC <sub>50</sub> <sup>f</sup> ± DP (µg/mL)	
<i>Litsea cubeba</i>	NI <sup>e</sup>	180.72 ± 1.37	-
<i>Matricaria chamomilla</i>	60.16 ± 4.24	173.04 ± 1.24	2.87
<i>Elettaria cardamomum</i>	>500.00 <sup>b</sup>	439.57 ± 2.27	-
<i>Lavandula officinalis</i>	>500.00	377.56 ± 8.91	-
<i>Cinnamomum camphora</i>	>500.00	>500.00	-
<i>Myroxylon peruiferum</i>	162.25 ± 1.57	160.80 ± 1.62	0.99
<i>Salvia sclarea</i>	325.92 ± 8.58	375.37 ± 3.62	1.15
<i>Bulnesia sarmientoi</i>	85.56 ± 3.38	163.46 ± 1.77	1.91
<i>Ferula galbaniflua</i>	95.70 ± 1.82	377.26 ± 2.71	3.94
<i>Pelargonium graveolens</i>	363.71 ± 6.77	368.39 ± 3.90	1.01
<i>Cananga odorata</i>	NI	142.80 ± 1.76	-
<i>Foeniculum officinalis</i>	328.28 ± 6.80	368.27 ± 3.81	1.12
<i>Cordia verbenaceae</i>	64.75 ± 2.04	130.00 ± 1.08	2.01
<i>Melissa officinalis</i>	132.02 ± 3.14	297.45 ± 1.32	2.25
<i>Siparuna guianensis</i>	48.55 ± 3.64	78.02 ± 1.19	1.60
<i>Cinnamodendron dinisii</i>	54.05 ± 4.88	106.31 ± 2.23	1.97
Anfotericina B <sup>c</sup>	(0.083 ± 0.003 µg/mL)	NI	-
DMSO <sup>d</sup>	NI	NI	-

<sup>a</sup>) IC<sub>50</sub> ± DP: the concentration able to cripple 50 % of the parasites ± standard deviation

<sup>b</sup>) > 500.00: IC<sub>50</sub> greater than the highest concentration tested

<sup>c</sup>) Amphotericin B - positive control

<sup>d</sup>) DMSO - negative control

<sup>e</sup>) NI: no inhibition

<sup>f</sup>) CC<sub>50</sub>: the concentration able to cripple 50 % of cells after 24 h of treatment ± standard deviation

<sup>g</sup>) Selectivity index - SI = CC<sub>50</sub> L6 / IC<sub>50</sub> promastigotes

(2.25), but all were more cytotoxic and less selective than Amphotericin B, because the reference drug did not show CC<sub>50</sub>/24 h value.

### Chemical composition

The GC-MS analyses were performed for EOs that showed the lower values of IC<sub>50</sub> and/or the higher SI values (Table 2). The analysis identified the main constituents as β-farnesene (52.73 %), bisabolol oxide (12.09 %), α-farnesene (10.34 %) for *M. chamomilla*; α-copaene (13.41 %), guaial (9.35 %), safrole (8.35 %) and δ-cadinene (7.08 %) for *M. peruiferum*; linalool (28.80 %) and linalyl acetate (60.08 %) for *S. sclarea*; guaial (48.29 %) and 2-undecanone (19.49 %) for *B. sarmientoi*; ethyl phthalate (13.09 %) and methyl-8-pimaren-18-oate (41.82 %) for *F. galbaniflua*; and neral (37.18 %) and geranial (5.02 %) for *M. officinalis*. According to Andrade et al. [20], EO from *C. dinisii* fresh leaves is composed mainly by α-pinene (35.41 %), β-pinene (17.81 %), sabinene (12.01 %) and bicyclogermacrene (7.59 %). EO from *S. guianensis* fresh leaves contains β-myrcene (13.14 %), germacrene-D (8.68 %) and bicyclogermacrene (16.71 %).

### Discussion

According to the classification of cytotoxicity and antileishmanial activity for extracts and fractions derived from plants and natural products defined by Study Program and Disease Control [27], the evaluated EOs are classified as moderately toxic (100 < CC<sub>50</sub> ≤ 1000 µg/mL), except the EO from *S. guianensis*, which was classified as toxic (10 < CC<sub>50</sub> ≤ 100 µg/mL). Regarding the antileishmanial activity only EOs from *S. guianensis*, *C. dinisii*, *M. chamomilla*, *C. verbenaceae*, *B. sarmientoi*, *F. galbaniflua* and *M. officinalis* are considered moderately active (50 < IC<sub>50</sub> ≤ 150 µg/mL). The others are considered not active.

Considering the chemical composition of the EO from *M. chamomilla*, (E)-β-farnesene and (E,E)-α-farnesene were found as the major compound group representing 73.07 % of the total composition. These results corroborate with those reported by Machado et al. [28] that found farnesene derivatives as the most representative constituents (22 %) and their bioassays using EO from *Lantana camara* revealed a significant leishmanicidal activity against *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub>/72 h = 0.25 µg/mL), except for the cytotoxic activity, in which the authors

**Table 2** Chemical composition of selected essential oils

Content (%)										
IRc	IRI	Component	<i>Matricaria chamomilla</i>	<i>Myroxylon peruiferum</i>	<i>Salvia sclarea</i>	<i>Bulnesia sarmientoi</i>	<i>Ferula galbaniflua</i>	<i>Melissa officinalis</i>	<i>Siparuna guianensis</i> <sup>a</sup>	<i>Cinnamodendron dinisia</i> <sup>a</sup>
930	932	α-pinene	–	–	–	–	–	–	1.83	35.41
958	963	sabinene	–	–	–	–	–	–	–	12.01
961	970	β-pinene	–	–	–	–	17.34	–	–	17.81
969	971	6-metil-5-hepten-2-one	–	–	–	–	–	3.88	–	–
975	0980	β-myrcene	–	–	1.23	–	–	–	13.14	1.46
1018	1024	1,8-cineole	–	–	–	8.71	3.71	–	–	4.37
1086	1092	linalool	–	–	28.80	2.67	–	–	–	–
1135	1130	α-terpineol	–	–	5.14	–	–	–	–	–
1231	1235	neral	–	–	–	–	–	37.18	–	–
1247	1252	linalyl acetate	–	–	60.08	2.64	–	–	–	–
1263	1264	geranial	–	–	–	–	–	52.02	–	–
1282	1285	safrole	–	8.35	–	–	–	–	–	–
1287	1293	2-undecanone	–	–	–	19.49	–	–	1.69	–
1374	1374	α-copaene	–	13.41	–	–	–	–	–	–
1428	1432	trans-α-bergamotene	–	3.48	–	–	–	–	–	–
1443	1439	(+)-aromadendrene	–	2.27	–	1.26	–	–	–	–
1451	1455	(E)-β-farnesene	52.73	–	–	–	–	–	–	–
1455	1458	allo-aromandrendene	–	5.24	–	–	–	–	–	–
1470	1474	γ-gurjunene	–	5.29	–	–	–	–	–	–
1476	1482	germancrene-D	3.42	–	–	–	–	–	8.68	–
1478	1479	ar-curcumene	–	5.05	–	–	–	–	–	–
1481	1487	β-selinene	–	3.27	–	–	–	–	–	–
1488	1497	bicyclogermancrene	–	–	–	–	–	–	16.71	7.59
1504	1505	(E,E)-a-farnesene	10.34	–	–	–	–	–	–	–
1504	1507	β-bisabolene	–	2.09	–	–	–	–	–	–
1510	1511	δ-amorfene	–	6.59	–	–	–	–	–	–
1520	1522	δ-cadinene	–	7.08	–	–	–	–	1.04	0.14
1576	1577	(–)-spathulenol	–	–	–	5.79	–	–	4.16	1.88
1594	–	diethyl phthalate	–	–	–	–	13.09	–	–	–
1601	1600	Guaiol	–	9.35	–	48.29	–	–	–	–
1630	–	(–)-sinularene	–	5.81	–	–	–	–	–	–
1652	1649	β-eudesmol	–	2.10	–	–	–	–	–	–
1656	1656	bisabolol oxide B	12.09	–	–	–	–	–	–	–
1657	1658	t-cadinol	–	–	–	1.35	–	–	4.14	–
1685	1685	α-bisabolol	9.83	–	–	–	–	–	3.35	–
1732	–	camazulene	2.30	–	–	–	–	–	–	–
–	–	elixene	–	–	–	–	5.87	–	–	–
–	–	methyl 8 (14)-pimaren-18- oate	–	–	–	–	41.82	–	–	–
–	–	NI	–	–	–	–	9.39	–	–	–
		Total identified (%)	90.72	79.38	94.05	88.85	81.83	93.08	55.25	80.67

IRI literature retention rate [22], IRc retention ratio calculated by Kovats' equation. a) Described by Andrade et al. [20]

obtained high values on Brine shrimp ( $CC_{50}$  10  $\mu\text{g/mL}$ ). Subsequently, Gawde et al. [29] observed that the chemical composition of *M. chamomilla* was similar to the one found in our study ( $\beta$ -farnesene,  $\alpha$ -bisabolol oxide B, chamazulene) but no leishmanicidal activity on *L. donavani* was observed.

Studies on the chemical composition and biological activity of *M. peruiiferum* EO are scarce. The literature reports (E) and (Z)-nerolidol,  $\alpha$ -bisabolol and (E, E)-farnesol as its major components [30] but those compounds were not identified in the present study. Santos et al. [18] reported high levels of  $\alpha$ -copaene in EO from *Copaifera reticulata* as well as for EO from *M. peruiiferum*. The last one showed growth inhibitory activity for *L. amazonensis* with  $IC_{50}/72$  h values of 5  $\mu\text{g/mL}$  for promastigotes and low cytotoxicity on J774G8 macrophages.

Ghannadi and Amree [31] have already described the EO composition obtained from the fresh oleogum resin and latex of Iranian *F. galbaniflua* (synonym *F. gummosa*) and the main constituents of this monoterpene rich oil were  $\beta$ -pinene (58.8 %). Other studies also indicate  $\beta$ -pinene as the major compound from the fresh oleogum resin and latex of this same specie [32, 33], which corroborates our results. The presence of methyl 8-(14)-pimaren-18-ate, a diterpene esters hydrocarbons, has been reported on rosin, a solid form of resin obtained from pines and some other plants; and also in the Cretaceous resins from India and Myanmar [34, 35]. To our knowledge, there is no antileishmanial activity reports related to this EO to date.

Rodilla et al. [36] determined the chemical composition of EO from *B. sarmientoi*. In accordance with our work, they identified guaiol as its major component. Studies with EO from *Endlicheria bracteolata*, which has 72.12 % of guaiol in its composition, showed  $IC_{50}$  of 7.93  $\mu\text{g/mL}$  for *L. amazonensis* and presented a  $CC_{50}$  of 15.14  $\mu\text{g/mL}$  for J774.G8 macrophages [37]. The antileishmanial activity may be attributed to the presence of a hydroxyl group of alcohol characteristics in the guaiol, especially in the exocyclic portion of the molecule [36].

The presence of linalyl acetate and linalool as the major compounds in *S. sclarea* EO (total of 88.88 %) corroborate to the results presented by Pitarokili et al. [38] that evaluated the EO composition of *S. sclarea* originated from two localities in Greece, and by Kuźma et al. [39] that evaluated the EO composition from *S. sclarea* plants generated *in vitro*. On the other hand, antileishmanial activity of linalool-rich EO from leaves of *Croton cajucara* against *L. amazonensis* was previously evaluated by Rosa et al. [40], they were able to demonstrate morphological changes in *L. amazonensis* promastigotes when treated with 15 ng/mL of that EO. In this study the cell lysis was observed within 1 h, indicating that the antileishmanial activity observed is

directly related to the presence of linalool, due to the existence of a hydroxyl group in the organic alcohol function.

As in our study, the presence of the isomers of citral, nerol and geranial are constantly reported in the chemical composition of the EO from *M. officinalis* [41–43]. Regarding the antileishmanial activity, Mikus et al. [44] reported an  $IC_{50}/72$  h of 7  $\mu\text{g/mL}$  for *L. major*, a  $CC_{50}/72$  h of 25.5  $\mu\text{g/mL}$  in HL-60 cells and SI of 3.6, higher than those observed in our study. Another study has already showed that citral presents activity against *T. cruzi*, possibly by inducing cell membrane lysis with leakage of cytoplasm [45].

The EO from *C. dinisii* and *S. guianensis* showed weak inhibitory effect on the protozoan *T. cruzi* with values of  $IC_{50}/24$  h = 209.30  $\mu\text{g/mL}$  and 282.93 mg/mL, respectively. These values are higher when compared to those obtained in the study for *L. amazonensis*, 54.05 and 48.55  $\mu\text{g/mL}$ , respectively [25].

The mechanism of action by which EOs inhibits parasite growth is still not well known, but previous studies have suggested that structural and morphological changes are caused by drugs that inhibit ergosterol synthesis, or interact with the membrane ergosterol [19, 46]. Other studies indicated that the activity of essential oils on parasites is mainly due to terpene composition. Terpenes are responsible for the hydrophobic characteristic of EOs, thus allowing their diffusion through the parasite cell membrane, affecting intracellular metabolic pathways and organelles [47].

## Conclusion

*F. galbaniflua* EO is effective against *L. amazonensis* promastigotes forms and has low cytotoxic activity. Thus, it represents a strong candidate for future studies in order to comprehend its biological activity against *L. amazonensis*.

The promising results of this study offer prospects for further research, as the evaluation of the antileishmanial potential of the major compounds and the elucidation of their molecules may, in the future, contribute to the discovery of effective drugs derived from plants for the treatment of parasitic diseases.

## Acknowledgements

The authors are indebted with Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de Brasília (CAIQ/UnB) for GC-MS analysis.

## Funding

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES): Programa Nacional de Incentivo a Pesquisa em Parasitologia Básica (CAPES grant no: 23038.005298/2011-83); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Chamada 79/2013-MCTI/CNPq/FNDCT); Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF- 193.001.076/2015); PGCTS-FCE/UNB; Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP); Decanato de Pesquisa e Pós-graduação/UnB (DPP/UnB).

**Availability of data and materials**

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article.

**Authors' contributions**

IMDB and JMS conceived the research idea. MAA, CSA and CLS conducted the experiment, analyzed and interpreted the data as well as prepared the first draft. MLS supported the conduct of the analysis and interpreted the data of CG-MS. IMDB, JMS, FNM, and CSA critically read and revised the paper. All authors have read and approved the paper before its final submission.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Ethics approval and consent to participate**

Not applicable.

**Author details**

<sup>1</sup>Pathogen-Host Interface Laboratory, Department of Cell Biology, The University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Bloco I, Brasília, DF CEP 70910-900, Brazil. <sup>2</sup>Faculty of Ceilândia, The University of Brasília, Brasília, Brazil. <sup>3</sup>Institute of Chemistry, The University of Brasília, Brasília, Brazil.

Received: 20 April 2016 Accepted: 13 October 2016

Published online: 08 November 2016

**References**

- Homsy Y, Makdasi G. Leishmaniasis: a forgotten disease among neglected people. *Internet J Health*. 2009;11:1–5. <http://ispub.com/IJH/11/2/9151>. Accessed 04 Apr 2016.
- de Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: recente developments in diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol*. 2015;16:99–109.
- WHO. World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: 3rd WHO report on neglected diseases. 2015. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf). Accessed 04 Apr 2016.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7:e35671.
- Ejaz A, Raza N, Iftikhar N. Recurrent cutaneous leishmaniasis presenting as sporotrichoid abscesses: a rare presentation near Afghanistan border. *Dermatol Online J*. 2007; 13:15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498434>. Accessed 04 Apr 2016.
- WHO. World Health Organization. Technical Report Series 949—control of leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf). Accessed 04 Apr 2016.
- Name RQ, Borges KT, Nogueira LSC, Sampaio JHD, Tauil PL, Sampaio RNR. Clinical, epidemiological and therapeutic study of 402 patients with american cutaneous leishmaniasis attended at University Hospital of Brasília, DF, Brazil. *Ann Bras Dermatol*. 2005;80:249–54.
- González U, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, Tweed JA. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;2:1–175. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19370612>. Accessed 04 Apr 2016.
- Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis*. 2007;5:150–8.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7:581–96.
- Ben Salah A, Ben Messaoud N, Guedri E, Zaatour A, Ben Alaya N, Bettaieb J. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med*. 2013;368:524–32.
- Utaile M, Kassahun A, Abebe T, Hailu A. Susceptibility of clinical isolates of *Leishmania aethiopia* to miltefosine, paromomycin, amphotericin B and sodium stibogluconate using amastigote-macrophage *in vitro* model. *Exp Parasitol*. 2013;134:68–75.
- Azeredo CMO, Santos TG, Maia BHLNS, Soares MJ. *In vitro* biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. *BMC Complementary Altern Med*. 2014;14:309–15.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46:446–75.
- Singh G, Maurya S, Lampasona MP, Catalan CAN. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol*. 2007;45:1650–61.
- Victoria FN, Lenardão EJ, Savegnago L, Perin G, Jacob RG, Alves D, Da Silva WP, Motta AS, Nascente OS. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chem Toxicol*. 2012;50:2668–74.
- Ueda-Nakamura T, Mendonça-Filho RR, Morgado-Díaz JA, Maza PK, Prado Dias Filho B, Cortez DAD, Alviano DS, Rosa MS, Lopes AH, Alviano CS, Nakamura CV. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitol Int*. 2006;55:99–105.
- Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. *J Ethnopharmacol*. 2008;120:204–8.
- Medeiros MGF, Silva AC, Citó AMGL, Borges AR, Lima SG, Lopes JAD, Figueiredo RCBQ. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol Int*. 2011;60:237–41.
- Andrade MA, Cardoso MG, Andrade J, Silva LF, Teixeira ML, Resende JV, Figueiredo ACS, Barroso J. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. *Antioxidants*. 2013;2:384–97.
- Guimarães LGL, Cardoso MG, Zacaroni LM, Lima RK, Pimentel F, Morais AR. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPP). *Quim Nova*. 2008;31:1476–80.
- Adams RP. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. 4th ed. IL: Allured Publishing Corporation; 2007.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267:5421–6.
- Raz B, Iten M, Grether-Buhler Y, Kaminsky R, Brun R. The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T. b. rhodesiense* and *T. b. gambiense*) *in vitro*. *Acta Trop*. 1997;68:139–47.
- Andrade MA, Cardoso MG, Gomes MS, Azeredo CMO, Batista LR, Soares MJ, Rodrigues LMA, Figueiredo ACS. Biological Activity of the Essential Oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. *Braz J Microbiol*. 2015;46:189–94.
- Ferreira DF. SISVAR: A computer statistical analysis system. *Cienc Agrotec*. 2008;6:36–41. doi:10.1590/S1413-70542011000600001. Accessed 04 Apr 2016.
- Rios YK, Otero AC, Muñoz DL, Echeverry M, Robledo SM, Yepes MA. Actividad citotóxica y leishmanicida *in vitro* del aceite de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). *Rev Colomb Cienc Quím Farm*. 2008;37:200–11. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/15254/16051>. Accessed 04 Apr 2016.
- Machado RRP, Valente Júnior W, Lesche B, Coimbra ES, Souza NB, Abramo C, et al. Essential oil from leaves of *Lantana camara*: a potential source of medicine against leishmaniasis. *Rev Bras Farmacogn*. 2012;22:1011–7.
- Gawde A, Cantrell CL, Zheljzakov VD, Astatkie T, Schlegel V. Steam distillation extraction kinetics regression models to predict essential oil yield, composition, and bioactivity of chamomile oil. *Ind Crops Prod*. 2014;58:61–7.
- Wanner J, Schmidt E, Bail S, Jirovetz L, Buchbauer G, Gochev V, et al. Chemical composition and antibacterial activity of selected essential oils and some of their main compounds. *Nat Prod Commun*. 2010;5:1359–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20922991>. Accessed 04 Apr 2016.
- Ghannadi A, Amree S. Volatile oil constituents of *Ferula gummosa* Boiss. from Kashan, Iran. *J Essent Oil Res*. 2002;14:420–42.
- Kouyakhi ET, Naghavi MR, Alayhs M. Study of the essential oil variation of *Ferula gummosa* samples from Iran. *Chem Nat Compounds*. 2008;44:124–6.
- Sahebkar A, Iranshahi M. Volatile Constituents of the Genus *Ferula* (Apiaceae): A Review. *J Essent Oil-Bear Plants*. 2011;14:504–31.
- Chang T, Mead TE, Zinkel DF. Mass Spectra of Diterpene Resin Acid Methyl. *J Am Oil Chem Soc*. 1970. [presented in part at the Meeting of the American Chemical Society, Chicago. 1970. http://link.springer.com/article/10.1007/BF02544660](http://link.springer.com/article/10.1007/BF02544660). Accessed 05 Apr 2016.
- Dutta S, Mallick M, Kumar K, Mann U, Greenwood PF. Terpenoid composition and botanical affinity of Cretaceous resins from India and Myanmar. *Int J Coal Geol*. 2011;85:49–55.
- Rodilla JM, Silva LA, Martinez N, Lorenzo D, Davyt D, Castillo L, Giménez C, Cabrera R, González-Coloma A, Zrostliková J, Dellacassa E. Advances in the identification and agrochemical importance of sesquiterpenoids from *Bulnesia sarmientoi* essential oil. *Ind Crops Prod*. 2011;33:497–503.

37. Rottini MM, Amaral ACF, Ferreira JLP, Silva JRA, Taniwaki, Souza CSF, d'Escoffier LN, Almeida-Souza F, Hardoim DJ, Costa SCG, Calabrese KS. *In vitro* evaluation of (–)  $\alpha$ -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol*. 2015;148:66–72.
38. Pitarokili D, Couladis M, Petsikos-Panayotarou N, Tzakou O. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *J Agric Food Chem*. 2002;50:6688–91.
39. Kuźma L, Kalemba D, Różalski M, Różalska B, Więckowska-Szakiel M, Krajewska U, Wysokińska H. Chemical composition and biological activities of essential oil from *Salvia sclarea* plants regenerated *in vitro*. *Molecules*. 2009;14:1438–47.
40. Rosa MSS, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR, Rodrigues IA, Soares RMA, Souto-Padrón T, Alviano CS, Lopes AHCS. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:1895–901.
41. Sadraei H, Ghannadib A, Malekshahia K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia*. 2003;74:445–52.
42. Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and Antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *J Agric Food Chem*. 2004;52:2485–9.
43. Silva S, Sato A, Lage CLS, Gil S, Silva RA, Azevedo, Almeida D, Esquibel MA. Essential oil composition of *Melissa officinalis* L. *in vitro* produced under the influence of growth regulators. *J Braz Chem Soc*. 2005;16:1387–90.
44. Mikus J, Harkenthal M, Steverding D, Reichling J. *In vitro* effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Med*. 2000;66:366–8.
45. Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Freire JM, Soares MJ. Antiproliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitology*. 2007;13:1649–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17686189>. Accessed 05 Apr 2015.
46. Brenzan MA, Nakamura CV, Filho BPD, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Cortez DAG. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res*. 2007;101:715–22.
47. Borges AR, Aires JR, Higino TM. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Exp Parasitol*. 2012;132:123–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

