

INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania* e as leishmanioses

Os parasitos causadores da leishmaniose são protozoários flagelados heteroxênicos pertencentes ao gênero *Leishmania* e a ordem Kinetoplastida. Nesta ordem encontram-se protozoários que possuem um ou dois flagelos locomotores, que podem ou não estar ligados à membrana plasmática formando a membrana, e uma mitocôndria única que percorre toda a extensão da célula (SCHMIDT & ROBERTS, 1989; VICKERMAN, 1976). Os membros desta ordem apresentam uma estrutura bastante peculiar, o cinetoplasto (DESCOTEAUX & TURCO, 1999), o qual origina o nome da ordem e é formada pela condensação de fibrilas de DNA mitocondrial interligadas entre si e também as cristas mitocondriais (SIMPSON, 2006).

Leishmanioses são um grupo de doenças com um largo espectro de manifestações clínicas, as quais variam desde lesões cutâneas auto-limitadas até o envolvimento visceral severo, podendo levar ao óbito (HANDMAN & BULLEN, 2002; SEN & CHATTERJEE, 2011). Atualmente cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção e 12 milhões distribuídas na África, Ásia, Europa e nas Américas são diretamente infectadas (MANSUETO *et al.*, 2007). A Organização Mundial da Saúde (2011) estima que a incidência anual destas parasitoses possa variar entre 1,5 a 2 milhões de novos casos por ano, dos quais 1,5 milhão das formas cutâneas e muco-cutânea e 500 mil da forma visceral (WHO/OMS, 2011).

De acordo com as manifestações clínicas, a leishmaniose pode ser classificada em quatro grupos: leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea, leishmaniose cutânea-difusa e leishmaniose visceral, dependendo não só da espécie infectante, mas também da genética do indivíduo infectado (REY, 2002; ROGERS *et al.*, 2002; CUNNINGHAM, 2002; LIPOLDOVÁ & DEMANT, 2006).

A leishmaniose cutânea (LC) é mais comumente causada pela espécie *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* nas Américas, e *L. major* ou *L. tropica* em outros países. A *L. major* e *L. tropica* tendem a ser menos graves, a curar mais rapidamente e, portanto, a assumir um curso relativamente benigno. Independentemente da espécie, a LC não é uma ameaça à vida. No entanto, as lesões podem levar à desfiguração significativa e estigmatização social. Em uma pequena porcentagem dos casos, o tratamento inadequado de uma lesão primária pode deixar um indivíduo sob risco de desenvolvimento posterior da leishmaniose muco-cutânea. Após recuperação e/ou tratamento bem-sucedido, a leishmaniose cutânea induz

imunidade contra re-infecção pela mesma espécie de *Leishmania* que causou a doença (DAVID & CRAFT, 2009).

A leishmaniose muco-cutânea (LMC) conhecida no Brasil como úlcera de Bauru ou ferida brava ou ferida seca ou boubá (FUNASA, 2000), inicialmente causa úlceras na pele similares aquelas da leishmaniose cutânea que, entretanto, cicatrizam, para depois reaparecerem, principalmente nas mucosas do nariz, boca e faringe. A leishmaniose muco-cutânea geralmente é acompanhada por infecções secundárias e destruição de grandes extensões do tecido. A LMC é um risco conhecido das espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, tipicamente encontradas nas Américas (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, e *L. guyanensis*). A evolução clínica desta doença é dependente de uma combinação de imunidade mediada por células do hospedeiro e da virulência do parasito. Entre a população de indivíduos infectados, a infecção progride para a mucosa em 1-10% dos pacientes (DAVID & CRAFT, 2009).

A leishmaniose cutânea-difusa (LCD) é rara mesmo em países onde a *Leishmania* é endêmica. É mais comumente causada pela *L. mexicana* e *L. amazonensis* nas Américas, e *L. aethiopica* na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e África. Os pacientes apresentam anergia específica aos antígenos de *Leishmania*, embora a proliferação de linfócitos e resposta a outros micro-organismos intracelulares permanecem intactos. A LCD pode ser clinicamente semelhante a hanseníase virchowiana. É uma doença que começa com uma pápula inicial, indolor ou nódulo no local da inoculação e progride para difusão, não-ulcerada, de máculas violáceas eritematosas, nódulos e placas muito infiltradas com amastigotas (DAVID & CRAFT, 2009).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é caracterizada por febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia. É uma doença sistêmica muito grave, com migração dos parasitos para o fígado, baço, medula óssea e tecidos linfóides, podendo levar o hospedeiro à morte (HANDMAN, 2000; REY, 2002).

No Novo Mundo, a distribuição da doença compreende todo o território nacional (Figura 1). A leishmaniose muco-cutânea é causada principalmente pela *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, cuja prevalência se estende pelo Brasil, Venezuela, Peru, Equador e Colômbia (SILVEIRA *et al.*, 2001; ASSCHE *et al.*, 2011). No Brasil, *L. braziliensis* tem ampla distribuição do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o Centro-Sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental, além da região Sudeste (SCHUBAD *et al.*, 2004). Mais de 40 espécies de mamíferos silvestres no Novo Mundo já foram encontradas naturalmente

infectadas por espécies de *Leishmania*, destacando-se pequenos roedores, marsupiais e edentados, além de primatas e carnívoros (SCHUBAD *et al.*, 2004).

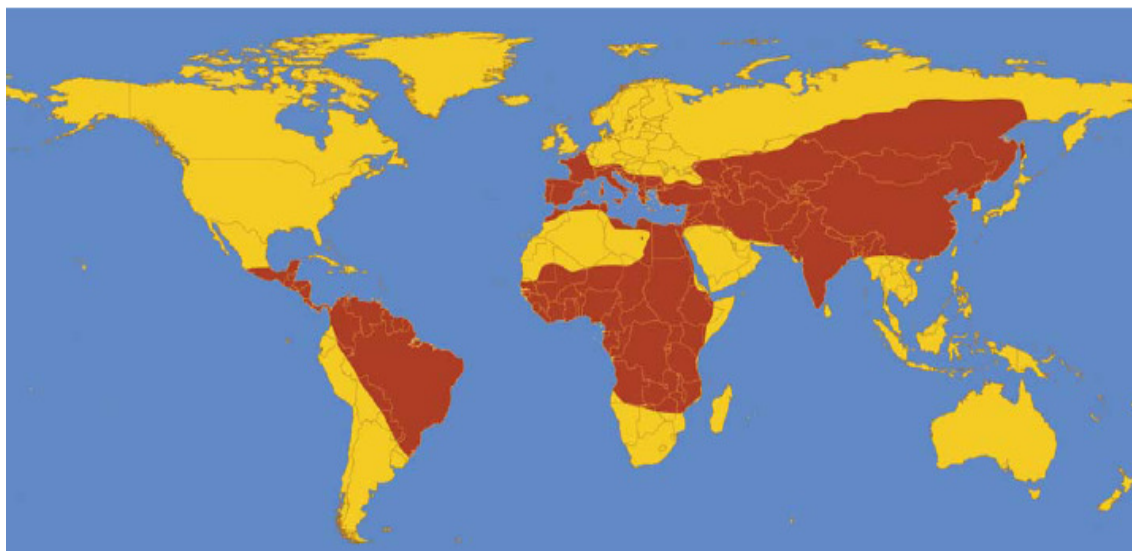


Figura 1 - Distribuição geográfica das zonas endêmicas das leishmanioses. Adaptado (LOPES *et al.*, 2010).

A leishmaniose é transmitida por fêmeas de insetos flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (REY, 2002; SHARMA & SINGH, 2008). Pelo menos 13 espécies do gênero *Lutzomyia* são descritas como prováveis transmissores (KILLICK-KENDRICK, 1990). Para *L. braziliensis*, em ambientes modificados, rural e peridomiciliar, são frequentes as espécies *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. migoneli* (PETERSON & SHAW, 2003) e *Lu. ovallesi* (RABINOVICH & FELICIANGELI, 2004) como vetores, sendo que *Lu. intermedia* parece ser a principal espécie vetorial no Estado do Rio de Janeiro (MENESES *et al.*, 2005).

Ciclo de vida e aspectos imunológicos da *Leishmania* spp.

Durante o seu ciclo evolutivo, estes protozoários apresentam duas formas distintas (Figura 2): (1) a promastigota, alongada e com flagelo livre, que se desenvolve no lúmen do tubo digestivo do inseto vetor e (2) a amastigota, arredondada e com flagelo rudimentar intracelular, que parasita principalmente as células do sistema fagocítico mononuclear do

hospedeiro vertebrado, multiplicando-se no interior de macrófagos (RITTING & BOGDAN, 2000; SINGH *et al.*, 2006).

No interior dos macrófagos, os promastigotas diferenciam-se em amastigotas os quais se multiplicam por fissão binária até ocorrer o rompimento da célula hospedeira e a disseminação das formas amastigotas para outros tecidos, infectando ou disseminando a infecção a novas células (RITTING & BOGDAN, 2000; BESTEIRO *et al.*, 2007). A ingestão destas formas pelo inseto durante o repasto sanguíneo dos flebotomíneos promove a diferenciação em formas promastigotas procíclicas, que se multiplicam rapidamente no trato digestivo do inseto vetor e que não pouco infectivas para o hospedeiro vertebrado (Figura 2) (BESTEIRO *et al.*, 2007).

Um aspecto intrínseco ao gênero *Leishmania*, essencial para a sua interação com o macrófago, é o processo de metaciclogênese, no qual o parasito adquire capacidade infectante (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; CHAPPUIS, 2007). Durante este processo, o parasito sofre diferenciação de formas promastigotas procíclicas, as quais são encontradas no tubo digestivo do inseto vetor, em formas promastigotas metacíclicas infectantes, encontradas na região bucal do inseto vetor (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; CHAPPUIS, 2007).

A transformação entre as diferentes formas (promastigotas procíclicas, promastigotas metacíclicas e amastigotas) é um processo regulado geneticamente e dependente de fatores extracelulares tais como pH e temperatura e é caracterizado pela mudança sequencial de expressão de mRNA. Isto reflete em uma reciclagem na síntese de proteínas específicas dos diferentes estágios como modificações nas moléculas de glicoconjugados da superfície do parasito (CAMPBELL & RAINEY, 1993; PAN *et al.*, 1993; BESTEIRO *et al.*, 2007).

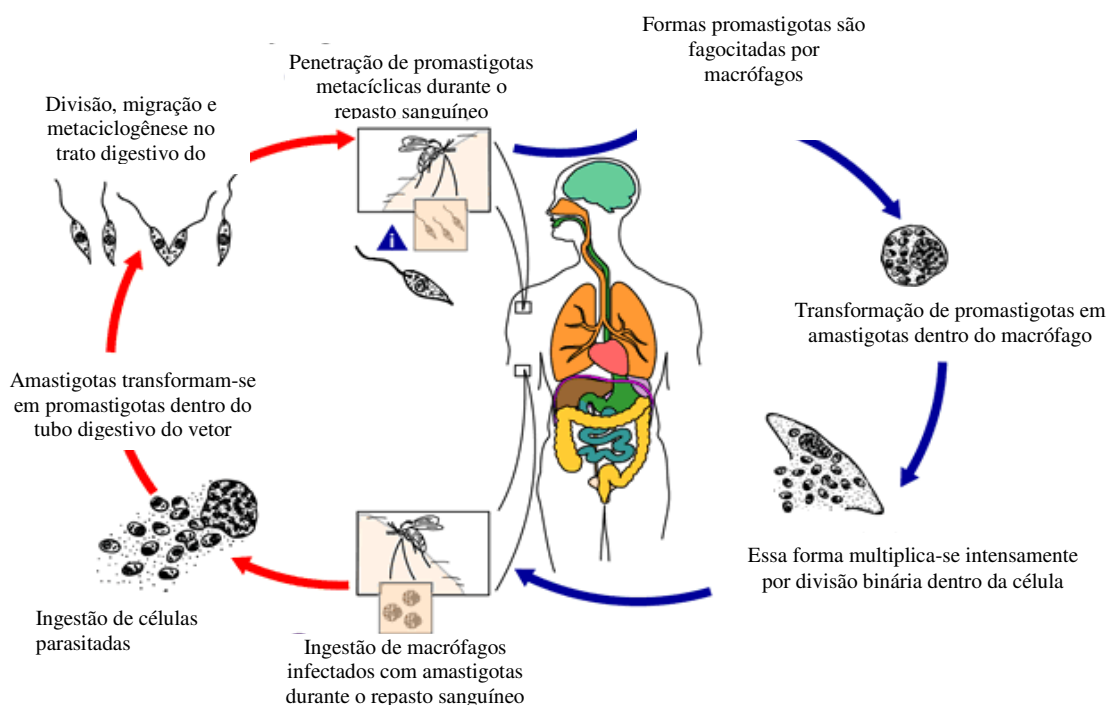


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de *Leishmania* sp. no hospedeiro mamífero e no inseto vetor. Adaptado de (www.cdc.gov).

Durante seu ciclo de vida, *Leishmania* sobrevive a vários ambientes hosts, apresentando mecanismos de escape que lhe permitem evitar sua destruição. Em seu hospedeiro invertebrado, precisa escapar das enzimas do trato digestivo, enquanto no hospedeiro vertebrado enfrenta o sistema complemento, anticorpos, enzimas hidrolíticas, pH ácido, explosão respiratória microbicida e produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos ativados (REY, 2002).

A ligação inicial e a internalização de promastigotas pelos macrófagos é um processo mediado por receptores, podendo envolver fatores derivados do soro e moléculas tanto do parasito quanto do hospedeiro (ILGOUTZ & McCONVILLE, 2001; YAO, 2010) (Figura 3).

As principais estruturas da membrana do macrófago, que podem fazer parte destas interações são: (1) receptores para o C3b e C3bi, que se ligam preferencialmente aos receptores do complemento 1 (CR1) e 3 (CR3 ou Mac-1), respectivamente; (2) receptores para porção Fc de algumas imunoglobulinas; (3) receptores do tipo lectina, que medeiam ligações com moléculas de carboidratos e (4) moléculas pertencentes à família das integrinas, que reconhecem estruturas determinadas por sequências específicas de aminoácidos (em particular a sequência Arg-Gly-Asp ou RGD, encontrada em fibronectina, vitronectina e outras moléculas adesivas) (YAO, 2010).

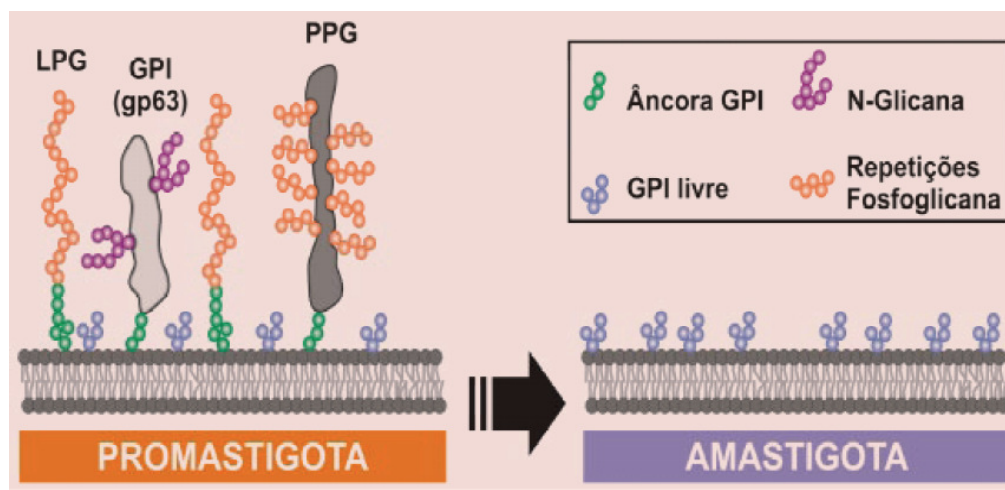


Figura 3 - Representação esquemática do glicocálice de *Leishmania*. Nas formas promastigotas, várias classes de macromoléculas estão presentes (LPG, proteínas ancoradas por GPI [gp63] e PPG). Nas formas amastigotas ocorre modulação negativa destas moléculas, mantendo, contudo, o nível de expressão de GPI. Adaptado (DUTRA *et al.*, 2010).

As principais moléculas de superfície de *Leishmania*, as quais também podem participar no processo de interação são: (1) gp63 (ou peptidase de superfície de promastigotas – PSP ou major surface peptidase – MSP), que é a proteína majoritária da superfície do parasito; (2) lipofosfoglicana (LPG), que é o principal glicoconjugado da superfície dos promastigotas e (3) glicosil-inositol fosfolipídios (GIPLs), presente em grande número de cópias tanto nas formas promastigotas quanto nas amastigotas (ILGOUTZ & McCONVILLE, 2001; OLIVIER *et al.*, 2005).

Outros fatores externos também estão envolvidos na interação *Leishmania*-macrófago. Uma proteína presente na saliva de flebotomíneos, a maxidilan, parece ser capaz de modular o sistema imunológico do hospedeiro, aumentando a secreção de IL-10 e IL-6 e paralelamente inibindo a produção de TNF- α por macrófagos, diminuindo sua capacidade de produzir NO e matar o parasito, proporcionando assim, o desenvolvimento de uma resposta Th2 e da lesão (ALEXANDER *et al.*, 1999; ALEXANDER & BRYSON, 2005; BRODIE *et al.*, 2007).

No interior dos macrófagos, a persistência dos parasitos se deve aos mecanismos de escape, que compreendem: (1) aspectos relacionados ao parasito, como a síntese de enzimas antioxidantes e moléculas quelantes de radicais de oxigênio e nitrogênio, a degradação rápida de proteínas que foram danificadas pela célula hospedeira e adaptações metabólicas que permitem ao micro-organismo sobreviver à restrição de nutrientes ou a moléculas tóxicas do hospedeiro; e (2) aspectos ligados à supressão de enzimas ligadas à produção de radicais de oxigênio e nitrogênio, o bloqueio do recrutamento destas enzimas para o fagossoma, a

inibição da fusão deste último com os lisossomos e o escape do parasito para o citosol; o desvio da resposta imune provocado pelo patógeno, com inibição da apresentação de antígeno, diminuição na produção de moléculas co-estimulatórias de superfície da célula hospedeira, a indução da produção de IL-10 e indução da população de células T regulatórias (BOGDAN, 2008; NADERER & McCONVILLE, 2008).

O controle da infecção leishmaniótica depende do balanço entre os fatores de virulência do parasito e a capacidade do hospedeiro produzir uma resposta imune protetora. A resposta imune celular é mediada por células como os linfócitos T e os macrófagos, enquanto a resposta imune humoral é mediada por anticorpos. Dependendo dos sinais e das citocinas liberadas no momento da ativação da célula $CD4^+$ (auxiliar/ *helper* – Th0), está poderá se diferenciar em Th1 (T *helper* tipo 1), o qual está associado à resposta celular, e em Th2 (T *helper* tipo 2), relacionado à resposta humoral (DUTRA *et al.*, 2010).

A entrada de *Leishmania* no macrófago pode ocorrer via CR3 (receptor de C3bi), levando à ativação de uma proteína tirosina fosfatase, que promove a desfosforilação de STAT1, interferindo na via de sinalização que resulta na transcrição do gene IL-12p40 e, consequentemente, inibindo a produção de IL-12 pelo macrófago (SACKS & SHER, 2002) (Figura 4). Esta citocina induz diferenciação das células T virgens em células Th1 com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ , que atua sobre os macrófagos, estimulando a expressão da enzima NO sintase induzida (iNOS ou NOS2), desencadeando a produção de óxido nítrico (NO), que representa o principal mecanismo microbicida capaz de destruir a *Leishmania* e outros parasitos intracelulares de macrófagos e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KANE & MOSSER, 2000; BRONTE & ZANOVELLO, 2005; GIUDICE *et al.*, 2007; NADERER & McCONVILLE, 2008; DUTRA *et al.*, 2010).

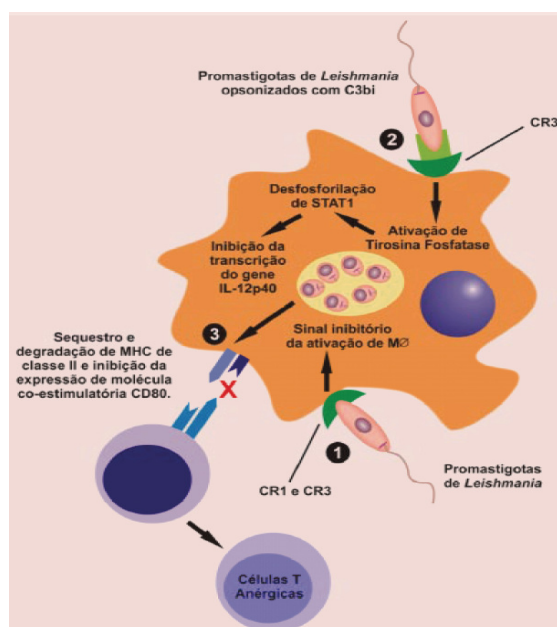


Figura 4 - Mecanismos de evasão e modulação do sistema imune por *Leishmania*. (1) Ligação do parasito aos receptores CR1 ou CR3 dispara a sinalização inibitória da ativação do macrófago; (2) a ligação de parasitos opsonizados com C3bi ao receptor CR3 leva à ativação de uma proteína tirosina fosfatase (SHP1), a qual promove a desfosforilação de STAT1, inibindo a transcrição do gene IL-12p40 e a produção de IL-12 pelo macrófago e (3) os amastigotas dentro dos macrófagos promovem o sequestro das moléculas de MHC de classe II e sua degradação pela cisteína peptidase, inibindo a apresentação de Ag, além de inibir a expressão da molécula co-estimulatória CD80, resultando em células T anérgicas. Adaptado (DUTRA *et al.*, 2010).

A toxicidade de NO é dependente da sensibilidade do parasito, que difere entre as estirpes e de acordo com o microambiente fisiológico. O NO tem sido demonstrado ser a principal molécula efetora envolvida na morte de amastigotas de *T. cruzi* mediada por macrófagos (SILVA *et al.*, 2003).

Durante a infecção experimental por *L. major*, a resposta que conduz à eliminação do parasito conta com a ativação dos macrófagos pelo IFN- γ e a produção por estes últimos de TNF- α , com a explosão oxidativa e com a expressão e atividade da iNOS na produção de NO, gerado a partir da reação do aminoácido L-arginina com o oxigênio molecular (O₂) (MOSSALAYI *et al.*, 1999).

A destruição das formas amastigotas de *Leishmania* pelo NO pode ocorrer pela indução da apoptose ou pela interferência no metabolismo do parasito, particularmente nos processos de glicólise e respiração celular, sobre enzimas como cis-aconitase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase (HOLZMULLER *et al.*, 2006; SOUSA-FRANCO *et al.*, 2006).

A produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) é iniciada pela enzima NADPH oxidase, que tem a sua atividade estimulada por produtos microbianos (como o LPS), INF- γ , IL-8 e pela ingestão da partícula pelo receptor para a porção Fc das imunoglobulinas, durante o processo de fagocitose. Esta enzima catalisa a produção do ânion superóxido, utilizando NADPH como substrato. O ânion superóxido rapidamente é convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion superóxido (O₂⁻) e radical hidroxila (OH⁻). Estas espécies reativas atuam sobre o suprimento celular de ferro, sobre os fosfolipídios de membrana, merecendo atenção aos danos à membrana mitocondrial interna e sobre o DNA, podendo levar a célula alvo à apoptose. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) induz um mecanismo de morte semelhante à apoptose em formas promastigotas (GANTT *et al.*, 2001).

Sendo assim, o controle ou não da infecção leishmaniótica depende do balanço entre os fatores de virulência do parasito e a capacidade do hospedeiro em produzir uma resposta imune protetora e equilibrada.

Tratamento das leishmanioses

No Brasil, o aumento da incidência da leishmaniose associado às altas taxas de morbidade e a difusão da doença para novas áreas geográficas, inclusive urbanas, tem constituído um grande problema para a saúde pública (BERMAN, 2006).

O problema da leishmaniose é agravado porque até o momento não existe vacina e os quimioterápicos utilizados são caracterizados pela alta toxicidade, baixa eficiência e em alguns casos, resistência generalizada (CROFT *et al.*, 2006; REITHINGER *et al.*, 2007; SUNDAR & OLLIARO, 2007; CRUZ *et al.*, 2008).

Os antimoniais pentavalentes (Sb5+) foram usados pela primeira vez pelo médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, na sua forma trivalente (Sb3+), o chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio), obtendo bastante sucesso, pois naquela época 90% dos casos evoluíam para o óbito por não haver tratamento adequado (DAVISON, 1998). Devido a toxicidade e aos graves efeitos colaterais, os antimoniais trivalentes foram sendo substituídos por compostos contendo antimônio pentavalente. Bramachari, em 1920, desenvolveu o primeiro composto a base de antimônio pentavalente, uréia estibamina, derivado uréico do ácido p-aminofenil estibínico. Em 1936, Schmidt introduziu na terapia médica o gluconato de antimônio (V) sódico, conhecido comercialmente como Solustibosan® (Bayer) ou o Pentostan® (Glaxo Wellcome) (RATH *et al.*, 2003).

No Brasil, atualmente, o fármaco utilizado é o antimoniato pentavalente N-metil glucamina (Glucantime®) que foi desenvolvido em 1945 e tem sido utilizado na França e no Brasil, e que permanece como tratamento inicial de escolha (MINODIER & PAROLA, 2007; GONZALÉZ *et al.*, 2010).

Antimoniais pentavalentes são considerados pró-fármacos, pois devem ser reduzidos a antimoniais trivalentes para exercerem atividade leishmanicida. Para atuar, os antimoniais precisam entrar na célula hospedeira e atravessar a membrana do fagolisossomo antes de atingir o parasito. Para se tornar ativo, o antimônio pentavalente (SbV) é reduzido para trivalente (SbIII), e essa redução aparentemente pode ser feita pela célula hospedeira ou pelo próprio parasito. O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não é claro, e parece atuar em vários pontos do metabolismo parasitário. Existem evidências de que inibem o potencial redox dos tióis (tripanotiona redutase) e induzem a fragmentação do DNA do parasito (MALTEZOU, 2009). Tripanotiona é o principal tiol em *Leishmania* e os antimoniais trivalentes inibem a tripanotiona redutase induzindo uma perda intracelular de tióis e um desequilíbrio letal de tióis, levando ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (MALTEZOU, 2009). Estas drogas são nefro, hepato e cardiotoxícas (SINHA *et al.*, 2008; GOTO & LINDOSO, 2010).

A anfotericina B, a pentamidina, a miltefosina e a paramomicina (Figura 5) têm sido as drogas alternativas nos casos de resistência aos antimoniais, mas não possuem um índice terapêutico tão favorável e também apresentam importantes reações adversas (MURRAY,

2005). A anfotericina B é um antibiótico poliênico com atividade antifúngica e leishmanicida. O mecanismo de ação deste composto envolve sua ligação ao ergosterol, principal esteroide presente na superfície da *Leishmania*, com consequente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasito (SCHWARTZ *et al.*, 2006; MINODIER & PAROLA, 2007). Recentemente, várias formulações de anfotericina B vêm sendo utilizadas em lipídeos, diminuindo consideravelmente seus efeitos tóxicos; contudo, essa terapia tem altíssimo custo, limitando seu uso em países em desenvolvimento. Em geral, estas formulações são bem absorvidas pelo sistema fagocítico mononuclear, no qual, *Leishmania* spp residem, sendo pouco absorvido pelo rim, o órgão alvo de toxicidade do fármaco (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004; KEDZIERSKI, 2009).

A pentamidina é uma diamidina aromática, que apresenta importante atividade antitripanossomatídica, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral (SILVA-LÓPEZ, 2010; BERMAN, 2006). AMATO e colaboradores (1998) demonstraram que a pentamidina interfere na síntese de DNA do protozoário, provavelmente modificando a morfologia do cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial, levando então, o parasito a morte (KEDZIERSKI, 2009). Este fármaco se apresenta menos eficaz, no tratamento da leishmaniose tegumentar americana por *L. braziliensis* (AMATO *et al.*, 2008; MINODIER & PAROLA, 2007).

A miltefosina é um fármaco antitumoral com estrutura de alquilfosfocolina, que estimula a cascata das caspases, induzindo a apoptose e a morte do parasito (SILVA-LÓPEZ, 2010; PARIS *et al.*, 2004). Esta droga tem sido eficaz contra leishmaniose visceral causada por *L. donovani* na Índia. Na leishmaniose tegumentar americana a eficácia do tratamento é variada e depende da espécie de *Leishmania* e da região estudada.

A paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus*, inibe a síntese proteica, pela ligação às proteínas ribossômicas. Ela difere da neomicina B pela substituição da hidroxila por amina e possui um espectro de atividade parasitária, que não é apresentada por outro aminoglicosídeo. A administração oral de paromomicina é recomendada para a leishmaniose visceral. Entretanto, pode apresentar nefro e mototoxicidade, afetando também o controle motor e do equilíbrio (SILVA-LÓPEZ, 2010; MISHRA *et al.*, 2007).

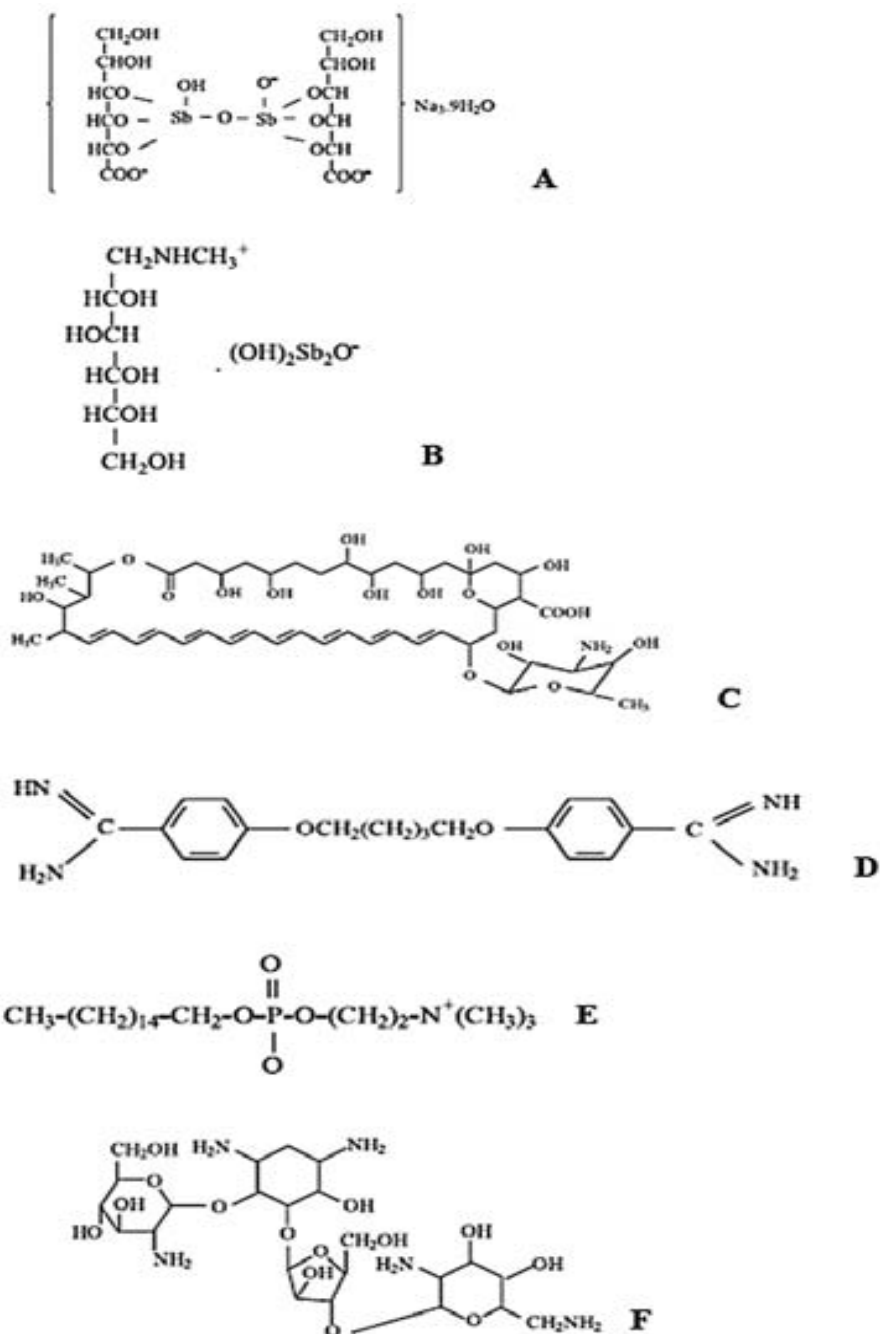


Figura 5 - Estrutura dos principais quimioterápicos usados no tratamento das leishmanioses. A - Estibogluconato de sódio (Pentostam®), B - Antimoniato de meglumina (Glucantime®), C - Anforicina B (Fungizone®), D - Isetionato de pentamidina (Lomidina®), E - Miltefosina e F - Paramomicina. Adaptado (RATH *et al.*, 2003).

A alta toxicidade dos quimioterápicos utilizados contra a leishmaniose e a resistência aos antimoniais levam a uma necessidade urgente de se desenvolver novos fármacos como alternativa terapêutica para as leishmanioses (ASHUTOSH, 2007; MOEIN *et al.*, 2008).

Metalopeptidases

As peptidases têm recebido considerável atenção dos parasitologistas por sua importância na interação parasito-hospedeiro. Um parasito bem sucedido deve conseguir penetrar e sobreviver no interior do hospedeiro, assimilando os componentes necessários à sua nutrição e conseguindo escapar da resposta imunológica. As peptidases participam de muitos desses mecanismos que garantem a persistência do parasito no hospedeiro (KLEMBA & GOLDBERG, 2002; McKERROW *et al.*, 2006; YAO, 2010).

Fortes evidências sugerem que em tripanossomatídeos, as peptidases desempenham um papel fundamental em muitas fases da interação parasito-hospedeiro, uma vez que estão envolvidas com o reconhecimento celular, adesão, invasão tecidual e celular e sobrevivência dentro do hospedeiro (KLEMBA & GOLDBERG, 2002; YAO *et al.*, 2003; McKERROW *et al.*, 2006; KULKARNI *et al.*, 2006, 2008; SANTOS *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2009; YAO, 2010). Além da sua importância para a patogenicidade, as peptidases também são cruciais para a diferenciação celular, proliferação e nutrição dos tripanossomatídeos (KLEMBA & GOLDBERG, 2002; YAO *et al.*, 2003; KULKARNI *et al.*, 2006, 2008; YAO, 2010), escape do sistema imune e variabilidade antigênica (SAJID & McKERROW, 2002; YAO *et al.*, 2003; KULKARNI *et al.*, 2006, 2008; McKERROW *et al.*, 2006; YAO, 2010).

Os estudos sobre as peptidases de tripanossomatídeos são relevantes por servirem de modelo para compreensão da função e evolução das peptidases em geral, além de servirem como alvo para intervenção quimioterápica. A comparação de sequências de aminoácidos, estruturas tridimensionais e mecanismo bioquímico de ação ajudam a decifrar o curso de evolução das peptidases (MEDINA-ACOSTA *et al.*, 1993; RAWLINGS *et al.*, 2002, 2004).

A classe das metalopeptidases são enzimas amplamente encontradas nos tripanossomatídeos (BRANQUINHA *et al.*, 1996; MOTTRAM *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2006, 2007, 2008; CUERVO *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2010; YAO, 2010). A principal metalopeptidase de superfície de *Leishmania* é denominada de gp63 (Figura 6), a qual é distribuída por toda a superfície das formas promastigotas, incluindo o flagelo e a bolsa flagelar (YAO *et al.*, 2003; LIEKE *et al.*, 2008). Estima-se que cada promastigota das espécies *L. major* e *L. mexicana*, durante sua fase estacionária, apresente cerca de 500.000 cópias de gp63, constituindo 1% das proteínas totais do micro-organismo (BAHR *et al.*, 1993; LIEKE *et al.*, 2008). Entretanto, a forma amastigota apresenta uma dramática redução na síntese de gp63, o qual constitui 0,1% das proteínas totais deste estágio morfológico do parasito (BAHR *et al.*, 1993).

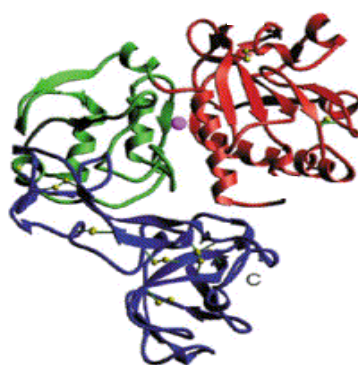


Figura 6 - Estrutura da gp63 de *L. major*. Representação da estrutura com domínio N-terminal mostrado em vermelho, o domínio central em verde e o domínio C-terminal em azul. Pontes dissulfeto estão mostradas em amarelo e o sítio ativo com o átomo de zinco é representado pela esfera rosa. Adaptado (SCHLAGENHAUF *et al.*, 1998).

Experimentos usando biotinylation de superfície, citometria de fluxo e imunocitoquímica revelaram que três-quartos das moléculas de gp63 em *L. mexicana* estão presentes na superfície celular, enquanto que o restante apresenta localização intracelular (WEISE *et al.*, 2000). A localização interna da gp63 tem sido demonstrada em promastigotas de *L. mexicana*, *L. chagasi* (WEISE, *et al.*, 2000; YAO, *et al.*, 2004, 2005) e *L. braziliensis* (CUERVO, *et al.*, 2008; LIMA, *et al.*, 2009). Além disso, a gp63 também pode ser liberada por promastigotas para o meio extracelular, tanto associada à membrana (*shedding*) quanto na forma livre. A indução de *capping* por anticorpos em parasitos vivos demonstraram que as peptidases de superfície são livres para se movimentarem no plano de membrana, concentrando-se primeiro nas extremidades das células, e em seguida sendo liberadas para o meio (FONG & CHANG 1982; CHANG *et al.*, 1986). McGWIRE e colaboradores (2002) demonstraram que a liberação da molécula gp63 para o meio extracelular por *L. amazonensis* foi drasticamente inibida na presença do quelante de metal 1,10-fenantrolina (um conhecido inibidor de metalopeptidases), sugerindo que este processo é dependente de autoproteólise. A este respeito, a molécula gp63 ancorada à GPI pode ser liberada a partir de dois mecanismos que seguem a rota secretória clássica, com encaminhamento desta molécula do retículo endoplasmático para o Golgi e, em seguida para a bolsa flagelar. (1) Vesículas contendo tanto a gp63 ligada à membrana quanto a gp63 livre fundem-se com a membrana da bolsa flagelar e, posteriormente, a gp63 livre é liberada extracelularmente, ou a (2) gp63 ligada à membrana é colocada ao longo da membrana externa, e uma parte desta é liberada diretamente via proteólise (ELLIS *et al.*, 2002; McGWIRE *et al.*, 2002; YAO *et al.*, 2003).

Em geral, as peptidases extracelulares catalisam a hidrólise de grandes proteínas em moléculas menores para subsequente absorção pela célula, enquanto as peptidases intracelulares desempenham um papel fundamental na regulação do metabolismo (RAO *et al.*, 1998).

Em *L. chagasi* foi demonstrado que em ambos os estágios, promastigota e amastigota, há a expressão de múltiplas isoformas de gp63, porém estas podem diferir quanto à função bioquímica e à localização celular. Análises bioquímicas demonstraram que a gp63 nas formas amastigotas encontraram-se solúveis no citossol, em vesículas ou organelas, enquanto em promastigotas estão associadas à membrana via âncora de GPI. Recentemente, foi observado que nas formas promastigotas de *L. chagasi* (HSIAO *et al.*, 2008) e *L. braziliensis* (LIMA *et al.*, 2009) a gp63 é liberada extracelularmente.

A molécula gp63 presente nas formas promastigotas de *Leishmania* parece estar envolvida no processo de interação entre o parasito e o macrófago, apresentando um papel protetor contra a degradação intracelular no fagolisossoma de macrófagos (MAUEL, 1996; YAO *et al.*, 2003; YAO, 2010). A gp63 também é capaz de converter C3b em C3bi, auxiliando a entrada e a sobrevivência do parasito no macrófago (JAFJE & DWYER, 2003; YAO, 2010;), além de inibir a função das células *Natural Killer* (NK) e outros componentes da imunidade inata, aumentando as chances do parasito sobreviver e estabelecer uma infecção de sucesso (LIEKE *et al.*, 2008; YAO, 2010).

Essas peptidases são também capazes de ligar-se a receptores celulares de macrófagos (MAC-1 (CD11b-Cd18) e CR3) e receptores de fibronectina (MAUEL, 1996; RITTING & BODGAN, 2000; YAO *et al.*, 2003; KULKARNI *et al.*, 2006, 2008), degradar proteínas relacionadas ao MARCKS (substrato de quinase C rico em alanina miristolada) (YAO *et al.*, 2003; CLAYTON & SHAPIRA, 2007) e peptídeos intracelulares apresentados pela MHC de classe I (GARCIA *et al.*, 1997; YAO *et al.*, 2003), além de degradar albumina, imunoglobulinas, hemoglobina, fibrinogênio, laminina, fibronectina e colágeno IV. Estes últimos são componentes da matriz extracelular, sugerindo que esta atividade proteolítica possa estar diretamente envolvida com a invasão e disseminação do parasito no hospedeiro vertebrado (McMASTER *et al.*, 1994; McGWIRE *et al.*, 2003; YAO *et al.*, 2003; KULKARNI *et al.*, 2006, 2008; YAO, 2010). A gp63 também é capaz de auxiliar no escape do sistema imune, clivando MHC de classe I (GARCIA *et al.*, 1997) e diminuindo a resposta das células T através da clivagem de receptores de superfície, como CD4 (HEY *et al.*, 1994).

Recentemente, foi relatado que a gp63 de *Leishmania* foi capaz de chegar rapidamente ao meio intracelular do macrófago e ativar a proteína tirosina fosfatase (PTPs). Essa ativação

regula a ação microbicida dos fagócitos durante a resposta imune inata - através da diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO). No mesmo estudo, revelou-se também que os parasitos *Leishmania* mutantes, ou seja, que não expressavam as moléculas gp63 foram incapazes de ativar a PTP, o que resultaria no acionamento da sinalização dos macrófagos. Sendo assim, a falta das moléculas gp63 pelos parasitos induz uma resposta inata inflamatória pelos macrófagos e, conseqüentemente, a drástica redução da sua capacidade de estabelecer e manter a infecção. O mecanismo exato pelo qual os parasitos induzem a ativação da PTP ainda não está completamente elucidado (GOMEZ *et al.*, 2009).

Agentes Quelantes – potencial alvo terapêutico

Devido à importância das peptidases em diferentes processos patológicos, inibidores proteolíticos vêm sendo utilizados como agentes terapêuticos e pesquisados e/ou aplicados no tratamento de cânceres (SHAW, 1990; CRAIK *et al.*, 1995; ; DE VIZCAYA-RUIZ *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2002), desordens inflamatórias e respiratórias (TANAKA *et al.*, 1995; FATH *et al.*, 1998), disfunções cardiovasculares (como a hipertensão arterial) (KLEINERT *et al.*, 1992; HOOVER *et al.*, 1995; SIMONEAU *et al.*, 1999), neurodegenerações (por exemplo, mal de Alzheimer) (VASSAR *et al.*, 1999; HONG *et al.*, 2002; TRINCHESE *et al.*, 2008; TOMITA *et al.*, 2009), infecções virais como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (DARKE & HUFF, 1994; HO *et al.*, 1995; DASH *et al.*, 2003) e tripanossomíases (CAZZULO *et al.*, 2002; VERMELHO *et al.*, 2007; TRUDEL *et al.*, 2008).

Outros compostos que demonstraram ter um potencial terapêutico contra infecções microbianas são os agentes quelantes (NEUPANE & KIM, 2009; SPELLBERG & IBRAHIM, 2010; MALAFAIA *et al.*, 2011; SANTOS, 2011; McCANN *et al.*, 2012a, 2012b). Muitos desses agentes quelantes são potentes inibidores de metalopeptidases, porém podem afetar também outros processos vitais, uma vez que têm a capacidade de sequestrar íons essenciais para a atividade de várias enzimas existentes em uma célula, não apenas as metalopeptidases. Por exemplo, EGTA e 1,10-fenantrolina demonstraram efeito bactericida contra *Streptococcus* do grupo B e também se mostraram eficazes em inibir a interação desta bactéria com células hospedeiras (SOARES *et al.*, 2008).

A 1,10-fenantrolina inibiu de maneira eficaz a proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* em baixas concentrações (2,5 µg/ml) e induziu drásticas alterações morfológicas (inchaços e depósitos elétron-densos no cinetoplasto, mitocôndria e cisternas do retículo

endoplasmático) de forma dose-dependente (LANE *et al.*, 1998). Outro trabalho demonstrou que a 1,10-fenantrolina foi capaz de inibir o crescimento celular de três cepas diferentes de *T. cruzi* (Dm28c, Y e 4163) após 96 h de incubação *in vitro* (SANTOS *et al.*, 2012).

BONALDO e colaboradores (1991) investigaram o papel da 1,10-fenantrolina, entre outros inibidores proteolíticos, na metaciclogênese de *T. cruzi*. Para isso, os parasitos (epimastigotas de Dm28c) foram incubados em condições quimicamente definidas que induzem a transformação de epimastigotas à tripomastigotas. Na presença do agente quelante de metal, as células exibiram uma mobilidade normal; entretanto, a diferenciação do parasito foi bloqueada de forma dose-dependente, atingindo 85% de inibição na presença de 10 μ M da 1,10-fenantrolina.

Em um estudo anterior, nosso grupo confirmou que a gp63 é a principal enzima de *L. braziliensis*, sendo sua expressão aumentada nas formas promastigotas de uma cepa virulenta em comparação com promastigotas de uma cepa avirulenta, tanto no perfil proteolítico celular quanto no perfil extracelular. A atividade de metalopeptidase associada a gp63 foi drasticamente reduzida após várias passagens *in vitro* do parasito recém-isolado da lesão de hamster. A 1,10-fenantrolina e EGTA diminuíram o crescimento da cepa virulenta deste parasito de forma dose-dependente, mesmo na concentração mais baixa utilizada (0,1 μ M). Alterações morfológicas das promastigotas virulentas tratadas com estes compostos foram observadas, tais como, arredondamento e perda do flagelo. Além disso, o pré-tratamento de promastigotas virulentas com 1,10-fenantrolina e EGTA promoveu uma redução significativa no índice de associação com macrófagos peritoneais de camundongos. Por outro lado, estes agentes quelantes não afetaram a proliferação, morfologia ou interação celular da cepa avirulenta. Corroborando com estes resultados, o pré-tratamento da cepa virulenta com anticorpo anti-gp63 promoveu uma redução significativa no processo de interação com os macrófagos. Além disso, o meio de cultura do sobrenadante rico em metalopeptidases da cepa virulenta aumentou significativamente o índice de associação entre a cepa avirulenta e macrófagos, e este efeito foi revertido na presença da 1,10-fenantrolina. Estes resultados sugerem que as metalopeptidases participam de vários processos cruciais em *L. braziliensis* (LIMA *et al.*, 2009).

O mecanismo de inibição da 1,10-fenantrolina também já foi analisado em homólogos da gp63 detectados em diferentes tripanossomatídeos. Por exemplo, um dos genes da família dos homólogos da gp63 em *T. brucei* está envolvido no processo de proteólise de uma glicoproteína de superfície variante (chamada de VSG) e este mecanismo foi inibido pelos compostos quelantes de zinco, incluindo 1,10-fenantrolina (BANGS *et al.*, 2001; LACOUNT

et al., 2003). Homólogos da metalopeptidase gp63 participam do processo de interação de *H. samuelpessoai* com macrófagos murinos, com base na redução do índice de associação quando na presença da 1,10-fenantrolina (PEREIRA *et al.*, 2010a). Além disso, PEREIRA e colaboradores (2010b) demonstraram um aumento na secreção de moléculas gp63-like (cerca de 2 vezes) por *H. samuelpessoai* quando em contato com o intestino explantado do inseto vetor *Aedes aegypti* em comparação com parasitos em culturas axênicas, sugerindo a possível participação de moléculas gp63 secretadas no processo de interação com o hospedeiro invertebrado. Em contraste, células de *H. Samuelpessoai* pré-tratadas com 1,10-fenantrolina e depois colocadas para interagir com o intestino do inseto, apresentaram uma redução de cerca de 60% no índice de associação (PEREIRA *et al.*, 2010b). Além disso, a diferenciação de *H. samuelpessoai* (formas promastigotas para formas paramastigotas/opistomastigotas) foi diminuída da presença da 1,10-fenantrolina (SANTOS *et al.*, 2001). *Phytomonas serpens*, um tripanossomatídeo capaz de infectar tomates, também apresentou homólogos da gp63 (d'AVILA-LEVY *et al.*, 2006). EDTA, EGTA e 1,10-fenantrolina foram capazes de interromper a proliferação de *P. serpens*, sendo a 1,10-fenantrolina o composto mais eficaz (d'AVILA-LEVY *et al.*, 2006).

Compostos complexados com metais de transição são utilizados na clínica no combate ao câncer já há algum tempo. Podemos citar como exemplo a cisplatina, que é uma droga muito utilizada no combate ao câncer de testículo e apresenta índices de 70 a 90% de cura (MANSANO *et al.*, 2002). Entretanto, vários estudos têm demonstrado que inibidores de peptidases complexados com metais de transição vêm surgindo como uma nova alternativa no combate às infecções fúngicas (COYLE *et al.*, 2004; 2003; ESHWIKI *et al.*, 2004; SILVA, 2009; McCANN *et al.*, 2000; 2004; 2012a; 2012b). McCANN e colaboradores (2004) sintetizaram, a partir da 1,10-fenantrolina, um quelante de zinco e conhecido inibidor de metalopeptidases, três novos compostos: 1,10-fenantrolina-5,6-dione (phendio), $[Ag(phendio)_2]ClO_4$ ou $[Ag(phendio)_2]$ e $[Cu(phendio)_3](ClO_4)_2 \cdot 4H_2O$ ou $[Cu(phendio)_2]$ (Figura 7). Estes compostos derivados da 1,10-fenantrolina foram mais eficazes em matar *Candida albicans* do que a 1,10-fenantrolina livre, inibindo o crescimento das leveduras em 95% na concentração de 5 µg/ml. Foi também descrito que o uso de phendio ou $[Ag(phendio)_2]$ provocou alterações drásticas na morfologia das leveduras, tais como, retração do citoplasma, rompimento das organelas internas, fragmentação nuclear e perturbação da função mitocondrial levando ao processo de apoptose (McCANN *et al.*, 2004). Além disso, a 1,10-fenantrolina e seus complexos foram capazes de perturbar a função mitocondrial, retardar a síntese de citocromo *b* e *c*, bem como promover o desacoplamento da cadeia

respiratória. Os complexos $[\text{Cu}(\text{phendio})_2]$ e $[\text{Ag}(\text{phendio})_2]$ induziram a redução da concentração de ergosterol na membrana plasmática fúngica, aumentando a sua permeabilidade. O modo de ação destas substâncias parece residir na capacidade de induzir o estresse oxidativo no interior das células (McCANN *et al.*, 2004).

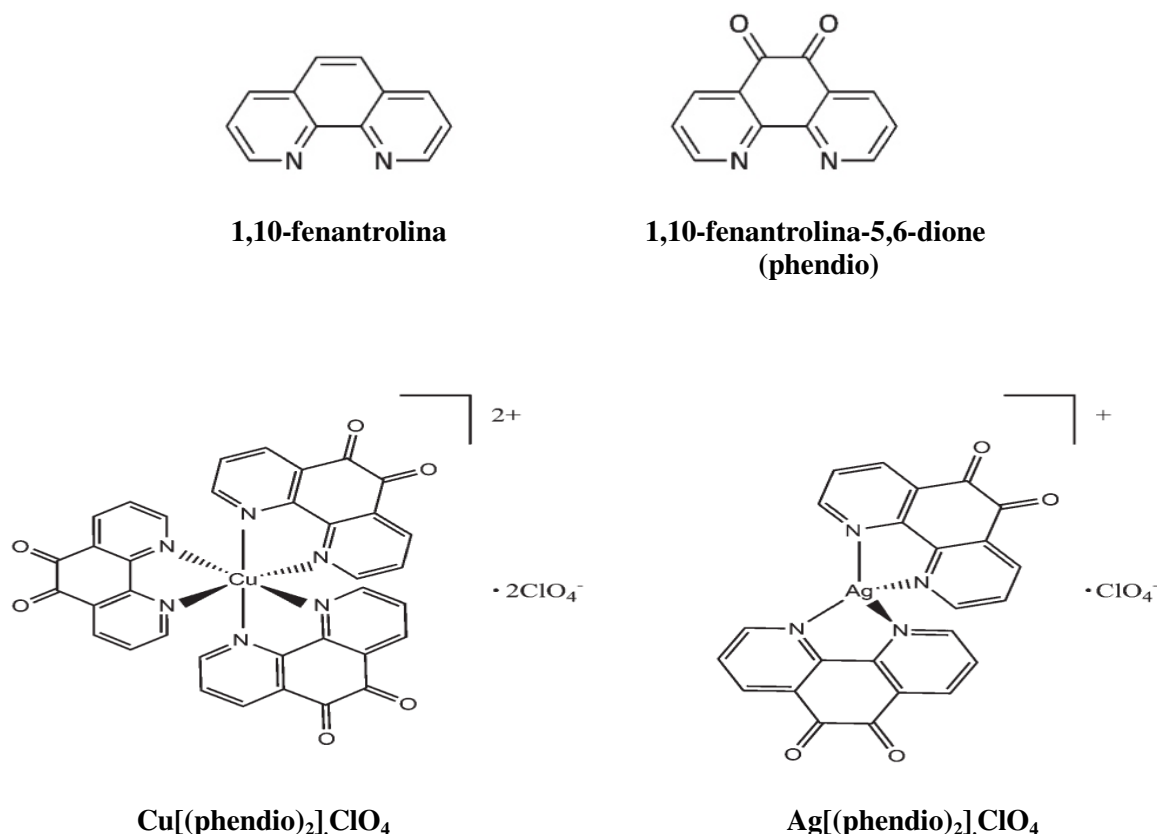


Figura 7 - Estrutura de 1,10-fenantrolina e seus derivados. Adaptado de (McCANN *et al.*, 2012b).

Em outro estudo anterior, 1,10-fenantrolina na concentração de 20 $\mu\text{g/ml}$ mostrou potente atividade antifúngica contra *C. albicans* (0% de crescimento celular durante 24 h), enquanto os isômeros não-quelantes 4,7-fenantrolina e 1,7-fenantrolina foram inativos (83% e 99% de crescimento celular, respectivamente) (McCANN *et al.*, 2000).

Estudos sequenciais mostraram que $[\text{Cu}(\text{phendio})_2]$ e $[\text{Ag}(\text{phendio})_2]$ alteraram a susceptibilidade das leveduras *C. albicans* ao miconazol e à anfotericina B (ESHWIKA *et al.*, 2004). Leveduras crescidas em concentrações subinibitórias do $[\text{Cu}(\text{phendio})_2]$ apresentaram uma diminuição na susceptibilidade ao miconazol e à anfotericina B, enquanto que as leveduras crescidas em concentrações subinibitórias de $[\text{Ag}(\text{phendio})_2]$ se mostraram mais susceptíveis à ação dos antifúngicos. O tratamento das leveduras com o derivado $[\text{Cu}(\text{phendio})_2]$ reduziu o consumo de oxigênio pelas leveduras, mas exacerbou esse processo

nas células tratadas com o derivado [Ag(phendio)₂]. Finalmente, o derivado [Cu(phendio)₂] causou redução na síntese de ergosterol pelas leveduras, enquanto o tratamento com o derivado [Ag(phendio)₂] causou efeito oposto (ESHWIKA *et al.*, 2004).

SILVA e colaboradores (2011) demonstraram que o pré-tratamento de conídios ou hifas de *Pseudallescheria boydii* com os compostos 1,10-fenantrolina e seus derivados (phendio, [Cu(phendio)₂] e [Ag(phendio)₂]) levaram a uma significativa inibição da viabilidade fúngica, bem como bloqueou a diferenciação celular. Além disso, o pré-tratamento dos conídios com esses compostos diminuíram a formação de biofilme e foram capazes de inibir etapas importantes da interação deste fungo com sua célula hospedeira.

Outros grupos também têm demonstrado que os agentes quelantes são capazes de inibir a invasão e a angiogênese de células tumorais (SHIAH *et al.*, 2003) e diminuir a viabilidade celular de tumores malignos através da inibição da síntese de DNA (DEEGAN *et al.*, 2006; 2007). O complexo de [Cu(phendio)₂] associado à 1,10-fenantrolina foi capaz de induzir a apoptose em células de carcinoma humano de fígado (Bel-7402) bloqueando a fase G₁ do ciclo celular (ZHOU *et al.*, 2002), e exibiu potentes efeitos citotóxicos na linhagem celular humana leucêmica HL-60 e na linhagem de câncer estomacal humano SGC-7901 com taxas de inibição de até 90% (ZHANG *et al.*, 2004).

Recentemente, McCann e colaboradores (2012b) mostraram que os compostos 1,10-fenantrolina, phendio, [Cu(phendio)₂] e [Ag(phendio)₂] foram altamente ativos, *in vitro*, contra várias linhagens celulares primárias, células cancerígenas de mamíferos, fúngicas e linhagens celulares de insetos, sendo que os complexos de metais apresentaram uma atividade aumentada. Além disso, a 1,10-fenantrolina (ao nível micromolar) e os outros compostos phendio, [Cu(phendio)₂] e [Ag(phendio)₂] (ao nível nanomolar) foram capazes de reduzir fortemente a viabilidade de conídios de *P. boydii* (IC₅₀ 0.032 (0.15) em relação as diferentes linhagens de células, tais como, macrófagos peritoneais e linhagens de células do inseto *Aedes albopictus* (C6/36) (IC₅₀ > 10 (55)), que foram mais tolerantes aos compostos. Larvas do inseto *Galleria mellonella* (usada como modelo para testar a tolerância dos compostos) mostraram que os compostos foram bem tolerados, mesmo na concentração mais alta de 100 µg/ml por larva, sendo que 10% das larvas tratadas com os compostos phendio, [Cu(phendio)₂] e [Ag(phendio)₂] sobreviveram, enquanto todas as larvas tratadas com 1,10-fenantrolina e cisplatina (composto utilizado na clínica) morreram. Em camundongos suíços, os quatro compostos foram bem tolerados na concentração de 45 mg/kg em comparação com a cisplatina, na qual não foi observado nenhum óbito. Além disso, as amostras de sangue retiradas dos camundongos suíços mostraram que os níveis das enzimas hepáticas (TGO e

TGP) permaneceram inalterados após o tratamento de 7 dias com os compostos. Camundongos imunocomprometidos mostraram uma menor tolerância ao $[\text{Ag}(\text{phendio})_2]$ e, posteriormente, quando estes animais foram implantados com tumores derivados de humano Hep-G2 (hepática) e HCT-8 (cólon), não houve nenhuma influência no crescimento do tumor. Neste trabalho foi constatada que a derivatização da 1,10-fenantrolina para phendio resultou em uma melhoria substancial citotóxica contra todas as linhagens de células testadas. Além disso, a complexação do phendio para se obter $[\text{Cu}(\text{phendio})_2]$ e $[\text{Ag}(\text{phendio})_2]$ resultou em uma melhoria adicional, em particular contra células tumorais humanas (MRC-5, Hep-2, A549, DLKP, A498 e Hep-G2) (McCANN *et al.*, 2012b).

As aplicações dos compostos complexados a metais de transição vêm crescendo, em especial o estudo dos efeitos destes complexos em diferentes sistemas biológicos com finalidade terapêutica. Os compostos metálicos oferecem excelentes oportunidades para encontrar novos fármacos contra as principais doenças causadas por protozoários, tais como a malária, a doenças de Chagas e as leishmanioses (BOUTALEB-CHARKI *et al.*, 2009; NAVARRO, 2010). Muitos destes compostos quelantes, como já explicado anteriormente, são capazes de inibir metaloproteínas, com particular atenção às metalopeptidases. Neste sentido, vários estudos têm mostrado que agentes quelantes de metal são capazes de inibir processos biológicos importantes de várias células microbianas, tais como a nutrição, crescimento, proliferação, diferenciação, bem como relevantes eventos patológicos, tais como adesão em estruturas do hospedeiro, adesão em superfícies abióticas, evasão da resposta imune e regulação dos fatores de virulência (Fig. 8) (SANTOS *et al.*, 2012).

Desta forma, o estudo de peptidases tem sido proposto como alvo potencial à pesquisa de novas terapias antiparasitárias, assim como reagentes para uso em diagnóstico laboratorial e em processos industriais (McKERROW *et al.*, 2006). Além disso, estes estudos favorecem uma melhor compreensão dos fatores de virulência de um grande número de micro-organismos. O conhecimento da interação das peptidases com seus respectivos substratos, assim como da especificidade destas enzimas, podem contribuir para o desenvolvimento de compostos que possam inibir sua ação. Através do uso de substratos sintéticos, da cristalização das enzimas, do estudo de suas propriedades físico-químicas e do emprego de radicais químicos, é possível a construção de inibidores proteolíticos por modelagem molecular (GUSTIN *et al.*, 1996; McKERROW *et al.*, 2006).

REFERÊNCIAS

- Alexander J, Satoskar AR & Russel DG. *Leishmania* species: Models of intracellular parasitism. J. Cell Sci. 1999; 112: 2993-3002.
- Alexander J & Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. Immunol. Lett. 2005; 99: 17-23.
- Amato V, Amato J, Nicodemo A, Uip D, Amato-Neto V & Duarte M. Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate. Ann. Dermatol. Venereol. 1998; 125(8): 492-495.
- Amato VS, Tuon FF, Bacha HÁ, Neto VA & Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis current scenario and prospects for treatment. Acta Tropica. 2008; 105: 1-9.
- Ameen M. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: emerging therapies and progress in disease management. Expert opin. Pharmacother. 2010; 11(4): 557-569.
- Arends MJ, Morris RG & Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. Am. J. Pathol. 1990; 136(3): 593-608.
- Ashutosh H, Sundar S & Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. J. Med. Microbiol. 2007; 56: 143-153.
- Assche TV, Deschacht M, Luz RAI, Maes L & Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. Free Radical Biol. Med. 2011; 51: 337-351.
- Bahr V, Stierhof YD, Ilg T, Demar M, Quinten M & Overath, P. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotas and amastigotas of *Leishmania Mexicana*. Mol. Biochem. Parasitol. 1993; 58: 107-121.
- Baiocco P, Franceschini S, Ilari A & Colotti G. Trypanothione reductase from *Leishmania infantum*: cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray data analysis. Protein Pept. Lett. 2009; 16(2): 196-200.
- Balamurugan K, Rajaram R, & Ramasami T. Caspase-3: its potential involvement in Cr(III) induced apoptosis of lymphocytes. Mol. Cell. Biol. 2004; 259: 43-51.
- Balestieri FMP, Queiroz ARP, Scavone C, Costa VMA, Barral-Neto M & Abrahamsohn IA. *Leishmania (L.) amazonensis* – induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. Microbes and Infection. 2002; 23-29.
- Bang JD, Ransom DA, Nimick, M, Christie G & Hooper NM. In vitro cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. Mol. Biochem. Parasitol. 2001; 114: 111-117.
- Bastos IMD, Neves D, Lima MM & Santana JM. Perspectives in drug development for chagas disease. 1 ed.: Benthan e-Books. 2009; 145-155.

- Berman, J.D. (2006). Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. *Indian J. Med. Res.*, 123(3): 289-324.
- Berridge MV & Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 303: 474-482.
- Besteiro S, Williams RAM, Coombs GH & Mottran JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* 2007; 37(10): 1063-1075.
- Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol.* 2008; 10: 1221-1234.
- Bonaldo MC, D'escoffier LN, Salles JM & Goldenberg, S. Characterization and expression of protease during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Exp. Parasitol.* 1991; 73: 44-51.
- Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem.* 1981; 256(4): 1604-1607.
- Bortner CD, Oldenburg NB & Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell. Biol.* 1995; 5(1): 21-26.
- Boutaleb-Charki S, Marín C, Maldonado CR, Rosales MJ, Urbano J, Guitierrez-Sánchez R, Quirós M, Salas JM & Sánchez-Moreno M. Copper (II) Complexes of [1,2,4]Triazolo [1,5 a]Pyrimidine Derivatives as Potential Anti-Parasitic Agents. *Drug Metabolism Letters.* 2009; 3: 35-44.
- Branquinha MH, Vermelho AB, Goldenberg S & Bonaldo MC. Ubiquity of cysteine and metalloproteinase in a wide range of trypanosomatids. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1996; 43(2): 131-135.
- Brodie TM, Smith MC, Morris RV & Titus RG. Immunomodulatory Effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect. Immun.* 2007; 75: 2359-2365.
- Bronte V & Zanouello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5(8): 641-654.
- Buroker-Kilgore M & Wang KKW. A Coomassie brilliant blue G-250-based colorimetric assay for measuring activity of calpain and other proteases. *Anal. Biochem.* 1993; 208: 387-392.
- Butler HM, Hurse A, Thursky E & Shulman A. Bactericidal action of selected phenanthroline chelates and related compounds. *Aust. J. Expt. Biol. Med. Sci.* 1969; 47: 541-552.
- Campbell SM & Rainey PM. *Leishmania pifanoi*: Kinetics of messenger RNA expression during amastigotes to promastigote transformation in vitro. *Exp. Parasitol.* 1993; 77: 1-12.

Cazzulo JJ, Stoka V & Turk V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chaga's disease. *Curr. Pharm. Des.* 2002; 7: 1143-1156.

Chang KP, Nacy CA & Pearson RD. Intracellular parasitism of macrophages in leishmaniasis: in vitro systems and their applications. *Methods in Enzymology.* 1986; 132: 603-626.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Suman R, Peeling RW, Alvar J & Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology.* 2007; 5: 873-882.

Clayton C & Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2007; 156(2): 93-101.

Coyle B, Kinsella P, McCann M, Devereux M, O'Connor R, Clynes M & Kavanagh K. Induction of apoptosis in yeast and mammalian cells by exposure to 1,10-phenanthroline metal complexes. *Toxicol. In Vitro.* 2004; 18:63-70.

Coyle B, McCann M, Kavanagh K, Devereux M & Geraghty M. Mode of antifungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. *BioMetals.* 2003; 16: 321-329.

Craik M & Debouck C. In: Perspectives in drug discovery and design. MCKERROW, J.H. and JAMES, M.N.G., eds., ESCOM, Leiden. 1995; 2: 1-125.

Crichton RR & Ward RJ. In Iron and disease (Laufer, R.B., ed.), CRC Press. 1994; 23-76.

Croft SL, Sundar S & Fairlamb AL. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews.* 2006; 19: 111-126.

Cruz EA, Da-Silva SAG, Muzitano MF, Silva PMR, Costa SS & Rossi-Bergmann B. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *International Immunopharmacology.* 2008; 8: 1616-1621.

Cuervas IC, Cazzulo JJ & Sánchez DO. Gp63 homologues in *Trypanosoma cruzi*: surface antigens with metalloprotease activity and a possible role in host cell infection. *Infect. Immun.* 2003; 71: 5739-5749.

Cuervo P, Santos ALS, Alves CR, Menezes GC, Silva BA, Britto C, Fernandes O, Cupolillo E & Jesus JB. Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Acta Tropica.* 2008; 106: 143-148.

Cuervo P, Sabóia-Vahia L, Costa Silva-Filho F, Fernandes O, Cupolillo E & Jesus JB. A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain. *Parasitol.* 2005; 132: 1-9.

Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. In *Exp. Mol. Path.* 2002; 72: 132-141.

Darke P & Huff J. HIV protease as an inhibitor target for the treatment of AIDS. *Adv.*

Pharmacol. 1994; 25: 399-454.

Dash C, Kulkarni A, Dunn B & Rao M. Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. Clin. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2003; 38: 89-119.

David CV & Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatologic Therapy. 2009; 22(6): 491-502.

Davies CR, Cooper AM, Peacock C, Lane RP & Blackwell JM. Expression of LPG and GP63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. Parasitology. 1990; 101: 337-343.

d'Avila-Levy CM, Santos ALS, CUERVO P, JESUS JB & Branquinha MH. Applications of Zymography 3 (Substrate-SDS-PAGE) for Peptidase 4 Screening in a Post-Genomic Era. Editora Intech. 2012.

d'Avila-Levy CM, Santos LO, Marinho FA, Dias FA, Lopes AH, Santos ALS & Branquinha MH. Gp63-like molecules in *Phytomonas serpens*: possible role in the insect interaction. Curr. Microbiol. 2006; 52: 439-444.

Davison RN. Practical guide for treatment of leishmaniasis. Drugs. 1998; 56: 1009-1018.

Debrant A & Nakhasi HL. Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest ? Kinetoplastid Biol Dis. 2003; 2(1):7.

Debrant A, Lee N, Bertholet S, Duncan R & Nakhasi HL. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. Int. J. Parasitol. 2003; 33: 257-267.

Deegan C, McCann M, Devereux M, Coyle B & Egan DA. *In vitro* cancer chemotherapeutic activity of 1,10-phenanthroline (phen), [Ag₂(phen)₃(mal)].2H₂O, [Cu(phen)₂(mal)].2H₂O and [Mn(phen)₂(mal)].2H₂O (malH₂ = malonic acid) using human cancer cells. Cancer Letters. 2007; 247(2): 224-233.

Deegan C, Coyle B, McCann M, Devereux M & Egan DA. *In vitro* anti-tumor effect of 1,10 phenanthroline-5,6-dione (phendione), [Cu(phendione)₃](ClO₄)₂.4H₂O and [Ag(phendione)₂]ClO₄ using human epithelial cell lines. Chem. Biol.Interactions. 2006; 164: 115-125.

Delorenzi JC, Freire-De-Lima L, Gattas CR, De Andrade Costa D, He L & Kuehne ME. *In vitro* activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*. Anti Agents Chem. 2002; 46: 2111-2115.

Descoteaux A & Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. Biochim. Biophys. Acta. 1999; 1455: 341-352.

De Souza W, Attias M & Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2009; 41: 2069-2080.

De Vizcaya-Ruiz A, Riverro-Muller A, Ruiz-Ramirez L, Kass GN, Kelland LR, Orr RM & Dobrota M. Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casipenia

II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol. In vitro*. 2000; 14: 1-5.

Dutra PML, Silva SAG, Da Cruz AM & Dutra FL. *Leishmaniose Americana – Bases Moleculares em Clínica Médica*. 1ª ed, Editora Atheneu. 2010.

Elias CGR, Chagas MG, Souza-Gonçalves AL, Pascarelli BMO, d'Avila-Levy CM, Branquinha MH & Santos ALS. Differential expression of cruzipain- and gp63-like molecules in the phytoflagellate trypanosomatid *Phytomonas serpens* induced by exogenous proteins. *Exp. Parasitol.* 2012; 130: 13–21.

Ellis M, Sharma DK, Hilley JD, Coombs GH & Mottram JC. Processing and trafficking of *Leishmania mexicana* GP63. Analysis using GP18 mutants deficient in glycosylphosphatidylinositol protein anchoring. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 27968-27974.

Eshwika A, Coyle B, Devereux M, McCann M & Kavanagh K. Metal complexes of 1,10 phenanthroline-5,6-dione alter the susceptibility of the yeast *Candida albicans* to amphotericin B and miconazole. *Biometals*. 2004;17(4): 415-422.

Etges R. Identification of a surface metalloproteinase on 13 species of *Leishmania* isolated from humans, *Crithidia fasciculata*, and *Herpetomonas samuelpessoai*. *Acta Tropica*. 1992; 50: 205-217.

Fath M, Wu X, Hileman R, Linhardt R, Kashem M, Nelson R, Wrigth C & Abraham W. Interaction of secretory leukocyte protease inhibitor with heparin inhibits proteases evolved in asthma. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 13563-13569.

Feder D, Gomes SAO, Garcia ES & Azambuja P. Metalloproteases in *Trypanosoma rangeli* infected *Rhodnius prolixus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1999; 94: 771-777.

Fong D & Chang KP. Surface antigenic change during differentiation of a parasite protozoan, *Leishmania mexicana*: identification by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982; 79: 7366-7370.

Fundação Nacional De Saúde (FUNASA) (2000). Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana. 2000; 1-62. Disponível em: www.funasa.gov.br

Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SMB, Nascimento ET, Britigan BE & Wilson ME. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol.* 2001; 167: 893-901.

Garcia MR, Graham S, Harris RA, Beverley SM & Kayne PM. Epitope cleavage by *Leishmania* endopeptidase(s) limits the efficiency of the exogenous pathway of major histocompatibility complex class I-associated antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 1005-1013.

Garg R & DUBE A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 2006; 123: 439-454.

Geraghty M, Cronin JF, Devereux M & McCann M. Synthesis and antimicrobial activity of copper(II) and manganese(II) a,w-dicarboxylate complexes. *BioMetals*. 2000; 13: 1-8.

Geraghty M, McCann M, Devereux M & McKee V. Syntheses and anti-*Candida* activity of cobalt(II) complexes of octanedioic acid (odaH₂) and nonanedioic acid (ndaH₂); X-ray crystal structures of [Co(phen)₃]oda·14H₂O and [Co(phen)₃]nda·11.5H₂O (phen=1,10 phenanthroline) *Inorganica Chimica Acta*. 1999; 293:160–166.

Giudice A, Camada I, Leopoldo PTG, Pereira JMB, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, De Jesus AR, Carvalho EM & Almeida RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect. Dis.* 2007; 7: 7.

Gomez MA, Contreras I, Hallé M, Trambly ML, McMaster RW & Olivier M. *Leishmania* gp63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci. Signal.* 2009; 2(90): 58.

González U, Pinart M, Reveiz L, Rengifo-Pardo M, Tweed J, Macaya A & Alvar J. Designing and reporting clinical trials on treatments for cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*. 2010; 51: 409–419.

Goto H & Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2010; 8(4): 419-433.

Green DR & Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998; 281: 1309-1312.

Grellier P, Vendeville S, Joyeau R, Bastos IMD, Drobecq H, Frappier F, Teixeira ARL, Schrevel J, Davioud-Charvet E, Sergheraert C & Santana JM. *Trypanosoma cruzi* prolol oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(50): 47078-47086.

Gustin JK, Kessler E & Ohman DE. A substitution at His-120 in the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* block enzymatic activity without affecting processing or extracellular secretion. *J. Bacteriol.* 1996; 178(22): 6608-6617.

Hajmová M, Chang KP, Kolli B & VOLF P. Down-regulation of gp63 in *Leishmania amazonensis* reduces its early development in *Lutzomyia longipalpis*. *Microb. Infect.* 2004; 6: 646–649.

Halliwell B & Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 1-85.

Handman E & Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitol.* 2002; 18(8): 332-334.

Handman E. Cell biology of *Leishmania*. *Advances in Parasitology*. 2000; 44: 1-39.

Hey AS, Theander TG, Hviid L, Hazrati SM, Kemp M & Kharazmi A. The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. *J. Immunol.* 1994; 152(9): 4542-4548.

Ho DD, Neuman AV, Perelson AS, Chen W, Leonard JM & Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD-4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995; 373: 123–126.

- Holzmuller P, Hide M, Sereno D & Lemesre J. *Leishmania infantum* amastigotes resistant to nitric oxide cytotoxicity: impact on in vitro parasite developmental cycle and metabolic enzyme activities. *Infect Genet Evol.* 2006; 6: 187-197.
- Hong L, Turner RT, Koelsch G, Shin D, Ghosh AK & Tang J. Crystal structure of memapsin 2 (b-secretase) in complex with an inhibitor OM00-3. *Biochem.* 2002; 41: 10963-10967.
- Hoover D, Lefker B, Rosati R, Wester R, Kleinman E, Bindra J, Holt W, Murphy W, Mangiapane M & Hockel GM. Discovery of inhibitors of human rennin with high oral bioavailability. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995; 362: 167-180.
- Hsiao CHC, Yao C, Storlie P, Donelson JE & Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2008; 157: 148-159.
- Ilgoutz SC & McConville MJ. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int. J. Parasitol.* 2001; 31: 899-908.
- Jaffe CL & Dwyer DM. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from *Leishmania* and insect trypanosomatids. *Parasitol. Res.* 2003; 91: 229-237.
- Jiménez Torres NV, Romero Crespo I, Ballester Solaz M, Albert Marí A & Jiménez Arenas V. Interacción de los antineoplásicos orales con los alimentos: revisión sistemática. *Nutr. Hosp.* [online]. 2009; 24(3): 260-272. ISSN 0212-1611.
- Kaaya GP. A review of progress in recent years on research and understanding of immunity in insect vectors of human and animal diseases. *Insect Sci. Appl.* 1989; 10: 751-769.
- Kane MM & Mosser DM. *Leishmania* parasites and their plays to disrupt macrophage activation. *Curr. Opin. Hematol.* 2000; 7: 26-31.
- Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M & Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta. Biochimica. Polonica.* 2009; 56: 211-224.
- Kedzierska A, Kochan P, Pietrzyk A & Kedzierska J. Current status of fungal cell wall components in the immunodiagnosics of invasive fungal infections in humans: galactomannan, mannan and (1-3)beta-D-glucan antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 26: 755-766.
- Khatami A, Firooz A, Gorouhi F & Dowlati Y. Treatment of acute old world cutaneous leishmaniasis: a systematic review of the randomized controlled trials. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2007; 57(2): 335-429.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.*, 4(1): 1-24.
- Kleinert H, Stein H, Boyd S, Fung A, Baker W, Verburg K, Polakowski J, Kovar P, Barlow J & Cohen J. Discovery of a well-absorbed, efficacious rennin inhibitor, a-74273. *Hypertension.* 1992; 20: 768-775.

Klemba M & Goldberb DE. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu. Rev. Biochem.* 2002; 71, 275-305.

Kolodzejski PJ, Koo JS & Eissa NT. Regulation of inducible nitric oxide synthase by rapid cellular turnover and contranlational down-regulation by dimerization inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(52): 18141-18146.

Kulkarni MM, Jones EA, McMaster WR & McGwire BS. Fibrinectin binding and proteolytic degradation by *Leishmania* and effects on macrophage activation. *Onfect. Immun.* 2008; 76: 1738-1747.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz E, Kamysz W, Engman DM & McGwire BS. The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol. Microbiol.* 2006; 62: 1484-1497.

Lacount DJ, Gruszynski AE, Grandgnett PM, Bangs JD & Donelson JE. Expression and function of the *Trypanosoma brucei* major surface protease (GP63) genes. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 24658-24664.

Lane JE, Bogitsh BJ, Ribeiro-Rodrigues R, Kral M, Jones MM & Carter CE. Ultrastructural effects of the chelating agent 1,10-phenanthroline on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in vitro. *Parasitol Res.* 1998; 84(5): 399-402.

Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Khamesipour A, Berg L & Akuffo H. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* 2008; 153(2): 221-230.

Lima MIS, Arruda VO, Alves EVC, Azevedo APS, Monteiro SG & Pereira SRF. (2010). Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®. *Arch. Toxicol.* 2010; 84: 227-232.

Lima AK, Elias CG, Souza JE, Santos ALS & Dutra PM. Dissimilar peptidase production by avirulent and virulent promastigotes of *Leishmania braziliensis*: inference on the parasite proliferation and interaction with macrophages. *Parasitol.* 2009;136(10):1179-1191.

Lipoldová M & Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat. Rev. Genetics.* 2006; 7(4): 294-305.

Lopes AH, Souto-Pradón T, Dias FA, Gomes TM, Rodrigues GC, Zimmermann LT, Alves E Silva TL & Vermelho AB. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Parasitol. J.* 2010; 4: 30-59.

Lowry OH, Rebrough NJ, Fan AL & Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.

Maarouf M, De Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp. Cell. Res.* 1997; 232: 339-348.

Mahmoudzadeh-Niknam H, Kiael SS & Iravani D. *Leishmania tropica* infection, in comparison to *Leishmania major*, induces lower delayed type hypersensitivity in Balb/c mice.

Korean J. Parasitol. 2007; 45(2): 103-109.

Malafaia G, Marcon LN, Pereira LF, Pedrosa ML, Rezende SA. *Leishmania chagasi*: effect of the iron deficiency on the infection in BALB/c mice. Exp. Parasitol. 2011; 127: 719-723.

Maltezou HC. Drug resistance in visceral leishmaniasis. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2009; 2010: 1-8.

Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S & Cillari E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. Int. J. Immun. Pharma. 2007; 20: 435-445.

Mauel J. Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. Adv. Parasitol. 1996; 38:1-51.

McCann M, Kellett A, Kavanagh K, Devereux M & Santos ALS. Deciphering the Antimicrobial Activity of Phenanthroline Chelators. Current Medicinal Chemistry. (2012a); 19: 1-12.

McCann M, Santos ALS, Silva BAS, Romanos MTV, Pyrrho AS, Devereux M, Kavanagh K, Fichtner I & Kellett A. In vitro and in vivo studies into the biological activities of 1,10 phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its copper(II) and silver(I) complexes. Tox. Research. (2012b); 00: 1-8.

McCann M, Coyle B, McKay S, McCormack P, Kavanagh K, Devereux M, McKee V, Kinsella P, O'Connor R & Clynes M. Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phenanthroline)₂]ClO₄ (phenanthroline = 1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells. BioMetals. 2004; 17: 635-645.

McCann M, Geraghty M, Devereux M, O'Shea D, Mason J & O'Sullivan L. Insights into the mode of action of the anti-Candida activity of 1,10-phenanthroline and its metal chelates. Metal-Based Drugs. 2000; 7: 185-193.

McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC & Teasdale RD. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2002; 66: 122-154.

McGwire BS, Chang KP & Engman DM. (2003). Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. Infect. Immun. 2003; 71(2): 1008-1010.

McGwire BS, O'Connell WA, Chang KP & Engman DM. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis. J. Biol. Chem. 2002; 277: 8802-8809.

McKerrow JH, Caffrey, Kelly B, Loke P & Sajid M. Proteases in Parasitic Diseases. Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2006; 1: 497-536.

McKerrow JH, Sun E, Rosenthal PJ & Bouvier J. The proteases & pathogenicity of parasitic protozoa. Annu. Rev. Microbiol. 1993; 47: 821-853.

McMaster WR, Morrison CJ, MacDonald H & Joshi PB. Mutational and functional analysis of

the *Leishmania* surface metalloproteinase gp63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitol.* 1994; 108: S29-S36.

Medina-Acosta E, Karess RE & Russel DG. Structurally distinct genes for the surface peptidase of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993; 57: 31-46.

Meneses CR, Cupolillo E, Monteiro F & Rangel EF. Micro-geographical variation among male populations of the sandfly, *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia*, from an endemic area of American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Med. Vet. Entomol.* 2005; 19(1): 38-47.

Mehta A & Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 11798-11813.

Mihok S, Stiles JK, Mpanga E & Olubayo RO. Relationships between protease activity, host blood and infection rates in *Glossina morsitans* spp. infected with *Trypanosoma congolense*, *T. brucei* and *T. simiae*. *Med. Vet. Entomol.* 1994; 8: 47-50.

Minodier P & Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med. Leuk. Biol.* 2007; 47: 187-193.

Mishra V. Oxidative stress and role of antioxidant supplementation in critical illness. *Clin. Lab.* 2007; 53: 199-209.

Moein MR, Pawar RS, Khan SI, Tekwani BL & Khan IA. Antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of 12,16-Dideoxy aegyptinone B from *Zhumeria majdae* Rech.f. & Wendelbo. *Phytotherapy Research Phytother Res.* 2008; 22: 283-285.

Mossalayi MD, Arock M, Mazier D, Vincendau P & Vouldoukis I. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem, *Parasitol Today.* 1999; 15: 342-345.

Mottram JC, Coombs GH & Alexander J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2004; 7(4): 375-381.

Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol. Rev.* 2011; 240(1): 286-296.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005; 366: 1561-1577.

Naderer, T. & McConville, M.J. (2008). The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol.*, 10(2): 301-308.

Naglik JR, Challamcombe SJ & Hube B. (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67: 400-428.

Navarro, M., Gabbiani, C., Messori, L. & Gambino, D. (2010). Metal-based drugs for

malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. *Drug Discovery Today*, 15: 1070-1078.

Neilands, J.B. (1994). in *The development of iron chelators for clinical use* (Bergeron, R.J. and Brittenham, G.M., eds.), pp 151-168, CRC Press.

Neupane, G.P. & Kim, D.-M. (2009). Comparison of the effects of deferasirox, deferiprone, and deferoxamine on the growth and virulence of *Vibrio vulnificus*. *Transfusion*, 49: 1762-1769.

Nguewa, P.A., Fuertes, M.A., Valladares, B., Alonso, C. & Perez, J.M. (2004). Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness? *Trends Parasitol.*, 33: 257-267.

Olivier, M., Gregory, D.J. & Forjet, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. R.*, 18(2): 293-305.

Pan, A.A., Duboise, S.M., Eperon, S., Rivas, L., Hodgkinson, V., Traub Cseko, Y. & McMahon-Pratt, D. (1993). Developmental life cycle of *Leishmania* cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes. *J. Euk. Microbiol.*, 40:213-223.

Paris, C., Looiseau, P.M., Bories, C. & Bréard, J. (2004). Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48(3): 852-859.

Pereira, F.M., Santos-Mallet, J.R., Branquinha, M.H., d'Avila-Levy, C.M. & Santos, A.L.S. (2010a). Influence of leishmanolysin-like molecules of *Herpetomonas samuelpessoai* on the interaction with macrophages. *Microbes Infect.*, 12: 1061-1070.

Pereira, F.M., Dias, F.A., Elias, C.G., d'Avila-Levy, C.M., Silva, C.S., Santos-Mallet, J.R., Branquinha, M. H. & Santos, A.L.S. (2010b). Leishmanolysin like molecules in *Herpetomonas samuelpessoai* mediate hydrolysis of protein substrates and interaction with insect. *Protist.*, 161: 589-602.

Peterson, a.t. & Shaw, j. (2003). *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. 33(9): 919-931.

Rabinovich, J.F. & Feliciangeli, M.D. (2004). Parameters of *Leishmania braziliensis* transmission by indoor *Lutzomyia ovallesi* in Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 70(4):373-82.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. & Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 597-635.

Rath, S., Trivelin, L. A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M., Jesús, M. N., Marzal, P. C. (2003). *Quim. Nova*, 26, 550.

Rawlings, N.D., Tolle, D.P. & Barrett, A.J. (2004). MEROPS: the peptidase

database. Nuc. Acids Res. 32: 160–164.

Rawlings, N.D., O'Brien, E. & Barrett, A.J. (2002). MEROPS: the protease database. Nuc. Acids Res. 30: 343–346.

Reithinger, R., Dujardin, J., LOUZIR, H., PIRMEZ, C., Alexander, B. & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. The Lancet Infectious Diseases, 7: 581-596.

Rey, L. (2002). Parasitologia. 3a Edição, Guanabara Koogan.

Ritting, M.G. & Bogdan, C. (2000). *Leishmania*-host cell interaction: complexities and alternative views. Parasitol. Today, 16: 292-297.

Rogers, K.A., Dekrey, G.K., Mbow, M.L., Gillespie, R.D., Brodskyn, C.I., & Titus, R.G. (2002). Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. FEMS Microbiol. Lett., 209: 1-7.

Roose J.P. & VAN Noorden C.J.F. (1995). Synthetic protease inhibitors: promising compounds to arrest pathobiologic processes. J. Lab. Clin. Med., 125: 433-441.

Roy, A., Ganguly, A., BoseDasgupta, S., Das, B.B., Pal, C., Jaisankar, P. & Majumder, H.K. (2008). Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F0F1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. Mol. Pharmacol., 74: 1292-1307.

Sacks, D. & Noben-Trauth, N. (2002) The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. Nat. Rev. Immunol., 2: 845-858.

Sacks, D. & Sher, A. (2002). Evasion of innate immunity by parasitic protozoan. Nature Immunology, 3: 1041-1047.

Sajid, M. & MCKerrow, J.H. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. Mol. Biochem. Parasitol., 120(1): 1-21.

Samuni, A., Chevion, M. & Czapski, G., (1981). Unusual copper-induced sensitisation of the biological damage due to superoxide radicals. J. Biol. Chem. 256: 12632-12635.

Santos, A.L.S., Sodr , C.L., Valle, R.S., Silva, B.A., Abi-chacra,  .A., Silva, L.V., Souza-Gonçalves, A.L., Sangenito, L.S., Gonçalves, D.S., Souza, L.O.P., Palmeira, V.F., d' vila-Levy, C.M., Kneipp, L.F., Kellett, A., MCCanns, M. & Branquinha, M.H. (2012). Antimicrobial Action of Chelating Agents: Repercussions on the Microorganism Development, Virulence and Pathogenesis. Curr. Med. Chem., 19(1): 1-23.

Santos, A.L.S. (2011). Protease expression by microorganisms and its relevance to crucial physiological/pathological events. World J. Biol. Chem., 2(3): 48-58.

Santos, A.L.S., Bittencourt, V.C.B., pinto, m.r. & Barreto-Bergter, E. (2009). Biochemical characterization of potential virulence markers in the human fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. 47(4): 375-386.

- Santos, A.L.S., Soares, R.M.A., Alviano, C.S. & Kneipp, L.F. (2008). Heterogeneous production of metallo-type peptidases in parasites belonging to the family Trypanosomatidae. *Eur. J. Prot.*, 44: 103–113.
- Santos, A.L.S., d'Avila-Levy, C.M., Elias, C.G.R., Vermelho, A.B. & Branquinha, M.H. (2007). *Phytomonas serpens*: immunological similarities with the human trypanosomatid pathogens. *Microb. Infect.*, 9: 15-21.
- Santos, A.L.S., Branquinha, M.H. & d'Avila-Levy, C.M. (2006). The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: in the search for a function. *Anais da Acad. Bras. Ciênc.*, 78: 687–714.
- Santos, A.L.S., Alviano, C.S., & Soares, R.M.A. (2005). Use of proteolytic enzymes as an additional tool for trypanosomatid identification. *Parasitology*, 130: 79-88.
- Santos, A.L.S., Batista, L.M., Abreu, C.M., Alviano, C.S., Angluster, J. & Soares, R.M.A. (2001). Developmentally regulated protein expression mediated by dimethylsulfoxide in *Herpetomonas samuelpessoai*. *Curr. Microbiol.*, 42: 111-116.
- Santos, A.L.S., Ferreira, A., Franco, V.A., Alviano, C.S. & Soares, R.M.A. (1999). Characterization of proteinases in *Herpetomonas anglusteri* and *Herpetomonas roitmani*. *Curr. Microbiol.*, 39: 61-64.
- Schlagenhauf, E., Etges, R. & Metcalf, P. (1998). The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure*. 6(8):1035-46.
- Schmidt, G.D. & Roberts, L.S. (1989). Kinetoplastida: Trypanosomes and their kin. *Foundations of Parasitology* 4th ed., Times Mirror/ Mosby College Publishing, 55-80.
- Schubad, T.M.P., Figueiredo, F.B., Pereira, S.A., Madeira, M.F., Santos, I.B., Andrade, M.V., Cuzzi, T., Marzochi, M.C.A. & Schubach, A. (2004). American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(3):165-167.
- Schwartz, E., Hartz, C. & Blum, J. (2006). New world cutaneous leishmaniasis in travelers. *Lancet. Infect. Dis.*, 6(6): 342-349.
- Seay, M.B., Heard, P.L. & Chaudhuri, G. (1996). Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect. Immun.*, 64: 5129-5137.
- Sen, N., DAS, B.B., Ganguly, A., Mukherjee, T., Tripathi, G., Bandyopadhyay, S., Rakshit, S., Sen, T. & Majumder, H.K. (2004). Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death Differ.*, 11: 924-936.
- Sen, R. & Chatterjee, M. (2011). Plant derived therapeutics for the treatment of leishmaniasis. *Phytomedicine*. 18(12): 1056-1069.

- Shaha, C. (2006). Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis, Indian J. Med. Res., 123: 233-244.
- Sharma, U. & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. J. Vector Borne Dis., 45: 255-272.
- Shaw, E. (1990). Cystenyl proteinases and their selective inactivation. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 63: 271-347.
- Shiah, S.G., Kao, Y.R., WU, Y.F. & WU, C.W. (2003). Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram. Mol. Pharmacol., 64(5): 1076-1084.
- Silva, B.A., Souza-Gonçalves, A.L., Pinto, M.R., Barreto-Bergter, E. & Santos, A.L.S. (2011). Metalloproteinase inhibitors arrest vital biological processes in the fungal pathogen *Scedosporium apiospermum*. Mycoses. 54(2): 105-112.
- Silva, B.A. (2009). Efeito de 1,10-fenantrolina e seus derivados sobre aspectos múltiplos da bioquímica e biologia celular do fungo *Pseudallescheria boydii*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Silva, J.S., Machado, F.S. & Martins, G.A. (2003). The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. Front. Biosci., 8: S314-325.
- Silva-López, R.E. (2010). Proteases de *Leishmania*: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. Quim. Nova, 20: 1-8.
- Silveira, T.G.V., Suzuki, E., Takahashi, H.K. & Straus, A.H. (2001). Inhibition of macrophage invasion by monoclonal antibodies specific to *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and characterization of their antigens. Int. J. Parasitol., 31: 1451-1458.
- Simoneau, B., Lavalle, P., Anderson, P.C., Bailey, M., Bantle, G., Berthiaume, S., Chabot, C., Fazal, G., Hamos, T., Ogilvie, W.W., Poupert, M.A., Thavonekham, B., XIN, Z., Thibeault, D., Bolger, G., Panzenbeck, M., Winquist, R. & Jung, G.L. (1999). Discovery of non-peptidic P2-P3 butanediamide rennin inhibitors with high oral efficacy. Bioorg. Med. Chem., 7: 489-508.
- Simpson, A.G., STEVENS, J.R. & LUKES, J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol., 22(4): 168-174.
- Singh, R.K., Pandey, H.P. & Sundar, S. (2006). Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. Indian J. Med. Res., 123: 331-344.
- Sinha, S., Fernández, G., Kapila, R., Lambert, W.C, Schwartz, R.A. (2008). Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. Ins. J. Dermatol., 47(12): 1263-1270.
- Soares, G. C., Silva, B.A., Dos Santos, M.H., Da Costa, A.F., SANTOS, A.L.S., Morandi, V. & Nagao, P.E. (2008). Metalloproteinases produced by group B *Streptococcus*: influence of proteolytic inhibitors on growth and on interaction with human cell lineages. Int.

J. Mol. Med. 22(1): 119-25.

Soares, D.C., Pereira, C.G., Meireles, M.A.A. & Saraiva, E.M. (2007). Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. Parasitol. Int., 56: 135-139.

Soares-Bezerra, R.J., Leon, L. & Genestra, M. (2004). Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 40(2).

Sousa-franco, J., Araújo-mendes, E., Silva-jardeim, I., Santos, J.L., Faria, D.R. & Dutra, W.O. (2006). Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. Microbes Infect., 8: 390-400.

Spellberg, B. & Ibrahim, A.S. (2010). Recent advances in the treatment of mucormycosis. Curr. Infect. Dis. Rep., 12: 423-429.

Sundar, S. & Olliaro, P.L. (2007). Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. Ther Clin. Risk Manag., 3(5): 733-740.

Tanaka, R.D., Clark, J.N., Warne, R.L., Abraham, W.M. & Katsuoka, K. (1995). Mast cell tryptase: a new target for therapeutic intervention in asthma. Int. Arch. Allergy Immunol., 107: 408-409.

Tomita, T. (2009). Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease treatment. Exp. Rev. Neurother. 9: 661-79.

Trinchese, F., FA', M., Liu, S., Zhang, H., Hidalgo, A., Schmidt, S.D., Yamaguchi, H., Yoshii, N., Mathews, P.M., Nixon, R.A. & Arancio, O. (2008). Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. J. Clin. Invest., 118: 2796-807.

Trudel, N., Garg, R., Messier, N., Sundar, S. Ouellette, M. & Tremblay, M.J. (2008). Intracellular survival of *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis is significantly reduced by HIV-1 protease inhibitors. J Infect Dis., 198: 1292-1299.

Van Hellemond, J.J., Opperdoes, F.R. & Tielens, A.G. (2005). The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. Biochem. Soc. Trans., 33: 967-971.

Van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., Müller, A., Hölscher, C., Herrmann, M., Sacks, D., Solbach, W. & Laskay, T. (2006). *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. Proc Natl Acad Sci USA. 103(37): 13837-13842.

Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Lile, J., Jaronsinski, M.A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J-C., Collins, F.,

- Treanor, J., Roge, Katzenstein & Gerstoftr, G. & Citron, M. (1999). b-Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286: 735-741.
- Vermelho, A.B., DE Simone, S.G., D'avila-Levy, C.M., Santos, A.L.S., Melo, A.C.N., Silva JR, F.P., Bon, E.P.S. & Branquinha, M.H. (2007). Trypanosomatidae Peptidases: A Target for Drugs Development. *Curr. Enz. Inhibit.*, 3: 19-48.
- Vickerman, K. & Preston, T.M. (1976). Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden, W.H.R. & Evans, D.A., eds. *Biology of the kinetoplastida*. Academic Press, New York, vol. I, pp.35-130.
- Weise, F., Stierhof, Y.D., Kühn, C., Wiese, M. & Overath, P. (2000). Distribution of GPI anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *J. Cell. Sci.*, 113: 4587-4603.
- Wijker, C.A. & Lafleur, M.V. (1999). The presence of traces of iron and copper ions during γ irradiation does not result in clear mutational hot spots in the *lacI* gene. *Mut. Res.* 429: 27-35.
- WHO/OMS. (2011). Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
- Yao, C. (2010). Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all? *Infect Immun.*, 78(1): 22-31.
- Yao, C., Luo, J., Hsiao, C., Donelson, J.E. & Wilson, M.E. (2005). Internal and surface subpopulations of the major surface protease (MSP) of *Leishmania chagasi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 139, 173-183.
- Yao, C., Luo, J., Storlie, P., Donelson, J.E. & Wilson, M.E. (2004). Multiple products of the *Leishmania chagasi* major surface protease (MSP or GP63) gene family. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 135(2): 171-183.
- Yao, C., Donelson, J.E. & Wilson, M.E. (2003). The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania sp.* biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 132: 1-16.
- Zangger, H., Mottram, J.C. & Fasel, N. (2002). Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis ? *Cell Death Differ.* 9(10): 1126-1139.
- Zhang, S.C., Zhu, Y.G., TU, C., Wei, H.Y., Yang, Z., LIN, L.P., Ding, J., Zhang, J.F. & Guo, Z.J. (2004). A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1,10 phenanthroline and L threonine with DNA nuclease activity. *J. Inorg.Biochem.*, 98: 2099-2106.
- Zhou, H., Zheng, C., Zou, G., Tao, D. & Gong, J. (2002). G(1)-phase specific apoptosis in liver carcinoma cell line induced by copper-1,10-phenanthroline. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 32: 678-684.