

Estrutura tridimensional da Major Surface Protease de *Leishmania guyanensis* resolvida por modelagem comparativa

Paulo Henrique Matayoshi Calixto¹, Diego Santos Fagundes², Júlio César Sá de Oliveira³

1. Professor da Universidade Federal do Amapá, Campus Binacional Oiapoque, NEPA - Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura. E-mail: matayoshi@unifap.br

2. Universidade Federal do Amapá. Campus Binacional Oiapoque. NEPA - Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura. E-mail: diegosfagundes@unifap.br

3. Universidade Federal do Amapá. Campus Marco Zero. NEPA - Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura. E-mail: juliosa@unifap.br

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi gerar e caracterizar a estrutura tridimensional da Major Surface Protease (MSP) de *L. guyanensis* (LgMSP). A obtenção do modelo estrutural foi realizada por modelagem comparativa, empregando o programa Modeller, a partir da sequência de aminoácidos da LgMSP depositada no GenBank. Os resultados obtidos apontaram que a LgMSP possui todos os elementos necessários para o processamento pós-traducional e de funcionamento, tais como: peptídeo sinal; pro-peptídeo; sinal de adição da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI); e os aminoácidos envolvidos na composição do sítio catalítico, motif HEXXH. A estrutura da LgMSP, apresentou as mesmas características estruturais da proteína molde, MSP de *Leishmania major* (LmMSP). O alinhamento entre as estruturas de LgMSP e LmMSP revelou grande conservação estrutural, sobretudo dos subdomínios onde está localizado o sítio catalítico. O estudo das cargas parciais aponta a mesma distribuição das cargas de superfície, indicando que ambas as proteínas possam clivar os mesmos substratos. De acordo com os resultados, sugerimos que a LgMSP seja um excelente alvo para o tratamento profilático e/ou curativo da leishmaniose tegumentar americana, através do desenho racional de fármacos baseado na estrutura gerada.

Palavras-chave: MSP, modelagem comparativa, *Leishmania guyanensis*, estrutura, cargas de superfície, conservação estrutural.

Three-dimensional structure of Major Surface Protease of *Leishmania guyanensis* solved by comparative modeling

ABSTRACT: The objective of this study was to generate and characterize the three-dimensional structure of *L. guyanensis* Major Surface Protease (LgMSP). The generation of the structural model was performed by comparative modeling, using the program Modeller from the amino acid sequence LgMSP deposited in GenBank. The results showed that the LgMSP has all the elements necessary for the post-translational processing and functionality, such as signal peptide, propeptide; addition signal glicosilfosfatidilinositol anchor (GPI) and the amino acids involved in the composition of catalytic site, HEXXH motif. The structure of LgMSP, showed the same structural characteristics of the template-protein, Major Surface Protease *Leishmania major* (LmMSP). The alignment between the structures LgMSP and LmMSP revealed great structural conservation, especially the subdomains where is located the catalytic site. The study of the partial charges shows the same distribution of surface charges, indicating that both proteins can cleave the same substrates. According to the results suggest that LgMSP is an excellent target for the prophylactic and/or curative treatment of American tegumentary leishmaniasis, through rational drug design based on structure generated.

Keywords: MSP; comparative modeling; *Leishmania guyanensis*; structure; surface charges; structural conservation.

1. Introdução

A leishmaniose é uma doença parasitária, de ampla distribuição geográfica, provocada por espécies do *Leishmania* spp. A leishmaniose é encontrada em 88 países de climas tropical e sub-tropical. Dados epidemiológicos apontam que existem, em todo o mundo, aproximadamente 12 milhões de indivíduos infectados, com a ocorrência de 270 mil novos casos a cada ano. O número de novos casos pode aumentar nos próximos anos, tendo em vista que aproximadamente 1,6 milhão de pessoas estão em potencial situação de risco. A leishmaniose é transmitida por mosquitos do *Lutzomyia* spp. e *Phlebotomus* spp. no Novo e Velho

Mundo, respectivamente. No Brasil, são registrados 26 mil novos casos de leishmaniose a cada ano, sendo a maioria deles atribuídos à *Leishmania braziliensis* e a *Leishmania guyanensis*, agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar americana (LTA) (WHO, 2010; ALVAR et al., 2012).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a manifestação mais comum da LTA e é caracterizada por uma lesão única no local de picada do mosquito. Essa lesão primária tende a regredir gradualmente, mesmo na ausência de tratamento (MARSDEN et al., 1984). Contudo, é comum que a partir dessa lesão, a *L. braziliensis* e a *L. guyanensis* se disseminem para regiões

distantes na pele e mucosas, porém, sem desenvolver lesões (OLIVEIRA et al., 2006). No entanto, um pequeno percentual dos indivíduos infectados com *L. braziliensis* ou *L. guyanensis* podem apresentar o quadro de leishmaniose mucocutânea (LMC) (MARSDEN, 1986). A LMC é uma condição desfigurante em virtude da ulceração da orofaringe e da mucosa nasal. As lesões ulcerativas podem ocorrer imediatamente à lesão primária ou, tardiamente, depois vários meses e até mesmo anos. O surgimento tardio das lesões na LMC ocorre pela presença da *L. braziliensis* ou da *L. guyanensis*, mesmo após a cura clínica do paciente e reflete uma refinada interação parasito/hospedeiro (GRIMALDI-Jr et al., 1991; AMATO et al., 1995).

As proteínas de superfície dos tripanossomatídeos são moléculas fundamentais para a interação parasito/hospedeiro. Uma dessas moléculas é a Major Surface Protease (MSP), também conhecida como gp63, uma metaloprotease zinco-dependente, inicialmente descrita no gênero *Leishmania* como uma glicoproteína de 63 kDa. A MSP pode estar associada à membrana através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (ETGES et al., 1986) ou se apresentar na forma secretada, ou seja, sem sinal de adição de âncora GPI (McGWIRE et al., 2002). O sítio catalítico da MSP é composto pelo *motif* HEXXH coordenado ao átomo de zinco (SCHLAGENHAUF et al., 1998). A MSP é apontada como fator de virulência em *Leishmania* spp., devido sua ampla variedade de substratos. As funções da MSP incluem: a) inativação do sistema do complemento, através da clivagem de C3b em C3bi (BRITTINGHAM et al., 1995); b) clivagem do receptor CD4 de linfócitos T, interferindo com a imunidade mediada por células (HEY et al., 1994); c) interação com receptores de macrófagos, garantindo ao parasito uma entrada silenciosa, sem desencadear o processo de explosão respiratória (MOSSER et al., 1985); d) clivagem de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), o principal controlador da tradução de RNA mensageiro, conduzindo o macrófago a um estado pouco responsivo e, conseqüentemente, favorecendo a replicação intracelular do parasito (JARAMILLO et al., 2011). Mesmo desempenhando um papel importante na interação parasito/hospedeiro, a MSP de *L. guyanensis* (LgMSP) ainda é pouco estudada e caracterizações, tais como, estruturais ainda não foram realizadas.

A caracterização de uma enzima é melhor conduzida quando conhecemos sua estrutura tridimensional (DILL; MACCALLUM, 2012). A determinação da estrutura proteica pode ser alcançada experimentalmente por dois métodos, o cristalográfico, que se baseia na construção de um mapa eletrônico gerado a partir da difração de raios-X sobre a proteína cristalizada (FAURE; SAUL, 2012) ou, ainda, nos casos de proteínas menores, pelo método de ressonância nuclear magnética (WIRMER-BARTOSCHEK; BARTOSCHEK, 2012). Ambos os métodos apresentam resultados

satisfatórios. Contudo, trata-se de técnicas dispendiosas e, na maioria das vezes, de difícil execução. Como alternativa aos estudos cristalográficos e de ressonância nuclear magnética, a modelagem comparativa pode ser empregada na determinação *in silico* da estrutura proteica. Em alguns casos, onde o percentual de identidade é satisfatório, a modelagem comparativa gera estruturas proteicas com resolução comparável aos resultados experimentais (LESCRINIER, 2011). A técnica de modelagem comparativa prediz a estrutura tridimensional de uma proteína baseado na identidade entre a sequência de aminoácidos da proteína a ser predita e a proteína de estrutura conhecida. Baseado no uso de uma estrutura como molde, a modelagem comparativa é considerada o método computacional mais acurado para a determinação da estrutura proteica *in silico* (LIU et al., 2011). Considerando as evidências supracitadas e a ausência de um modelo estrutural para a LgMSP, o objetivo deste trabalho foi gerar e caracterizar, por meio de modelagem comparativa, a estrutura tridimensional da proteína em questão. Tais informações poderão ajudar no entendimento da interação da *L. guyanensis* com o hospedeiro vertebrado, bem como, fornecer perspectivas como base para a elaboração de ações de controle e/ou eliminação do parasito.

2. Material e Métodos

Análises computacionais de predição e computação da LgMSP

A busca de elementos *cis* envolvidos no processamento pós-traducional e de comparação da LgMSP, foi realizada usando as seguintes ferramentas: a) SignalP (BENDTSEN et al., 2004) para a identificação do peptídeo sinal; b) PredGPI (PIERLEONI et al., 2008) para a predição do sítio de adição da âncora GPI; c) ProtParam (WILKINS et al., 1999) para a determinação do ponto isoelétrico e da massa; d) ClustalW (LARKIN et al., 2007) para o alinhamento de sequências de aminoácidos.

Geração da estrutura terciária e análises computacionais complementares

Neste estudo, utilizamos a sequência da LgMSP recuperada do GenBank (Q00689). O alinhamento de sequências foi gerado pelo programa ClustalW (LARKIN et al., 2007) em modo *default*. Já a predição da estrutura secundária (dado não mostrado) foi realizada através do *software* PSI-PRED (BRYSON et al., 2005).

A estrutura terciária da LgMSP não foi experimentalmente determinada e, desse modo, a determinação estrutural foi realizada por modelagem comparativa. A fim de escolher a melhor estrutura

molde, com cobertura e percentual de identidade satisfatórios, realizamos pesquisas via BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). O alinhamento entre a LgMSP e a proteína molde foi realizado pelo programa Promals3D (PEI et al., 2008) e manualmente acurado com o suporte do DNATagger, uma ferramenta *online* de visualização de sequências. O programa Modeller (9.10v) (SALI; BLUNDEL, 1993) foi usado para gerar inicialmente 100 estruturas candidatas para a LgMSP, sendo a que apresentou os melhores parâmetros, incluindo os estereoquímicos, foi selecionada para este trabalho. Tendo em vista que a estrutura molde possui os heteroátomos zinco e moléculas de água associadas, os mesmos foram adicionados manualmente ao arquivo.pdb da LgMSP recém-modelada.

O refinamento da estrutura foi conduzido através da predição dos rotâmeros e minimização da energia. A minimização foi realizada empregando o campo de força OPLS 2005 (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*) em 1.000 passos de iteração.

O processo de validação estrutural compreendeu os seguintes níveis: I) avaliação dos parâmetros estereoquímicos, empregando o *software* Procheck (LASKOWSKI et al., 1993); II) avaliação dos átomos não-ligados, utilizando o programa ERRATv2 (COLOVOS; YEATES, 1993); III) avaliação da qualidade geral da estrutura, alcançado pelo uso do programa ProSa (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007).

Estudos de alinhamentos estruturais, bem como a

visualização do modelo, foram realizados empregando o programa Chimera UCSF (PETERSEN et al., 2004). Já a determinação da superfície topológica e das cargas parciais de superfície foi realizada através do programa Molegro Molecular Viewer (THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

3. Resultados e Discussão

Obtenção da sequência da LgMSP e análises preliminares

De acordo com o *software* SignalP (Bendtsen et al., 2004), os resíduos de Met1 a Ala29 da LgMSP correspondem ao peptídeo sinal (Figura 1). O *software* PredGPI (PIERLEONI et al., 2008) indica o resíduo Met590 como o sítio-ômega para adição da âncora GPI (Figura 1). Baseado nesses dados, podemos inferir que a LgMSP possui todos os elementos necessários para a sua localização na superfície externa da *L. guyanensis*.

Além disso, o alinhamento da sequência de aminoácidos entre LgMSP e a MSP de *L. major* (LmMSP) revelou a existência, na região N-terminal da LgMSP, de uma sequência conservada, denominada propeptídeo (Val31 a Ser97). O propeptídeo contém um resíduo de cisteína (Cys44) (Figura 1) envolvido no mecanismo de *cysteine switch*, que controla a atividade enzimática, impedindo a degradação dos componentes intracelulares do parasito pela enzima recém-

MSRDRSSTHRRRSVAARLIGFAAAGLVMAVGAAVWAQAAGHHCIHDLRLQARVLQSVAAQQRVPAAFSALGLPYVSTGTI
SSAHTVDWALADSTSPSVARAADWGTLRIAVSTADLTDPGYHCTRVRVQQRVNNHNGEIVTCTAEDVLTEEKRDILVSYLIP
QALQLHAERLKVQVQGSWVGTGMTGSICGDFSVPTAHLTAGVTNADFLVYVAVPSEPGLVWATTCQVFSDDHPAVGV
INIPAANIVSRYDQGATRVVTHEVAHALGFSSTFFKSAGIVKSVTNLRGKPFPAAPVINSSTVVAKAREQYGCPTLEYLEV
EDQGGSGSAGSHIKMRNAKDELMAPASAAGYYTALTMVAFEDLGFYKADFTKAEVMPWGRNASCDFLTCKCMENNITQWP
EMFCNTTERRYRCPTDRLRLGTGCGIRTYSTPMPYPFEYFNDTFLAGYSAFLDYCPFTLGYNSGACNQDPSTAPALLKEFS
VFSDASRCLDGAQPTTAREVLMYNALCANVMCDTAARTYSVQVRGSSGYVACTPGQRVELATLSAAFVNGSYITCPPYV
EVCQANIKGVIDFEGDAADTAAMRRWRERMTALATVTAALLGIVLAAMAILVVWLLITIP

Figura 1. Sequência de aminoácidos da LgMSP: As letras marcadas na cor verde, delimita o peptídeo sinal. Os aminoácidos marcados em roxo representam o propeptídeo, já o aminoácido sublinhado representa o resíduo de cisteína envolvido no processo de *cysteine switch*. Os aminoácidos coloridos em vermelho indicam os resíduos clivados para a adição âncora GPI. A cor azul indica o sítio-ômega, o local de adição da âncora GPI. Por fim, os aminoácidos marcados na cor preta, correspondem à proteína madura, após as modificações pós-traducionais.

Conservação das sequências de MSPs

Todas as MSPs estudadas até o momento, em diferentes espécies, mostraram alto grau de conservação entre si (CHAUDHURI et al., 1988; MILLER et al., 1990; YAO et al., 2003; CALIXTO et al., 2013). De acordo com essa observação, realizamos o alinhamento múltiplo entre MSPs de *L. major*, *Leishmania donovani*, *L. braziliensis* e *Leishmania mexicana* (dado não mostrado). O alinhamento revelou alta conservação da sequência de aminoácidos, incluindo os resíduos do sítio ativo HEXXH e um terceiro resíduo de histidina envolvido na formação do sítio catalítico. De maneira geral, aproximadamente 32% de todos os resíduos são idênticos em todas as MSPs estudadas, incluindo 18 cisteínas, 12 glicinas e 7 prolínas. Os mesmos resultados

foram encontrados em alinhamentos múltiplos realizados por YAO e colaboradores (2003).

Para gerar um modelo estrutural baseado em homologia da LgMSP, selecionamos como *template* a estrutura da LmMSP (PDB code: 1LML) resolvida por difração de raio-X, com resolução de 1.86Å (SCHLAGENHAUF et al., 1998). O alinhamento de sequência demonstrou que LgMSP apresenta 71% de identidade e 76% de similaridade com a sequência de aminoácidos da LmMSP. Os *gaps* foram manualmente fechados, através da edição do alinhamento e pela remoção do peptídeo sinal, propeptídeo e dos resíduos localizados abaixo do ômega-site. Subsequentemente, um novo alinhamento foi gerado para a construção do modelo (Figura 2). Após a geração e a minimização da

energia a estrutura foi submetida e aprovada no processo de validação (Tabela 1). O modelo estrutural da Lgpp63 foi depositado no *Protein Model Database* (PMDb) (número de acesso: PM0078903). O PMDB é um

banco de dados *online* para proteínas resolvidas por técnicas de biologia computacional e pode ser acessado pelo endereço eletrônico: <http://mi.caspur.it/PMDb/>.

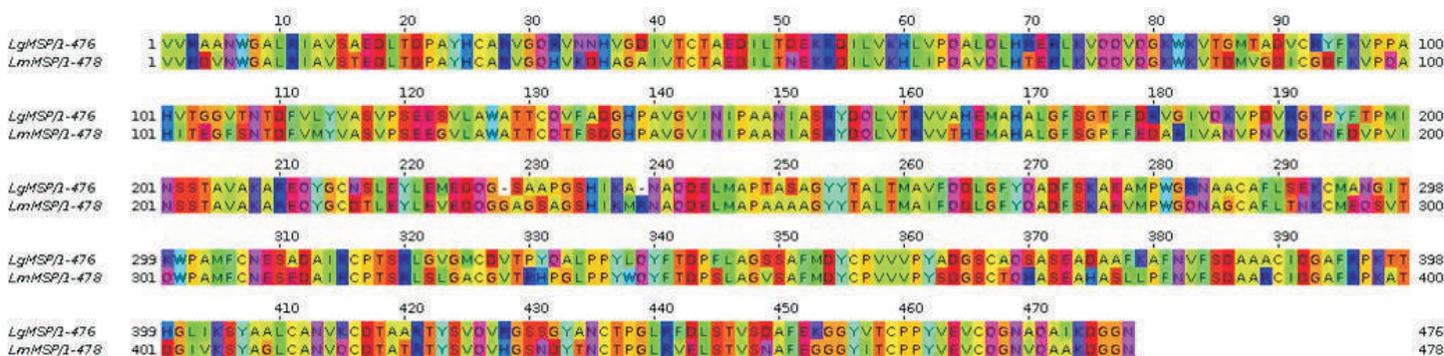


Figura 2. Alinhamento entre aminoácidos da LgMSP e da proteína-molde LmMSP: As sequências alinhadas correspondem à proteína madura. Os aminoácidos foram coloridos de acordo com o esquema de cores Taylor, para facilitar a visualização da conservação entre as sequências.

Tabela 1. Resultados de validação da LgMSP. ^aMOFR – resíduos nas regiões mais favoráveis; ^bAAR: resíduos em regiões adicionalmente permitidas; ^cGAR: resíduos em regiões generosamente permitidas; ^dDR: resíduos em regiões não permitidas.

Modelo	ProSa-Web (Z-score)	Procheck				Errat Score (%)
		MOFR ^a (%)	AAR ^b (%)	GAR ^c (%)	DR ^d (%)	
LgMSP	-8,2	89	10	0,3	0,8	87

As metaloproteases zinco-dependentes que apresentam o *motif* catalítico HEXXH podem ser agrupadas em três principais famílias: gluzincina, aspzincina e metzincina. Este último inclui o grupo das astacinas, serralisinas, adamalisinas, metaloproteases de matriz, snapalisinas e as leishmanolisinas. Todos os grupos mencionados apresentam como característica o domínio catalítico formado por duas α -hélices, projetadas contra uma folha- β composta por cinco fitas- β entrelaçadas (GOMIS-RUTH, 2003; SILVA et al., 2007; MUNIZ, et al. 2008). Diferentemente dos outros grupos, membros do grupo das leishmanolisinas possuem a folha- β composta por apenas 4 fitas- β . A

fita- β ausente é substituída por uma inserção de 40 aminoácidos em LgMSP e LmMSP (SCHLAGENHAUF et al., 1998).

A estrutura tridimensional da LgMSP é compacta e pode ser dividida em três principais subdomínios: N-terminal, Central e C-terminal (Figura 3). O subdomínio N-terminal corresponde aos resíduos Val98 a Leu268 e possui um padrão de enovelamento similar ao módulo catalítico de outras zinco-proteases. O subdomínio N-terminal alberga os resíduos que compõem o sítio catalítico HEXXH (His262, Glu263 e His266), o *motif* de assinatura das metaloproteases zinco-dependentes.

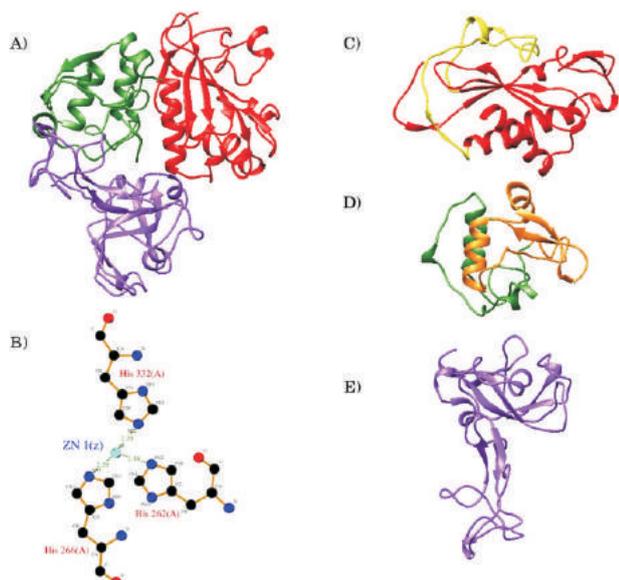


Figura 3. Representação da estrutura tridimensional obtida por modelagem comparativa. A) Estrutura terciária da LgMSP. Os subdomínios N-terminal, Central e C-terminal são representados pelas cores vermelho, verde e roxo, respectivamente. B) Coordenação dos resíduos de histidinas ao átomo de zinco em distâncias inferiores a 3.0Å. C) Representação individual do subdomínio N-terminal. O segmento colorido em amarelo corresponde à substituição da fita- β mencionada no texto. D) Subdomínio Central. A cor laranja representa a inserção de 61 aminoácidos entre a glicina imediatamente após o *motif* HEXXH e o terceiro resíduo de histidina envolvido na formação do sítio catalítico. E) subdomínio C-terminal, consistindo basicamente de fitas- β .

O subdomínio Central corresponde aos resíduos Gly269 a Thr388 e apresenta um padrão de enovelamento compacto com α -hélices anti-paralelas e fitas- β anti-paralelas, formando o cerne do subdomínio (Fig. 3). Uma única ponte dissulfeto é responsável por ligar os subdomínios Central e C-terminal. Membros da família da metzincina possuem um *motif* catalítico estendido HEXXHXXGXXH, onde o resíduo de glicina faz parte de uma pequena alça que projeta o terceiro resíduo de histidina dentro do sítio catalítico, colocando sua cadeia lateral em coordenação com o átomo de zinco. Interessantemente, a LgMSP apresenta uma inserção de 61 resíduos entre a Gly269 do *motif* estendido e a His332, que também se coordena ao zinco. Essa inserção entre o resíduo de glicina e a terceira histidina está presente em todos os membros do grupo das leishmanolisinas (SCHLAGENHAUF et al., 1998; GOMIS-RUTH, 2003; RAZZAZAN et al., 2008).

A geometria dos resíduos em coordenação ao zinco é similar aos de outras zinco proteases. O átomo de zinco está coordenado às cadeias laterais da His262, His266 e His332 em distâncias de 2.3Å, 2.2Å e 2.2Å, respectivamente (Figura 3). Em adição aos três resíduos de histidina no sítio catalítico, existe uma molécula de água coordenada ao zinco. Essa molécula de água está localizada muito próxima ao átomo de zinco e é o nucleófilo responsável por atacar o substrato, um mecanismo denominado hidrólise. Ainda no sítio ativo da LgMSP, o átomo de zinco parece estar coordenado com a cadeia lateral do Glu263, em uma distância de 1.9Å.

O subdomínio C-terminal corresponde à região entre os aminoácidos Lys389 a Asp572. Dentro desse domínio estão localizadas seis das nove pontes dissulfeto da

estrutura, indicando que este domínio é extremamente rígido. A âncora GPI é adicionada nos últimos resíduos do subdomínio C-terminal e é caracterizado como uma alça em espiral, similar a uma α -hélice.

Conservação da estrutura terciária da LgMSP

Para fim comparativo, nós investigamos a conservação da estrutura terciária da LgMSP em relação à LmMSP (Figura 4). O alinhamento estrutural entre LgMSP e LmMSP mostrou que ambas as estruturas apresentam as mesmas características estruturais, especialmente dos subdomínios C-terminal e Central. Por outro lado, o subdomínio C-terminal não se apresenta tão conservado quanto os demais subdomínios. Contudo, essa divergência não é encarada com surpresa, pois a região C-terminal de todas as MSPs estudadas costumam ser divergentes, até mesmo entre membros de uma mesma espécie (YAO, 2003). Ademais, o RMSD (*Root-mean-square deviation*) foi de 0,125 e indica grande similaridade estrutural entre as estruturas analisadas.

Considerando que a interação enzima/substrato é influenciada não apenas por aspectos topológicos, mas também pela complementaridade das cargas na interface de contato (SHEINERMAN et al., 2000), decidiu-se investigar a distribuição das cargas parciais de superfície (Figura 5). O mapa de distribuição das cargas, revelou que a LgMSP é predominantemente positiva na região da fenda catalítica. Em contraste, a carga ao redor da fenda catalítica é negativa. Tais resultados são semelhantes aos da LmMSP (SCHLAGENHAUF et al., 1998), indicando que ambas as moléculas atuam sobre os mesmos substratos e, por conseguinte, desempenham a mesma função em *L. guyanensis* e *L. major*.

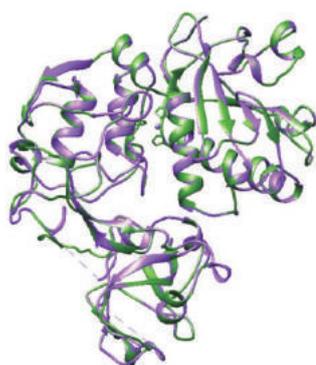


Figura 4. Sobreposição estrutural. Alinhamento estrutural entre LgMSP (verde) e LmMSP (roxo), evidenciando a grande conservação estrutural, sobretudo, dos subdomínios C-terminal e Central.

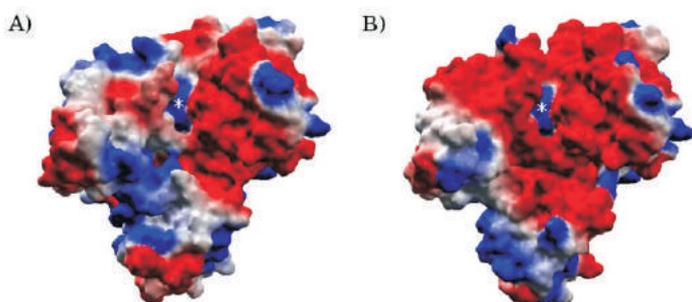


Figura 5. Mapa de distribuição de cargas. Representação das cargas parciais de superfície da LgMSP (A) e LmMSP (B). As cores azul, vermelho e branco correspondem às cargas positiva, negativa e neutra, respectivamente. O asterisco (branco) indica a fenda catalítica.

4. Conclusão

A LgMSP possui importante papel na interação da *L. guyanensis* com o hospedeiro. Devido sua importância como fator de virulência, o estudo da LgMSP abre novas possibilidades para o tratamento profilático e/ou terapêutico da infecção pela *L. guyanensis*, que poderia diminuir drasticamente o número de novos casos de LTA. Uma dessas possibilidades é o desenho racional de fármacos baseado na estrutura da LgMSP que sejam capazes de impedir ou inativar a função dessa enzima. Por conseguinte, o parasito seria eliminado diretamente pela ação do fármaco, ou pelo menos, teria sua densidade populacional reduzida, o que diminuiria a morbidade e possibilitaria a eliminação do parasito pelo sistema imunológico.

5. Referências Bibliográficas

- ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. E35671. 2012.
- AMATO, V. S.; BOULOS, M. I.; AMATO, N. V.; FILOMENO, L. T. The use of a silicone T tube for the treatment of a case of American mucocutaneous leishmaniasis with tracheomalacia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, n. 2, p. 129-130. 1995.
- BENDTSEN, J. D.; NIELSEN, H.; HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, n. 4, p. 783-795. 2004.
- BRITTINGHAM, A.; MORRISON, C. J.; McMASTER, W. R.; McGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; MOSSER, D. M. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **The Journal of Immunology**, v. 155, n. 6, p. 3102-3111. 1995.
- BRYSON, K.; MCGUFFIN, L. J.; MARSDEN, R. L.; WARD, J. J.; SODHI, J. S.; JONES, D. T. Protein structure prediction servers at University College London. **Nucleic Acids Research**, v. 33 (Web Server), n. 1, p. W36-W38. 2005.
- CALIXTO, P. H. M. et al. Gene identification and comparative molecular modeling of a *Trypanosoma rangeli* major surface protease. **Journal of Molecular Modeling**, v. 19, n. 8, p. 3053-3064. 2013.
- CHAUDHURI, G.; CHANG, K. P. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 27, n. 1, p. 43-52. 1988.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, v. 2, n. 9, p. 1511-1519. 1993.
- DILL, K. A.; MACCALLUM, J. L. The protein-folding problem, 50 years on. **Science**, v. 23, n. 338, p. 1042-1046. 2012.
- ETGES, R.; BOUVIER, J.; BORDIER, C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a protease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 20, p. 9098-9101. 1986.
- FAURE, G.; SAUL, F. **Crystallographic characterization of functional sites of crotoxin and ammodytoxin, potent β -neurotoxins from Viperidae venom.** **Toxicon**, v. 15, n. 60, p. 531-538. 2012.
- GOMIS-RUTH, F. X. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. **Molecular Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 157-200. 2003.
- GRIMALDI-Jr, G.; MOMEN, H.; NAIFF, R. D.; McMAHON-PRATT, D.; BARRETT, T. V. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild animals, and sandflies in the Amazon region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 1, p. 645-661. 1991.
- HEY, A. S.; THEANDER, T. G.; HVIID, L.; HAZRATI, S. M.; KEMP, M.; KHARAZMI, A. The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. **The Journal of Immunology**, v. 152, n. 9, p. 4542-4548. 1994.
- JARAMILLO, M.; GOMEZ, M. A.; LARSSON, O.; SHIO, M. T.; TOPISIROVIC, I.; CONTRERAS, I.; LUXENBURG, R.; ROSENFELD, A.; COLINA, R.; McMASTER, R. W.; OLIVIER, M.; COSTA-MATTIOLI, M.; SONENBERG, N. *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. **Cell Host Microbe**, v. 9, n. 4, p. 331-341. 2011.
- LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948. 2007.
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; MOSS, D. S.; THORNTON, J. M. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 1, p. 283-291. 1993.
- LESCRINIER, E. Structural biology in drug development. **Verhandelingen - Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België**, v. 73, n. 2, p. 65-78. 2011.
- LIU, T.; TANG, G. W.; CAPRIOTTI, E. Comparative modeling: the state of the art and protein drug target structure prediction. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 14, n. 6, p. 532-547. 2011.
- MARSDEN, P. D.; TADA, M. S.; BARRETO, A. C.; CUBA, C. C. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis* skin ulcers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 1, p. 561-562. 1984.
- MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p. 859-876. 1986.
- McGWIRE, B. S.; O'CONNELL, W. A.; CHANG, K. P.; ENGMAN, D. M. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 8802-8809. 2002.
- MILLER, R. A.; REED, S. G.; PARSONS, M. *Leishmania* gp63 molecule implicated in cellular adhesion lacks an Arg-Gly-Asp sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 39, n. 2, p. 267-274. 1990.
- MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **The Journal of Immunology**, v. 135, n. 4, p. 2785-2789. 1985.
- MUNIZ, J. R. et al. The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. **Toxicon**, v. 52, n. 7, p. 807-816. 2008.
- OLIVEIRA, C. P.; JUNGER, J.; PIRES, F. E. S. S.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; FERNANDES, O.; PIRMEZ, C. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 12, p. 1112-1117. 2006.
- PEI, J.; TANG, M.; GRISHIN, N. V. PROMALS3D web server for accurate multiple protein sequence and structure alignments. **Nucleic Acids Research**, v. 36 (Web Server), n. 1, p. W30-W34. 2008.
- PETERSEN, E.F. et al. UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612. (2004).
- PIERLEONI, A.; MARTELLI, P. L.; CASADIO, R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 392, p. 1-11. 2008.

- RAZZAZAN, A.; SABERI, M. R.; JAAFARI, M. R. Insights from the analysis of a predicted model of gp63 in *Leishmania donovani*. **Bioinformation**, v. 3, n. 3, p. 114-118. 2008.
- SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779-815. 1993.
- SCHLAGENHAUF, E.; ETGES, R.; METCALF, P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). **Structure**, v. 6, n. 8, p. 1035-1046. 1998.
- SHEINERMAN, F. B.; NOREL, R.; HONIG, B. Electrostatic aspects of protein-protein interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, n. 2, p. 153-159. 2000.
- SILVA, J. O. et al. Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. **Toxicon**, v. 50, n. 2, p. 283-291. 2007.
- THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. MolDock: A New Technique for High-accuracy Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 3315-3321. 2006.
- WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in 15 three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35 (Web Server). n. 1, p. W407-W410. 2007.
- WILKINS, M. R.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; SANCHEZ, J. C.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. F. Protein identification and analysis tools in the ExpASY server. **Methods in Molecular Biology**, v. 112, n. 1, p. 531-552. 1999.
- WIRMER-BARTOSCHEK, J.; BARTOSCHEK, S. NMR in drug discovery on membrane proteins. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 7, p. 869-875. 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. Geneva: WHO, 2010, 202 p.
- 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. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1-16. 2003.