UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ALLANA KELLY OLIVEIRA DUTRA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE PROTEÍNAS GP63 PARÁLOGAS EM ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*

Recife
2021

ALLANA KELLY OLIVEIRA DUTRA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE PROTEÍNAS GP63 PARÁLOGAS EM ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto
Coorientador: Dr. Wagner Tenório dos Santos

Recife
2021

Catalogação na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Dutra, Allana Kelly Oliveira
Avaliação da expressão e localização subcelular de proteínas GP63 parálogas em espécies de *Leishmania* / Allana Kelly Oliveira Dutra - 2021.
77 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompilio de Melo Neto
Coorientador: Wagner Tenório dos Santos
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Proteína de virulência 2. Genes parálogos 3. *Leishmania* I. Melo Neto, Osvaldo Pompilio de (Orientador) II. Santos, Wagner Tenório dos (Coorientador) III. Título

616.9364 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2021-173

ALLANA KELLY OLIVEIRA DUTRA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE PROTEÍNAS GP63 PARÁLOGAS EM ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*

Aprovado em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA:

_____

Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

_____

Dr. Tercílio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Dra. Isabelle Freire Tabosa Viana
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Recife
2021

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Osvaldo Pompilio, pela confiança, por todo o suporte e conhecimento repassado;

Aos meus coorientadores de mestrado e de vida, Wagner Tenório e Adriana Neuman, por todos os conhecimentos compartilhados, pela parceria, por todo apoio, por toda a paciência ao me orientarem e por acreditarem em mim;

Aos meus pais, que mesmo de longe sempre me incentivaram, sempre me apoiaram e me deram todo o suporte para continuar;

Ao meu namorado, que mesmo de longe sempre esteve disposto a me ouvir e ajudar no que eu precisasse;

A minha tia Ruth e seu marido Izaque, por terem me permitido morar com eles ao longo desses últimos 4 anos;

Ao restante da minha família, por terem me apoiado e me dado todo o suporte na ausência dos meus pais;

A todo o corpo docente da Pós-Graduação em Genética pela minha formação;

Aos meus amigos de colégio, em especial Lorenna Lira, por tantas vezes ter me ouvido chorar e ter me ajudado durante momentos difíceis, a Allan Medeiros, Carolina Queiroz, Yuri Henrique e Letícia Escóssia, por sempre me proporcionarem momentos únicos;

A todas as pessoas maravilhosas que já fizeram ou ainda fazem parte do departamento de Microbiologia, em especial a Lilian, Maria, Ludmila, Igor, Tallyta, Adriana Roberto, Thaíse, Gustavo, Moezio, Camila, Irassandra, Isis, Renata, Rafaela, Yallen, Stephanny, Maressa e vários não citados, por estarem sempre dispostos a ajudar e por terem feito os dias melhores dentro e fora do laboratório;

A Carol Pereira, por ser a melhor secretária que o departamento poderia ter;

A Dra. Danielle Moura, por todo o suporte durante os últimos experimentos do mestrado;

A plataforma do NPT, por todos os serviços prestados com excelência;

A Artur Leonel, por ter me apresentado ao universo GP63;

A todos aqueles que não foram citados, mas que, de alguma forma, me ajudaram nessa jornada;

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Parasitas flagelados do gênero *Leishmania*, agentes etiológicos da leishmaniose, apresentam como importante fator de virulência a protease GP63, codificada por um número grande de genes parálogos localizados em cromossomos distintos (10, 28 e 31). O significado funcional destes múltiplos parálogos permanece desconhecido, porém estudos prévios implicaram os genes localizados no cromossomo 10 na patogênese no hospedeiro mamífero. Estes genes foram classificados em grupos diferentes baseados na extremidade C-terminal dos respectivos polipeptídios. Este estudo buscou avaliar representantes desses grupos quanto a sua expressão e localização subcelular em *L. braziliensis* e *L. infantum*, buscando identificar diferenças funcionais. Para isso foram utilizados soros produzidos contra peptídeos encontrados em GP63 de *L. braziliensis*, sendo dois encontrados em parálogos específicos e um terceiro conservado em todos aqueles com genes localizados no cromossomo 10. Testes com proteínas recombinantes primeiro nos permitiram confirmar especificidades distintas em relação aos parálogos de GP63 para os anticorpos gerados. Estes foram então utilizados para se avaliar a expressão da proteína ao longo de curvas de crescimento de formas de vida de ambas as espécies. Com isso observou-se a expressão muitas vezes simultânea, porém com perfis distintos, de diferentes parálogos. Perfis distintos de localização subcelular também foram identificados com os diferentes anticorpos em frações proteicas dos parasitas produzidas com digitonina. Por fim, ensaios de imunofluorescência confirmaram a localização em membrana de ao menos um grupo de parálogos. Estes estudos evidenciam diferenças claras entres parálogos distintos que, entretanto, ainda necessitam ser melhor caracterizadas.

PALAVRAS-CHAVE: Proteína de virulência. Genes parálogos. *Leishmania*.

ABSTRACT

Flagellated parasites of the *Leishmania* genus, etiologic agents of leishmaniasis, have the protease GP63 as an important virulence factor, encoded by a large number of related genes localized on different chromosomes (10, 28 and 31). The functional significance of these multiple paralogues remains unknown, but previous studies have implicated genes localized on chromosome 10 in the pathogenesis of the mammalian host. These genes were classified into different groups based on the C-terminal end of the respective polypeptides. This study sought to evaluate representatives of these groups regarding their expression and subcellular location in *L. braziliensis* and *L. infantum*, seeking to identify functional differences. For this, sera produced against peptides found in *L. braziliensis* GP63 were used, two found in specific paralogues and a third preserved in all those encoded by genes localized on chromosome 10. Tests with recombinant proteins first allowed us to confirm distinct specificities in relation to the GP63 paralogues for the generated antibodies. These were then used to evaluate the protein's expression along growth curves of life forms of both species. As a result, mostly simultaneous expression, but with different profiles, were observed for different paralogues. Different profiles of subcellular location were also identified with the different antibodies in parasite's protein fractions produced with digitonin. Finally, immunofluorescence assays confirmed the membrane location of at least one group of paralogues. These studies show clear differences between different paralogues that, however, still need to be better characterized.

KEY-WORDS: Virulence protein. Paralog genes. *Leishmania*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Classificação esquemática das espécies de *Leishmania* em seus respectivos subgêneros..... 18

Figura 2 — Principais formas de vida de *Leishmania sp*..... 19

Figura 3 — Ciclo de vida de *Leishmania sp*..... 20

Figura 4 — Lesões características da LT..... 22

Figura 5 — Criança com hepatoesplenomegalia característica de LV..... 23

Figura 6 — Países endêmicos para LT em 2018..... 24

Figura 7 — Países endêmicos para LV em 2018..... 25

Figura 8 — Características comuns às três vias do sistema completemento..... 26

Figura 9 — Esquema geral das citocinas envolvidas na imunopatogenia da leishmaniose..... 29

Figura 10 — Representação esquemática de moléculas presentes na superfície de promastigotas de Leishmania..... 30

Figura 11 — Disposição em tandem dos genes de GP63 no cromossomo 10 de *L. braziliensis*..... 32

Figura 12 — Diferenças na região C-terminal de parálogos de GP63 de espécies de Leishmania..... 34

Figura 13 — Análise por RNAseq dos mRNAs codificantes de GP63 de formas promastigotas de *L.braziliensis*..... 37

Figura 14 — Representação esquemática das proteínas de GP63 de *L. braziliensis*..... 38

Figura 15 — Características de C-terminal das GP63 de L. braziliensis do novo sequenciamento..... 47

Figura 16 — Posição dos peptídeos utilizados na estrutura 3D de proteínas GP63..... 48

Figura 17 — Representação esquemática da topologia das proteínas LbrM.10.0520 e LbrM.10.0590 na membrana plasmática..... 49

Figura 18 — Ensaios de Western Blot dos soros anti-GP63 frente a proteínas recombinantes..... 50

Figura 19 — Análise comparativa das sequências envolvidas no estudo... 51

Figura 20 — Análise dos motivos de reconhecimento nas sequências

de GP63 do cromossomo 10 de *L. braziliensis*..... 52
Figura 21 — Análise dos motivos de reconhecimento nas sequências de GP63 do cromossomo 31 de *L. braziliensis*..... 53
Figura 22 — Análise dos motivos de reconhecimento nas sequências do cromossomo 10, 28 e 31 de *L. infantum*..... 54
Figura 23 — *Western Blot* dos anticorpos anti-GP63 frente a curvas de crescimentos de promastigotas de *L. braziliensis*..... 56
Figura 24 — *Western Blot* dos anticorpos anti-GP63 frente a curvas de crescimentos de promastigotas de *L. infantum*..... 58
Figura 25 — *Western Blot* dos anticorpos anti-GP63 frente a curvas de crescimentos de amastigotas de *L. infantum*..... 60
Figura 26 — *Western Blot* dos anticorpos de GP63 frente ao fracionamento de *L. braziliensis*..... 62
Figura 27 — *Western Blot* dos anticorpos anti-GP63 frente ao fracionamento de *L. infantum*..... 63
Figura 28 — Imunofluorescência de células de *L. braziliensis* com anticorpo 10.0520..... 64
Figura 29 — Imunofluorescência de células de *L. infantum* com anticorpo 10.0520..... 65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 — Sequência de aminoácidos dos peptídeos utilizados para síntese dos anticorpos do estudo..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DO	Densidade óptica
eIF4E	Fator de iniciação da tradução eucariótico 4 E
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GIPLs	Glicoinositolfosfolipideos
GP63	Glicoproteína 63
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GST	Glutationa S-transferase
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
IRAK-1	Quinase associada o receptor de interleucina
JAK/STAT	Janus quinase/Transdutores de Sinal
kDa	Kilodaltons
KLH	Hemocianina de lapa californiana
KMP-11	Proteína de membrana cinetoplástica de 11 kilodaltons
LB	Luria Bertani
LT	Leishmaniose Tegumentar
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniose Visceral
MARCK	Substrato de quinase C rico em alanina miristoilada
MAPK	Proteíno-quinase ativada por mitógeno
MRP	Proteínas relacionadas ao substrato de quinase C rico em alanina miristoilada
MSP	Principal proteína de superfície
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC1	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos complexo 1
NO	Óxido Nítrico
SDS- PAGE	Dodecil sulfato de sódio – Eletroforese em gel de Poliacrilamida
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino

PKC	Proteína quinase C
PPGs	Proteofosfoglicanos
PTPs	Proteínas tirosina fosfatase
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
TBS	Tampão salino tris
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
WB	*Western Blot*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 14
1.1 OBJETIVOS..... 15
1.1.1 Objetivo Geral..... 15
1.1.2 Objetivos Específicos..... 15
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 17
2.1 OS TRYPANOSSOMATÍDEOS..... 17
2.2 GÊNERO *LEISHMANIA*..... 17
2.2.1 Morfologia e Ciclo de Vida..... 18
2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS..... 20
2.3.1 Leishmaniose Tegumentar..... 21
2.3.2 Leishmaniose Visceral..... 22
2.4 EPIDEMIOLOGIA..... 23
2.5 PERFIL IMUNOLÓGICO DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA*..... 25
2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *LEISHMANIA SP*..... 29
2.6.1 GP63..... 31
2.6.1.1 Organização Genômica..... 32
2.6.1.2 Funções no Hospedeiro Vertebrado..... 34
2.6.1.3 Funções no Hospedeiro Invertebrado..... 35
2.7 ESTUDOS PRÉVIOS QUE ORIGINARAM ESTE TRABALHO..... 36
3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 40
3.1 PRODUÇÃO DE SOROS ANTI-GP63..... 40
3.2 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS GP63..... 40
3.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA..... 41
3.4 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS POR IMUNOADSORÇÃO..... 41
3.5 CULTIVO CELULAR DE FORMAS PROMASTIGOTAS, AMASTIGOTAS E CURVAS DE CRESCIMENTO..... 42
3.6 FRACIONAMENTO CELULAR POR GRADIENTE DE DIGITONINA..... 43
3.7 *WESTERN BLOT*..... 44
3.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA 45
3.9 ANÁLISES COMPUTACIONAIS..... 46
4 RESULTADOS..... 47

4.1 ANÁLISE DE MOTIVOS DE RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS DE GP63..... 47
4.2 RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS DE GP63 FRENTE A CURVAS DE CRESCIMENTO DE PROMASTIGOTAS DE *I. BRAZILIENSIS*..... 55
4.3 RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS DE GP63 FRENTE A CURVAS DE CRESCIMENTO DE PROMASTIGOTAS DE *L. INFANTUM*..... 57
4.3.1 Curvas de Crescimento de Promastigotas..... 57
4.3.2 Curvas de Crescimento de Amastigotas..... 59
4.4 RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS DE GP63 FRENTE A FRACIONAMENTOS CELULARES POR GRADIENTE DE DIGITONINA..... 61
4.4.1 Fracionamento Celular de Promastigota de *L. braziliensis*..... 61
4.4.2 Fracionamento Celular de Promastigota de *L. infantum* 62
4.5 ENSAIOS DE IMUNOFUORESCÊNCIA COM O ANTICORPO 10.0520..... 63
5 DISCUSSÃO..... 66
6 CONCLUSÕES..... 71

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical considerada como um grave problema de saúde pública mundial, afetando até 1,6 milhões de pessoas por ano em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento. É por isso categorizada pela Organização Mundial de Saúde como uma doença tropical negligenciada. Esta enfermidade é causada por protozoários flagelados da família Trypanossomatidae e gênero *Leishmania.* Ao longo de sua evolução, as espécies de *Leishmania* desenvolveram métodos de escape que permitem sobreviver frente a resposta imune do seu hospedeiro, o que permite a multiplicação do parasita durante o processo de infecção.

Durante os momentos iniciais da infecção, os protozoários do gênero *Leishmania* se deparam com ações do sistema imune do hospedeiro na tentativa de impedir sua sobrevivência. Para neutralizá-las estes parasitas fazem uso então de moléculas denominadas fatores de virulência, tendo como principal representante a glicoproteína 63 (GP63). A GP63 é uma das principais proteínas de superfície de espécies de *Leishmania*, geralmente apresentando uma massa molecular de aproximadamente 63 kDa e ancorada a membrana plasmática por uma molécula de glicofosfatidilinositol (GPI). Dentre suas principais funções ligadas aos mecanismos de evasão do sistema imune, podem ser citadas: inibição do sistema complemento; facilitação de fagocitose de promastigotas por macrófagos; promoção da migração do parasita através da matriz extracelular; inibição da função de células *natural killer*; degradação de proteínas citosólicas de macrófagos e fibroblastos com implicações na transdução de sinais celulares; e a promoção da sobrevivência das formas amastigotas intracelulares. Além das funções no hospedeiro mamífero, a proteína GP63 também possui ações nos hospedeiros invertebrados, promovendo o favorecimento da sobrevida do parasita contra enzimas digestivas do intestino do inseto, além de funções de adesão e nutrição.

Em relação à sua organização genômica, foram observados múltiplos genes que codificam parálogos de GP63. Também se observou que há uma diferença significativa na quantidade desses genes entre as espécies de *Leishmania*, com destaque para a *Leishmania braziliensis* que apresenta cerca de cinco vezes mais genes que outras espécies infectivas para humanos. Estudos prévios

demonstraram que essa quantidade de genes de GP63 em *L. braziliensis* pode estar associada a diferentes atividades que variam de acordo com o ciclo de vida do parasita. Como exemplo, os genes localizados no cromossomo 31 poderiam estar relacionados as funções exercidas no inseto vetor, enquanto os genes no cromossomo 10 estariam relacionados a ações no hospedeiro mamífero. Análises genômicas realizadas nos genes presentes no cromossomo 10, demonstraram a separação dos mesmos em três grupos com base nas diferenças existentes nas suas sequências C-terminais. Estas diferenças, podem indicar padrões distintos de localização subcelular ou de expressão ao longo do ciclo de vida de *L. braziliensis* e ligadas a funções também diferenciadas.

Pelo exposto, estudos que possam identificar diferenças funcionais entre grupos de GP63 de *L. braziliensis*, comparando-os a GP63 de outras espécies, são indispensáveis para contribuir no entendimento do seu papel na patogenicidade destes parasitas, conhecimento que pode levar a novas alternativas de controle da leishmaniose. Este trabalho buscou então investigar diferenças no padrão de expressão de parálogos de GP63 selecionados ao longo do ciclo de vida dos parasitas, avaliando ainda sua localização subcelular.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão e localização subcelular de grupos de parálogos de GP63 em estágios representativos do ciclo de vida de *L. infantum* e *L. braziliensis*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o reconhecimento, de forma específica, de proteínas representantes dos grupos de parálogos de GP63, de *L. infantum* e *L. braziliensis*, por soros produzidos contra peptídeos selecionados destas proteínas;
- Analisar, de forma comparativa, a expressão proteica dos representantes

dos grupos de parálogos de GP63 em estágios representativos do ciclo de vida de *L. infantum* e *L. braziliensis*;

- Identificar a localização subcelular no parasita de grupos de paralógos selecionados de acordo com os dados de expressão destas proteínas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 OS TRYPANOSSOMATÍDEOS

A família Trypanosomatidae é composta por 17 gêneros distintos de protozoários, parasitas unicelulares obrigatórios que possuem como característica comum uma organela denominada cinetoplasto, localizada próximo ao núcleo e que contem múltiplas moléculas de DNA circular (AKHOUNDI et al., 2016; MEYER; MUSACCHIO; MENDONÇA, 1958). Apesar dessa semelhança, estes parasitas divergem em sua bioquímica e morfologia.

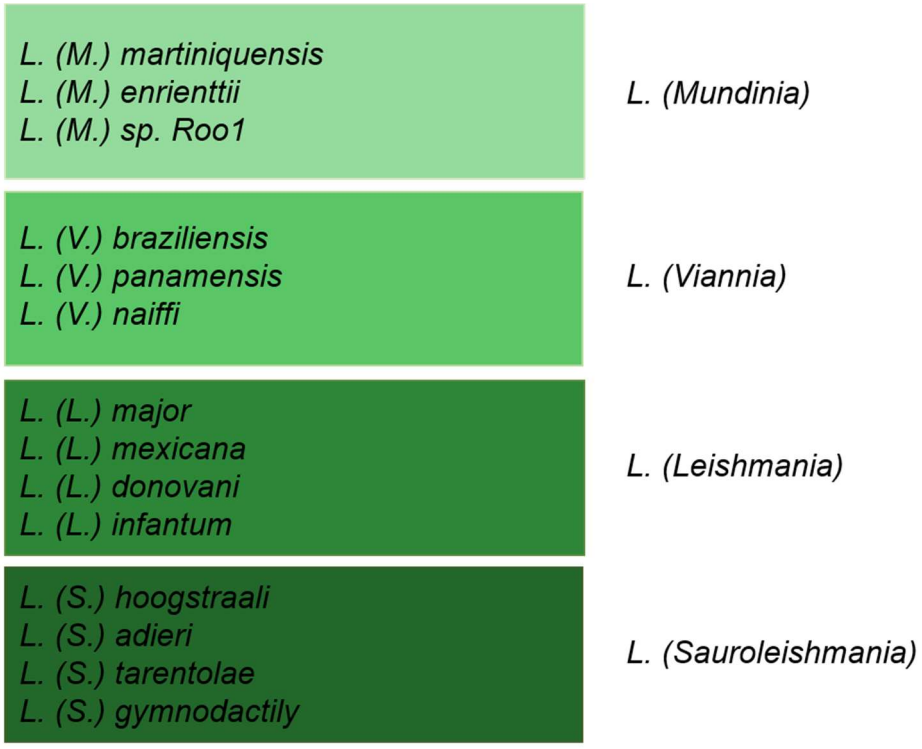
Devido às suas diferentes características, os tripanossomatídeos possuem uma ampla variedade de hospedeiros, dentre eles vertebrados, invertebrados e plantas. Em sua maioria apresentam um único hospedeiro, porém, as espécies mais bem estudadas são as que apresentam dois hospedeiros, devido ao seu impacto na saúde pública e seus efeitos socioeconômicos (CONTEH; ENGELS; MOLYNEUX, 2010). Dentre essas espécies, destacam-se os parasitas dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, responsáveis por causar doenças consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como a doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), tripanossomíase humana africana (*Trypanosoma brucei*) e leishmaniose (*Leishmania sp.*) (WHO 2020).

2.2 GÊNERO *LEISHMANIA*

O gênero *Leishmania* compreende mais de 50 espécies diferentes de protozoários, dos quais pelo menos 20 são patogênicos para seres humanos, responsáveis pelas mais variadas formas de leishmaniose (AKHOUNDI et al., 2016). Estudos filogenéticos permitiram a classificação dessas espécies em quatro subgêneros distintos, denominados *Leishmania, Viannia*, *Sauroleishmania* e *Mundinia*. Os subgêneros *Leishmania* e *Mundinia* possuem espécies encontradas no Novo Mundo (Américas) e Velho Mundo (Europa, Ásia e África), enquanto o *Viannia* é endêmico apenas no Novo Mundo (ESPINOSA et al., 2018). Já o subgênero *Sauroleishmania* está presente apenas no Velho Mundo e é composto por espécies não patogênicas para humanos (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

As principais espécies presentes em cada subgênero estão representadas na Figura 1.

Figura 1. Classificação esquemática das espécies de *Leishmania* em seus respectivos subgêneros. Os retângulos em verde contêm algumas das espécies de *Leishmania* dos respectivos subgêneros, ao lado direito dos retângulos.

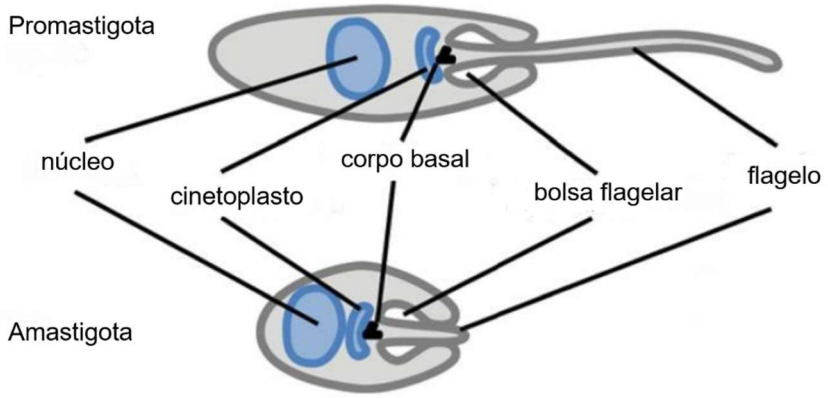


Fonte: Adaptado de ESPINOSA et al 2016.

2.2.1 Morfologia e Ciclo de Vida

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam duas formas morfológicas principais: a amastigota, presente no hospedeiro vertebrado; e a promastigota, no inseto vetor. Às formas promastigotas em seu último estágio de maturação, dá-se o nome de promastigotas metacíclicos. Ambos os tipos celulares apresentam estruturas em comum como um único núcleo, cinetoplasto, corpo basal, bolsa flagelar e flagelo, com um longo flagelo externalizado apenas na forma promastigota (SUNTER; GULL, 2017). Estas duas morfologias e os seus constituintes estão representadas na figura 2.

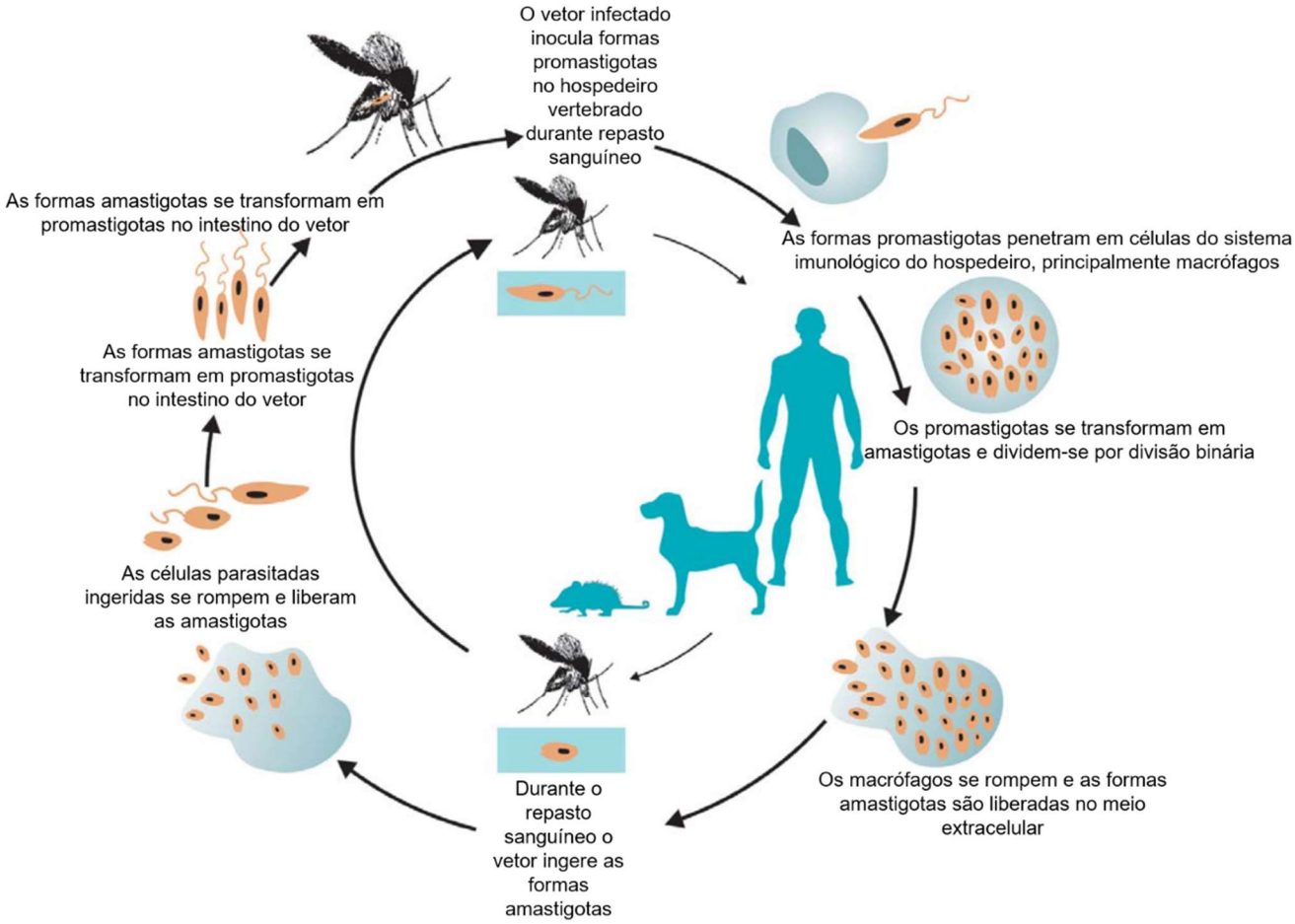
Figura 2. Principais formas de vida de *Leishmania sp*. Figura ilustrativa que demonstra as estruturas celulares que as formas amastigotas e promastigotas apresentam em comum.



Fonte: Adaptado de Sunter; Gull 2017.

A infecção por *Leishmania* se inicia através da picada de insetos fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007). No momento do repasto sanguíneo, realizado pelas fêmeas dos flebotomíneos, as formas promastigotas metacíclicas são inseridas no hospedeiro mamífero e fagocitadas por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Uma vez dentro das células do hospedeiro, as promastigotas transformam-se em formas amastigotas intracelulares, multiplicam-se por divisão binária, rompem a célula e infectam novas células. O ciclo é completado quando o inseto se alimenta novamente em hospedeiros que atuam como reservatórios, como roedores e cães, e ingere formas amastigotas, que se transformam em promastigotas no seu intestino. As formas promastigotas migram então para a probóscide do inseto e se tornam aptas para reiniciar seu ciclo de vida com a picada posterior (Figura 3) (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania sp.*



Fonte: Adaptado de Motta et al. 2010.

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A infecção por espécies de *Leishmania* em humanos pode levar a uma variedade de manifestações clínicas que ocorrem devido a diferenças nas espécies de *Leishmania* e a resposta imunológica dos hospedeiros. Elas são divididas em dois grandes grupos principais: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV). Baseado na resposta do hospedeiro frente à infecção pelo parasita, assim como na evolução clínica do paciente, a LT engloba diferentes manifestações clínicas, caracterizadas de acordo com os tipos de lesões que podem ser originadas, como lesões cutâneas localizadas, difusas, disseminadas e mucosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

2.3.1 Leishmaniose Tegumentar

A forma mais comum de Leishmaniose Tegumentar (LT) é a leishmaniose cutânea localizada, que é caracterizada pelo aparecimento de uma lesão única no local de picada do inseto, geralmente em áreas mais expostas do corpo como rosto, mãos e pernas. As lesões geralmente começam com vermelhidão e inchaço e vão gradativamente aumentando de tamanho durante todo o período de incubação, que pode variar de dez dias até três meses. Eventualmente, se torna uma úlcera de base eritematosa com bordas bem delimitadas (Figura 4A) (DOWLATI, 1996). O processo de progressão para úlcera pode levar de meses a anos, a depender do parasita responsável pela infecção, carga parasitária e imunocompetência do paciente. No Brasil, as principais espécies envolvidas com essa manifestação são *Leishmania amazonensis, Leishmania mexicana, Leishmania braziliensis e Leishmania guyanensis* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

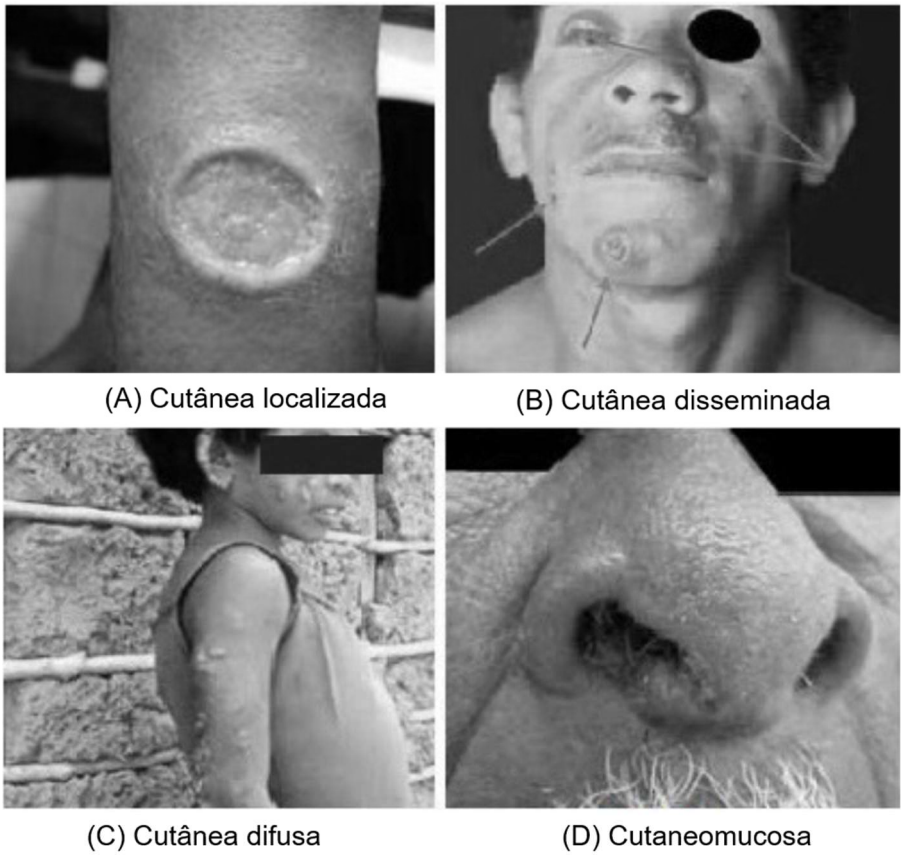
A forma cutânea disseminada é a forma mais rara da doença, caracterizada pelo aparecimento de diversas lesões ulcerativas que podem se estender por diferentes áreas do corpo (figura 4B) (TURETZ et al., 2002). No início da infecção, sintomas como febre e mal-estar são comuns, sendo ocasionada pela disseminação linfo-hematogênica do parasita (CARVALHO et al., 1994). No Brasil, as principais espécies responsáveis são *L. mexicana, L. amazonensis* e *L. guyanensis* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A forma cutânea difusa da doença é uma forma rara que atinge mais frequentemente pacientes com deficiência no desenvolvimento da resposta imunológica contra o parasita (CONVIT; PINARDI; RONDÓN, 1972). É caracterizada inicialmente pelo aparecimento de uma lesão única, de caráter nodular, que rapidamente progride e atinge grande parte do corpo (figura 4C) (BARRAL et al., 1995). No brasil, as principais espécies responsáveis por essa manifestação são *L. braziliensis, L. amazonensis* e *L. mexicana* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A forma cutaneomucosa da doença é caracterizada por lesões desfigurantes que acometem a mucosa das vias aéreas superiores (figura 4D). Geralmente, as lesões de mucosa ocorrem secundariamente a lesões cutâneas e podem levar meses ou anos para surgir (DAVID; CRAFT, 2009). Os primeiros sinais dessa forma clínica incluem espessamento da derme nasal, rinorreia, hiperemia e inchaço da

pirâmide nasal (LESSA et al., 2007). No Brasil, a espécie mais comumente responsável por esse tipo de lesão é a *L. braziliensis.* (ANVERSA et al., 2018).

Figura 4. Lesões características da LT. Na figura A está representada lesão única característica da leishmaniose cutânea localizada. Na figura, B as setas apontam para diferentes lesões na face do peciente, característica de leishmaniose cutânea disseminada. Na figura C está representada criança com múltiplas lesões na face e no braço, caracteristicas de leishmaniose cutânea difusa. Na figura D está representada lesão em mucosa nasal, característica de leishmaniose cutaneomucosa.



Fonte: Adaptado de Anversa et al. 2018.

2.3.2 Leishmaniose Visceral

Diferente das demais formas clínicas de leishmaniose, a Leishmaniose Visceral (LV) é a mais difícil de ser detectada, pois nem sempre vem acompanhada de ferimentos externos. Pode ser caracterizada por febre, anorexia, atrofia muscular e hepatoesplenomegalia (Figura 5). É uma doença crônica e pode ser fatal se o tratamento não for realizado, com sua morbimortalidade aumentada devido a presença de infecções secundárias que costumam aparecer, como pneumonia, tuberculose e disenteria (KARIMI; ALBORZI; AMANATI, 2016). No Brasil, a LV acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas

endêmicas 80% dos casos registrados ocorrem em crianças com menos de 10 anos (CHEN et al., 2018). A espécie de *Leishmania* que causa esse tipo de leishmaniose, no Brasil, é a *Leishmania infantum* (ANVERSA et al., 2018).

Figura 5. Criança com hepatoesplenomegalia característica de LV.

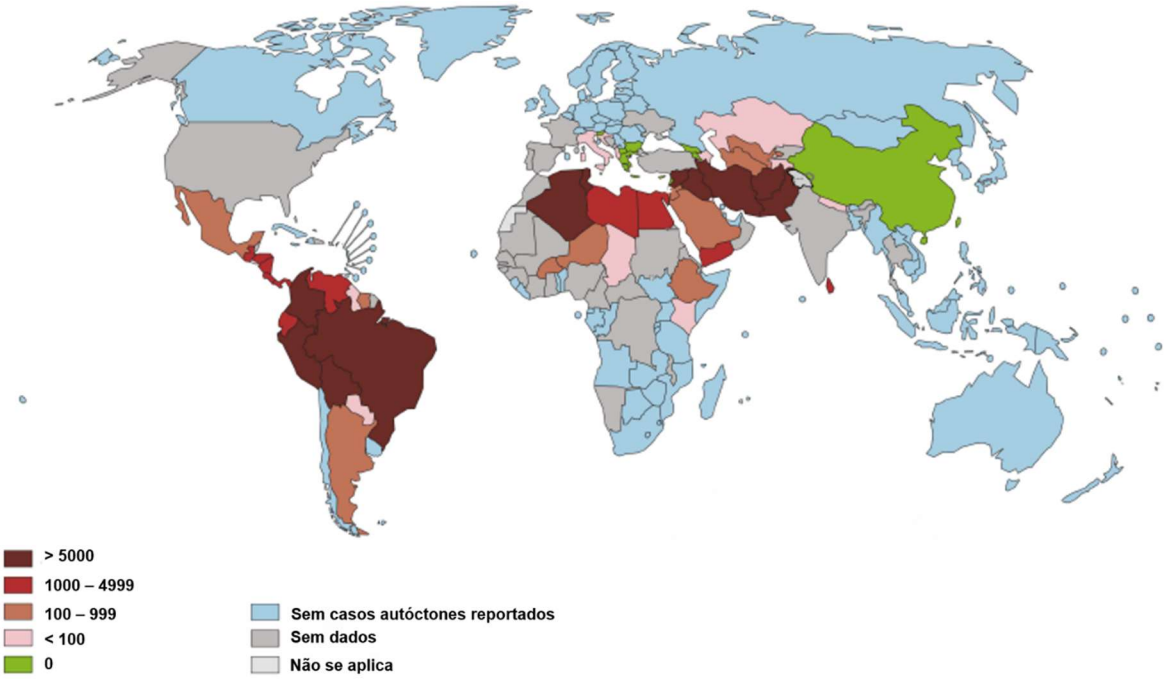
Fonte: Bowles et al 2015.

2.4 EPIDEMIOLOGIA

A leishmaniose afeta principalmente populações mais necessitadas da África, Ásia e América Latina, e está associada a uma série de fatores como condições de moradia, migração populacional e ausência de recursos da população afetada (GEORGIADOU; MAKARITSIS; DALEKOS, 2016), além de fatores ambientais como desmatamento e variáveis climáticas (ORYAN; AKBARI, 2016).

Em 2018, um total de 89 países foram considerados endêmicos para a LT (Figura 7). Dentre estes, 17 países pertencentes ao continente americano reportaram uma taxa média de 54 mil casos por ano, entre 2001 e 2019. Dos 41 mil casos reportados somente em 2019, 15.484 mil foram referentes ao Brasil, com a maioria dos casos identificados no sexo masculino (PAHO; WHO, 2020).

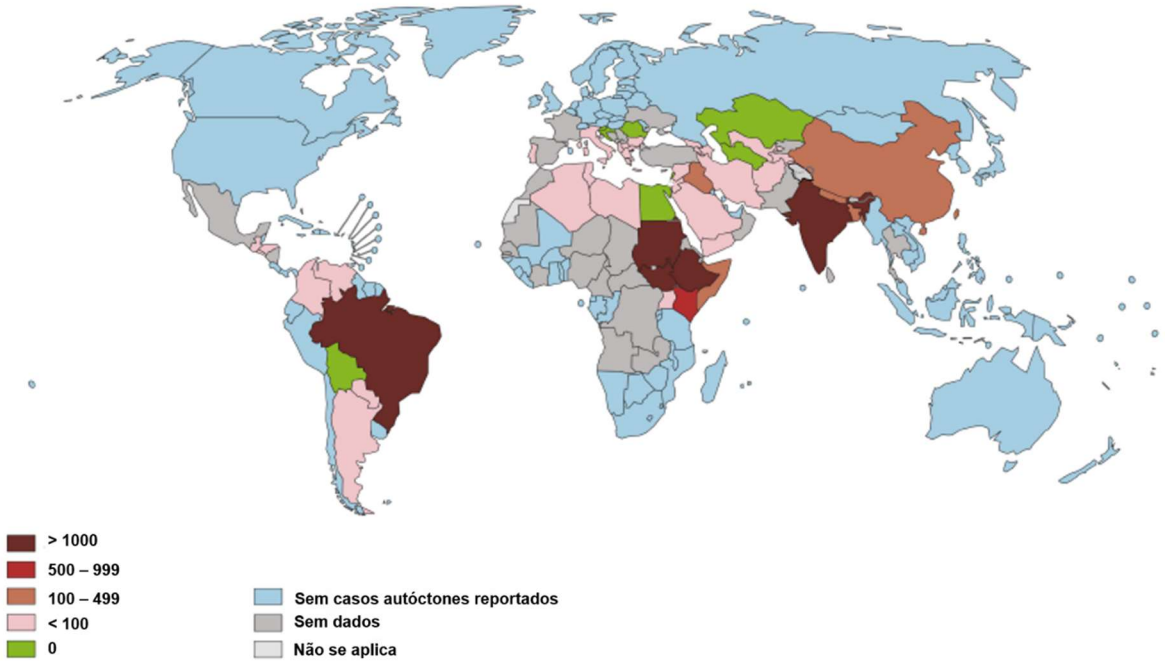
Figura 6. Países endêmicos para LT em 2018. Encontram-se destacados em cor de vinho os países com números de casos superiores a 5.000, incluindo o Brasil. Destacados em verde são os países sem casos reportados.



Fonte: Adaptado de WHO 2018.

No que diz respeito à LV, 75 países foram considerados endêmicos para esta forma em 2018 (Figura 7). Dentre estes, 13 são do continente americano e reportaram uma taxa média de 3.5 mil casos por ano entre 2001 e 2019 (PAHO; WHO, 2020). Em 2019, cerca de 2.5 mil casos foram registrados somente no Brasil, representando 97% do total de casos para o ano. A maioria dos casos foram identificados em homens e cerca de 10% apresentaram co-infecção com HIV (PAHO; WHO, 2020). No Brasil, ao longo dos anos, foi possível observar uma mudança no padrão epidemiológico da LV, passando de uma doença predominantemente rural para urbana. Acredita-se que essa diferença tenha sido ocasionada pela ação humana no meio ambiente, como por exemplo, a ocupação urbana não planejada em conjunto com a falta de saneamento básico resultante. (DOS REIS et al., 2017).

Figura 7. Países endêmicos para LV em 2018. Encontram-se destacados em cor de vinho os países com números de casos superiores a 1.000, incluindo o Brasil. Destacados em verde são os países sem casos reportados.



Fonte: Adaptado de WHO 2018.

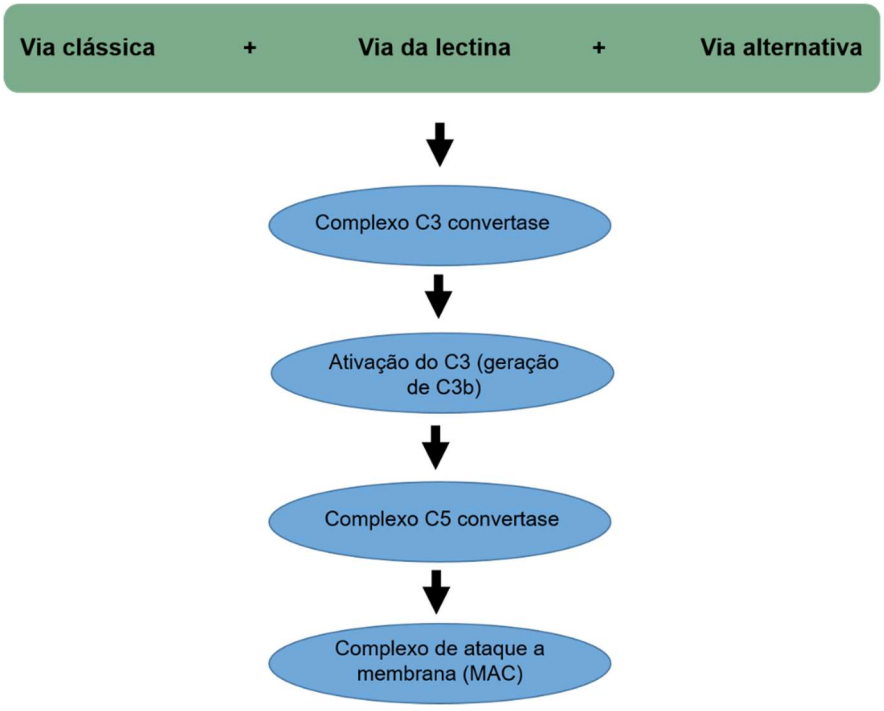
2.5 PERFIL IMUNOLÓGICO DA INFEÇÃO POR *LEISHMANIA*

Na leishmaniose, a interação entre o parasita e os diversos tipos celulares do sistema imunológico do hospedeiro pode culminar no desenvolvimento de infecção ou pode eliminar o parasita antes que haja progressão para doença, a depender da quantidade de células afetadas, do estado de ativação de cada célula e da intensidade da infecção (Gollob et al. 2014)

Atuando como primeira linha de defesa do hospedeiro, o sistema complemento tem importante papel na destruição do parasita. Composto por diversas proteínas envolvidas diretamente na remoção de patógenos do organismo, o sistema complemento possui duas grandes funções: promove a lise dos parasitas e auxilia a fagocitose dos mesmos por neutrófilos e macrófagos (DUNKELBERGER; SONG, 2010). O sistema complemento pode ser ativado por três vias distintas, a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas, todas culminando na formação do complexo de ataque a membrana (MAC) (Figura 8). A

via clássica já foi associada a destruição específica das formas promastigotas de *Leishmania* (PEARSON; STEIGBIGEL, 1980) e a via alternativa foi associada a destruição de amastigotas (HOOVER et al., 1984), enquanto que a via das lectinas não parece ter especificidade definida embora também contribua no combate ao parasita (GREEN et al., 1994). Embora a resposta do sistema complemento possa ser efetiva contra protozoários do gênero *Leishmania*, estes apresentam componentes em seu glicocálice que são capazes de subverter o sistema imunológico, inclusive o sistema complemento, favorecendo a fagocitose dos parasitas e evitando a morte por lise dos mesmos (Cecílio et al. 2014).

Figura 8. Características comuns às três vias do sistema complemento. No retângulo verde encontram-se destacadas as três vias de ativação do sistema complemento; em azul, demonstra-se a parte em comum entre as três vias de ativação do sistema complemento.



Fonte: A autora.

As primeiras células do hospedeiro a serem recrutadas para o local de picada do inseto, os neutrófilos, tem função de fagocitar e destruir patógenos invasores e contam com o auxílio das armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs) para levar a sua imobilização e morte (ABI ABDALLAH; DENKERS, 2012; KAPLAN; RADIC, 2013). A partir de estudos com modelo experimental de camundongos (modelo murino), foi visto que moléculas presentes na saliva do vetor

são muito importantes para o estabelecimento da infeção por *Leishmania,* favorecendo a quebra das NETs e, dessa forma, a sobrevida dos parasitas (CHAGAS et al., 2014). Quando fagocitadas, as formas promastigotas são retidas no fagossomo que, durante o processo de maturação, se funde com organelas endocíticas formando o vacúolo parasitóforo, onde as promastigotas se convertem em amastigotas (ANTOINE et al., 1998). Após a fagocitose dos parasitas, os neutrófilos infectados entram em apoptose e consequentemente liberam moléculas quimiotáticas que atraem as principais células de interesse do parasita, os macrófagos (ROSSI; FASEL, 2018).

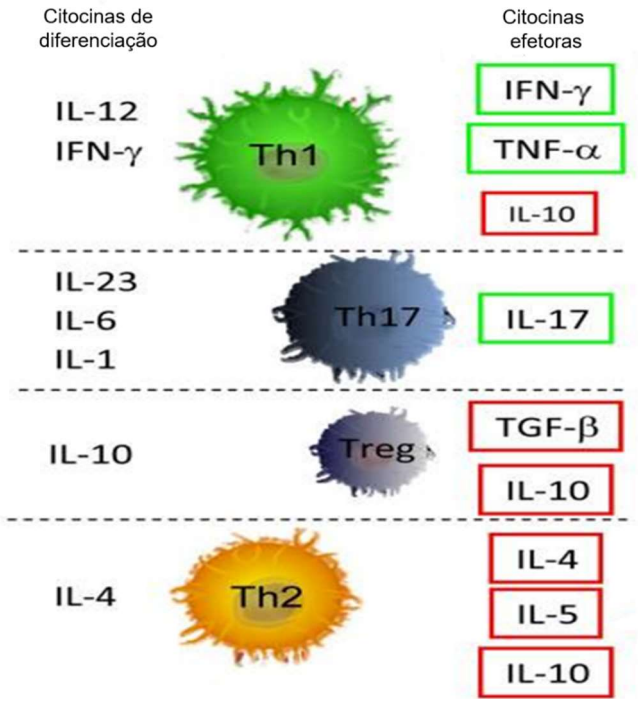
Estudos realizados com *L. major* demonstraram que os neutrófilos apoptóticos que são fagocitados por macrófagos, atuam como vetores para o parasita, permitindo a entrada do mesmo nos macrófagos e os protegendo contra os ataques do meio extracelular (VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Os macrófagos são as principais células responsáveis pela perpetuação da doença, tendo como defesa mais importante a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (FANG, 2004; FORMAN; TORRES, 2002). Para inibir o dano oxidativo, fatores de virulência das leishmanias conseguem alterar vias de sinalização envolvidas na produção de ERO e ERN (OLIVIER et al., 2012).

Concomitantemente à ação de neutrófilos e macrófagos, a infecção por *Leishmania* leva a ativação de várias outras células envolvidas na resposta imune adaptativa. Com papel crucial na ativação dessa resposta estão as células dendríticas, células mononucleadas que são as grandes responsáveis por apresentar os antígenos do parasita às células T efetoras do sistema imunológico (BANCHEREAU et al., 2000). Após ativação das células T, existem dois tipos principais de respostas que podem ser desenvolvidas: a resposta Th1 e a Th2. Ambas são caracterizadas pela ativação de células efetoras TCD4+, porém, diferem com relação ao padrão de citocinas que secretam. Na resposta Th1, as principais citocinas envolvidas são IFN-y e IL-12, que são citocinas pró-inflamatórias responsáveis por estimular os macrófagos a produzirem ROS para a destruição intracelular do parasita. Essa resposta está associada a um caráter mais protetor contra a leishmaniose, mas também já foi correlacionada a condições de piora da doença (BELKAID et al., 2002), além de também poder ter um papel regulador na resposta imune (ANDERSON et al., 2009). Na resposta Th2, há secreção de citocinas anti-inflamatórias do tipo IL-4 e IL-13, responsáveis por inibir

a atividade leishmanicida dos macrófagos (KROPF et al., 2005) e regular negativamente a resposta Th1 (LAZARSKI et al., 2013). Também são encarregadas de regular outros tipos celulares, além de, auxiliarem na produção de anticorpos contra o parasita. A depender da espécie responsável, da cepa e do hospedeiro, essa resposta pode influenciar para a progressão da doença (JONES; BUXBAUM; SCOTT, 2000; MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004).

A resposta adaptativa também envolve uma série de outras células como as células T-Th17 e células T reguladoras (T reg). As células Th17 são linfócitos produtores da IL-17, geralmente encontradas em pacientes com doenças autoimunes (KORN et al., 2009). Estas células possuem um papel importante no recrutamento e ativação de neutrófilos durante a infecção por *Leishmania*, com sua ação a depender da espécie do parasita. Dessa forma já foram associadas tanto ao processo de cura da infecção causada por *L. braziliensis* (VARGAS-INCHAUSTEGUI; XIN; SOONG, 2008) e *L. infantum* (AGALLOU; MARGARONI; KARAGOUNI, 2011), quanto à piora da infecção causada por *L. major* (KOSTKA et al., 2010) e *L. guyanensis* (HARTLEY et al., 2016). Já as células T-reg, são linfócitos produtores de IL-10, citocina anti-inflamatória associada a manutenção da homeostase e limitação do processo inflamatório como um todo (ROSSI; FASEL, 2018). Em estudos realizados com *L.* major, foi visto que essa citocina favorece a persistência do parasita no sítio primário de infecção (BELKAID et al., 2001) e o desenvolvimento da doença (ANDERSON; MENDEZ; SACKS, 2005). A figura 9 ilustra as principais citocinas envolvidas no processo de infecção.

Figura 9. Esquema geral das citocinas envolvidas na imunopatogenia da leishmaniose. Legenda: Os retângulos verdes marcam as citocinas mais envolvidas na ativação de atividade que leva a morte do parasita, enquanto os retângulos vermelhos marcam as citocinas que estão mais envolvidas no processo de estabelecimento da doença.



Fonte: Adaptado de GOLLOB et al 2014.

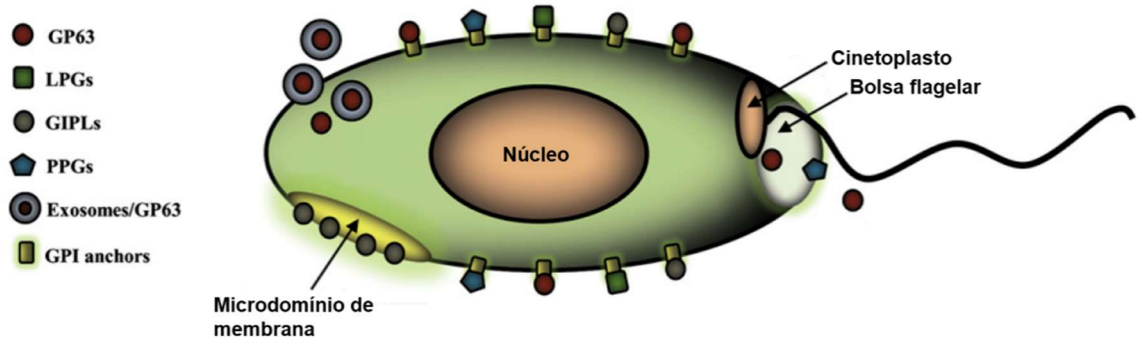
Os mecanismos que levam o hospedeiro humano a desenvolver determinado tipo de resposta podem variar de acordo com diversos fatores, dentre eles: a presença de determinadas citocinas no meio durante os eventos iniciais da diferenciação celular; a espécie de *Leishmania* envolvida; o conteúdo salivar do vetor; e as características genéticas de cada hospedeiro (GOLLOB, KENNETH J; VIANA, AGOSTINHO G.; DUTRA, 2014). A capacidade de controlar a infecção e a replicação do parasita, sem progredir para doença com aspectos clínicos, é consequência de uma imunidade bem modulada.

2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *LEISHMANIA SP.*

A superfície externa da membrana plasmática das espécies de *Leishmania*, é coberta por moléculas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI) ou *trans*-

membranares, que formam um revestimento protetor e mediador de interações essenciais entre o parasita e o hospedeiro (Figura 10) (ILGOUTZ; MCCONVILLE, 2001). Dentre essas moléculas, algumas são consideradas fatores de virulência que contribuem para a patogênese da doença e permitem a invasão do parasita e estabelecimento da infecção no hospedeiro mamífero. Entre esses fatores, podem ser citados os lipofosfoglicanos (LPG), glicoinositol-fosfolipídeos (GIPLs), proteofosfoglicanos (PPG), a proteína de membrana cinetoplástica de 11kDa (KMP11) e a glicoproteína 63 (GP63) (SILVA-ALMEIDA et al., 2012).

Figura 10. Representação esquemática de moléculas presentes na superfície de promastigotas de *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de Olivier 2012.

Uma molécula de superfície dominante da forma promastigota é o LPG. Sua estrutura varia entre as espécies de *Leishmania*, mas é composta principalmente de unidades repetitivas de um dissacarídeo e um fosfato, ligados à membrana por uma âncora GPI (ILGOUTZ; MCCONVILLE, 2001). Dentre suas funções, destacam-se: proteção à *Leishmania* contra a lise pelo sistema complemento do hospedeiro mamífero; proteção das promastigotas contra eventos oxidativos durante fagocitose; regulação da expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase dentro dos macrófagos; retardo da maturação dos fagolisossomos; e inibição da secreção de IL-12 pelos macrófagos (NOVOZHILOVA; BOVIN, 2010).

Outro grupo de moléculas abundantes na superfície e nos microdomínios de membrana dos promastigotas são as GIPLs, uma classe de glicolipídeos ancorados por GPI (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005). As GIPLs desempenham um papel importante na entrada de promastigotas nos macrófagos, agindo como

ligantes para a proteína de ligação a manose ou ao receptor de manose-fucose macrofágica. Como também são encontradas em grande quantidade em amastigotas, acredita-se que podem estar envolvidas na proteção dessas células dentro de macrófagos (OLIVIER et al., 2012).

Os PPGs, são polipeptídeos altamente glicosilados que também podem ser secretados ou ancorados à membrana do parasita por GPI (SILVA-ALMEIDA et al., 2012). Especula-se que o PPG membranar tenha alguma função na ligação aos receptores de macrófagos. Já o PPG secretado por parasitas dentro dos macrófagos pode contribuir para a manutenção do vacúolo parasitóforo que protege o parasita contra a ação das células do sistema imune, além de atuar também na ativação do sistema complemento (NOVOZHILOVA; BOVIN, 2010).

Em relação a KMP11, esta foi descrita como uma proteína hidrofóbica associada a LPG com possível papel no aumento da sobrevida do parasita no interior dos fagolisossomos (JARDIM et al., 1995; TOLSON et al., 1994).

2.6.1 GP63

A GP63 ou MSP, do inglês *Major Surface Protease,* foi descoberta em 1980 e é caracterizada como uma metaloprotease dependente de zinco que é encontrada na superfície da *Leishmania*. Ela é considerada como uma das principais proteínas de virulência da superfície das formas promastigotas do parasita, além de também poder ser liberada para o meio extracelular (Olivier et al., 2012 ; Yao et al. 2007).

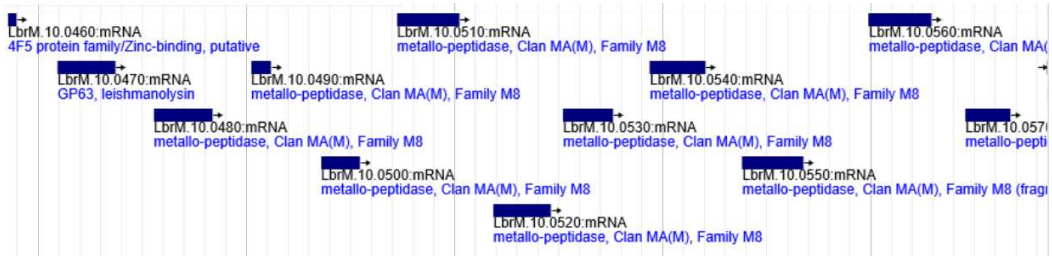
Durante sua síntese, a GP63 é levada até o retículo endoplasmático através de um peptídeo sinal localizado na região N-terminal da sequência proteica. Nesta organela, a proteína é modificada pela adição de N-glicosilações e de uma âncora de GPI incorporada em região específica do carboxi-terminal da proteína. Após essas modificações, o peptídeo sinal ligado ao retículo endoplasmático é clivado e a proteína é liberada. Subsequentemente ocorre a clivagem de um pró-peptídeo para produzir a cadeia polipeptídica madura. O pró-peptídeo contém um resíduo de cisteína que é conservado em todas as moléculas de GP63 de várias espécies. Já foi demonstrado que esse resíduo é responsável por modular a ligação do zinco ao seu sítio ativo, o que contribui para a regulação da atividade enzimática da GP63 e

protege o parasita contra autodestruição decorrente de uma GP63 ativada (SANTOS; BRANQUINHA; D'AVILA-LEVY, 2006).

2.6.1.1 Organização Genômica

Foi constatado que os genes codificantes de GP63 são organizados em *tandem* (Figura 11) e que existe uma considerável variação na quantidade de genes que codificam essas proteínas entre as espécies de *Leishmania*. Em *L. major*, o conjunto de genes que codificam a GP63 consiste de quatro cópias no cromossomo 10, um único gene no cromossomo 28 e um gene relacionado no cromossomo 31. Já *L. infantum* apresenta doze, dois e um gene, respectivamente. *L. braziliensis* se destaca por apresentar trinta e três genes identificados no cromossomo 10 e três no cromossomo 31 (Yao et al. 2003; Valdivia et al. 2015).

Figura 11. Disposição em tandem dos genes de GP63 no cromossomo 10 de *L. braziliensis.* Os retângulos azuis representam diferentes genes de GP63 de *L. braziliensis,* dispostos de maneira sequencial.

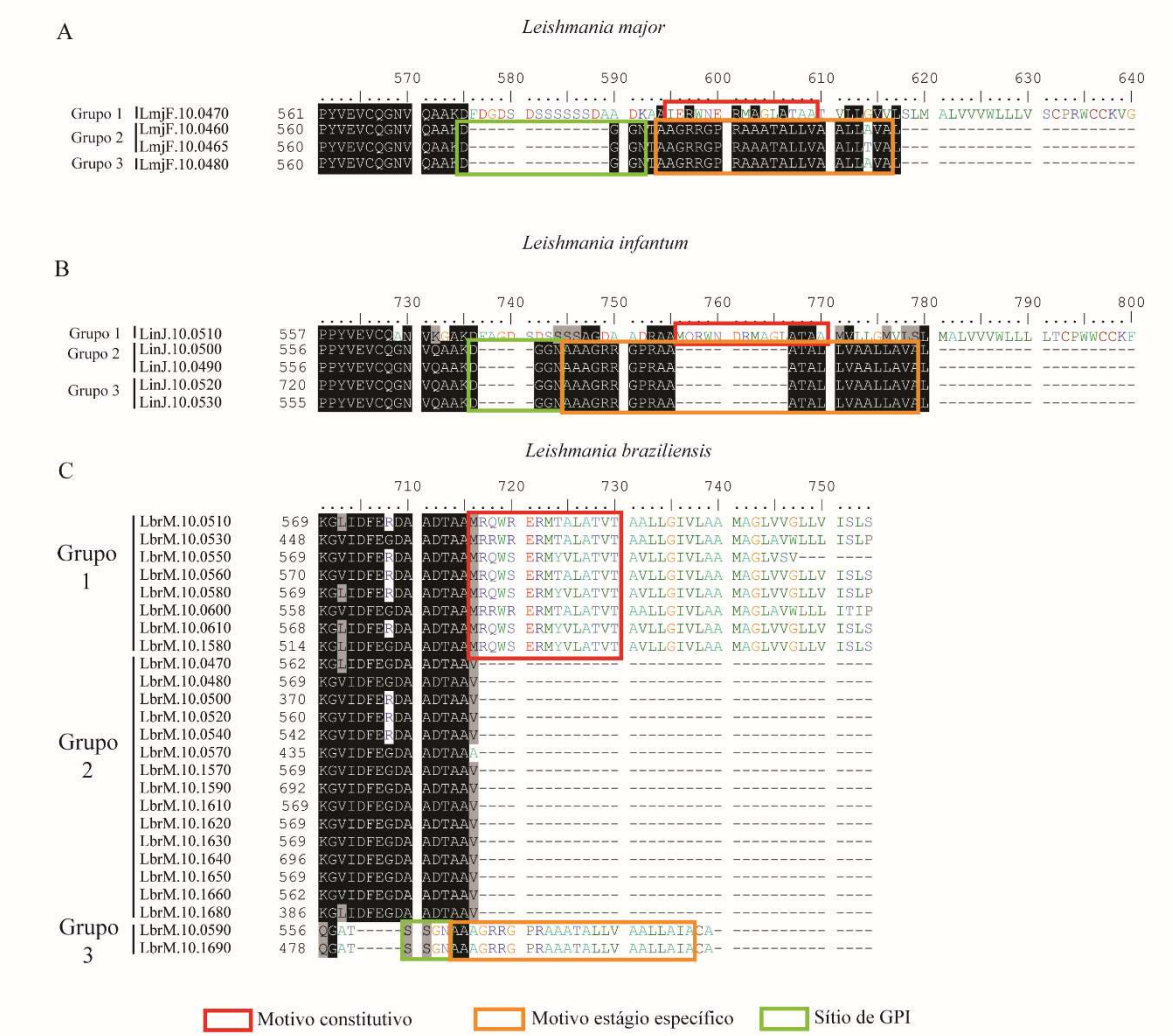


Fonte: TriTrypDB (**TriTrypDB**).

Recentemente, análises filogenéticas demonstraram que os genes de GP63 presentes nos cromossomos 28 e 31 de *Leishmania sp* são mais semelhantes aos genes de GP63 de organismos monoxênicos, ou seja, que parasitam somente insetos ou plantas. Isso sugere que, diferentemente dos genes presentes no cromossomo 10, os genes do cromossomo 28 e 31 podem estar associados, principalmente, a funções exercidas no inseto vetor (Castro Neto et al. 2019). No que diz respeito a expressão dos genes localizados no cromossomo 10 em espécies do subgênero *Leishmania*, estudos já apontaram a existência de três grupos distintos. Estes se diferenciam com base nas variações encontradas em nível de expressão das respectivas proteínas nas diferentes fases e formas do ciclo

de vida do parasita, assim como em diferenças na região C-terminal dessas proteínas (MEDINA-ACOSTA; KARESS; RUSSELL, 1993; VOTH et al., 1998). Em estudo mais recente, foi feita a divisão dos grupos da seguinte maneira: grupo 1, abrange genes constitutivamente expressos em ambas as fases do parasita; grupo 2, composto por genes expressos apenas na fase logarítmica de promastigotas; e grupo 3, constituído por genes expressos em fase estacionária/amastigota (Figura 12A e 12B). As proteínas codificadas pelos genes do grupo 1 apresentam C-terminal mais longo e composto por aminoácidos hidrofóbicos, e não apresentam sinal de adição da âncora de GPI, o que pode indicar que estas são liberadas para o meio extracelular. As proteínas dos grupos 2 e 3 apresentam C-terminal mais curto com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, ambos com sinal de adição da âncora de GPI. Em *L. braziliensis*, três grupos distintos também foram identificados entre aqueles genes de GP63 localizados no cromossoma 10 e que podem ou não estar relacionados aos demais. Com base na região C-terminal das proteínas codificadas, os do grupo 1 se mostram semelhantes aos do grupo 1 de *L. infantum*, enquanto os do grupo 3 apresentam semelhanças com aqueles genes expressos na fase estacionária/amastigota de *L. infantum*. Os genes classificados no grupo 2, contudo, apresentam características não encontradas em nenhum grupo de *L. infantum*, e associados a uma redução da extremidade C-terminal das respectivas proteínas (Figura 12C) (Castro Neto et al. 2019).

Figura 12. Diferenças na região C-terminal de parálogos de GP63 de espécies de *Leishmania*. Os retângulos em vermelho demarcam os motivos que caracterizam as proteínas do Grupo 1; os retângulos em laranja ressaltam motivos específicos de proteínas expressas em diferentes fases do ciclo de vida de *Leishmania* e ligadas aos Grupos 2 e/ou 3; os retângulos em verde demarcam o sinal de adição da âncora GPI.



Fonte: Editado de Castro Neto *et al*, 2019.

2.6.1.2 Funções no Hospedeiro Vertebrado

Dentre suas principais características funcionais, a GP63 desenvolve um importante papel na resistência à lise mediada pelo sistema complemento. Através da clivagem da subunidade C3b da sua cascata de ativação, a GP63 forma a subunidade C3bi, uma forma inativa de C3b, incapaz de formar o complexo C5. No entanto, essa subunidade inativa pode atuar como opsonina, pois ao se ligar à superfície do parasita é reconhecida pelo seu respectivo receptor na superfície do

macrófago, o CR3, facilitando assim a entrada da *Leishmania* em sua célula alvo (Brittingham et al. 1995; Cecílio et al. 2014).

Para poder sobreviver e se instalar em um ambiente adequado, o parasita altera vias de sinalização da célula hospedeira envolvidas na modulação do sistema imunológico. Estudos com *L. donovani* e *L. amazonensis* demonstraram que através da ativação das proteínas tirosina fosfatases (PTPs), principalmente a SHP-1, diferentes vias de sinalização são alteradas devido a um processo de desfosforilação generalizado, tais como: a via Janus quinase/transdutora de sinal; ativadores de transcrição (JAK/STAT); a via da proteína quinases ativadas por mitógenos (MAPK); e aquela ligada a quinase associada ao receptor de interleucina 1 (IRAK – 1). Estas alterações tornam as células fagocíticas irresponsivas a IFN-y e levam a uma inibição da formação de óxido nítrico, principal produto resultante da ativação das vias supracitadas (FORGET et al., 2006; GOMEZ et al., 2009). Outras moléculas de sinalização como o substrato de quinase C rico em alanina miristoilada (MARCKS) e as proteínas relacionadas a MARCKS (MRP) também são afetadas. Elas atuam como substratos para a proteína quinase C (PKC) e são alvos de hidrólise pela GP63. A PKC é uma molécula envolvida com diferenciação celular, apoptose e inibição de agentes microbicidas, como as espécies reativas de oxigênio (EROs) (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012).

Outra função de relevância da GP63 é a clivagem da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e inativação do complexo 1 ligado a esta proteína (mTORC1) em macrófagos infectados, tendo como consequência, a repressão da tradução de proteínas do hospedeiro. Esse controle traducional protagonizado por mTORC1 também é um componente importante da resposta imune inata visto que regula a síntese de IFN-α e IFN-β (JARAMILLO et al., 2011).

2.6.1.3 Funções no Hospedeiro Invertebrado

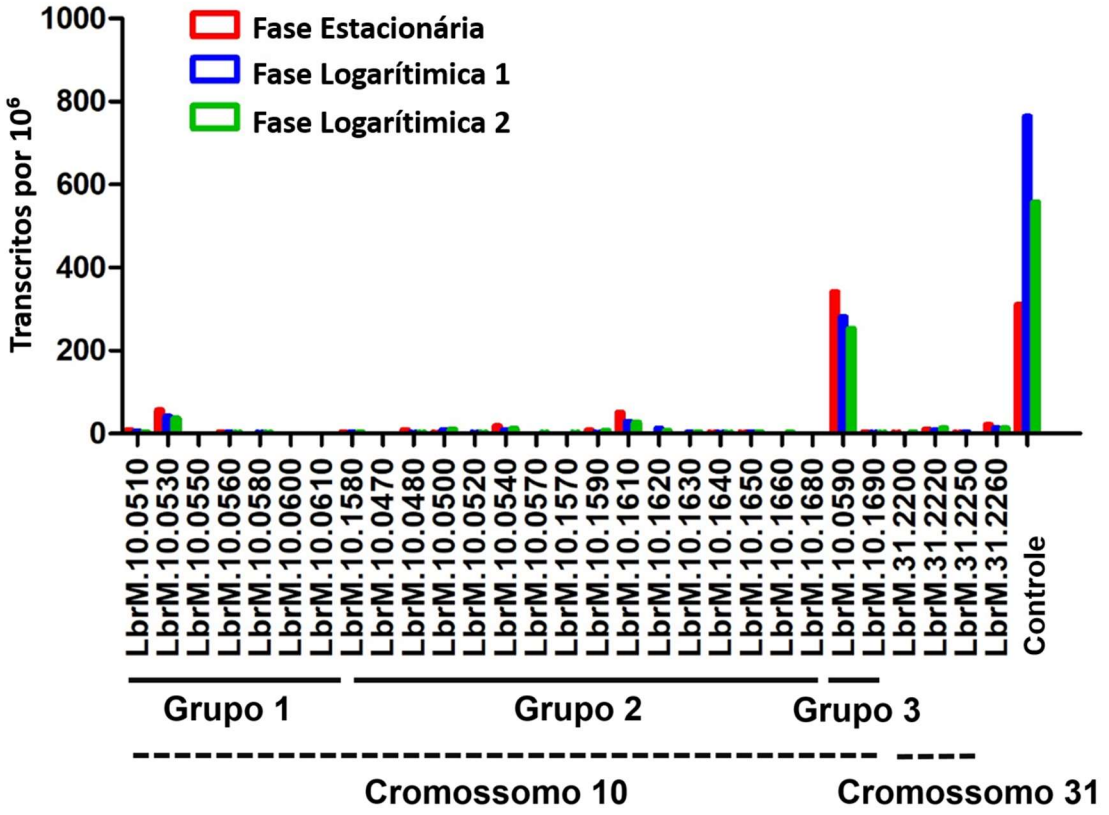
Já foi observado que a GP63 se apresenta em maior quantidade na forma promastigota, forma encontrada no inseto vetor, do que na forma amastigota. Apesar disso, pouco é sabido sobre as funções exercidas por essa proteína no vetor. Uma função conservada da GP63 dentre as espécies de *Leishmania* é a aquisição de nutrientes no intestino de diversos insetos através da degradação do material presente em seu interior (D'AVILA-LEVY et al., 2014). Além disso, também

foi observado que, ao se induzir baixa taxa de expressão de GP63, a adesão do parasita ao intestino do vetor é prejudicada (CRISTINA; ALTOÉ, 2013).

2.7 ESTUDOS PRÉVIOS QUE ORIGINARAM ESTE TRABALHO

Visando avaliar eventos de transcrição diferencial dos múltiplos genes de GP63 de *L. braziliensis*, foi realizado o sequenciamento dos mRNAs (RNAseq) da sua forma promastigota (Figura 13). Foram obtidas amostras de RNAs das seguintes fases: estacionária, fase logarítimica de células recém descongeladas e fase logarítimica de células que passaram por sucessivos repiques. Como resultado, foi possível observar que o mRNA codificado pelo gene LbrM.10.0590 é o mais abundante, nas três situações de crescimento, seguido dos genes LbrM.10.0530 e LbrM.10.1610, porém em menor quantidade. Com relação a esses três genes, foi observado uma maior quantidade de transcritos na fase estacionária do parasita. Nota-se também a reduzida ou quase nula expressão dos genes de GP63 codificados no cromossomo 31. Nas análises foi utilizado como controle o gene LbrM.30.2950, que codifica a enzima glicerol 3-fosfato, muito expressa na fase promastigota dos parasitas (dados não publicados).

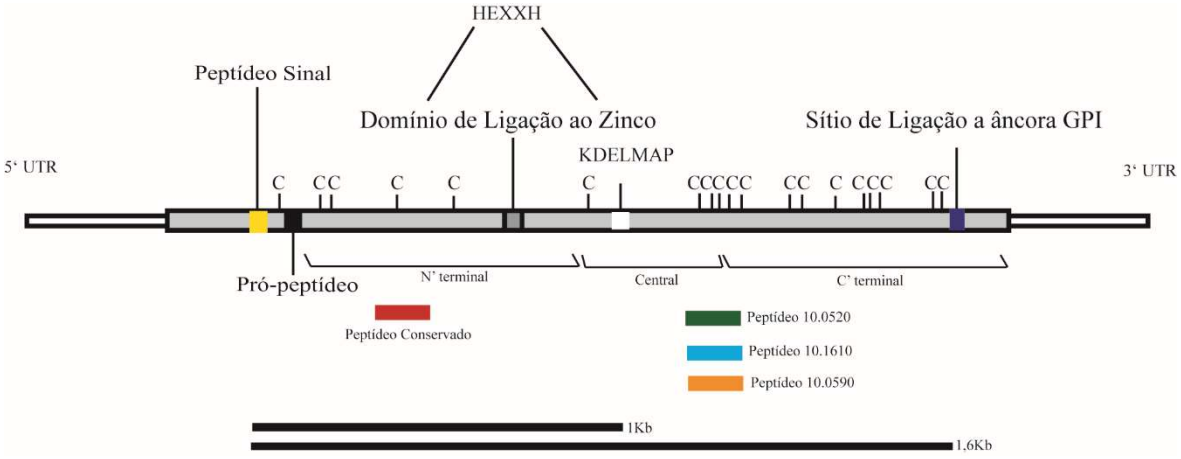
Figura 13. Análise por RNAseq dos mRNAs codificantes de GP63 de formas promastigotas de *L. braziliensis*. No eixo vertical podemos observar o número de transcritos por 10^6 leituras de cada gene de GP63 analisado (eixo horizontal). As barras em vermelho representam os genes na fase Estacionária; as barras em azul representam os genes na Fase Logarítmica (1) de uma célula recém descongelada; as barras em verde representam os genes na Fase Logarítmica (2) de uma célula após repiques sucessivos.



Fonte: Editado de Brito, 2018.

Para posterior análise de expressão dos genes de GP63 de *L. braziliensis,* proteínas recombinantes GP63 obtidas anteriormente foram utilizadas em ensaios de *Western Blot* frente a soros anti-GP63 produzidos comercialmente. Esses soros foram gerados a partir de peptídeos sintéticos específicos contra determinadas sequências de GP63 codificadas por diferentes genes presentes no cromossomo 10 de *L. braziliensis*. As regiões da proteína de onde foram retirados os peptídeos estão demonstrados na figura 14.

Figura 14. Representação esquemática das proteínas de GP63 de *L. braziliensis*. O quadrado amarelo representa a região de remoção do peptídeo sinal das sequências; o quadrado preto representa a região de remoção do pró-peptídeo; o quadrado branco representa a região conservada KDELMAP enquanto o quadrado roxo representa a região de adição da âncora de GPI. Os retângulos coloridos abaixo da sequência demonstram a região em que os peptídeos sintéticos utilizados na produção dos soros anti-GP63 estão na sequência.



Fonte: Editado de Brito, 2018.

Foram produzidos quatro soros: soro anti-peptídeo encontrado na proteína codificada pelo gene LbrM.10.0520 (soro anti-10.0520), soro anti-peptídeo encontrado na LbrM.10.0590 (anti-10.0590), soro anti-peptídeo da proteína LbrM.10.1610 (anti-10.1610) e soro anti-peptídeo presente nas diferentes proteínas cujos genes estão localizados no cromossomo 10 (anti-peptídeo conservado). O resultado de ensaios utilizando anticorpos purificados a partir destes soros, utilizando os respectivos peptídeos, contra diferentes GP63 recombinantes de *L. braziliensis* mostrou um padrão diferenciado de reconhecimento por estes anticorpos. Enquanto aqueles derivados do soro anti-peptídeo conservado reconheceram as diferentes proteínas avaliadas, aqueles do anti-10.0520 e anti-10.0590 reconheceram um número mais restrito de proteínas, como as LbrM.10.0520 (ambos) e LbrM.10.0590 (apenas o anti-10.0590). Já o anti-10.1610 não reconheceu nenhuma das proteínas avaliadas.

Utilizando anticorpos purificados dos soros anti-peptídeo conservado, anti-10.0520 e 10.0590, este estudo buscou avaliar se as diferenças nas regiões C-terminais encontradas nas proteínas de GP63 podem trazer alterações no que diz respeito a sua expressão e localização celular, contribuindo na compreensão das

suas diferenças funcionais e seu papel na patogenicidade de *L. braziliensis* e *L. infantum*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PRODUÇÃO DE SOROS ANTI-GP63

Os soros utilizados foram obtidos em estudo prévio (BRITO, 2018), onde peptídeos contra parálogos específicos de GP63 foram sintetizados comercialmente pela empresa GenOne (tabela 1) e foram enviados para a empresa Célula B, onde foram conjugados a uma molécula carreadora de hemocianina de lapa californiana (KLH) e utilizados para produção de anticorpos em coelhos.

Tabela 1. Sequências de aminoácidos dos peptídeos utilizados para síntese dos anticorpos do estudo. Na coluna da esquerda consta os identificadores dos genes utilizados, e na coluna direita as respectivas sequências peptídicas provenientes de cada gene. Os números à direita das sequências representam a posição do último aminoácido contido na sequencia peptídica.

Genes codificantes	Sequência de aminoácidos dos peptídeos
LbrM.10.0590	IVLTHTSVPQYFQYFTDPT (431)
LbrM.10.0520	IIVTHDDPLPTYFQYFTEPS (486)
Sequência conservada nos genes de GP63 do cromossomo 10	VRQVQGSWKVTGMTG (177)

Fonte: A autora.

3.2 INDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS GP63

Para purificação dos anticorpos obtidos, foi feita a indução de três proteínas recombinantes de GP63 derivadas de *L. braziliensis* cujos genes haviam sido previamente clonados no vetor pGEX4T3, de expressão procariótica: LbrM.10.0520, LbrM.10.0590 e LbrM.10.1610. As construções resultantes codificam para proteínas de fusão apresentando a proteína glutationa S-transferase (GST) na sua extremidade N-terminal.

As construções foram transformadas em células quimiocompetentes de *E. coli* cepa Rosetta através de choque térmico. Para tal, o DNA a ser transformado foi acrescido com 50 µl de dessas células e mantido a 4º C por 30 minutos, logo após

transferido para o banho-maria à 37ºC, por 5 minutos. O produto da transformação foi plaqueado em meio LB acrescido de ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (30 µg/ml) e incubado em estufa bacteriológica a 37º C por 18 horas.

As colônias obtidas foram inoculadas em 20 ml de meio LB acrescido de ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (30 µg/ml) e deixadas sob agitação de 180 rpm, à 37º C por 16 horas. Em seguida, o inóculo foi colocado em 400 ml de meio LB com ampicilina e reincubado à 37ºC até atingir a densidade óptica (DO) de 0.5 a 600 nm. Após atingir a DO, foi adicionado o indutor IPTG a uma concentração final de 0,1 mM e o inóculo foi reincubado à 28ºC por 16 horas sob agitação. Foram retiradas alíquotas de 200 µl (antes e depois de colocar o IPTG), centrifugadas à 13800 x g por 5 minutos, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 80 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE e incubados a 100º C por 5 minutos. Ao final, as alíquotas foram verificadas por eletroforese em gel de SDS-PAGE 15% corado por azul de Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich).

3.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA

As culturas bacterianas foram centrifugadas a 3500 x g durante 10 minutos e o sedimento bacteriano foi ressuspendido em 20 ml de tampão fosfato salino (PBS). Em seguida a lise das bactérias foi feita por ultra-sonicação (seis pulsos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto). Para purificação, o produto sonicado foi incubado com 300 µl de resina Glutationa sefarose (GE Healthcare), previamente equilibrada em PBS após três lavagens de 10 ml cada. A incubação foi realizada por 1 hora à temperatura de 4ºC sob leve agitação, em seguida a resina foi lavada três vezes com 1 ml de PBS e por fim, eluída duas vezes com 300 µl de glutationa reduzida (em 50 mM de Tris-HCl pH 9.0) por uma e 18 horas. Alíquotas do eluato, resina e sobrenadante foram fracionados em SDS-PAGE 15% e visualizados após coloração com azul de Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich).

3.4 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS POR IMUNOADSORÇÃO

Para a purificação dos anticorpos, foram adotadas duas metodologias. A primeira, utilizando as proteínas LbrM.10.1610, LbrM.10.0520 e LbrM.10.0590 para a purificação dos anticorpos do soro anti peptídeo conservado, anti-10.0520 e anti-

10.0590, respectivamente, e a segunda, utilizando os respectivos peptídeos conjugados a molécula de albumina de soro bovino (BSA).

Para a purificação dos anticorpos policlonais anti-peptídeo conservado, anti-10.0520 e anti-10.0590 com as proteínas recombinantes, cerca de 100 µg das proteínas LbrM.10.1610, LbrM.10.0520 e LbrM.10.0590 foram fracionadas em gel *SDS-PAGE* 15% e transferidas para membrana de transferência de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno, Immobilon-P, Millipore Corporation) e cada membrana, após transferência, corada com *Ponceau* S 0,2% (Sigma-Aldrich) em solução de ácido tricloroacético (1%). As bandas correspondentes as proteínas de interesse foram excisadas da membrana, cortadas em pequenos pedaços e transferidas para tubos de microcentrífuga. Os fragmentos de membrana foram lavados três vezes com 1 ml de PBS, por 10 minutos cada, e bloqueados com solução de leite 5% em PBS-Tween 20 durante 30 minutos a 4ºC. A solução bloqueadora foi removida e a membrana lavada rapidamente uma vez com PBS. Foram então adicionados 750 µl do soro obtido da imunização e 500 µl de PBS e os fragmentos de membrana permaneceram incubando por 48 horas, sob agitação constante, a 4 ºC. Ao término da incubação, os fragmentos de membrana foram então lavados três vezes com 1 ml de PBS-Tween 20 por 10 minutos cada e os anticorpos adsorvidos às membranas foram eluídos com 200 µl de solução de glicina ácida (glicina-HCl 0,1 M, pH 2,5) por agitação vigorosa durante cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução de glicina com os anticorpos eluídos foi recuperada para um novo tubo de microcentrífuga e o pH da solução equilibrado pela adição de 20 µL de Tris-HCl (1M, pH 8,0). Os anticorpos purificados foram estocados a -80ºC.

Já para a purificação dos anticorpos utilizando os peptídeos conjugados a BSA, foram reutilizadas membranas já devidamente picadas contendo os peptídeos, armazenadas a -20 ºC em solução de PBS. Após descongelados, a purificação seguiu com os mesmos passos já citados anteriormente.

3.5 CULTIVO CELULAR DE FORMAS PROMASTIGOTAS, AMASTIGOTAS E CURVAS DE CRESCIMENTO

A manutenção das formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* e de *L. infantum* foi realizada em meio Schneider pH 7,2 suplementado com 20% e 10% de soro fetal bovino (SFB), respectivamente. A manutenção das formas

amastigotas de *L. infantum* foi realizada em estufa de CO_2, em meio específico 199 (Sigma-Aldrich), contendo HEPES (Sigma-Aldrich), bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich), glicose (Sigma-Aldrich) e caldo de triptona-soja (KASVI), suplementado com 10% de SFB, com pH final de 5,5. Para cultura de amastigotas de *L. braziliensis*, foram testados diversos meios sob condições diferentes, mas não foi possível obter as respectivas formas.

Para as curvas de crescimento de promastigotas de ambas as espécies, foram realizados inóculos de 10^6 células em meio Schneider pH 7,2 e o crescimento celular foi acompanhado diariamente até a fase de morte celular. Todos os dias eram retiradas alíquotas para obtenção de extratos celulares para os ensaios de WB. Para as curvas de crescimento de amastigotas de *L. infantum*, foram realizados inóculos de 10^6 células em meio específico descrito acima, pH 5,5, sob pressão de CO_2 e o crescimento celular foi acompanhado diariamente até a fase de morte celular. Todos os dias foram retiradas alíquotas para obtenção de extratos celulares para os ensaios de WB.

Os extratos totais do parasita, utilizados para os ensaios de *Western Blot*, foram obtidos a partir de culturas quantificadas, em fase exponencial de crescimento (10^6), das quais as células foram coletadas por centrifugação (900 x g / 5 minutos / 4°C) e em seguida ressuspendidas em 100µL de tampão de proteína para gel SDS-PAGE desnaturante.

3.6 FRACIONAMENTO CELULAR POR GRADIENTE DE DIGITONINA

Para o fracionamento celular utilizando gradientes do detergente digitonina (SIGMA) foram utilizadas 10^8 células de *L. braziliensis* e *L. infantum*. As células foram submetidas a centrifugação por 5 minutos a 900 x g, 18°C. O sedimento foi lavado duas vezes com 10 ml de PBS gelado e ressuspenso em 0,5 ml de tampão de ressuspensão (75mM TRis-HCl pH7.4, 145mM NaCl, 11mM KCl) acrescido de inibidores de proteases (ROCHE). Foram realizadas então incubações com concentrações crescentes de digitonina (20 μM, 200 μM, 1 mM, 10 mM). A cada incubação os sedimentos foram solubilizados em tampão de ressuspensão acrescido de inibidores de protease, e foram adicionados 0,5 ml da solução

contendo digitonina (solução aquosa com 0,05% de metanol) seguido de incubação por 5 minutos a 37°C. Após esta incubação, foram então adicionados 200 μl de uma solução de sacarose 0,3 M, e as células foram centrifugadas por 16200 x g durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, os sobrenadantes foram submetidos a precipitação com acetona, na proporção de 1:1, por pelo menos 1 hora, a -20°C, com as amostras em seguidas centrifugadas por 30 minutos, a 3500 x g, a 4°C. Os sedimentos foram ressuspendidos em 100 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE desnaturante. O fracionamento gerou cinco frações: as frações 1 e 2 são constituídas por proteínas citoplasmáticas, as frações 3 e 4 são constituídas por proteínas associadas a organelas e a fração 5 corresponde a proteínas não solúveis, contendo proteínas nucleares e associadas a membrana. Para análise, cada fração foi fracionada em gel SDS-PAGE, utilizando 10 µl de cada fração, e submetidas a ensaios de *Western blot*.

3.7 *WESTERN BLOT*

Para os ensaios de *Western Blot* utilizando os anticorpos anti-GP63, tanto as curvas de crescimento quanto os fracionamentos de *L. braziliensis* e *L. infantum* foram fragmentados em gel *SDS PAGE* 15% e transferidos para membranas de PVDF em sistema de transferência semi-seco. Em uma primeira etapa**,** as membranas foram bloqueadas em solução de leite 5% em TBS/Tween (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween 20 1% pH 7,5) por 1 hora. Posteriormente foram incubadas por 16 horas com os respectivos anticorpos primários anti-GP63 em diluições de 1:50. As membranas, após a incubação, foram lavadas por 10 minutos, três vezes com TBS/Tween 20. Em seguida, uma nova incubação de 1 hora foi realizada com o segundo anticorpo, anti-IgG de coelho (*Jackson Immunoresearch Laboratories*), marcado com peroxidase, numa diluição 1:10000. Decorrido esse tempo, as membranas foram novamente lavadas três vezes com TBS/Tween 20 por 10 minutos. Após as lavagens, as membranas foram banhadas em solução reveladora comercial (Merck) e reveladas no equipamento iBright (Thermo Fisher Scientific) com tempo de exposição variados.

Como controle dos ensaios utilizando as curvas de crescimento, foi utilizado como anticorpo primário, o soro contra o fator de iniciação eucariótico 4A1 (EIF4A1), em diluição de 1:1000. As demais etapas ocorreram como já descrito.

Como controle dos ensaios utilizando os fracionamentos com digitonina, foi utilizado, além do anti-EIF4A1, o anticorpo contra a proteína Lci13 na diluição 1:1000. A demais etapas ocorreram como já descrito.

3.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A Imunofluorescência foi realizada utilizando-se aproximadamente 2,5 x 10^6 células por lamínula. As células foram centrifugadas a 1600g por 10 minutos a 25ºC, lavadas com 1 ml de PBS e fixadas com paraformaldeído a 3% por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram novamente centrifugadas, ressuspendidas em solução de PBS 10 vezes concentrado e colocadas em lamínulas pré-fixadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Após 15 minutos, as lamínulas foram submetidas a três lavagens de 1 minuto com solução de lavagem (PBS mais Glicina 20 mM), seguido de permeabilização das células por incubação com 0,1% de Triton-X (Sigma-Aldrich) na mesma solução, por 10 minutos. Em seguida as lamínulas foram lavadas três vezes por 1 minuto com solução de lavagem e foi realizado o bloqueio, onde se suplementou a solução de lavagem com BSA 1% e incubaram-se as lamínulas por 20 minutos. Após o bloqueio, seguiu-se a incubação com o primeiro anticorpo purificado na diluição de 1:10, por 1 hora a 37 ºC. Em seguida foram feitas três lavagens com PBS-Glicina 20 mM. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 na diluição 1:1000, por 1 hora a 37ºC no escuro. Ainda no escuro, foram lavadas com PBS – Glicina 20 mM, secas e as lamínulas foram fixadas em lâminas contendo 10 µl de DAPI (VECTASHIELD) e foram guardadas a 4 ºC. As células foram visualizadas em microscópio de fluorescência.

Como controle positivo dos ensaios, foi utilizado como anticorpo primário o anticorpo contra a proteína Lci10, que apresenta padrão de reconhecimento já conhecido. Esse anticorpo foi usado na diluição de 1:25, e as demais etapas ocorreram como já descrito anteriormente.

3.9 ANÁLISES COMPUTACIONAIS

Para o alinhamento das novas sequências proteicas de GP63, as sequências foram retiradas do banco de dados Leish-ESP (http://leish-esp.cbm.uam.es/), depositadas na plataforma *online* MAFFT (KATOH et al., 2002) e o alinhamento resultante foi carregado no programa Bioedit (HALL, 1999).

Para geração da estrutura terciária das proteínas de GP63 de *L. braziliensis*, as sequências das proteínas LbrM.10.0520 e LbrM.10.0590 foram retiradas do banco de dados TriTrypDB e depositadas no programa SWISS-MODEL (GUEX; PEITSCH; SCHWEDE, 2009). Em seguida, as modelagens resultantes foram editadas no programa PyMOL (*Molecular Graphics System)*.

Para predição dos sítios de N-glicosilação, as sequências das proteínas as sequências das proteínas LbrM.10.0520 e LbrM.10.0590 foram retiradas do banco de dados TriTrypDB e depositadas no programa GlycoEP (CHAUHAN; RAO; RAGHAVA, 2013).

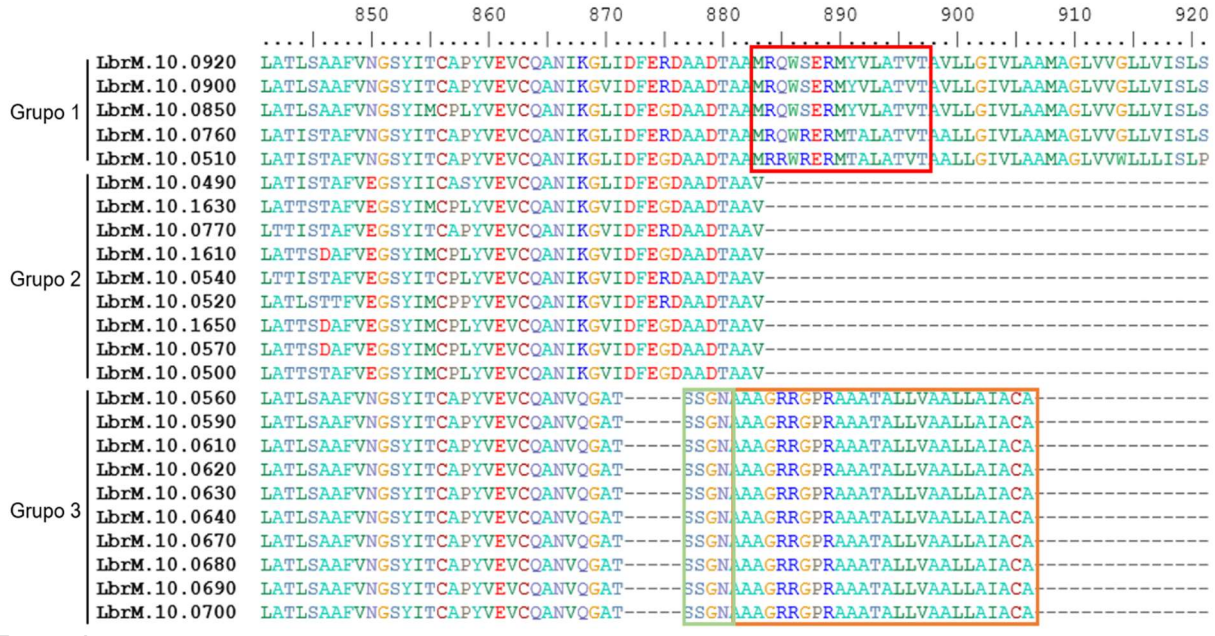
Para a predição de topologia das proteínas de GP63, as sequências foram coletadas de banco de dados e carregadas na plataforma *online* MEMSAT-SVM (NUGENT; JONES, 2009).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DE MOTIVOS DE RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS DE GP63

Buscando compreender o padrão de reconhecimento dos anticorpos 10.0520 e 10.0590, foram feitas análises de comparação de sequências, levando em consideração as sequências peptídicas a partir das quais os anticorpos foram feitos juntamente com as sequências de GP63 do cromossomo 10 de *L. braziliensis* e *L. infantum*. Para isso, primeiramente, foi feito um novo alinhamento entre as sequências de GP63 de *L. braziliensis* (Figura 15) utilizando as sequências do banco de dados de cinetoplastídeos (TriTrypDB) obtidas com sequenciamento de nova geração, com o objetivo de avaliar se houve alguma alteração nas regiões de C-terminal das proteínas do estudo. Foi observado que a quantidade de proteínas pertencentes ao grupo 1 diminuiu de oito para cinco; o grupo 2 reduziu de quinze para nove; e o grupo 3 aumentou de duas para dez, porém, não houve alteração da porção C- terminal das sequências.

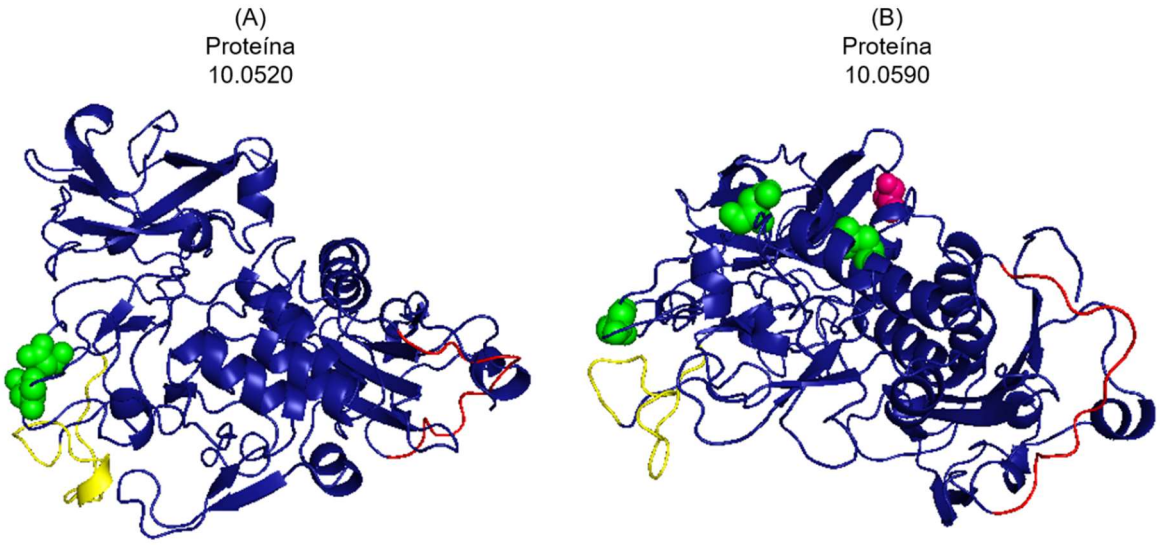
Figura 15. Características de C-terminal das GP63 de *L. braziliensis* do novo sequenciamento. O quadrado em vermelho demarca o motivo que caracteriza as proteínas constitutivas; o quadrado em laranja ressalta motivos específicos de proteínas expressas em diferentes fases; os quadrados em verde demarcam o sinal de adição da âncora GPI.



Fonte: A autora.

Posteriormente, foi visto o posicionamento dos peptídeos utilizados para produção dos soros na estrutura terciária das proteínas a partir dos quais eles foram originados, assim como também foi visto possíveis sítios de N- glicosilação e o posicionamento da âncora de GPI (Figura 16). Foi observado que os peptídeos se encontram em posições opostas na estrutura e também que cada proteína apresenta diferentes sítios de N- glicosilação, localizados em regiões distintas da dos peptídeos.

Figura 16. Posição dos peptídeos utilizados na estrutura 3D de proteínas GP63. Nas figuras A e B estão representadas a estrutura terciária das proteínas LbrM.10.0520 e LbrM.10.0590, respectivamente. Nas figuras A e B, encontra-se em vermelho a posição do peptídeo conservado, as esferas verdes representam os aminoácidos que podem sofrer glicosilações e em amarelo estão os peptídeos 10.0520 e 10.0590, respectivamente. Em rosa, na figura B, está representada a posição de adição da âncora de GPI.

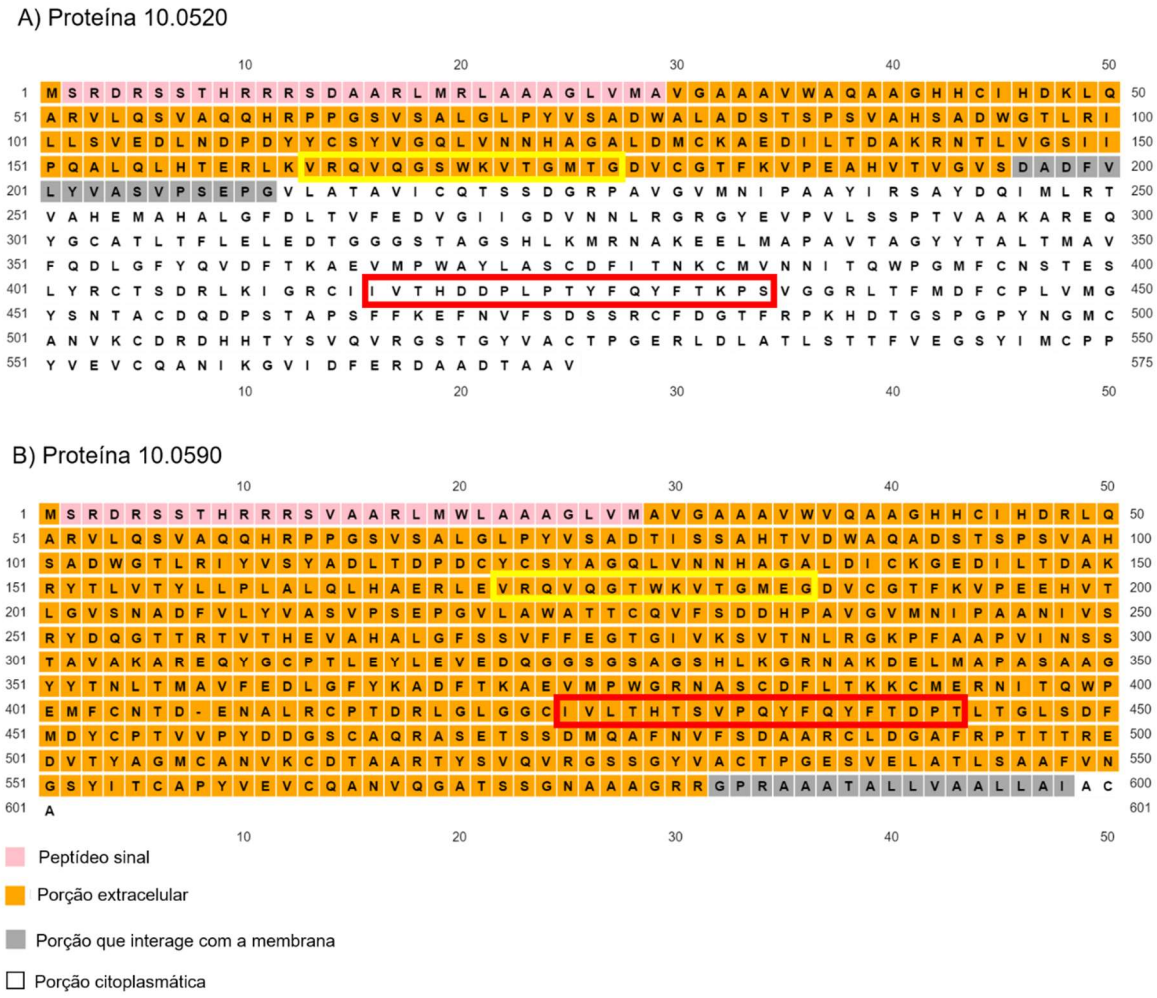


Fonte: A autora.

Com base nas características das cadeias polipeptídicas das sequências proteicas LbrM.10.0520 e LbrM.10.0590, a topologia dessas proteínas na membrana plasmática foi predita por comparação com outras proteínas que possuem topologia já descrita em banco de dados (Figura 17). Foi possível observar que as proteínas apresentam topologias diferentes, com a LbrM.10.0520 apresentando apenas ~200 aminoácidos voltados para o meio extracelular enquanto a proteína LbrM.10.0590 está completamente voltada para o meio extracelular. Além disso, nota-se que as posições dos peptídeos nas proteínas também são diferentes, visto que o peptídeo 10.0520 pode estar localizado no meio

citoplasmático, enquanto o peptídeo 10.0590 pode estar localizado no meio extracelular. O peptídeo conservado encontra-se no meio extracelular em ambas as predições.

Figura 17. Representação esquemática da topologia das proteínas LbrM.10.0520 e LbrM.10.0590 na membrana plasmática. Nas figuras A e B estão representadas sequências das proteínas LbrM.10.0520 e LbrM.10.0590, respectivamente. Nas figuras A e B, encontra-se em rosa os aminoácidos correspondentes ao peptídeo sinal predito, em laranja os aminoácidos que estão localizado na porção extracelular, em cinza os aminoácidos que interagem com a membrana plasmática e em branco os aminoácidos localizados na porção citoplasmática da célula. Os retângulos amarelos demarcam a sequência correspondente ao peptídeo conservado em ambas as figuras, e os retângulos vermelhos correspondem as sequências dos peptídeos 10.0520, na figura A, e 10.0590, na figura B.

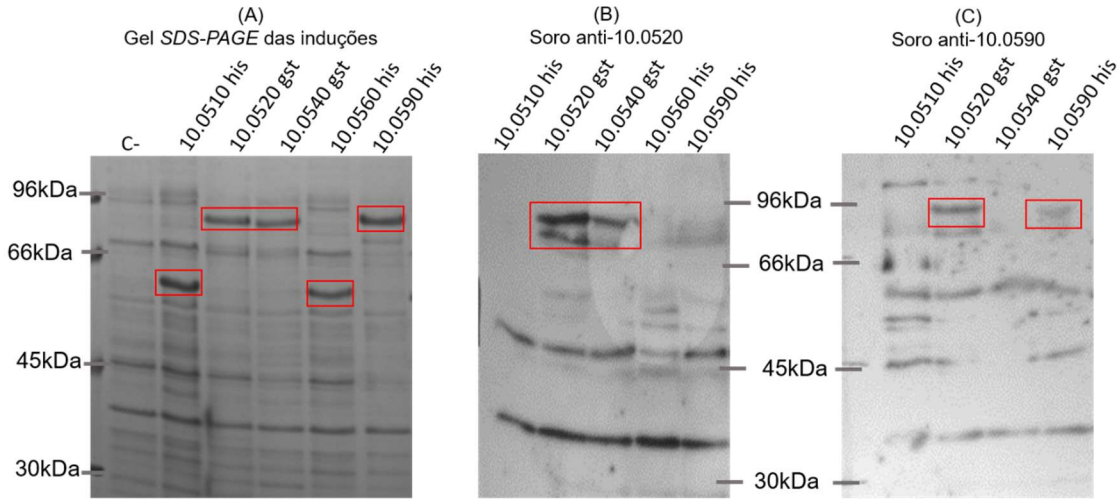


Fonte: A autora.

Em seguida, foram realizados novos ensaios de *Western Blot* feitos com os soros dos peptídeos anti-10.0520 e anti-10.0590 frente as proteínas recombinantes de GP63 (Figura 18). Observa-se que cada soro reconhece proteínas diferentes,

sendo a proteínas LbrM.10.0520 reconhecida por ambos, e as proteínas LbrM.10.0540 e LbrM.10.0590 sendo reconhecidas pelo anti-10.0520 e anti-10.0590, respectivamente.

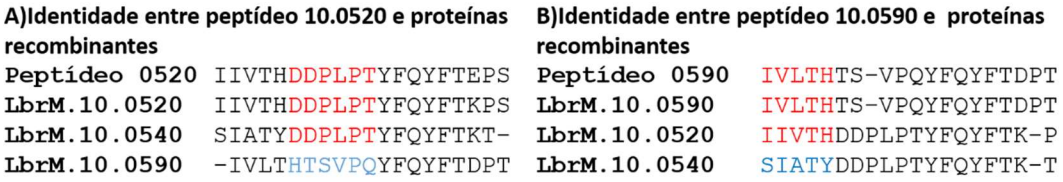
Figura 18. Ensaios de *Western Blot* dos soros anti-GP63 frente a proteínas recombinantes. Nas figuras A está representado a eletroforese em gel SDS-PAGE 15% contendo extratos celulares de *E. coli* fracionados com as induções das proteínas recombinantes de GP63 utilizadas nos ensaios de *Western Blot* das figuras B e C. Os retângulos vermelhos da figura A demarcam as proteínas recombinantes nos seus respectivos pesos moleculares. Nas figuras B e C estão os ensaios realizados com os soros anti-10.0520 e anti-10.0590, respectivamente. Os retângulos vermelhos indicam as proteínas recombinantes detectadas. Os ensaios foram realizados com os soros na diluição 1:3000.



Fonte: A autora.

Considerando as proteínas detectadas pelos soros contra os dois peptídeos citados, foi feita a busca pelos possíveis motivos de reconhecimento dos anticorpos nessas proteínas. Para isso, a sequência do peptídeo anti-10.0520 foi alinhada com as sequências equivalentes das proteínas LbrM.10.0520 e LbrM.10.0540, as quais ele reconhece, juntamente com a proteína LbrM.10.0590, que ele não reconhece, buscando ver o que há em comum ou não entre essas proteínas. O mesmo foi feito com o peptídeo anti-10.0590, utilizando as proteínas LbrM.10.0520, LbrM.10.0590 e LbrM.10.0540, sendo esta última a que o soro não reconhece (Figura 19).

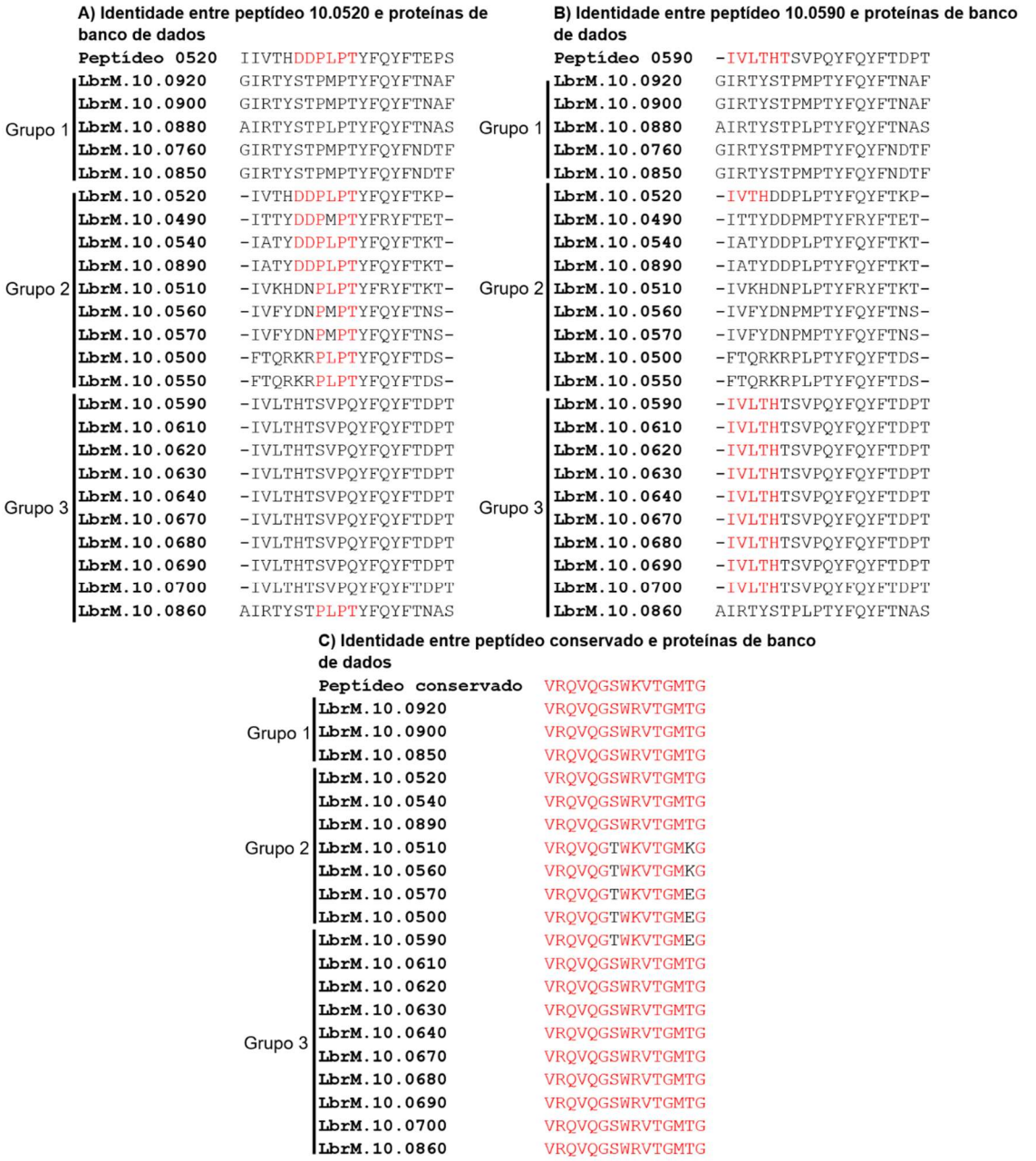
Figura 19. Análise comparativa das sequências envolvidas no estudo. Nas figuras A e B estão representados os alinhamentos entre os peptídeos derivados das proteínas LbrM.10.0520 e LbrM.10.0590, usados na produção dos soros, frente as proteínas recombinantes utilizadas no estudo, respectivamente. Demarcado em vermelho na figura A, estão os motivos idênticos (em comum) entre o peptídeo da LbrM.10.0520 e as proteínas recombinantes que o respectivo soro reconhece, a LbrM.10.0520 e a LbrM.10.0540. Em azul, encontra-se marcado o motivo diferente encontrado na proteína LbrM.10.0590. Na figura B está demarcado em vermelho os motivos em comum entre o peptídeo da LbrM.10.0590 e as proteínas que ele reconhece, a LbrM.10.0590 e a LbrM.10.0520. Em azul está marcado o motivo diferente encontrado na proteína LbrM.10.0540.



Fonte: A autora.

A análise da figura indica que as sequências de aminoácidos DDPLPT e IVLTH sejam críticas para o reconhecimento pelos anticorpos dos soros anti-10.0520 e anti-10.0590, respectivamente, em sequências de *L. braziliensis*, embora não seja possível descartar outros aminoácidos como tendo um papel neste reconhecimento. Com base nessa análise, foi feita então uma pesquisa por esses motivos em todas as proteínas de GP63 do cromossomo 10 de *L. braziliensis*. Também foi realizada a busca pelo peptídeo conservado nas mesmas sequências. Na figura 20 estão representados os alinhamentos dos três peptídeos juntamente com as sequências das proteínas que contém a região equivalente aos peptídeos.

Figura 20. Análise dos motivos de reconhecimento nas sequências de GP63 do cromossomo 10 de *L. braziliensis*. Nas figuras A, B e C encontram-se alinhadas as sequências dos peptídeos usados na produção dos soros anti-10.0520, anti-10.0590 e conservado, respectivamente, juntamente com as sequências de GP63 de *L. braziliensis* de banco de dados que contêm os motivos de reconhecimento dos anticorpos avaliados. Demarcado em vermelho na figura A e B, estão os motivos idênticos em comum entre os peptídeos utilizados na produção dos soros anti-10.0520 e anti-10.0590, respectivamente, e diversas sequências de GP63 do cromossomo 10.



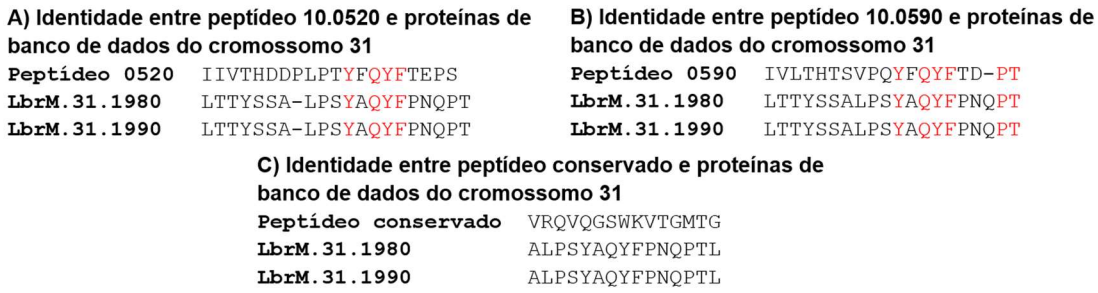
Fonte: A autora.

Observando esses dados juntamente com os dados das proteínas separadas por grupos identificadas na figura 15, foi possível estabelecer que o anti-10.0520 deve reconhecer preferencialmente as proteínas GP63 do grupo 2 de *L. braziliensis* previamente definido, enquanto o anti-10.0590 parece ter uma

preferência pelas proteínas integrantes do grupo 3, embora também possa reconhecer proteínas presentes no grupo 2, visto que ele consegue reconhecer a proteína LbrM.10.0520 (grupo 2). Nenhum dos anticorpos parece reconhecer proteínas do grupo 1. Com relação ao anticorpo conservado, todas as proteínas de GP63 do cromossomo 10 parecem ser reconhecidas.

Apesar de não terem sido feitos testes dos soros utilizando proteínas recombinantes do cromossomo 31 de *L. braziliensis*, também foi feita a procura por motivos similares entre as sequências peptídicas dos anticorpos e as duas sequências existentes no cromossomo 31 do parasita (Figura 21).

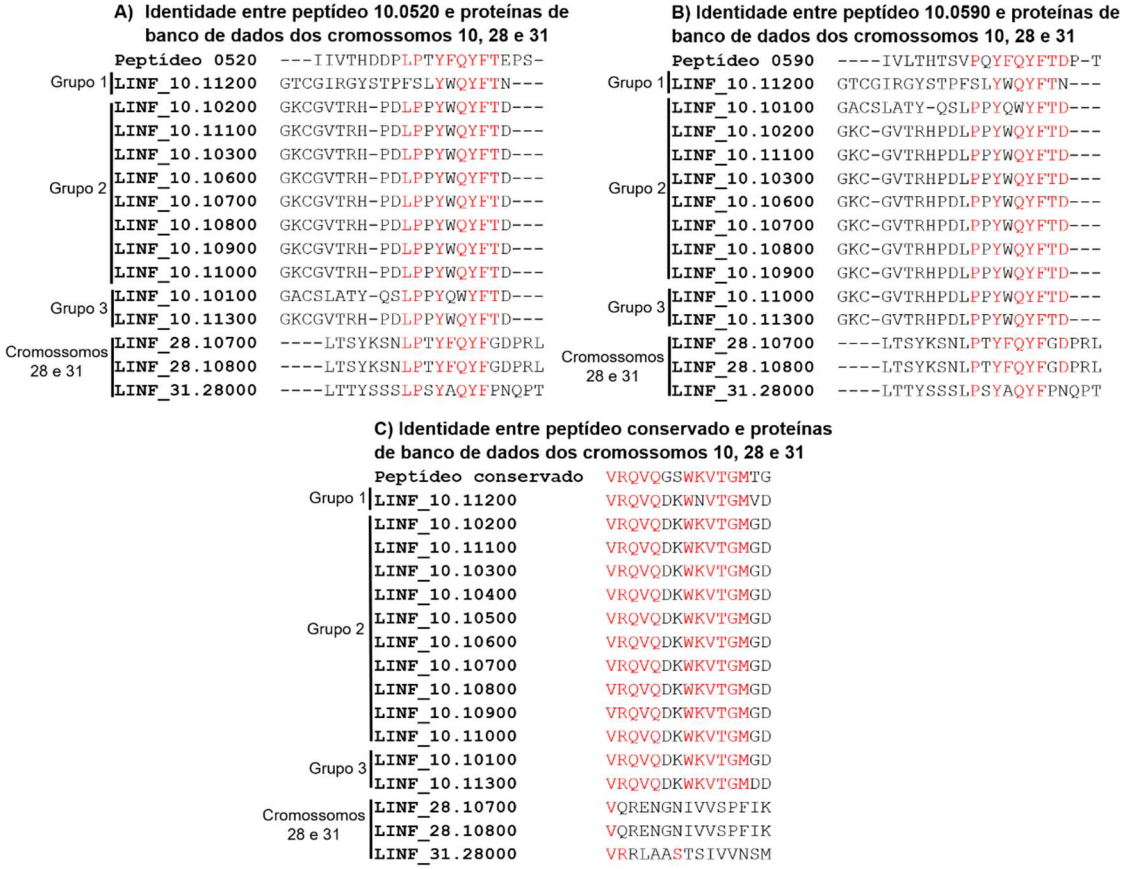
Figura 21. Análise dos motivos de reconhecimento nas sequências de GP63 do cromossomo 31 de *L. braziliensis*. Nas figuras A, B e C encontram-se alinhadas as sequências dos peptídeos usados na produção dos soros anti-10.0520, anti-10.0590 e conservado, respectivamente, juntamente com as sequências de GP63 de *L. braziliensis* de banco de dados do cromossomo 31. Demarcado em vermelho na figura A e B, estão os aminoácidos idênticos em comum entre os peptídeos utilizados na produção dos soros anti-10.0520 e anti-10.0590, respectivamente, e as proteínas.



Fonte: A autora.

Com essa análise foi possível observar que existem resíduos de aminoácidos em comum entre os peptídeos e as sequências do cromossomo 31, porém, não se encontram dispostos de maneira sequencial. Dessa forma não é possível afirmar que há reconhecimento dessas sequências pelos anticorpos do estudo, mas o seu reconhecimento não pode ser excluído. Em seguida, a mesma análise foi aplicada aos genes de GP63 de bancos de dados do cromossomo 10, 28 e 31 de *L. infantum* (Figura 22).

Figura 22. Análise dos motivos de reconhecimento nas sequências do cromossomo 10, 28 e 31 de *L. infantum*. Legenda: Nas figuras A, B e C encontram-se alinhadas as sequências peptídicas ligadas aos soros anti-10.0520, anti-10.0590 e conservado, respectivamente, juntamente com as sequências de GP63 de *L. infantum*. Demarcado em vermelho nas figuras A, B e C estão demarcados os aminoácidos idênticos encontrados em comum entre os peptídeos e as sequências de bancos de dados.



Fonte: A autora.

Estas análises indicam que os principais componentes dos motivos de reconhecimento dos anticorpos 10.0520 (DDPLPT) e 10.0590 (IVLTH), presentes nas sequências de *L. braziliensis,* não foram devidamente encontrados em *L. infantum.* No entanto, o motivo YFQYFT dos peptídeos 10.0520 e 10.0590 encontra-se presentes em todas as sequências avaliadas, incluindo as sequências do cromossomo 28 e 31, com alguns resíduos variáveis. Já o peptídeo conservado parece reconhecer proteínas somente do cromossomo 10 de *L. infantum*. Dessa forma, diferente do que foi visto em *L. braziliensis*, não é possível diferenciar entre os grupos de C-terminal de *L. infantum.*

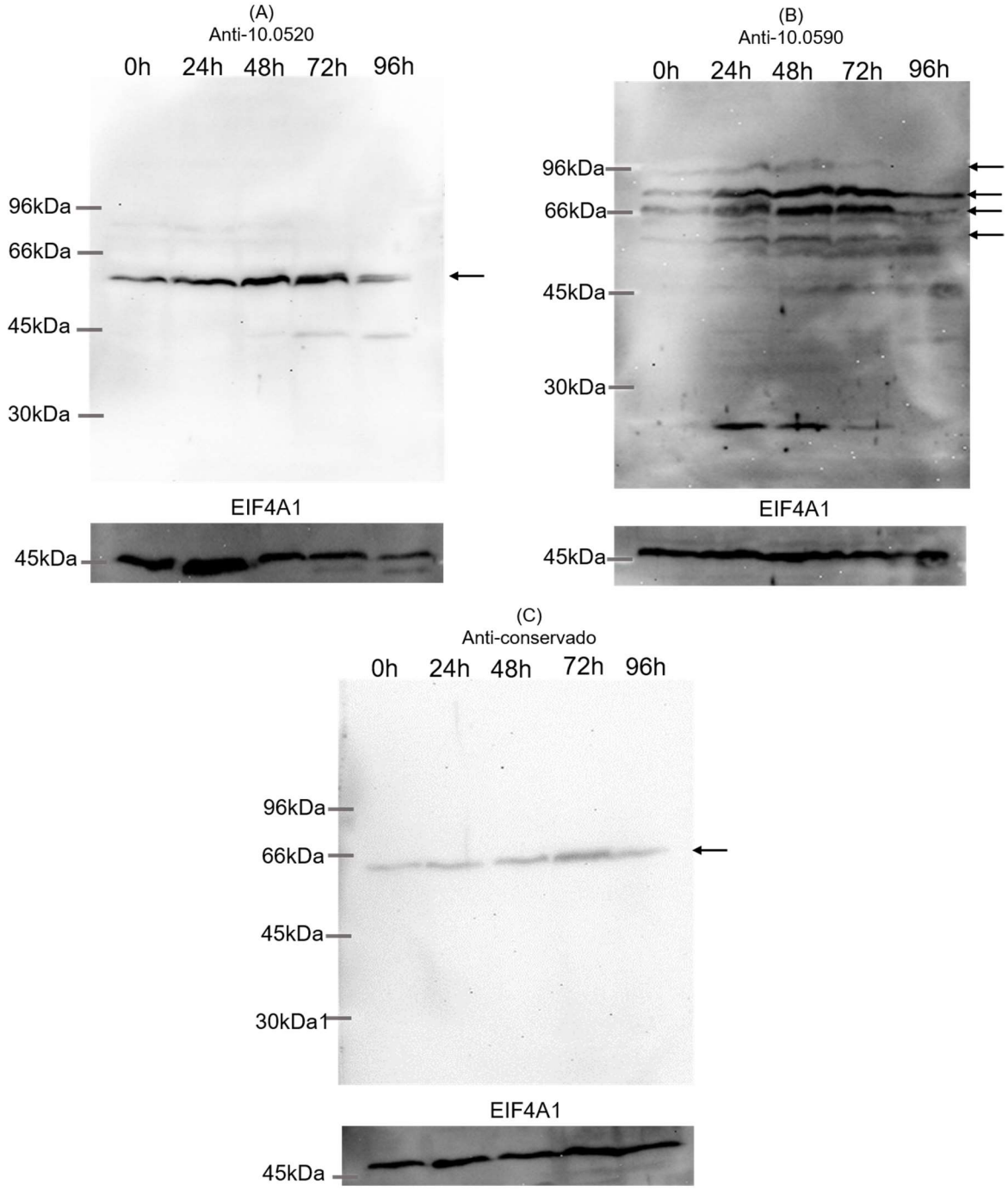
4.2 RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS DE GP63 FRENTE A CURVAS DE CRESCIMENTO DE PROMASTIGOTAS DE *L. BRAZILIENSIS*

Ensaios de *Western Blot* foram realizados frente a curvas de crescimento de *L. braziliensis* e podem ser visualizados na figura 23. Na figura 23A, pode ser observado o ensaio com o anti-10.0520. Neste ensaio, houve o reconhecimento de bandas de ~60 kDa, as quais se mantêm estável durante todo o ciclo do parasita, com um aumento discreto dos níveis de expressão nos pontos de 48h e 72h, correspondentes a fase de crescimento exponencial.

Na figura 23B está representado o ensaio realizado com o anti-10.0590. É possível observar a detecção de ao menos cinco bandas distintas, uma inferior a 30 kDa e outras bandas de ~60 kDa, ~66 kDa, ~75 kDa e ~96 kDa. A banda inferior a 30 kDa apresenta expressão detectada somente nos períodos de 24h até 72h, e a banda de ~96 kDa não apresenta expressão em 96h. De uma forma geral, todas as bandas estão mais fortes nos pontos do meio da curva, indicando uma maior expressão nas células em crescimento exponencial, com uma particularidade que a banda de ~75 kDa se torna mais abundante que as demais no ponto de 96h.

Na figura 23C, está representado o ensaio realizado com o anti-peptídeo conservado, onde é possível observar a presença de uma banda de ~60 kDa, similar a banda encontrada pelo anti-10.0520. Pode-se observar que os níveis de expressão permanecem estáveis durante todo o ciclo do parasita com um discreto aumento no ponto de 72h.

Figura 23. *Western Blot* dos anticorpos anti-GP63 frente a curvas de crescimentos de promastigotas de *L. braziliensis*. Extratos celulares de promastigotas de *L. braziliensis* fracionados em gel *SDS-PAGE* 15% e analisados por *WB* com anticorpos anti-10.0520 (A), anti-peptídeo conservado (B) e anti-10.0590 (C). O ensaio demonstrado na figura A foi realizado na diluição 1:100 enquanto os das figuras B e C foram realizados na diluição 1:50. As setas apontam para as diferentes bandas detectadas.



Fonte: A autora.

4.3 RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS DE GP63 FRENTE A CURVAS DE CRESCIMENTO DE *L. INFANTUM*

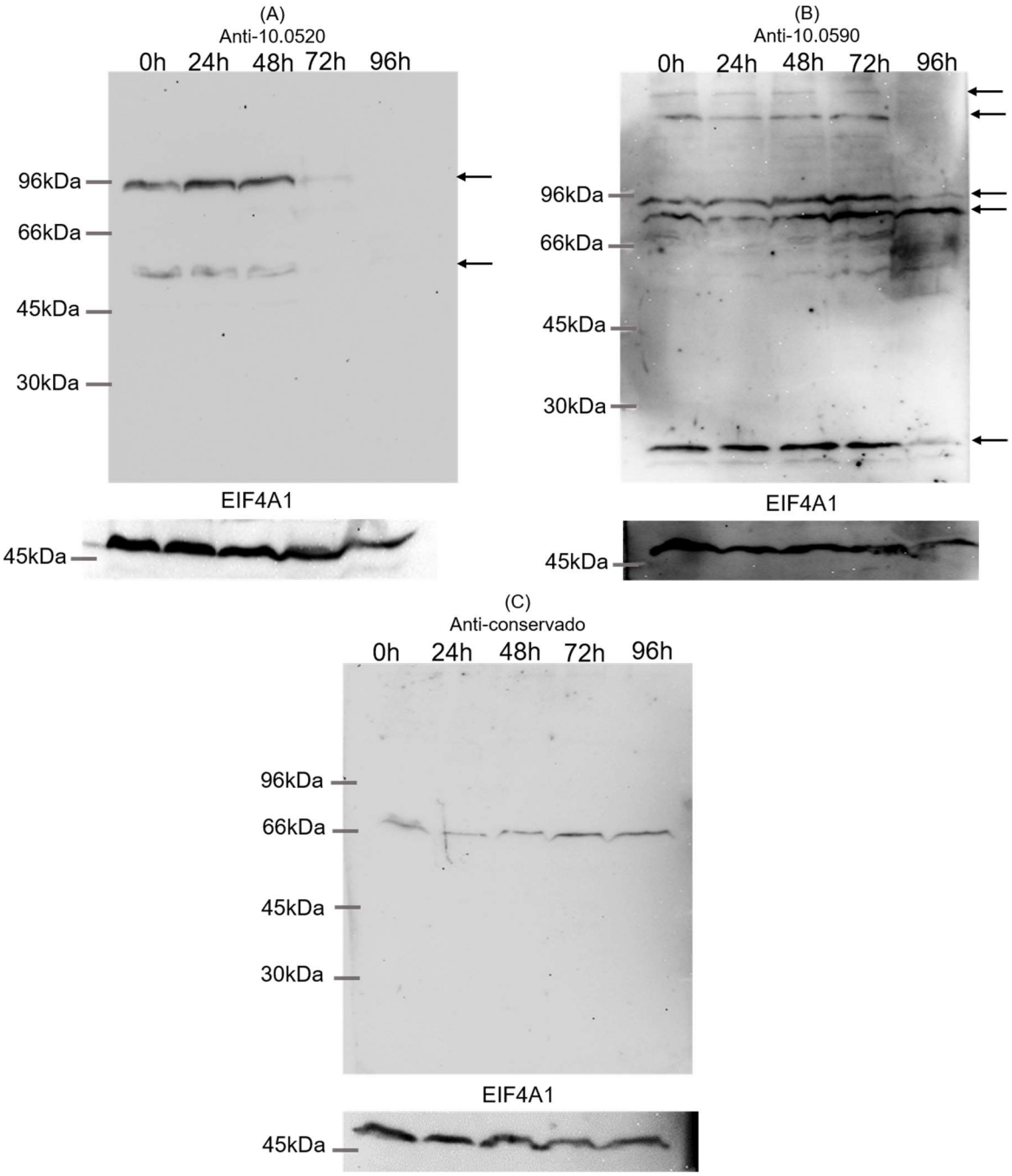
4.3.1 Curvas de Crescimento de Promastigotas

Ensaios de *Western Blot* realizados frente a curvas de crescimento de promastigotas de *L. infantum* podem ser visualizados na figura 24. Na figura 24, pode ser observado o ensaio com o anti-10.0520, onde, houve um fraco reconhecimento de uma banda de ~60 kDa, equivalente a banda observada em *L. braziliensis*, e outro mais significativo de uma banda de ~96 kDa. Observa-se que ambas as bandas apresentam expressão praticamente nula nos dois últimos pontos da curva, indicando expressão preferencial nas fases de crescimento exponencial.

Na Figura 24B está representado o ensaio realizado com o anti-10.0590, representante dos grupos 2 e 3 de *L. infantum.* Neste, é possível observar a presença de uma banda inferior a 30 kDa e outras bandas de ~80 kDa, ~90 kDa, e outras duas bandas superiores as demais. Diferentemente do que acontece em *L. braziliensis,* as bandas sugerem expressão mais estável ao longo das fases de crescimento, havendo nível mais baixo de expressão somente no tempo de 96h da curva de crescimento. Similar a *L. braziliensis*, uma única banda, no caso de ~80 kDa, se torna mais abundante no ponto de 96h, quando as demais diminuem.

Na figura 24C, está representado o ensaio realizado com o anti-peptídeo conservado, onde é possível observar a presença de uma banda de ~66 kDa. Pode-se observar que os níveis de expressão permanecem estáveis durante todo o ciclo do parasita, como também visto em *L. braziliensis*. Como controle das reações, foi utilizado o anticorpo da EIF4A1, proteína citoplasmática de expressão constitutiva.

Figura 24. *Western Blot* dos anticorpos anti-GP63 frente a curvas de crescimentos de promastigotas de *L. infantum*. Extratos celulares de promastigotas de *L. infantum* fracionados em gel *SDS-PAGE* 15% e analisados por *WB* contra os anticorpos anti-10.0520 (A), anti-10.0590 (B) e anti-peptídeo conservado (C). Os ensaios demonstrados nas figuras foram realizados na diluição 1:50. As setas apontam para as diferentes bandas detectadas.



Fonte: A autora.

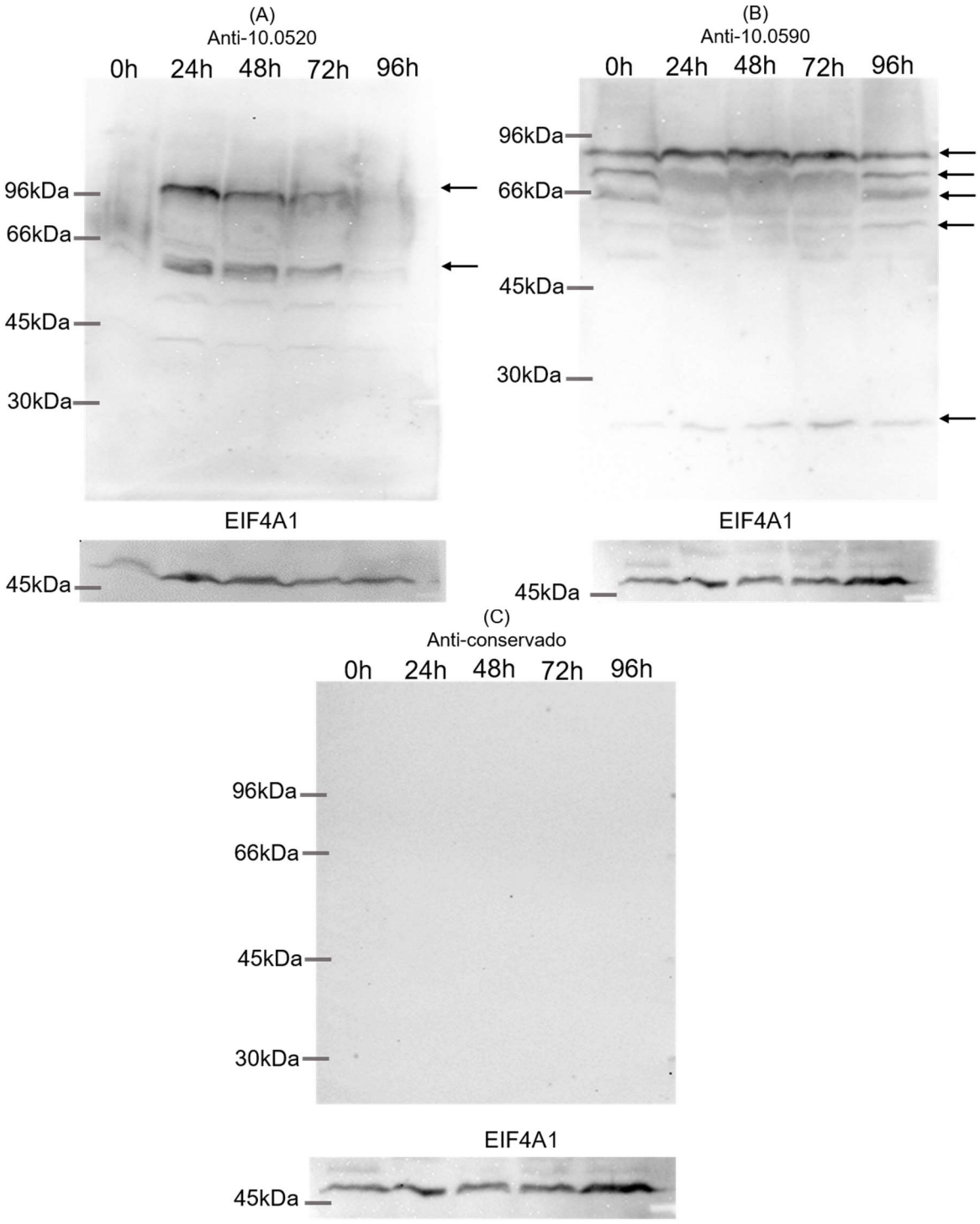
4.3.2 Curvas de Crescimento de Amastigotas

Os ensaios de *Western Blot* realizados frente a curvas de crescimento de amastigotas de *L. infantum* podem ser visualizados na figura 25. Na figura 25A, pode ser observado o ensaio com o anti-10.0520, mostrando o reconhecimento de uma banda de ~60 kDa e outro reconhecimento de uma banda de 96 kDa. Ambas as bandas podem ser visualizadas também na curva de promastigotas da espécie, porém não há reconhecimento nos pontos de 0h e 96h, indicando expressão somente em fase de crescimento exponencial.

Na Figura 25B está representado o ensaio realizado com o anti-10.0590. Neste, é possível observar a presença de uma banda inferior a 30 kDa e outras bandas de ~60 kDa, ~66 kDa, ~80 kDa, ~90 kDa. É possível observar que o perfil é mais semelhante ao observado para promastigotas de *L. braziliensis* do que promastigotas de *L. infantum*. E assim como em *L. braziliensis,* as bandas sugerem uma maior expressão nas células em crescimento exponencial, apresentando níveis mais baixos de expressão nos pontos de 0h e 96h da curva de crescimento.

Na figura 25C, está representado o ensaio realizado com o anti-peptídeo conservado, onde não foi possível detectar a presença de bandas. Como controle das reações, foi utilizado o anticorpo da EIF4A1, proteína citoplasmática de expressão constitutiva.

Figura 25. *Western Blot* dos anticorpos anti-GP63 frente a curvas de crescimentos de amastigotas de *L. infantum*. Extratos celulares de amastigotas de *L. infantum* fracionados em gel *SDS-PAGE* 15% e analisados por *WB* contra os anticorpos anti-10.0520 (A), anti-10.0590 (B) e anti-peptídeo conservado (C). Os ensaios demonstrados nas figuras foram realizados na diluição 1:50. As setas apontam para as diferentes bandas detectadas.



Fonte: A autora.

4.4 RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS DE GP63 FRENTE A FRACIONAMENTOS CELULARES POR GRADIENTE DE DIGITONINA

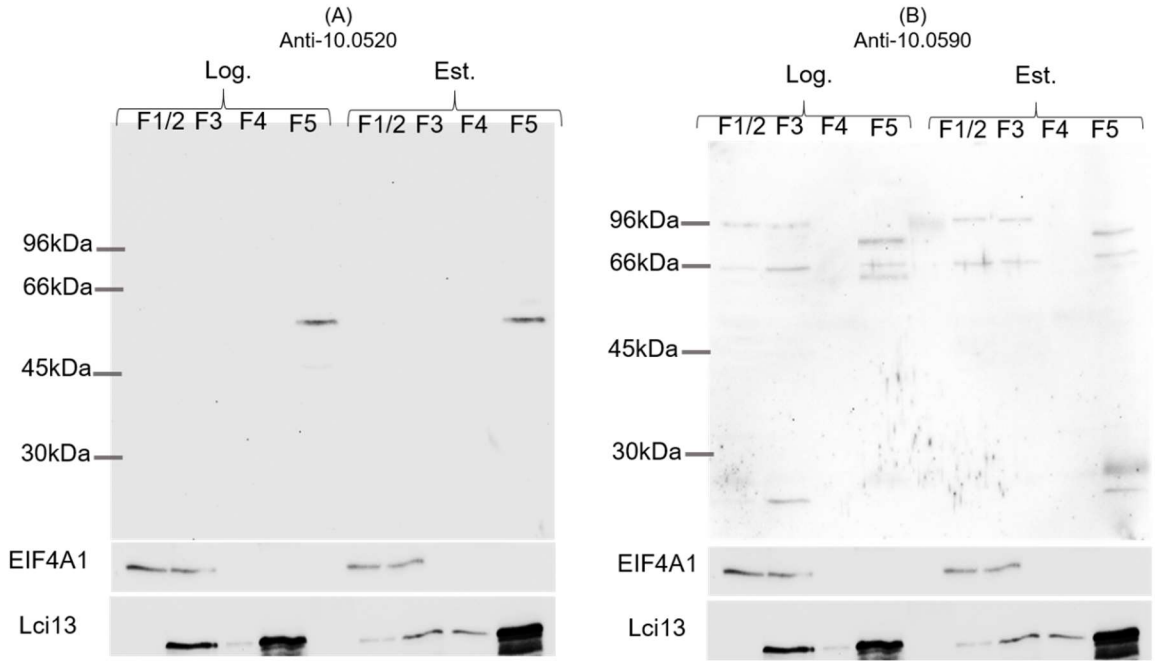
4.4.1 Fracionamento Celular de Promastigotas de *L. braziliensis*

Os ensaios de *Western Blot* realizados frente ao fracionamento celular de promastigotas de *L. braziliensis,* em fase de crescimento logarítimica e estacionária, podem ser visualizados na figura 26. Na figura 26A, pode ser observado o ensaio com o anti-10.0520. Neste ensaio foi possível observar o aparecimento da banda de ~60 kDa, previamente identificadas em ambas as fases de crescimento. Esta banda aparece somente na fração 5 do fracionamento, porção que contém proteínas insolúveis, nucleares e de membrana.

Na figura 26B está o ensaio realizado com o anti-10.0590. Como na análise anterior, neste ensaio também foi observado a presença de diversas bandas, em ambas as fases de crescimento, e foram detectadas de forma diferenciada nas várias frações testadas. Na fração 1/2, é possível visualizar uma banda de ~96 kDa e outra de ~66 kDa em ambas as fases de crescimento. Já na fração 3 é possível visualizar as mesmas bandas de ~96 kDa e ~66 kDa, nas duas fases, e outra banda inferior a 30 kDa que aparece apenas na fase estacionária. Na fração 4 não foram visualizadas bandas em nenhuma fase de crescimento. Na fração 5, por sua vez, foram observadas bandas de ~75 kDa, ~66 Da e ~63 kDa nas duas fases, e uma banda inferior a 30 kDa somente na fase estacionária.

Nos ensaios de *western Blot* realizados com o anti-peptídeo conservado não foi possível visualizar nenhuma banda (dados não mostrados). Como observado na figura 26, e como controle do experimento de fracionamento, proteínas citoplasmáticas (representadas pelo EIF4A1) podem ser encontradas nas frações 1/2 e 3, enquanto proteínas mitocondriais (Lci13, a HSP70 mitocondrial) podem estar presentes principalmente nas frações 3, 4 e 5.

Figura 26. *Western Blot* dos anticorpos de GP63 frente ao fracionamento de *L. braziliensis*. As frações resultantes do fracionamento por digitonina de promastigotas de *L. braziliensis*, em duas fases de crescimento diferentes, foram analisados contra os anticorpos anti-10.0520 (A), anti-10.0590 (B) na diluição de 1:50. Como controle citoplasmático, foi utilizado o anticorpo EIF4A1, e como controle mitocondrial foi utilizado o anticorpo anti-Lci13 (HSP70 mitocondrial), ambos em diluição de 1:1000.



Fonte: A autora.

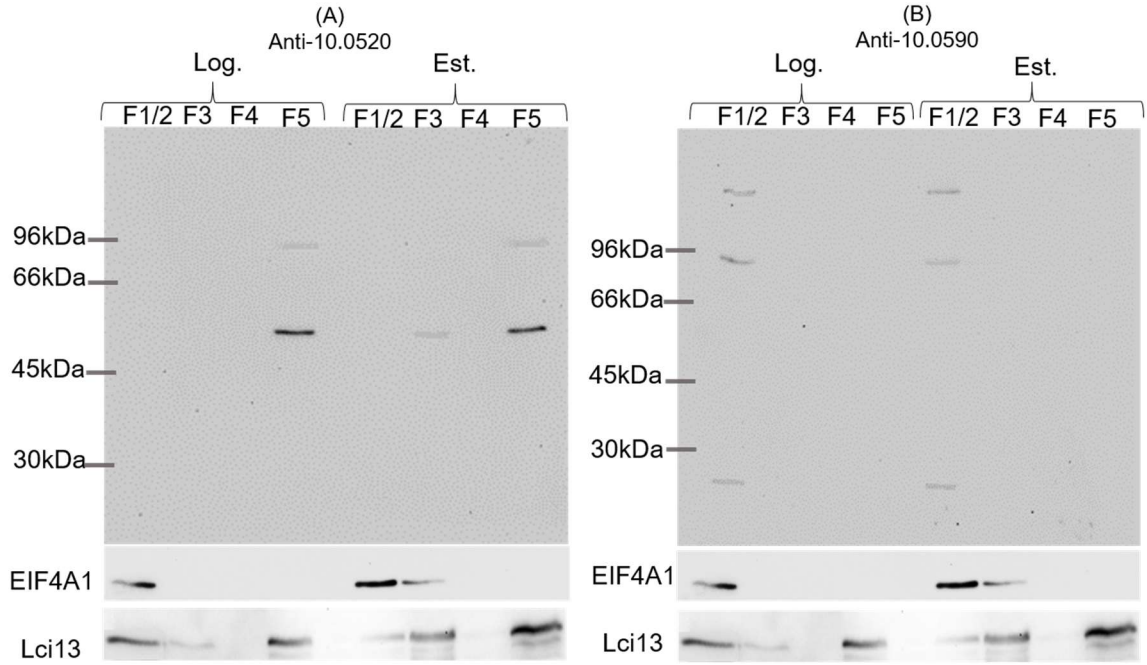
4.4.2 Fracionamento Celular de Promastigotas De *L. infantum*

Os ensaios de *Western Blot* realizados frente aos fracionamentos por gradiente de digitonina de *L. infantum* podem ser visualizados na figura 27. Também foram feitos fracionamentos nas fases de crescimento logarítimica e estacionária. Na figura 27A, pode ser observado o ensaio com o anti-10.0520. Neste ensaio foi possível observar o aparecimento de uma banda de ~96 kDa, em ambas as fases de crescimento, que aparece somente na fração 5 do fracionamento. Além desta, também é possível observar uma banda de ~60 kDa que aparece na fração 5 de ambas as fases de crescimento, mas também pode ser vista fracamente na fração 3 das células em fase de crescimento estacionária.

Na figura 27B está o ensaio realizado com o anti-10.0590. Neste ensaio foi observado a presença de três bandas distintas, em ambas as fases de crescimento, apenas na fração 1/2. É possível observar uma banda com peso molecular superior a 96 kDa, outra banda de ~96 kDa e outra com peso inferior a 30 kDa. Nos ensaios

de *western Blot* realizados com o anti-peptídeo conservado, mais uma vez, não foi possível visualizar nenhuma banda (dados não mostrados).

Figura 27. *Western Blot* dos anticorpos anti-GP63 frente ao fracionamento de *L. infantum*. As frações resultantes do fracionamento por digitonina de promastigotas de *L. infantum*, em duas fases de crescimento diferentes, foram analisados contra os anticorpos anti-10.0520 (A), anti-10.0590 (B) na diluição de 1:50. Como controle citoplasmático, foi utilizado o anticorpo EIF4A1, e como controle mitocondrial foi utilizado o anticorpo anti-Lci13 (HSP70 mitocondrial), ambos em diluição de 1:1000.

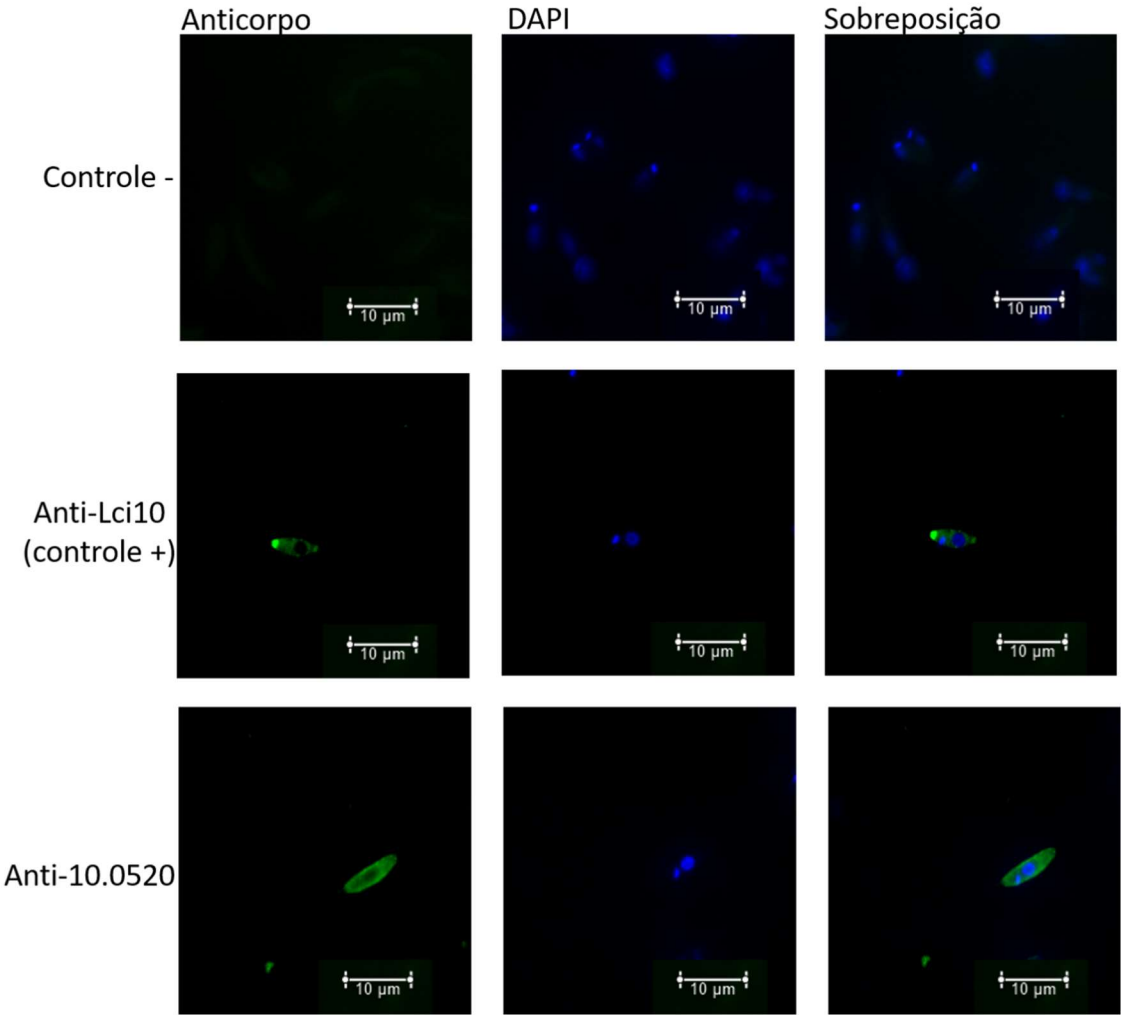


Fonte: A autora.

4.5 ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA COM O ANTICORPO 10.0520

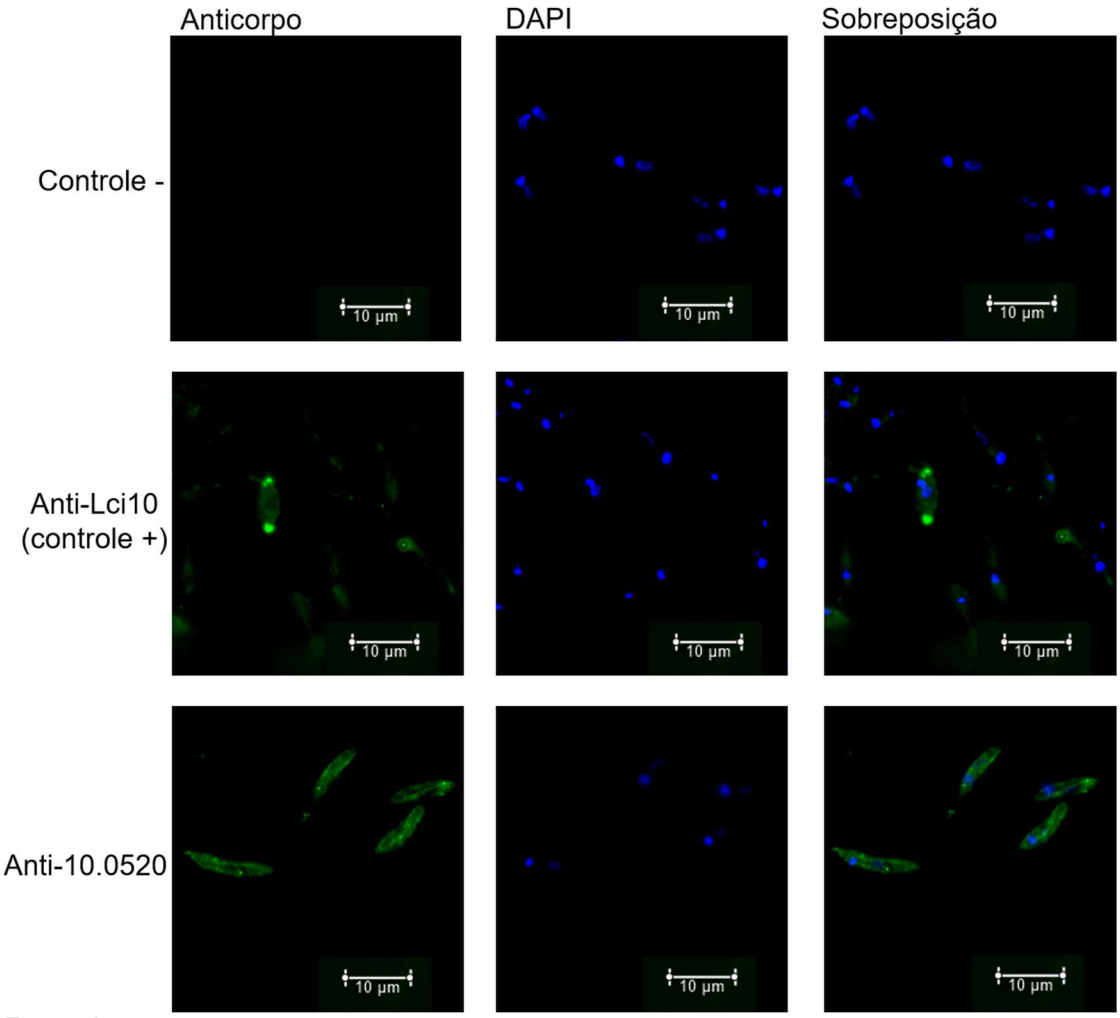
Visando confirmar os resultados obtidos acima, foram realizados ensaios de imunofluorescência com os anticorpos anti-10.0520, com as espécies de *L. braziliensis* e *L. infantum* ambas em fase exponencial de crescimento. Os resultados podem ser vistos nas figuras 28 e 29, respectivamente. Ambas as espécies avaliadas apresentaram o mesmo padrão de fluorescência, que marcou grande parte da membrana das células, indicando que as proteínas detectadas pelos anticorpos anti-10.0520 são majoritariamente membranares. Como controle positivo do experimento, foi utilizado o anticorpo contra a proteína Lci10, com padrão de fluorescência apical e axial.

Figura 28. Imunofluorescência de células de *L. braziliensis* com anticorpo 10.0520. Na figura está representado o ensaio feito com *L. braziliensis.* Nas duas primeiras fileiras estão representados os controles negativo e positivo, respectivamente. Na terceira fileira observa-se o ensaio realizado com o anticorpo 10.0520. Em azul está marcado pelo DAPI o núcleo e cinetoplasto das células, e em verde estão os antígenos reconhecidos pelos anticorpos utilizados. Na última coluna observa-se a sobreposição das duas fluorescências.



Fonte: A autora.

Figura 29. Imunofluorescência de células de *L. infantum* com anticorpo 10.0520. Na figura está representado o ensaio feito com *L. infantum.* Nas duas primeiras fileiras estão representados os controles negativo e positivo, respectivamente. Na terceira fileira observa-se o ensaio realizado com o anticorpo 10.0520. Em azul está marcado pelo DAPI o núcleo e cinetoplasto das células, e em verde estão os antígenos reconhecidos pelos anticorpos utilizados. Na última coluna observa-se a sobreposição das duas fluorescências.



Fonte: A autora.

5 DISCUSSÃO

Estudos têm mostrado que as espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* apresentam maior número de genes codificantes da proteína de virulência GP63, preferencialmente situados no cromossomo 10 (Steinkraus et al. 1993; Valdivia et al. 2015). Dentre essas espécies, destaca-se a *Leishmania braziliensis*, que apresenta o maior número de cópias gênicas, resultado de um processo de expansão que possivelmente ocorreu como um mecanismo de adaptação do parasita frente aos seus diferentes hospedeiros (VALDIVIA et al., 2015). A grande quantidade de cópias são dispostas em "*tandem"*, o que pode viabilizar diferentes níveis de transcrição desses genes (ROGERS et al., 2011), corroborando com análises de um estudo prévio de RNAseq com promastigotas de *L. braliziensis* (dados não publicados). Além disso, estudos *in silico* sugerem que as sequências presentes no cromossomo 10 de *Leishmania sp.* podem estar mais relacionadas a funções exercidas no hospedeiro vertebrado (Castro Neto et al. 2019).

No que diz respeito a expressão das proteínas de GP63, sabe-se que em espécies de *Leishmania* do subgênero *Leishmania* existem diferentes níveis de expressão das mesmas ao longo das fases de crescimento do parasita, como visto em estudo realizado com *L. infantum*. Através de análises de espectometria de massas juntamente com a utilização de anticorpo policlonal anti-GP63, foi visto que o conteúdo de GP63 liberado em exossomas de *L. infantum* pode variar, sendo maior ou menor de acordo com a fase de crescimento em que o parasita se encontra (MARSHALL et al., 2018). Além de diferenças de expressão, as proteínas GP63 apresentam notáveis divergências entre suas regiões de C-terminal, o que pode influenciar tanto no momento de expressão das mesmas, como na localização dessas proteínas no parasita. Já foi observado em estudo com *L. mexicana,* que diferentemente das GP63 nas formas promastigotas, nas formas amastigotas as proteínas que não possuíam sinal de adição da âncora de GPI foram localizadas na bolsa flagelar do parasita (MEDINA-ACOSTA et al., 1989). Estudos *in silico* apontaram que essas divergências na C-terminal das GP63 são observadas também em *L. braziliensis*, com a existência de três tipos de C-terminal predominantes: um mais alongado, composto por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que podem caracterizar domínio transmembranar (grupo 1); outro com

a presença do sinal de adição da âncora de GPI (grupo 3); e outro muito mais curto que os demais, que termina em uma região conservada, caracterizando um C-terminal inexistente em outras espécies de *Leishmania* (grupo 2) (Castro Neto et al. 2019).

Os anticorpos utilizados nesse estudo para análise de expressão das proteínas de GP63 se mostraram específicos a grupos distintos de proteínas de GP63 de *L. braziliensis*. Apesar disso, foi observado que as proteínas de ambas as espécies avaliadas são expressas de maneira simultânea, porém, com diferentes níveis de expressão ao longo do ciclo de vida dos parasitas, corroborando com os dados da literatura (MEDINA-ACOSTA; KARESS; RUSSELL, 1993; VOTH et al., 1998). Dentre os anticorpos utilizados, o anti-10.0520 se mostrou mais específico, identificando menos bandas em ambas as espécies avaliadas. Nos resultados obtidos frente as curvas de promastigota e amastigota de *L. infantum*, podemos observar que existe clara preferência de expressão em fase de crescimento exponencial. Já em *L. braziliensis*, essa preferência não é evidente, com as proteínas apresentando expressão mais estável. Com estes ensaios foi possível ver que as proteínas de GP63 apresentam-se em isoformas, com diferentes pesos moleculares que indicam processos de modificação pós-traducionais distintos. Esses dados corroboram com estudo realizado também com *L. braziliensis* provenientes de lesões cutâneas, onde a partir da utilização de anticorpo policlonal de GP63 de *L. mexicana*, foram encontradas diversas isoformas da proteína com pesos moleculares de 35 kDa até 120 kDa (CUERVO et al., 2008). A origem da diversidade de isoformas de GP63 encontradas em estudos já foi avaliada em *L. infantum,* onde foi visto que a retirada das N- glicosilações e da âncora de GPI do C-terminal das proteínas não impactou significativamente na migração das proteínas em gel de poliacrilamida, sugerindo que essas modificações pós-traducionais pelas quais as proteínas passam não são unicamente responsáveis pelas isoformas existentes (YAO et al., 2004).

Nos ensaios utilizando o anti-10.0590 frente as curvas de crescimento, é possível observar a detecção de uma maior variedade de isoformas, indicando possivelmente a detecção não apenas de proteínas do cromossomo 10, mas também as proteínas dos cromossomos 28 (*L. infantum*) e 31 (*L. infantum* e *L. braziliensis*). Além disso, foi possível detectar cinco bandas definidas de proteínas nas duas formas evolutivas de *L. infantum,* porém, as proteínas apresentam

diferentes pesos moleculares, supostamente indicando o reconhecimento de variantes das mesmas proteínas, mas que apresentam modificações pós-traducionais distintas para cada forma de vida. A diferença dessas modificações entre diferentes formas evolutivas de uma mesma espécie já foi vista em estudos com *L. infantum* e *Trypanosoma cruzi,* e em ambas, essa diferença de modificação foi correlacionada a diferentes localizações subcelulares das proteínas nos parasitas (HSIAO et al., 2008; KULKARNI et al., 2009).

Com relação as análises com o anticorpo conservado, foi visto que ele consegue detectar apenas proteínas do cromossomo 10 de ambas as espécies, o que pode justificar o reconhecimento de apenas uma banda nas formas promastigota de ambas as espécies. Além disso, observou-se que nas formas promastigotas os resultados foram mais fracos de forma geral, se comparados aos resultados obtidos com os demais anticorpos, e em amastigotas não houve detecção de nenhuma banda. É possível que o peptídeo utilizado para produção do anticorpo não tenha sido imunogênico o suficiente para geração de títulos de anticorpos mais altos, o que pode explicar o reconhecimento mais fraco em promastigotas. Com relação a ausência de reconhecimento em amastigotas, alguns estudos apontam que o processamento pós-traducional dessas proteínas acontece de maneira diferente do dos promastigotas (HSIAO et al., 2008; MEDINA-ACOSTA et al., 1989), como também foi visto neste estudo em *L. infantum*, havendo então a possibilidade de alguma modificação desconhecida estar próxima ou na própria região do peptídeo conservado, o que prejudicaria o reconhecimento dessa região.

Os resultados obtidos de análise de expressão das proteínas de GP63 de *L. braziliensis* até o presente momento, não corrobora totalmente com os dados da literatura das espécies do subgênero *Leishmania* (RAMAMOORTHY et al., 1992; VOTH et al., 1998) visto que não foi observado distinção de expressão entre os grupos de C-terminal, porém, as proteínas apresentaram diferentes níveis de expressão. Os dados mostram que as proteínas reconhecidas pelo anti-10.0590 (grupo 3 e proteínas do cromossomo 31) apresentaram aumento de expressão em determinados momentos do crescimento do parasita, mas não são exclusivas da fase logarítmica ou estacionária. Já os dados com relação ao anti-10.0520 (grupo 2), demonstraram que as proteínas são expressas de maneira constitutiva. Com relação a diferença de expressão entre formas evolutivas, não foi possível avaliar

as formas amastigotas de *L. braziliensis* para conclusão da análise. O perfil de bandas encontradas de GP63 em todos os ensaios de *Western Blot* corrobora com ensaios de detecção de atividade enzimática de metaloproteases, pela técnica de zimografia, realizados com extrato de *L. braziliensis,* onde foram detectadas atividades proteolíticas a partir de 50 kDa até 125 kDa (CUERVO et al., 2006). Bandas inferiores a 30 kDa não foram encontradas, sugerindo que a banda encontrada com o anti-10.0590 pode ser produto de degradação.

Acerca da localização subcelular das proteínas de GP63, foi visto tanto por fracionamento quanto por imunofluorescência que o anti-10.0520 parece detectar proteínas exclusivamente membranares, resultado esse surpreendente visto que esse anticorpo detecta preferencialmente proteínas do grupo 2 de C-terminal de *L. braziliensis*, que não apresentam sinal de adição da âncora de GPI. Entretanto, não é excluída a possibilidade dessas proteínas serem liberadas para o meio extracelular posteriormente, como já foi visto em estudo com *L. mexicana,* onde as proteínas foram liberadas da membrana possivelmente por eventos de autoproteólise (MCGWIRE et al., 2002).

Através dos dados obtidos com o anti-10.0590 pelo fracionamento celular, foi possível verificar que as proteínas detectadas com esse anticorpo se dividem entre citoplasmáticas, organelares e membranares, com algumas sendo encontradas em todos os compartimentos simultaneamente, como visto em *L. braziliensis.* A variedade de bandas encontradas nessa análise reflete os resultados encontrados na análise de motivos realizada, onde foi visto que esse anticorpo pode detectar proteínas não apenas do grupo 3 de C-terminal, mas também de proteínas dos cromossomos 28 e 31 das espécies avaliadas. Nesse caso, não foi possível definir especificamente a quais grupos de C-terminal cada proteína detectada pertence, porém, observa-se que foram encontradas proteínas em frações solúveis do fracionamento, indicando que elas podem ser eventualmente secretadas pelos parasitas, como já demonstrado em diversos estudos (JAFFE; DWYER, 2003; MCGWIRE et al., 2002; YAO et al., 2002).

De modo geral, este estudo evidenciou as diferenças de expressão das proteínas GP63 não apenas entre espécies distintas como também entre diferentes formas evolutivas de uma mesma espécie. Para maiores esclarecimentos sobre a atuação dessas proteínas durante ciclo de vida do parasita, outras análises ainda

precisam ser realizadas, especialmente no que concerne a localização subcelular dessas proteínas.

6 CONCLUSÕES

- Os anticorpos utilizados nesse estudo foram capazes de detectar grupos de proteínas GP63 distintos em *L. braziliensis* e *L infantum*;
- As proteínas identificadas nos ensaios de *Western Blot* apresentam diferentes pesos moleculares, indicando a presença de isoformas da proteína GP63 com diferentes modificações pós-traducionais;
- Há aumento de expressão da maioria das proteínas de GP63 durante crescimento exponencial dos parasitas;
- Não há diferenças de expressão com relação aos grupos de C-terminal de *L. braziliensis*;
- As proteínas identificadas pelos anticorpos 10.0520 e 10.0590 apresentam localização subcelular distintas, ressaltando as divergências entre as sequências de GP63.

REFERÊNCIAS

ABI ABDALLAH, D. S.; DENKERS, E. Y. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. DEC, 2012.

AGALLOU, M.; MARGARONI, M.; KARAGOUNI, E. Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of Leishmania infantum KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 29, n. 31, p. 5053–5064, 2011.

AKHOUNDI, M. et al. **A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and SandfliesPLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016.

ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 1–6, 2017.

ANDERSON, C. F. et al. IL-27 Regulates IL-10 and IL-17 from CD4 + Cells in Nonhealing Leishmania major Infection . **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 7, p. 4619–4627, 2009.

ANDERSON, C. F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing Infection despite Th1 Polarization Produced by a Strain of Leishmania major in C57BL/6 Mice . **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 5, p. 2934–2941, 2005.

ANTOINE, J. C. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 392–401, 1998.

ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.

BANCHEREAU, J. et al. Mmunobiology of Dendritic Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 18, n. Figure 1, p. 767–811, 2000.

BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. **Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans**. [s.l: s.n.]. v. 64

BARRAL, A. et al. Polar and Subpolar Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Brazil: Clinical and Immunopathologic Aspects. **International Journal of Dermatology**, v. 34, n. 7, p. 474–479, 1995.

BELKAID, Y. et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 10, p. 1497–1506, 2001.

BELKAID, Y. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502–507, 2002.

BOWLES, DE & BRITCH, SETH & LINTHICUM, KENNETH & JOHNSON, RN & LINTON, YVONNE-MARIE & WHITE, G. **Sand Flies: Significance, Surveillance, and Control in Contingency OperationsArmed Forces Pest Management Board**. [s.l: s.n.].

BRITO, A. N. A. L. M. **AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES PARÁLOGOS CODIFICANTES DA PROTEÍNA DE VIRULÊNCIA GP63 DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS**. [s.l: s.n.].

BRITTINGHAM, A. et al. 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.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n.

10151, p. 951–970, 2018.
CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, n. 4, p. 315–325, 1994.
CECÍLIO, P. et al. Deception and manipulation: The arms of Leishmania, a successful parasite. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–16, 2014.
CHAGAS, A. C. et al. Lundep, a Sand Fly Salivary Endonuclease Increases Leishmania Parasite Survival in Neutrophils and Inhibits XIIa Contact Activation in Human Plasma. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 2, 2014.
CHAUHAN, J. S.; RAO, A.; RAGHAVA, G. P. S. In silico Platform for Prediction of N-, O- and C-Glycosites in Eukaryotic Protein Sequences. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–10, 2013.
CHEN, Y. et al. Current Visceral Leishmaniasis Research: A Research Review to Inspire Future Study. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **The Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 239–247, 2010.
CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; RONDÓN, A. J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: A disease due to an immunological defect of the host. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 603–610, 1972.
CRISTINA, E.; ALTOÉ, F. Avaliação da relevância da gp63 de Leishmania braziliensis e Leishmania infantum na interação com o hospedeiro invertebrado. 2013.
CUERVO, P. et al. A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of Leishmania (Viannia) braziliensis strains. **Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 177–185, 2006.
CUERVO, P. et al. Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in Leishmania (Viannia) braziliensis strains. **Acta Tropica**, v. 106, n. 3, p. 143–148, 2008.
D'AVILA-LEVY, C. M. et al. GP63 Function in the Interaction of Trypanosomatids with the Invertebrate Host: Facts and Prospects. In: **Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma**. [s.l: s.n.]. v. 74.
DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, p. 491–502, 2009.
DOS REIS, L. L. et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 638–645, 2017.
DOWLATI, Y. Cutaneous leishmaniasis: Clinical aspect. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 425–431, 1996.
DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 34–50, 2010.
ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430–442, 2018.
FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 820–832, 2004.
FORGET, G. et al. Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in Leishmania donovani-induced inhibition of nitric oxide production. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6272–6279, 2006.
FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: Respiratory burst in macrophage signaling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 12 II, 2002.

GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 3, n. 2, p. 43–50, 2016.
GOLLOB, KENNETH J; VIANA, AGOSTINHO G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. **parasite immunology**, v. 36, n. 8, p. 367–376, 2014.
GOMEZ, M. A. et al. Leishmania GP63 Alters Host Signaling Through Cleavage-Activated Protein Tyrosine Phosphatases. **Science Signaling**, v. 2, n. 90, p. ra58–ra58, 2009.
GREEN, P. J. et al. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of Leishmania parasites by the human serum mannan-binding protein. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 66, n. 2, p. 319–328, 1994.
GUEX, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **Electrophoresis**, v. 30, n. SUPPL. 1, p. 162–173, 2009.
HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v. 41, p. 95–98, 1999.
HARTLEY, M. A. et al. Leishmaniavirus-Dependent Metastatic Leishmaniasis Is Prevented by Blocking IL-17A. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 9, p. 1–19, 2016.
HOOVER, D. L. et al. Killing of Leishmania tropica amastigotes by factors in normal human serum. **Journal of Immunology**, v. 132, n. 2, p. 893–897, 1984.
HSIAO, C. H. C. et al. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of Leishmania chagasi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 157, n. 2, p. 148–159, 2008.
ILGOUTZ, S. C.; MCCONVILLE, M. J. Function and assembly of the Leishmania surface coat. v. 31, 2001.
ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. May, p. 72, 2012.
JAFFE, C. L.; DWYER, D. M. Extracellular release of the surface metalloprotease, gp63, from Leishmania and insect trypanosomatids. **Parasitology Research**, v. 91, n. 3, p. 229–237, 2003.
JARAMILLO, M. et al. Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. **Cell Host and Microbe**, v. 9, n. 4, p. 331–341, 2011.
JARDIM, A. et al. Isolation and structural characterization of the Leishmania donovani kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. **The Biochemical journal**, v. 305 (Pt 1, p. 307–13, 1995.
JONES, D. E.; BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. IL-4-Independent Inhibition of IL-12 Responsiveness During Leishmania amazonensis Infection . **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 1, p. 364–372, 2000.
KAPLAN, M. J.; RADIC, M. Neutrophil extracelullar traps (NETs):Double-edged swords of innate immunity. **Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2689–2695, 2013.
KARIMI, A.; ALBORZI, A.; AMANATI, A. Visceral leishmaniasis: An update and literature review. **Archives of Pediatric Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, 2016.
KATOH, K. et al. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 14, p. 3059–3066, 2002.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.
KORN, T. et al. IL-17 and Th17 cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 485–517, 2009.
KOSTKA, S. L. et al. IL-17 Promotes Progression of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible Mice. **Journal Of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 3039–3046, 2010.
KROPF, P. et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 8, p. 1000–1002, 2005.
KULKARNI, M. M. et al. Trypanosoma cruzi GP63 proteins undergo stage-specific differential posttranslational modification and are important for host cell infection. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 2193–2200, 2009.
LAZARSKI, C. A. et al. IL-4 Attenuates Th1-Associated Chemokine Expression and Th1 Trafficking to Inflamed Tissues and Limits Pathogen Clearance. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.
LESSA, M. M. et al. Mucosal leishmaniasis: Epidemiological and clinical aspects. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 73, n. 6, p. 843–847, 2007.
MARSHALL, S. et al. Extracellular release of virulence factor major surface protease via exosomes in Leishmania infantum promastigotes. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018.
MAURICIO, I. L. et al. Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World Leishmania. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 5, p. 565–576, 2007.
MCGWIRE, B. S. et al. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked Leishmania surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis. Implications for parasite virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 11, p. 8802–8809, 2002.
MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunological Reviews**, v. 201, p. 206–224, 2004.
MEDINA-ACOSTA, E. et al. The promastigote surface protease (gp63) of Leishmania is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 37, p. 263–274, 1989.
MEDINA-ACOSTA, E.; KARESS, R. E.; RUSSELL, D. G. Structually distinct genes for the surface protease of Leishmania mexicana are developmentally regulated. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 57, n. 1, p. 31–45, 1993.
MEYER, H.; MUSACCHIO, M. O.; MENDONÇA, I. A. Electron microscopic study of Trypanosoma cruzi in thin sections of infected tissue cultures and of blood-agar forms. **Parasitology**, v. 48, n. 1–2, p. 1–8, 1958.
MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.].
NETO, A. L. C. et al. In silico characterization of multiple genes encoding the GP63 virulence protein from Leishmania braziliensis : identification of sources of variation and putative roles in immune evasion. p. 1–17, 2019.
NOVOZHILOVA, N. M.; BOVIN, N. V. Structure , Functions , and Biosynthesis of Glycoconjugates of Leishmania spp . Cell Surface. v. 75, n. 6, p. 686–694, 2010.
NUGENT, T.; JONES, D. T. Transmembrane protein topology prediction using support vector machines. **BMC Bioinformatics**, v. 10, p. 1–11, 2009.
OLIVIER, M. et al. Leishmania virulence factors : focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1377–1389, 2012.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View Subversion Mechanisms by Which Leishmania Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 2, p. 293–305, 2005.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016.

PAHO; WHO. **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the AmericasPAHO/WHO Institutional Repository**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34856/LeishReport6_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Mechanism of lethal effect of human serum upon Leishmania donovani. **Journal of Immunology**, v. 125, n. 5, p. 2195–2201, 1980.

RAMAMOORTHY, R. et al. Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of Leishmania donovani chagasi promastigotes to an infectious form. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 3, p. 1888–1895, 1992.

ROGERS, M. B. et al. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of Leishmania. **Genome Res.**, v. 21, p. 2129–2142, 2011.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H.; D'AVILA-LEVY, C. M. The ubiquitous gp63-like metalloprotease from lower trypanosomatids: In the search for a function. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 78, n. 4, p. 687–714, 2006.

SILVA-ALMEIDA, M. et al. Proteinases as virulence factors in Leishmania spp . infection in mammals. p. 1–10, 2012.

STEINKRAUS, H. B. et al. Sequence heterogeneity and polymorphic gene arrangements of the Leishmania guyanensis gp63 genes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 62, n. 2, p. 173–185, 1993.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, 2017.

TOLSON, D. L. et al. The kinetoplastid membrane protein 11 of Leishmania donovani and African trypanosomes is a potent stimulator of T-lymphocyte proliferation. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 4893–4899, 1994.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 750, 2017.

TURETZ, M. L. et al. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 2002.

VALDIVIA, H. O. et al. The Leishmania metaphylome: a comprehensive survey of Leishmania protein phylogenetic relationships. **BMC Genomics**, v. 16, p. 887, 2015a.

VALDIVIA, H. O. et al. The Leishmania metaphylome: A comprehensive survey of Leishmania protein phylogenetic relationships. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2015b.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for Leishmania Entry into Macrophages . **The Journal of Immunology**, v.

173, n. 11, p. 6521–6525, 2004.
VARGAS-INCHAUSTEGUI, D.; XIN, L.; SOONG, L. Leishmania braziliensis Infection Induces Dendritic Cell Activation, ISG15 Transcription, and the Generation of Protective Immune Responses. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7537–7545, 2008.
VOTH, B. R. et al. Differentially expressed Leishmania major gp63 genes encode cell surface leishmanolysin with distinct signals for glycosylphosphatidylinositol attachment. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 93, n. 1, p. 31–41, 1998.
YAO, C. et al. Biosynthesis of the major surface protease GP63 of Leishmania chagasi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 121, n. 1, p. 119–128, 2002.
YAO, C. et al. Multiple products of the Leishmania chagasi major surface protease (MSP or GP63) gene family. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 171–183, 2004.
YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. 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.
YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. Internal and surface-localized major surface proteases of Leishmania spp. and their differential release from promastigotes. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 10, p. 1905–1912, 2007.