

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES

Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Mayara Souza Barbalho

Potencial imunogênico da proteína GP63 codificada por múltiplos  
genes parálogos em *Leishmania braziliensis*

RECIFE  
2017

MAYARA SOUZA BARBALHO

**Potencial imunogênico da proteína GP63 codificada por múltiplos genes parálogos em *Leishmania braziliensis***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Orientador:**

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

**Coorientador:**

Dr. Franklin Barbalho Magalhães

RECIFE

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

B228p Barbalho, Mayara Souza  
Potencial imunogênico da proteína GP63 codificada por múltiplos genes parálogos em *Leishmania braziliensis* / Mayara Souza Barbalho. - Recife: [s.n.], 2017.  
80 p. : il.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2017.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto; coorientador: Franklin Barbalho Magalhães.

1. *Leishmania braziliensis* - fisiologia. 2. *Leishmania braziliensis* - patogenicidade. 3. Interações Hospedeiro-Parasita. 4. Peptídeo Hidrolases. 5. Proteínas Recombinantes. 6. Proteínas de Protozoários. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. II. Magalhães, Franklin Barbalho. III. Título.

CDU 616.993.161

---

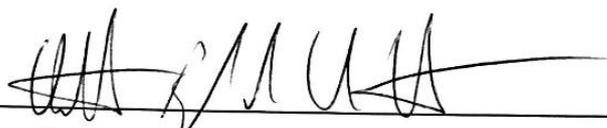
MAYARA SOUZA BARBALHO

**Potencial imunogênico da proteína GP63 codificada por múltiplos genes parálogos em *Leishmania braziliensis***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 10 / 03 / 2017.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto – Orientador  
Depto de Microbiologia – IAM – FIOCRUZ PE



---

Dr. Éden Ribeiro Freire  
Depto de Microbiologia – IAM – FIOCRUZ PE

---

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti  
Depto de Microbiologia – IAM – FIOCRUZ PE

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois Ele que colocou o sonho de ir além no meu coração, me capacitou e fortaleceu em todos os momentos, tudo é por Ele e para Ele.

Aos orientadores, que mesmo ocupados acompanharam todo o trabalho e pela confiança e disponibilidade.

Ao grupo Biomoltryp, pois me senti muito bem acolhida por todos e sempre se dispuseram a me repassar os seus conhecimentos de forma mais leve e proveitosa.

Aos funcionários, pela sua dedicação e contribuição em todas as etapas do mestrado.

A Dra. Danielle Moura por toda paciência e disponibilidade em tirar todas as dúvidas e ao Dr, Édén Freire que admiro porque além de um grande pesquisador, tem um grande coração e se tornou um professor e amigo.

Aos mestres e doutores Artur, Camila, Wagner, Ludmilla, Gustavo, Maria, Mariana, Amaranta, Ada, Kleison, Moezio, Diego pois tornaram a jornada do mestrado mais leve, tanto na rotina do laboratório quanto nos momentos descontraídos, nunca vou esquecer de vocês.

As amigas e irmãs por escolha Thaíse, Adriana Roberto, Adriana Neuman, Alline e Camila, palavras nunca serão suficientes por tudo que vocês fizeram por mim, nos piores momentos não permitiram que eu desanimasse.

A turma do mestrado e doutorado 2015.1, vocês fizeram toda diferença na minha formação, sou grata por todo apoio.

Aos meus pais, Iara e Ivamário, vocês acreditam mais em mim do que eu mesma e isso sempre fez toda diferença, vocês são os melhores pais do mundo.

Ao meu namorado e futuro noivo Raphael, você sempre fez questão de estar presente em tudo, aguentar meus momentos de estresse, escutar assuntos que não compreendia e sempre ter me incentivado a seguir em frente. Essa conquista é nossa!

Aos meus amigos, obrigado por todas as orações e força que sempre me passaram seja por mensagens ou por abraços, sem vocês eu não conseguiria.

Aos meus pastores Alline e Jullio, a minha discipuladora Carolina Cavalcanti, a minha mãe de oração Jane Chianca, pois vocês são meus intercessores/ amigos e sem vocês o fardo seria mais pesado.

Ao CPqAM - FIOCRUZ PE que forneceu toda a infra-estrutura e equipamentos necessários no desenvolvimento deste trabalho e a FACEPE por toda contribuição financeira.

Entrega o teu caminho ao Senhor, confia  
Nele e o mais Ele fará.

Salmos 37:5

---

BARBALHO, M. S. **Potencial imunogênico da proteína GP63 codificada por múltiplos genes parálogos em *Leishmania braziliensis*** 2017. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

---

## RESUMO

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o principal agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil. No estado de Pernambuco ocorrem as três formas clínicas de leishmaniose: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LMC) e leishmaniose disseminada (LD), sendo considerada endêmica a Leishmaniose Tegumentar Americana. Estas diferentes formas da doença variam de acordo com a infecção por diferentes espécies de *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro. Ao longo dos anos estas espécies têm desenvolvido diferentes mecanismos de escape contra o sistema imune. Um deles é baseado na GP63, ou leishmanolisina, uma importante protease abundante na superfície de *Leishmania sp.* Seus produtos estão envolvidos na adesão e internalização desses parasitas nos macrófagos do hospedeiro e tem sido relacionado com a resistência do parasita à lise pelo sistema complemento e o aumento da virulência. Este trabalho buscou contribuir para a compreensão da relação parasito-hospedeiro através da avaliação da imunogenicidade da GP63 codificada por diferentes genes parálogos de *Leishmania braziliensis* em modelo murino. Cinco proteínas recombinantes foram geradas baseadas nos cinco parálogos, de GP63, mais divergentes entre si, e foram avaliadas, quanto ao seu potencial imunogênico, frente a diferentes soros produzidos por linhagens BALB/c e SUIÇO de camundongos fêmeas. Os 10 soros das duas linhagens reconheceram o extrato total de *L. braziliensis* de forma diferente entre si enquanto que os dois soros controles não identificaram o extrato. Apesar das diferentes abordagens, os soros policlonais em geral não reconheceram as proteínas recombinantes, com possível exceção de três destes de BALB/c que apresentaram contrabanda. Isso pode ter ocorrido devido ao fato da GP63 ter a capacidade de bloquear o sistema imune, através da expressão de diferentes parálogos ou ainda por não ser tão imunogênica quanto o esperado.

**Palavras chaves:** Interações hospedeiro- parasita. *Leishmania braziliensis*. Peptídeo hidrolases.

---

BARBALHO, M. S. **Immunogenic potencial of GP63 protein encoded by multiple paralogous genes in *Leishmania braziliensis*** 2017. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

---

## ABSTRACT

*Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main cause of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in Brazil. In the state of Pernambuco there are three clinical forms of leishmaniasis: cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal leishmaniasis (ML) and disseminated leishmaniasis (LD), being American Cutaneous Leishmaniasis considered endemic. These different forms of the disease vary according to infection by different species of *Leishmania* and the immune response of the host. Over the years, these species have developed different escape mechanisms against the immune system. One is based on GP63, or leishmanolysin, an important abundant protease on the surface of *Leishmania* capable of hydrolyzing a wide variety of substrates both in the parasite and in the host. Its products are involved in the adhesion and internalization of these parasites in the host macrophages and have been related to the resistance of the parasite to be lysed by the complement system and the increase of virulence. This work aimed to contribute to the understanding of the host-parasite relationship by evaluating the immunogenicity of different GP63 parallels of *Leishmania (L.) braziliensis* in the murine model. Five recombinant proteins were generated based on five more divergent paralogues of GP63, and were evaluated for their immunogenic profile against different sera produced by BALB / c and SWISS strains from female mice. The 10 sera of the two strains recognized the total extract of *L. braziliensis* differently from each other, whereas two sera did not identify the extract. Polyclonal sera generally did not recognize the recombinant proteins, with the possible exception of three of these BALB / c that presented contraband despite the different approaches that were tried. This may have occurred due to the fact that GP63 blocks the immune system through the expression of different paralogues or because it is not as immunogenic as expected.

**Keywords:** Host-parasite interaction. *Leishmania (V.) braziliensis*. Peptide hydrolases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa mundi ilustrando a distribuição das Leishmanioses Cutânea e Visceral .....	21
Figura 2 – Insetos vetores da Leishmaniose .....	22
Figura 3 – Formas evolutivas da Leishmania .....	25
Figura 4 – Ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i> .....	26
Figura 5 – Espécies de parasitas de Leishmania e resposta imune do hospedeiro influenciam a consequência da doença .....	31
Figura 6 – Fatores de virulência de Leishmania .....	33
Figura 7 – Estrutura 3D e localização das regiões variáveis das sequências de GP63 de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	38
Figura 8 – Estratégias de PCR .....	43
Quadro 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos genes de GP63 de <i>Leishmania braziliensis</i> por PCR .....	44
Figura 9 – PCR dos genes de GP63 .....	55
Figura 10 – Digestão das clonagens dos genes de GP63 .....	56
Figura 11 – Árvore filogenética das sequências de GP63 de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	57
Figura 12 – Confirmação de subclonagem dos genes 1620, 1640, 312260, 0590 – KDELMAP e 1610 – GPI no plasmídeo pET21a .....	58
Figura 13 – Expressão das proteínas 1620, 1640, 312260, 0590 – KDELMAP e 1610-GPI fusionados a GST .....	59
Figura 14 – Western blot do reconhecimento anti-histidina .....	60
Figura 15 – Expressão das proteínas 1620, 1640, 312260, 0590 – KDELMAP e 1610-GPI fusionados a GST .....	60
Figura 16 – Extrato total de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	62
Figura 17 – Soros de camundongos BALB/c frente à extrato total de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	62
Figura 18 – Soros de camundongos SWISS frente à extrato total de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	63
Figura 19 – Ordem de corrida dos ensaios de Western blot .....	64

Figura 20 – Western blot do soro controle de camundongo BALB/c contra as proteínas recombinantes .....	65
Figura 21 – Western blot do soro 2 de camundongo BALB/c com as proteínas recombinantes .....	66
Figura 22 – Western blot dos soros 5 e 6 de camundongos BALB/c com as proteínas recombinantes .....	67
Figura 23 – Western blot do soro controle e soro 2 de camundongo SUIÇO com as proteínas recombinantes .....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CJP	Calf Intestinal Phosphatase
DO	Densidade Óptica
dNTP	Deoxynucleotide
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FcyRI	Receptores para Imunoglobulinas G
FcyRII	Receptores para Imunoglobulinas G
GP63	Glicoproteína de 63 kDa
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GST	Glutathione S- Transferase
IFN- γ(gama)	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IPTG	Isopropil-Beta-D-galactosídeo
JAK/STAT	Via de sinalização
KDELMAP	Sequência de aminoácidos conservados nas GP63 de <i>Leishmania braziliensis</i>
LB	Luria Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LDC	Leishmaniose Dérmica Pós Calazar
LPG	Lipofosfoglicanos
MSP	Major Surface Protease
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaCl	Cloreto de sódio

NO <sub>2</sub>	Óxido Nítrico
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate buffered
PVDF	Fluoreto Polivinidileno
PTP	Proteína Tirosina Fostatase
RE	Retículo Endoplasmático
SbV	Antimônio pentavalente
SFM	Sistema Mononuclear Fagocítico
T	Deoxitimidina
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
TGF-beta	<i>Transforming growth factor beta</i>
TBS	Tris buffered saline
Toll TLR2	Receptores relacionados à imunidade inata localizados na membrana plasmática
TH1	T Helper 1
VSG	Glicoproteína de Superfície
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
WB	<i>Western blot</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>19</b>
2.1	Aspectos Gerais	19
2.2	Vetor, hospedeiro e agente etiológico	22
2.3	Ciclo biológico	24
2.4	Manifestações clínicas e seus aspectos imunológicos	27
2.4.1	Leishmaniose Visceral	27
2.4.2	Leishmaniose Cutânea	27
2.4.3	Leishmaniose Mucocutânea	28
2.5	Tratamento e prevenção	29
2.6	Relação parasito hospedeiro	30
2.7	A metaloprotease GP63	33
2.7.1	Atividade catalítica na forma promastigota	34
2.7.2	Atividade catalítica na forma amastigota	35
2.7.3	Organização gênica	37
2.8	Resultados prévios	38
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
4.1	Objetivo Geral	41
4.2	Objetivos específicos	41
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>42</b>
5.1	Extração DNA genômico	42
5.2	Construção Oligonucleotídeos e amplificação dos genes	42
5.3	Purificação dos produtos amplificados por PCR	44
5.4	Clonagem em vetor <i>pGEM- T easy</i>	44
5.5	Confirmação da clonagem e sequenciamento	46
5.6	Subclonagem nos vetores de expressão <i>pGEX-tev</i> , <i>pET21a</i> , <i>pRSET</i>	46
5.6.1	Utilização da enzima de Modificação Antartic Phosphatase	47
5.6.2	Confirmação da subclonagem	47
5.7	Árvore filogenética	48
5.8	Expressão das proteínas recombinantes	48

<b>5.9 Imunização dos camundongos</b> .....	<b>49</b>
5.9.1 Animal experimental .....	49
5.9.2 Obtenção dos extratos de <i>L. braziliensis</i> .....	49
5.9.3 Eutanásia dos camundongos e obtenção dos soros .....	50
<b>5.10 Ensaio de <i>Western blotting</i></b> .....	<b>50</b>
5.10.1 Ensaio de <i>Western blotting</i> para verificação de produção de anticorpos dos soros dos camundongos BALB/c e Suíço .....	51
5.10.2 Ensaio de <i>Western blotting</i> dos soros de camundongos (BALB/c e Suíço) incubados com as proteínas recombinantes .....	52
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
<b>6.1 Amplificação e clonagem em <i>pGEM-T easy</i></b> .....	<b>54</b>
6.1.2 Clonagem em <i>pGEM-T easy</i> e confirmação .....	55
<b>6.2 Subclonagem nos vetores de expressão</b> .....	<b>56</b>
<b>6.3 Árvore filogenética</b> .....	<b>57</b>
<b>6.4 Expressão das proteínas GP63 fusionadas a GST</b> .....	<b>58</b>
<b>6.5 Reconhecimento das proteínas GP63 por anticorpos de camundongos através de ensaios de <i>Western Blot</i></b> .....	<b>61</b>
6.5.1 Reconhecimento dos soros versus extrato de <i>L. braziliensis</i> .....	61
6.5.2 Reconhecimento dos soros de camundongo BALB/ c com extratos bacterianos das proteínas GP63 .....	63
6.5.3 Reconhecimento dos soros de camundongo SUIÇO com extratos bacterianos das proteínas GP63 .....	67
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>74</b>
<b>APÊNDICE A – TAMPÃO DE LISE</b> .....	<b>86</b>
<b>ANEXO A – SOLUÇÕES PARA <i>WESTERN BLOT</i></b> .....	<b>87</b>
<b>ANEXO B – TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA</b> .....	<b>88</b>
<b>ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b> .....	<b>89</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças não contagiosas, ocasionadas por diversas espécies de parasitas pertencentes a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*. Estas estão entre as seis doenças infecto-parasitárias mais importantes no mundo e são consideradas negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), acometendo tanto animais como seres humanos e estando presente em cerca de 98 países. Estima-se que de 1,5 a 2 milhões de pessoas desenvolvam sintomaticamente a doença anualmente e que existam 12 milhões de pessoas infectadas no mundo.

Existem três formas clássicas das leishmanioses que se distinguem clinicamente: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose MucoCutânea (LMC) e Leishmaniose Visceral (LV). Estas diferentes formas da doença variam de acordo com a infecção por diferentes espécies de *Leishmania* e com a resposta imune do hospedeiro. A LC é causada por espécies dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, sendo a forma clínica com o maior número de casos no Brasil e no mundo, sendo que 90% dos casos brasileiros tem como principal agente causador a *Leishmania (V.) braziliensis*. As formas clínicas frequentemente encontradas na doença provocadas pela *L. (V.) braziliensis* incluem a LC e LMC e ainda uma forma disseminada da leishmaniose (LD).

O tratamento das leishmanioses ainda é insatisfatório, pois as drogas leishmanicidas são tóxicas e precisam de um uso prolongado. A droga de primeira escolha é o antimonial pentavalente, mas mesmo com o tratamento adequado a ocorrência de recidivas e/ou comprometimento mucoso é frequente. Assim, novas terapias alternativas e de imunoprofilaxia contra as leishmanioses são necessárias. Nesse sentido estudos relacionaram a importância da resposta imunológica para a eficácia quimioterápica, sendo que para que haja proteção do hospedeiro esta resposta necessita ser ativada após a entrada do parasita no organismo. Entretanto, foi observado que durante esse processo, células do sistema imunológico mostram sinais de supressão. Isso acontece devido a mecanismos de escape da ação do sistema imune, e modulação no início da infecção, que as espécies de *Leishmania* conseguiram desenvolver ao longo da evolução. Esses mecanismos de defesa são em parte realizados por proteases que garantem que o parasita consiga invadir o tecido e se proliferar, causando assim a infecção.

Dentre as proteases de interesse em *Leishmania*, destaca-se a glicoproteína 63 (GP63), ou leishmanolisina, a glicoproteína mais abundante na superfície celular e que foi identificada como um importante fator de virulência. A GP63 é capaz de hidrolisar vários substratos tanto no parasita quanto no hospedeiro. Entre suas funções se destaca a de mediar a adesão e internalização dos parasitas nos macrófagos do hospedeiro, estando relacionada também a inativação da cascata do sistema complemento, além de clivar proteínas da matriz extracelular do hospedeiro. O aumento da expressão dessa protease foi correlacionado com o aumento da virulência da *L. (V.) braziliensis* e sua importância foi bem evidenciada em estudos, que promoveram sua deleção em células de *Leishmania (L.) major*, onde a ausência da GP63 acarretou uma grande redução na habilidade do parasita de estabelecer e manter a infecção.

Diante disso, a GP63 se mostra um relevante candidato a ser empregado como subunidade numa eventual vacina para a profilaxia das leishmanioses. Contudo, seu emprego é dificultado diante da variada organização genômica dos seus genes entre diferentes espécies de *Leishmania*. Embora estes codifiquem para proteínas que partilham uma alta identidade de sequência entre si, elas diferem significativamente, principalmente nas regiões C-terminais. Em relação a sua organização genômica, foi observado que múltiplos genes de GP63 são encontrados organizados em *tandem*, e que há uma diferença significativa na quantidade de genes entre as espécies de *Leishmania*. Em *L. major* o conjunto de genes que codificam a GP63 incluem quatro cópias no cromossomo 10, com um único gene no cromossomo 28 e um gene relacionado no cromossomo 31. Em *L. infantum* cinco genes foram encontrados e em *L. braziliensis* um mínimo de 33 genes existem no cromossomo 10.

Assim, são necessários estudos que venham a contribuir na compreensão da variabilidade da expressão dos parálogos de GP63. Em *Trypanosoma brucei* a variação na expressão dos múltiplos genes codificando a glicoproteína de superfície VSG é o principal mecanismo de defesa contra o sistema imune do hospedeiro. Um mecanismo de variação semelhante pode estar ocorrendo com as proteínas GP63 de *L. braziliensis*, interferindo diretamente na relação parasito-hospedeiro.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos Gerais

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários intracelulares da ordem Kinetoplastida do gênero *Leishmania* e são amplamente distribuídas ao redor do mundo. Estas doenças acometem 98 países em cinco continentes (ALVAR *et al.*, 2012), sendo todos eles tropicais ou subtropicais. No Velho Mundo elas ocorrem no hemisfério oriental e são endêmicas na Ásia, África e sul da Europa. Já no Novo Mundo, elas são endêmicas no hemisfério ocidental, estando presente principalmente nas Américas Central e do Sul (exceto Chile e Uruguai). Estas doenças não são encontradas na Austrália, na Antártida ou nas ilhas do Pacífico (BARRA *et al.*, 1991).

As leishmanioses estão entre as seis doenças infecto-parasitárias mais importantes no mundo, sendo consideradas negligenciadas pela OMS pelo seu alto coeficiente de detecção, capacidade de produzir deformidades e também, pela ineficiência das ações de controle (BRASIL, 2011). Dados da OMS indicam que aproximadamente 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair estas enfermidades. Estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas estejam infectadas com alguma forma de leishmaniose no mundo, e que sua incidência anual seja de aproximadamente 2 milhões de casos, destes 500.000 relacionados à leishmaniose visceral (LV) e 1,5 relacionado à forma cutânea (LC) da doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016). Estima-se que ocorram de 1,5 a 2 milhões de novos casos de leishmaniose por ano com cerca de 20 a 30 mil mortes anuais. Entre as doenças parasitárias, as leishmanioses perdem apenas em importância para a malária e a doença do sono, ocupando também o nono lugar em termos de carga global entre todas as doenças infecciosas e parasitárias (HOTEZ, 2004; JANNIN *et al.*, 2011), chegando a representar aproximadamente 2,3 milhões de DALYs (anos saudáveis perdidos por incapacidade ou morte precoce) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011).

A incidência real das leishmanioses é desconhecida, provavelmente devido à falta de dados atualizados, subnotificação, falta de vigilância epidemiológica adequada ou métodos de diagnósticos eficientes, com a maioria dos dados disponíveis baseados em estimativas. A disseminação da doença para outras áreas está associada a mudanças climáticas, urbanização, desflorestamento, aumento do

turismo ou viagens de trabalho, e operações militares (ALVAR *et al.*, 2012; SUTHERST, 2004). Cerca de 58 mil casos de leishmaniose visceral e 220 mil casos de leishmaniose cutânea são reportados oficialmente a cada ano, porém em torno de apenas dois terços dos países notificam de fato a real incidência (ALVAR *et al.*, 2012). A maioria dos dados oficiais são obtidos através da detecção passiva de casos e, por ser uma doença associada à pobreza, muitos pacientes não têm acesso a cuidados de saúde (STOCKDALE; NEWTON, 2013). As infecções assintomáticas (ou indivíduos com infecção subclínica que podem atuar como um reservatório) não são relatadas e podem ser um importante fator de risco para futuras infecções, principalmente em outras áreas geográficas (STOCKDALE; NEWTON, 2013).

Mais de 90% dos casos de LV ocorrem na Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia, Sudão do Sul, e Brasil, variando de 200.000 a 400.000 casos anuais. A mortalidade estimada está entre 10 e 20% dos casos, especialmente em áreas menos favoráveis economicamente. No Brasil têm sido registrados surtos frequentes de LV, com uma média de 3.379 casos anuais. A doença é mais frequente em menores de 10 anos (58%), podendo ser explicado pelo fato de crianças possuírem uma imaturidade imunológica agravada pela desnutrição, bastante comum em áreas endêmicas (BRASIL, 2008). A transmissão é principalmente doméstica e tem uma preponderância masculina, podendo esse fato estar associado com aspectos profissionais, como trabalhos em agricultura, pastoreio de gado, entre outros (COLLIN *et al.*, 2004).

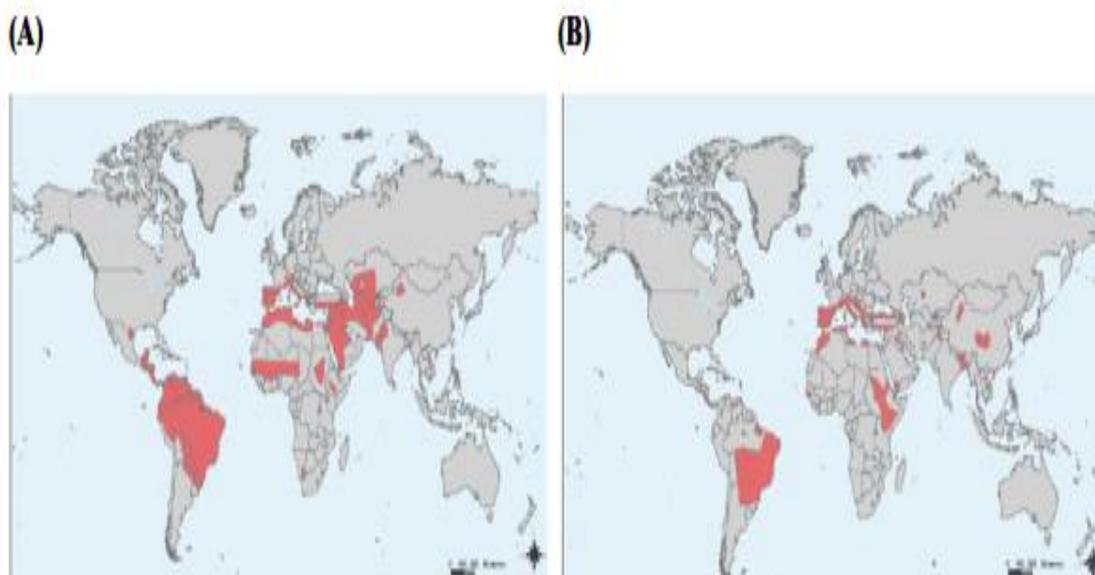
Caso não tratada a LV pode resultar em morte e, mesmo com o acesso ao tratamento, pode resultar em taxas de letalidade de 10-20%, por diversas razões (BERN *et al.*, 2005; COLLIN *et al.*, 2004; DESJEUX, 1996; ZIJLSTRA *et al.*, 1994). No quinquênio de 2010- 2014 foram registrados cerca de 1.100 óbitos, com autoctonia em 1/4 dos municípios brasileiros de 21 Unidades da Federação (ALVAR *et al.*, 2013).

A LC é mais amplamente distribuída, ocorrendo em três principais regiões: no litoral do Mediterrâneo, nas Américas e na Ásia Ocidental (Figura 1) (ALVAR *et al.*, 2013; STOCKDALE *et al.*, 2013). Os dez países com maior número de casos de LC são: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Sul, Costa Rica e Peru, somando um total de 700.000 a 1.200.000 de casos estimados anualmente (ALVAR *et al.*, 2013; GRIESVEN; DIRO, 2012; STOCKDALE *et al.*, 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016). A mortalidade associada à LC não é tão significativa quanto a LV, porém as consequências sociais são de grande

relevância, pelo fato de surgirem lesões cutâneas com cicatrizes (STOCKDALE *et al.*, 2013). Em áreas endêmicas algumas pessoas têm a crença que a LC pode ser passada através de contato físico (KASSI *et al.*, 2008), resultando em exclusão social. Não é apenas importante a questão dos efeitos econômicos da saúde, mas também a qualidade de vida do indivíduo e sua inclusão social (HOTEZ, 2008).

A partir da década de 80, verificou-se uma tendência de aumento no número de casos registrados de LC no Brasil, também denominada de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), com picos de transmissão a cada cinco anos. No período de 1985 a 2005, a média anual foi de 28.568 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2010). No Brasil, as regiões Norte e Nordeste apresentam a maior taxa de indivíduos acometidos pela LC, com 36,9% na região Nordeste e 36,25% na região Norte. A região Norte apresentou coeficientes mais elevados de incidência (99,85/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (41,85/100.000 habitantes) e Nordeste (26,50/100.000 habitantes) (BRASIL, 2010).

**Figura 1 - Mapa mundi ilustrando a distribuição das Leishmanioses Cutânea e Visceral.**



**Fonte:** Organização Mundial de Saúde (2016).

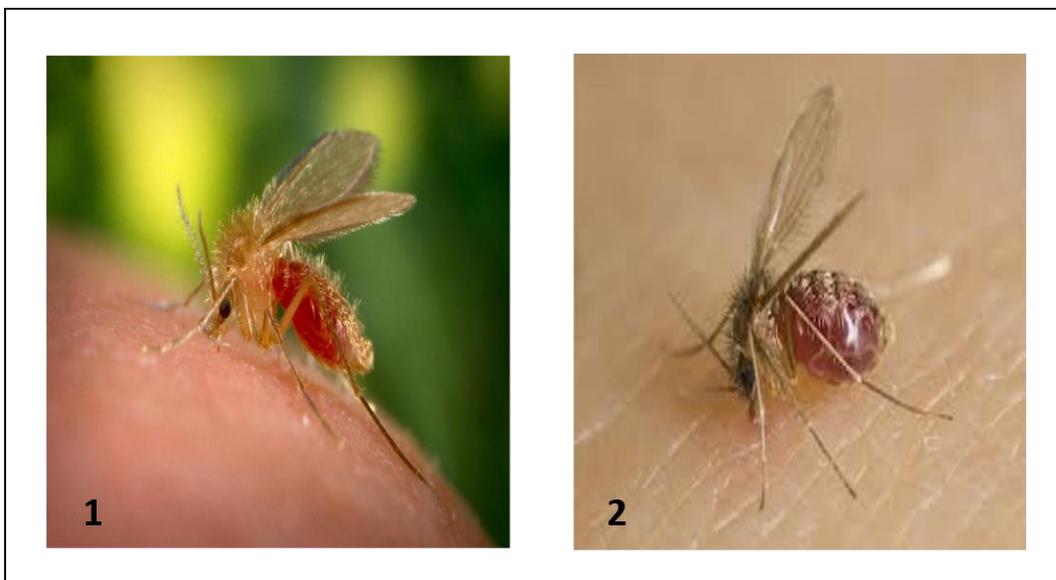
**Legenda:** Mapas ilustrando a distribuição geográfica das Leishmanioses Cutânea (A) e em (B) Visceral.

A complexa epidemiologia e ecologia, a falta de ferramentas eficazes e de fácil acesso para diagnósticos de casos e a escassez de dados de incidência atuais são fatores negativos que fazem com que os gestores políticos não reconheçam a importância das leishmanioses (ALVAR *et al.*, 2008; BERN *et al.*, 2008).

## 2.2 Vetor, hospedeiro e agente etiológico

As leishmanioses são transmitidas pela picada de insetos flebotomíneos fêmeas infectadas, dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (BASANO *et al.*, 2004; NEGRÃO *et al.*, 2009). Existem cerca de 30 espécies de flebotomíneos incluídas nestes dois gêneros (KOBETS *et al.*, 2012; SHAW, 1998). Estes flebotomíneos (Figura 2) medem cerca de 2 a 3 mm de comprimento (ALIAGA *et al.*, 2003) e são encontrados em torno de assentamentos humanos, em matéria orgânica, como serrapilheira (cobertura que se forma na superfície do solo composta por restos de vegetação em diferentes estágios de decomposição e ainda restos de animais) e estrume, em matas e em tocas de roedores (KOBETS *et al.*, 2012). Em relação ao seu hábito alimentar, ou seja, onde eles preferem realizar o repasto sanguíneo, eles são frequentemente classificados em endofágicos (dentro de habitações) ou exofágicos (fora de habitações). Quanto ao local onde se abrigam, podem ser classificados em endofílicos (dentro das habitações) ou exofílicos (ao ar livre) (DESJEUX, 2010).

**Figura 2- Insetos vetores da Leishmaniose**



**Fonte:** Gathany (2013).

**Legenda:** Em (1) *Phlebotomus*, vetor da Leishmaniose no Velho mundo e em (2) *Lutzomyia*, vetor da Leishmaniose nas Américas.

Os principais hospedeiros das espécies de *Leishmania* são animais vertebrados, dentre estes incluem os humanos (QUINNELL; COURTENAY, 2009). Infecções por *Leishmania* que causam a LTA foram descritas em várias espécies de

animais silvestres (roedores, marsupiais), sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos) (BRASIL, 2007). Dependendo do tipo de leishmaniose e da região endêmica, a doença recebe um nome característico de cada região, de acordo com a sua origem: “botão do oriente” “úlceras ou botão de Bikra (Argélia), gafsa (Tunísia), Bagdá (Irão), espúndia, úlcera de Bauru, ferida brava, úlcera de los chicleros, bay sore. (REY, 1991).

Os organismos do gênero *Leishmania* são protozoários intracelulares que pertencem à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (ASHFORD *et al.*, 1997; DESJEUX, 1996). Estes protozoários foram observados pela primeira vez na Índia, por Cunningham em 1885. Em 1903, Ross criou o gênero e chamou o parasito de *Leishmania* e Right, no mesmo ano chamou de *Leishmania tropica* (AWASTHI *et al.*, 2004; BASANO *et al.*, 2004; OUMEISH *et al.*, 1999). No Brasil, Alexandre Cerqueira em 1855, na Bahia, foi o primeiro a identificar a moléstia e a suspeitar do papel dos flebotomíneos como vetores. Gaspar Vianna, em 1911, considerou o parasita diferente da espécie identificada no Velho Mundo e a nomeou *Leishmania braziliensis* para o agente específico da LC, de forma que até a década de setenta todos os casos de leishmaniose no país eram atribuídos a esta espécie. Com o desenvolvimento nas técnicas de análise, foram descritas outras espécies e associações com a doença (BASANO *et al.*, 2004; OUMEISH *et al.*, 1999; VIANNIA, 1912).

Os parasitos do gênero *Leishmania*, possuem um DNA mitocondrial único (kDNA), que pode ser usado para diferenciá-los de quaisquer organismos pertencentes a outras ordens (SIMPSON, 1987). O gênero *Leishmania* possui mais de 20 espécies patogênicas, que influenciarão na manifestação clínica da doença juntamente com a imunidade do hospedeiro. Este gênero se divide em dois subgêneros principais, baseado no tamanho, nos locais do desenvolvimento do parasita no intestino do inseto vetor e na região geográfica da sua evolução no mundo: *Viannia*, que compreende o complexo *Leishmania braziliensis*; e o subgênero *Leishmania*, que compreende os complexos *Leishmania donovani*, *Leishmania trópica* e *Leishmania mexicana* (CUPOLILLO *et al.*, 2000; LAINSON; SHAW, 1998). Em relação ao local de desenvolvimento no vetor, espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* se localizam nas porções média e posterior do intestino do vetor (peri-pilórico), enquanto que para as do subgênero *Leishmania*, o seu desenvolvimento ocorre apenas no intestino médio (supra-pilórico) (BATES, 2007). As espécies até então

reconhecidas e associadas com doença em humanos no Velho Mundo pertencem aos complexos *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum*), responsáveis pela LV e *L. tropica*, responsáveis pela LC, todas do subgênero *Leishmania*. Já no Novo Mundo, estas estão contidas em ambos os subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* (AMATO *et al.*, 2008; KOBETS *et al.*, 2012).

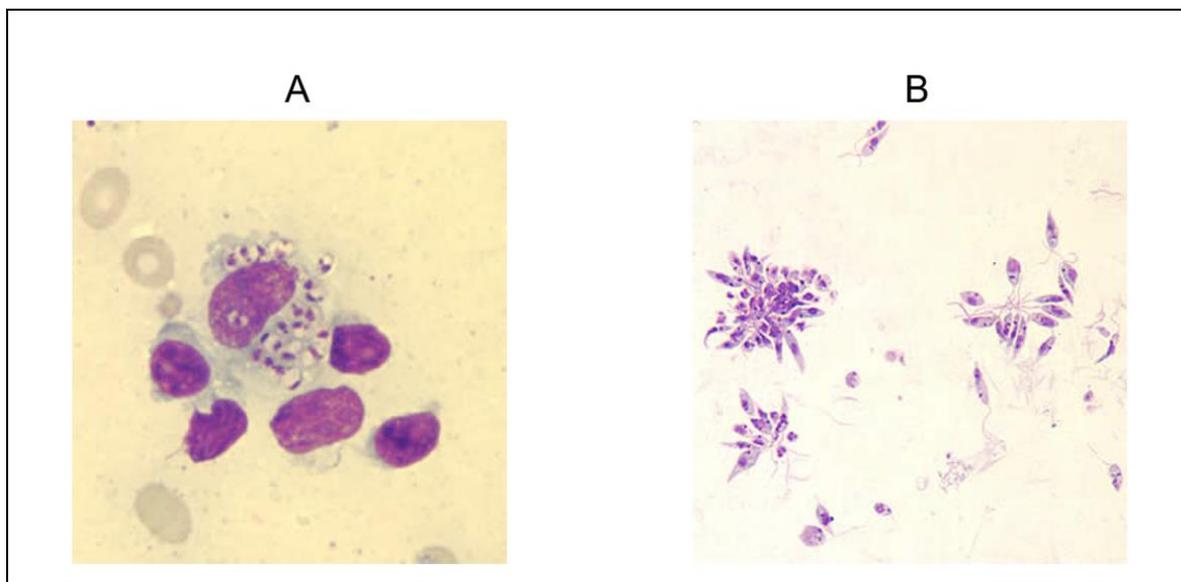
Dentre as espécies do subgênero *Viannia*, a *L. (V) braziliensis* é o principal agente causador da LC em regiões endêmicas na América Central e Sul (GRIMALDI *et al.*, 1989). Esta espécie tem uma grande relevância, pelo seu alto grau de polimorfismo genético e fenotípico, e pelo espectro de manifestações clínicas observadas na LC (CUPOLILLO *et al.*, 2003; SARAVIA *et al.*, 1998; SCHRIEFER *et al.*, 2004).

### 2.3 Ciclo Biológico

A *L. (V) braziliensis*, assim como as demais espécies de *Leishmania*, possuem ciclo de vida digenético, ou seja, completam seu ciclo de vida passando por dois hospedeiros, vertebrado e invertebrado. Possuem assim duas principais formas morfológicas, denominadas de amastigota (no hospedeiro vertebrado) e promastigota (no hospedeiro invertebrado) (Figura 3). A forma amastigota apresenta-se ovóide ou arredondada, com um único núcleo semelhante ao encontrado na forma promastigota que geralmente fica disposto em um dos lados da célula. Não possui flagelo aparente, apenas rudimentar associado a bolsa flagelar, e seu tamanho varia entre 3 a 6,5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5 a 3  $\mu\text{m}$  de largura, dependendo da espécie (SCHMIDT, 2009; NEVES, 2011). Já a forma promastigota apresenta tamanho muito variável, mesmo dentro da mesma espécie, de 1,5 a 3  $\mu\text{m}$  de largura e 16 a 40  $\mu\text{m}$  de comprimento incluindo o flagelo, que é muitas vezes maior do que o corpo celular (NEVES, 2011). A forma promastigota dentro do vetor, independente da espécie de *Leishmania*, ainda é subdividida em: promastigotas procíclicas, promastigotas nectomonas, promastigotas paramastigotas, promastigotas haptomonas e promastigotas metacíclicas. A forma promastigota metacíclica da *Leishmania* é a forma infectiva do parasita para o hospedeiro vertebrado. Ela possui um pequeno corpo celular, porém com um flagelo alongado que facilita a rápida locomoção (BATES; ROGERS, 2004; KAMHAWI, 2006; BESTEIRO *et al.*, 2007). Seu núcleo é único e esférico, variando

bastante quanto a sua posição. Estes estágios de desenvolvimento mostram características morfológicas e metabólicas diferentes, consistentes com um alto nível de regulação da expressão diferencial de proteínas (CAMPBELL *et al.*, 2003).

**Figura 3- Formas evolutivas da *Leishmania*.**



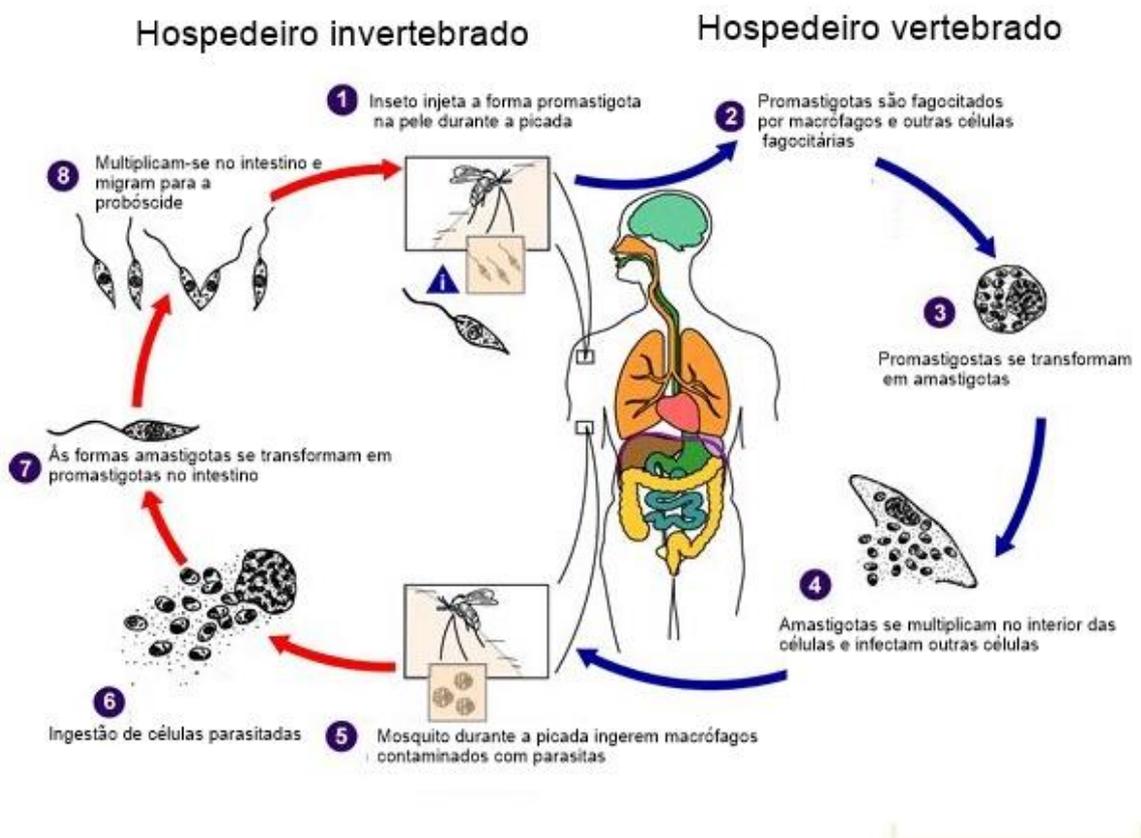
**Fonte:** Center for Disease Control and Prevention, (2013).

**Legenda:** Em (A) as formas amastigotas parasitando os macrófagos do hospedeiro vertebrado e em (B) promastigotas de *Leishmania* sp. obtidos por cultura.

O ciclo de vida das espécies de *Leishmania* recomeça quando uma nova fêmea do vetor flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo sangue contendo macrófagos com as formas amastigotas (LAINSON *et al.*, 1987). Inicialmente o sangue ingerido vai migrar para o intestino médio do inseto. Em seguida, as formas amastigotas irão se diferenciar em diversos estágios do seu desenvolvimento à medida que migram da porção média do intestino para a válvula estomodeal. Cada um desses estágios é caracterizado por mudanças morfológicas e fisiológicas que visam assegurar a sobrevivência dos parasitas no inseto. Inicialmente, as formas em divisão permanecem no intestino médio do inseto e são protegidas pela matriz peritrófica, onde ficam durante cerca de quatro horas. Em seguida, a matriz peritrófica se degenera e as promastigotas procíclicas migram para o segmento anterior do tubo digestivo onde sofrem mais divisões e diferenciação tornando-se promastigotas metacíclicos infectantes. O tempo aproximado para o parasita completar seu desenvolvimento no inseto é de seis a nove dias, dependendo da espécie. Devido à intensa multiplicação ocorre uma obstrução mecânica, a qual

dificulta a ingestão de sangue pelo inseto. Após cada novo repasto sanguíneo, os músculos responsáveis pela sucção relaxam provocando o refluxo dos parasitas que, assim, infectam um novo hospedeiro (Figura 4) (KAMHAWI, 2006). Quando as formas promastigotas metacíclicas são introduzidas na pele do hospedeiro vertebrado, encontram neste local células do sistema imune (linfócitos T e B, macrófagos residentes células de Langherans, mastócitos), que formam um compartimento bastante específico denominado sistema imune da pele. Por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido, envolvendo receptores e ligantes em ambas as superfícies, o parasito se adere à superfície dos macrófagos e de células de Langherans, passando para o meio intracelular por meio de um processo de fagocitose mediada por receptores, transformando-se então na forma amastigota, característica do parasitismo nos mamíferos (BRASIL, 2007).

Figura 4 - Ciclo de vida da *Leishmania* sp.



**Fonte:** Center for Disease Control and Prevention (2007, tradução nossa).

**Notas:** As formas promastigotas são encontradas no inseto vetor infectado, que ao fazer o repasto sanguíneo infecta o hospedeiro mamífero. Estas formas irão ser fagocitadas pelos macrófagos, diferenciando em amastigotas e se multiplicando. O inseto não infectado, ao fazer o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, ingere os macrófagos presentes no sangue contendo as formas

amastigotas, que se diferenciam em promastigotas procíclicos e depois na forma metacíclica, fechando o ciclo.

## 2.4 Manifestações clínicas e seus aspectos imunológicos

A infecção através da picada do vetor flebotomíneo contaminado por *Leishmania* pode ocasionar desde uma exposição assintomática até o desenvolvimento da forma grave de leishmaniose em seres humanos (MURRAY *et al.*, 2005). A determinação quanto a doença ser cutânea ou visceral é dada através da espécie de *Leishmania*. As formas clínicas mais bem características das leishmanioses são então denominadas de Leishmaniose Visceral (LV), Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose MucoCutânea (LMC) (GOMEZ *et al.*, 2010).

### 2.4.1 Leishmaniose Visceral

Até recentemente a LV era primariamente uma zoonose caracterizada como doença de caráter eminentemente rural. Ela vem, contudo, se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte e se tornou crescente problema de saúde pública no Brasil e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica. Esta é uma doença sistêmica, caracterizada por febre prolongada, palidez, emagrecimento, aumento do volume abdominal, hepatoesplenomegalia e edema (BRASIL, 2007). Observam-se ainda outras manifestações clínicas como tosse, diarreia, icterícia e sangramentos que dificultam o diagnóstico diferencial com outras doenças, retardando assim sua identificação e levando quase sempre o paciente à morte, quando não tratada. Uma porcentagem dos casos de LV pode evoluir para uma disseminação cutânea de parasitas (SANJAY *et al.*, 2005).

### 2.4.2 Leishmaniose Cutânea

A LC é a mais comum das formas de manifestação da LTA, podendo também ser causada por parasitos pertencentes ao subgênero *Leishmania*, além do *Viannia*, destacando as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naffi*, *L. (V.) lainsoni*. Ela pode ainda ser classificada em única (presença de lesões localizadas na pele) ou disseminada (lesões numerosas em várias áreas do corpo).

Na sua fase inicial, que ocorre após a entrada da forma promastigota infectante, quando da picada do flebótomíneo, ela é caracterizada pela presença de lesões na pele, principalmente em áreas expostas, como a face, braços e pernas. Essas lesões podem ser acompanhadas com frequência pela presença de linfangite e/ou adenopatia satélite, que pode preceder a lesão de pele. Essa lesão se apresenta, mais comumente, ulcerada com bordas elevadas. (SILVEIRA *et al.*, 2004). Geralmente a imunidade celular do indivíduo continua preservada, com uma resposta do tipo TH1 moderada e bem regulada, quando comparada contra antígenos totais de *Leishmania*. Esta resposta pode ser avaliada através do teste cutâneo de resposta tardia, a intradermorreação de Montenegro (BACELLAR *et al.*, 2002). Os indivíduos afetados apresentam níveis elevados de interferon-gama (IFN-gama), citocina que induz a ativação de macrófagos e outros fagócitos, com elevada atividade antimicrobiana para a forma amastigota do protozoário (ANTONELLI *et al.*, 2005).

Quando a infecção não é controlada pelos mecanismos adaptativos da resposta imune celular, a doença pode evoluir para uma forma mais grave e em cerca de 4% dos casos ocorre associação com a LMC (CARVALHO *et al.*, 1995). Na LC, sabe-se que a incapacidade de montar uma resposta imune celular eficaz está associada à evolução clínica e respostas terapêuticas menos favoráveis. Em pacientes imunocomprometidos, como na síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), a LC pode apresentar quadros clínicos atípicos, tendência à disseminação e má resposta aos esquemas medicamentosos usuais (BRASIL, 2007).

#### 2.4.3 Leishmaniose Mucocutânea

A forma mucocutânea que ocorre em torno de 3% a 5% dos casos, geralmente, apresenta-se secundária às lesões cutâneas, surgindo geralmente meses ou anos após a resolução das lesões de pele e é caracterizada pelo envolvimento da mucosa nasal, oral ou faríngea. (DAVID; CRAFT, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011). Lesões mucosas clássicas que ocorrem durante a LMC são altamente destrutivas e severamente desfigurantes. Pacientes que tenham tido LC possuem fatores de risco para desenvolver LMC (DAVID; CRAFT, 2009).

Os indivíduos acometidos pela LMC apresentam uma forte imunidade celular representada por intensa produção de citocinas pró-inflamatórias TNF e IFN-gama (BACELLAR *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 1995). Este exagero na produção das

citocinas do tipo Th1 está associado também a uma produção relativamente baixa de IL-10, citocina capaz de modular a resposta e inibir a ativação de macrófagos. A perfuração do septo nasal é a complicação mais comum na LMC, podendo também haver obstrução nasal, epistaxes, e crostas da faringe, odinofagia da laringe, rouquidão e tosse, afetando a cavidade oral e provocando ferida na boca. Em algumas situações poderá ocorrer destruição parcial ou total da pirâmide nasal e outras estruturas acometidas na boca. Outras mucosas, como na língua e órgãos genitais, são raramente atingidas (KATO *et al.*, 2010). A doença pode progredir e até algumas vezes chega a ser fatal (BACELLAR *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2001). A LMC ocorre predominantemente na América do Sul e tem dificuldades no seu tratamento. Ainda se tem muito o que entender sobre a imunopatogênese da LMC, pelo fato de ser complexa e pouco conhecida (CARVALHO *et al.*, 1994).

## 2.5 Tratamento e prevenção

A droga de primeira escolha para terapia das leishmanioses é o antimonial pentavalente, existente sob duas formas: o antimoniato de N-metilglucamina e o stibogluconato de sódio, sendo que este último não é comercializado no Brasil. Visando padronizar o esquema terapêutico, a OMS recomenda que a dose do antimonial seja calculada em mg/SbV/Kg/dia. SbV = antimônio pentavalente (DAVID; CRAFT, 2009). Este antimonial é indicado para tratamento de todas as formas de leishmaniose cutânea, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. As lesões ulceradas podem sofrer contaminação secundária, razão pela qual devem ser prescritos cuidados locais. Os efeitos colaterais mais freqüentes são artralgia, mialgia, inapetência, cefaléia, febre, vômitos, tontura e inchaço no local da aplicação. A cardio, nefro e hepatotoxicidade dos antimoniais constituem uma importante limitação à sua segurança. É recomendado que os pacientes, em especial os mais idosos, devem ser submetidos à avaliação cardiológica prévia. Por serem abortivos, os antimoniais não podem ser administrados a gestantes (AMATO, 2008).

A resposta ao esquema terapêutico varia de acordo com a espécie envolvida, a resposta imune do hospedeiro e a forma clínica ou estágio da doença. A resistência ao Sbv é significativa na América do Sul, e é uma causa frequente de falha terapêutica e recaída. Ainda não se tem certeza quanto a dependência das características do

parasita ou da resposta imune do hospedeiro (naturais ou adquiridas) (AMATO, 2008; DAVID; CRAFT, 2009). Pacientes não responsivos devem utilizar uma das drogas de segunda escolha. Além dos antimoniais, outras drogas têm sido empregadas no tratamento das diversas formas da leishmaniose, entre as quais se destacam a pentamidina, anfotericina B, paromomicina e o miltefosina (FIROOZ *et al.*, 2006).

Os medicamentos utilizados para o tratamento das leishmanioses possuem alta taxa toxicidade e efeitos colaterais, além da sua eficácia variar de acordo com o estágio da doença, imunidade hospedeiro e espécie da *Leishmania*, entre outros. Infelizmente, não há terapia ideal disponível para o tratamento da LC, sendo um desafio a cura do indivíduo acometido. Os ensaios clínicos para LC são geralmente confrontados com vários obstáculos, incluindo a diversidade de espécies *Leishmania*, a natureza da doença, a variedade de manifestações clínicas e a heterogeneidade das regiões geográficas onde ocorre mais comumente a doença. Por causa da resistência aos medicamentos para o controle da doença, a vacinação continua a ser uma das melhores esperanças para o controle de todas as formas da doença e tem sido foco de pesquisas. As tentativas para desenvolver vacinas contra a leishmaniose resultaram na identificação de inúmeros antígenos candidatos (FIROOZ *et al.*, 2006; KHALIL *et al.*, 2000; MOMENI *et al.*, 1999; SHARIFI *et al.*, 1998), no entanto, os resultados ainda são insatisfatórios, em alguns ensaios e, em geral, a eficácia é limitada principalmente devido à falta de um sistema de distribuição apropriado ou adjuvantes (NOAZIN *et al.*, 2009).

Até o momento, poucos antígenos avançaram para ensaios clínicos ou veterinários. O desenvolvimento de candidatos à vacina contra as leishmanioses, poderia ter um impacto significativo sobre o controle da doença. Também é interessante, para se controlar a doença, compreender geneticamente fatores que regulam e influenciam a resposta imunológica nos seres humanos (NOAZIN *et al.*, 2009).

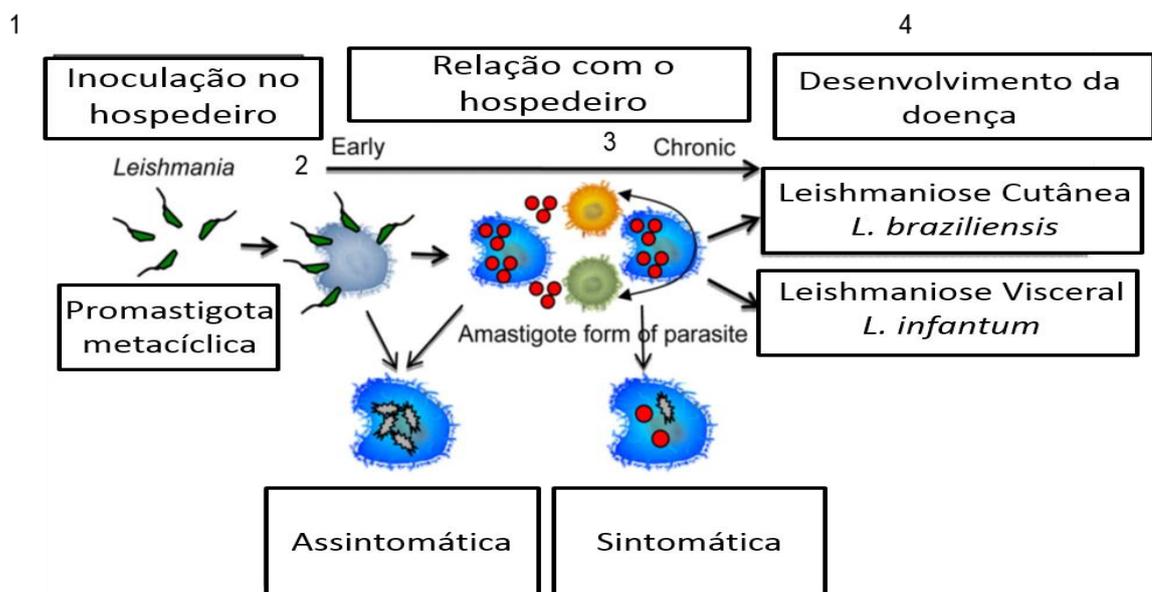
## **2.6 Relação parasito hospedeiro**

Uma ampla variedade de mecanismos pode estar envolvida no controle da resposta imune à infecção pelas espécies de *Leishmania* (BOTELHO *et al.*, 2009). Ao penetrar no hospedeiro, estes parasitos desencadeiam uma série de eventos importantes associados a ação do sistema imune. Assim, durante a infecção, as

formas promastigotas metacíclicas obtêm acesso ao hospedeiro onde eles encontram neutrófilos, células dentríticas, macrófagos e monócitos, todos os quais são considerados alvos da infecção. De acordo com a proporção que essas células são infectadas é que é determinada a intensidade da patologia, podendo ser extinguida ou progredir para uma infecção patente (Figura 5) (BOTELHO *et al.*, 2009).

Os macrófagos são considerados o tipo celular preferencial da infecção pela *Leishmania*, sendo a sua função de extrema importância para o desenvolvimento da doença no hospedeiro. Independente do hospedeiro (homem, animais silvestres ou domésticos) ou espécie de *Leishmania*, os parasitos vivem e proliferam em macrófagos e monócitos de vários tecidos, no chamado sistema fagocítico monoclear (SFM), um sistema que tem por sua vez um importante papel na detecção e eliminação de microrganismos patogênicos (MOSSER *et al.*, 1985).

**Figura 5- Espécies de *Leishmania* e resposta imune do hospedeiro influenciam a consequência da doença.**



**Fonte:** Gollob; Viana; Dutra, (2014).

**Nota:** 1) infecção ao hospedeiro através da entrada de promastigotas metacíclicas pela picada do inseto vetor 2) infecção inicial nos macrófagos do hospedeiro 3) conversão para a forma de replicação intracelular do parasita (amastigota) e 4) progressão para a interação parasita-hospedeiro culminando em doenças com variadas formas clínicas.

Nas leishmanioses, a relação parasito/hospedeiro depende em geral do perfil de linfocinas induzidas ao início da infecção e que tem sido evidenciado em estudos no modelo experimental murino, cuja infecção pela *L. major* vem sendo bastante estudada. Após a infecção das células hospedeiras, a *Leishmania* é transportada para os linfonodos, onde dependendo das células presentes pode ocorrer novas

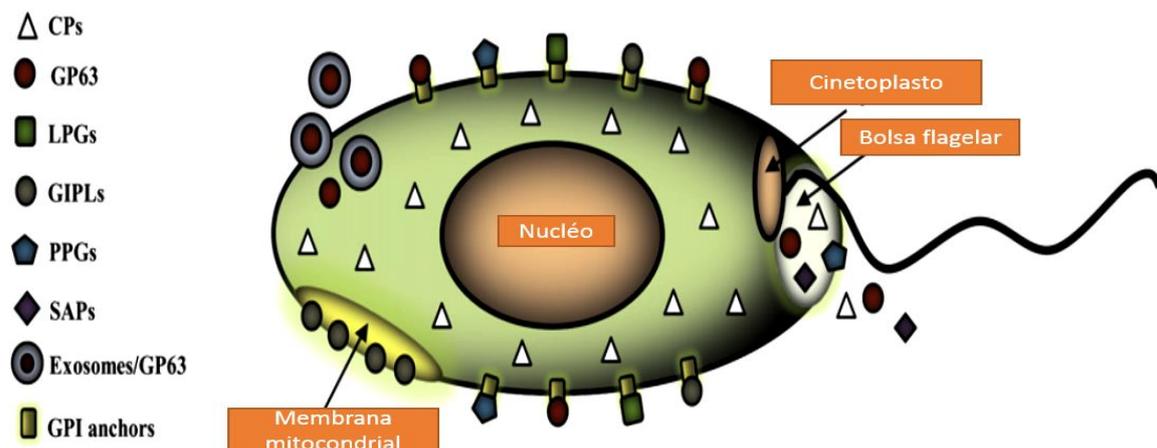
replicações e disseminação da infecção, ocorrendo também a ativação da resposta imune adaptativa, composta por células B e T (CD4,CD8). Essa etapa é crucial para se confirmar se a infecção realmente será estabelecida (MOSSER *et al.*, 1985).

A atividade leishmanicida de macrófagos depende da produção de radicais livres como oxigênio (O<sub>2</sub>) e óxido nítrico (ON), em resposta ao interferon gama (IFN-gama). O equilíbrio da infecção depende de alguns fatores, como a indução pelos parasitas da produção de TNF-alfa pelos macrófagos, após a penetração, o que potencializa a ação do IFN-gama que vai promover a ativação destas células de defesa. Por outro lado, a indução de produção de TGF-beta, que inibe o IFN-gama, está r tanto relacionada à não ativação dos macrófagos. Deve-se salientar também que a presença do parasita no interior de macrófagos interfere com a apresentação de antígenos e pode influenciar no curso da doença. Alguns fatos que tem chamado a atenção de pesquisadores é o efeito imunossupressor de componentes da saliva do flebótomo, onde em um estudo em modelo animal de LC, a inoculação de parasita *L. braziliensis*, com a presença da saliva do vetor exacerbou a infecção, apontando assim que a saliva do vetor contém substâncias com potencial de aumentar o processo infeccioso da leishmaniose (MOSSER *et al.*, 1985). Outro fato é em relação ao sistema imune da pele, onde ocorre um complexo de reações imunológicas cujas células são responsáveis pelo estímulo da resposta imunológica. As células do sistema imunológico cutâneo interagem com a resposta imune, envolvendo um conjunto de fatores humorais que podem estar relacionados com a imunidade natural (queratinócitos, histiócitos, monócitos, granulócitos e mastócitos) ou com a imunidade adquirida (células de Langerhans, células T e células endoteliais). Por ser imunoregulatório, o sistema imune da pele do homem é então relevante e parece estar envolvido na evolução da LC (MACHADO, 2010).

Embora os macrófagos tenham o papel de desempenhar a função no combate a *Leishmania*, regulando sua invasão e desenvolvimento dentro do hospedeiro, a mesma consegue aprimorar estratégias de defesa eficazes para escapar da resposta imune inata durante os primeiros momentos da infecção. Isto se deve através do bloqueio e indução de funções importantes do macrófago, como: produção de ON, TNFa, interleucina 12, entre outros (OLIVIER *et al.*, 2005). Tal característica se deve em parte à contribuição de algumas moléculas da *Leishmania*, que podem ser segregadas e/ou expressas na superfície do parasita, que representam um importante papel no direcionamento da infecção e sua interação com os seus respectivos

receptores. Algumas das principais moléculas presentes na superfície do parasita são aquelas que formam a camada de lipofosfoglicanos (LPG) além da protease denominada de GP63. Outras moléculas presas à superfície celular são proteofosfoglicanos, fosfatases ácidas, nucleotidases e cisteína proteinases que em conjunto conferem virulência às espécies de *Leishmania* (Figura 6). Os receptores celulares envolvidos na interação entre a célula hospedeira e o parasita são o CR1, o CR3, o receptor para manose-fucose, os receptores para a porção Fc de imunoglobulinas (FcγRI, FcγRII), receptores do tipo Toll (TLR2) e o receptor para fibronectina. Em conjunto estes apresentam importante papel na ativação ou inativação da resposta imune inata (KZHYSHKOWSKA *et al.*, 2008).

**Figura 6. Fatores de virulência de Leishmania**



**Fonte:** Isnard; Shio; Olivier (2012).

**Legenda:** Representação esquemática de promastigota de *Leishmania* sp. mostrando as moléculas de superfície ancoradas à GPI: GP63, LPGs, PPGs e GIPLs.

Embora os mecanismos que participam da ativação/inativação da imunidade adquirida contra as leishmanioses sejam bastante complexos, uma vacina que induza a uma eficaz e duradoura resposta celular e humoral contra o parasita poderia prevenir ou combater a infecção como um todo (NOAZIN *et al.*, 2009).

## 2.7 A metaloprotease GP63

A glicoproteína de 63 kDa denominada de GP63 (ou leishmanolisina) é uma metaloprotease de zinco que, apesar da sua importância como fator de virulência em *Leishmania*, ainda é pouco estudada. Esta proteína foi descrita pela primeira vez em 1980, sendo identificada genética e bioquimicamente como um dos principais

antígenos de superfície, expresso em promastigotas de *Leishmania* (BOUVIER *et al.*, 1985; CHANG *et al.*, 1986; ETGES *et al.*, 1985; FONG; CHANG, 1982). Devido ao seu estado de glicosilação, e ao fato de ligar a concanavalina A, foi nomeada GP63 (BOUVIER *et al.*, 1985; CHANG *et al.*, 1986). Inicialmente, a GP63 foi descrita como tendo atividade de protease, assim chamada de *Major Surface Protease* (MSP), ou seja, a principal protease de superfície, e mais tarde, especificada como uma zinco-metaloprotease (BOUVIER *et al.*, 1989; CHAUDHURI; CHANG, 1988; CHAUDHURI *et al.*, 1989; ETGES *et al.*, 1986). Devido a esta propriedade, a GP63 foi nomeada de *leishmanolysin* pela IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Esta metaloprotease está presente não só em diferentes espécies de *Leishmania*, mas também em várias espécies de *Trypanosoma* e na *Trichomonas vaginalis* (ETGES *et al.*, 1985).

A GP63 é uma molécula compacta, sintetizada no retículo endoplasmático (RE), contendo predominantemente estrutura beta pregueada e foi identificada como uma metaloproteinase neutra com atividade em uma vasta escala de pH (6 a 9), possuindo uma ampla gama de substratos, incluindo caseína, gelatina, albumina, hemoglobina e fibrinogênio (ETGES *et al.*, 1986; MACDONALD *et al.*, 1995; YAO *et al.*, 2003). Esta protease pertence à classe da *metzincin*, cujos membros incluem a seqüência de aminoácidos HExxHxxGxxH na região N-terminal, rigorosamente conservados. Este domínio contém um átomo de zinco catalítico e um sítio ativo contendo duas histidinas típicas de proteinases de zinco, possui ainda um pró-peptídeo que torna a pró-enzima inativa durante a tradução e que é removido durante sua maturação e ativação (ETGES *et al.*, 1986; YAO *et al.*, 2003). A GP63 está ancorada a membrana plasmática por meio de uma molécula de GPI (glicofosfatidilinositol), sendo que 1,5% do seu total é encontrado no retículo endoplasmático e 75% na superfície do parasita (ELLIS *et al.*, 2002; MCGWIRE *et al.*, 2002; WEISE *et al.*, 2000). Uma maior quantidade de GP63 é encontrada na superfície da forma promastigota de *Leishmania* ( $5 \times 10^5$  moléculas / célula) do que nas amastigotas (DESJEUX, 1996; YAO; DONELSON; WILSON, 2003).

### 2.7.1 Atividade catalítica na forma promastigota

Moléculas da superfície do parasita, tais como a GP63 e a camada de lipofosfoglicano (LPG), são de extrema importância na fixação, internalização e

escape deste parasita às células de defesa da resposta imune inata do hospedeiro, garantindo assim a sua sobrevivência (CHAKRABARTY *et al.*, 1996; GARCIA *et al.*, 1997). Estudos tem permitido identificar que modificações estruturais da GP63 ou falha na sua expressão podem provocar mudanças na virulência em diferentes espécies do parasita. Dada a sua presença em ambas as formas evolutivas, a GP63 desempenha então diferentes funções dependendo do estágio do parasita (CHAKRABARTY *et al.*, 1996; CHANG; MCGUIRE, 1996; LIU; CHANG, 1992; MCMASTER *et al.*, 1994).

Na interação parasito hospedeiro um ponto chave envolve a fixação e internalização de formas promastigotas por macrófagos (MUKHERJEE *et al.*, 1988; RUSSELL; TALAMAS- ROHANA, 1989;). No estudo de Joshi *et al.* (1998), através do bloqueio da expressão de todas as GP63, verificou-se que a capacidade do parasita de infectar os macrófagos *in vitro* foi reduzida e que provavelmente a GP63 desempenha um papel mais significativo no estabelecimento da infecção do que na vida parasitária da *Leishmania*. De fato, em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. major*, a GP63 foi observada clivando C3b em iC3b e, portanto, ajudando o parasita a evitar a lise mediada pelo sistema complemento do hospedeiro (BRITTINGHAM *et al.*, 1995). Simultaneamente, a geração do iC3b a GP63 também pode atuar como um opsonina, auxiliando o parasita a interagir com os macrófagos através de receptores do complemento, favorecendo sua internalização (CHANG *et al.*, 1990; MOSSER *et al.*, 1985). Além dessas ações, foi observada a capacidade da GP63 interagir com os receptores de fibronectina e, portanto, poderia ajudar ainda mais a adesão do parasita aos macrófagos (BRITTINGHAM *et al.*, 1999; ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012). Outro achado importante foi que, uma vez que promastigotas de *L. mexicana* estão em contato com a matriz extracelular de tecido subcutâneo, a GP63 pode degradar componentes extracelulares favorecendo sua migração rápida *in vitro* (MCGWIRE *et al.*, 2003). A partir dessas várias conclusões, por clivagem e/ou degradação, a GP63 pode afetar profundamente as funções dos macrófagos e favorecer a sobrevivência do parasita (OLIVIER *et al.*, 2005).

### 2.7.2 Atividade catalítica na forma amastigota

Uma vez interiorizados pelos macrófagos, as diferentes espécies de *Leishmania* precisam sobreviver e se multiplicar como amastigotas dentro do

fagolisossomo (YAO *et al.*, 2003). A função exata da GP63 na sobrevivência intracelular é ainda objeto de discussão. Contudo, resultados relatados nos últimos 20 anos sugerem que em amastigotas a GP63 poderia ter um papel importante nesta sobrevivência (CHAUDHURI *et al.*, 1989; CHEN *et al.*, 2000). Assim, estudos mostraram que as proteínas acondicionadas em lipossomas são protegidas da degradação dos fagolisossomos quando revestidas com GP63 purificadas de *L. mexicana* e essa proteção foi perdida quando ocorreu a desnaturação da GP63 (CHAUDHURI *et al.*, 1989). Outros estudos suportaram esta hipótese, usando cepas virulentas e atenuadas de *Leishmania mexicana* e *L. amazonensis*. Foi observada uma baixa taxa de sobrevivência das cepas atenuadas, quando associadas com uma redução de 20 à 50 vezes da expressão de GP63 em sua superfície, comparado com a cepa virulenta (SEYA *et al.*, 1996).

Em relação a via de sinalização celular JAK2/STAT mediada por IFN-gama e responsável pela produção de agentes antimicrobianos, incluindo óxido nítrico (ON), esta foi encontrada alterada em células infectadas por *Leishmania*. Enquanto, estudos eram realizados para entender os possíveis mecanismos desta alteração, vários grupos relataram a presença da proteína-tirosina-fosfatase (PTP) na via JAK2/STAT (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012). Blanchette *et al.* (1999) foram os primeiros a relatar que a ativação da PTP, gerada a partir da interação da *Leishmania* com os macrófagos, levava a uma inativação de JAK2, e conseqüente diminuição da resposta dos macrófagos frente à estimulação por IFN-gama. Posteriormente, estudos *in vitro* e *in vivo*, utilizando ratos com deficiência de PTP, confirmou que esta era um componente importante para sobrevivência da *L. major* dentro de macrófagos (ABU-DAYYEH *et al.*, 2008). Em outros estudos, usando uma cepa virulenta de *L. major* e uma deficiente de GP63, foi possível revelar que a GP63 é responsável pela ativação da PTP, através da clivagem na sua porção C-terminal, o que demonstra mais um método de escape do sistema imune (GOMEZ *et al.*, 2009).

O efeito protetor observado pela GP63 contra a resposta imune do sistema complemento, o seu impacto na sinalização celular durante o estágio inicial da infecção e ainda para a sobrevivência da forma amastigota são então todos fatores relevantes que tornam a GP63 a principal proteína de virulência das diferentes espécies de *Leishmania* (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012).

### 2.7.3 Organização gênica

O conhecimento da sequência dos genes que codificam a GP63 no genoma de *Leishmania major* mostraram que os mesmos são organizados em uma matriz em *tandem* (quatro cópias) no cromossomo 10, um único no cromossomo 28 e outro gene relacionado no cromossomo 31 (IVENS *et al.*, 2005). Este e outros estudos sugerem que existem diferentes isoformas da metaloprotease e que a mesma pode ser codificada por diferentes genes (CUERVO *et al.*, 2008). Tem sido relatado, contudo, que espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* apresentam um maior número de genes que codificam a GP63 quando comparado com espécies do subgênero *Leishmania* (STEINKRAUS *et al.*, 1993; VICTOIR *et al.*, 2002). Como exemplo, em *L. infantum* (subgênero *Leishmania*) e *L. braziliensis* (subgênero *Viannia*) foram encontrados 5 e 33 genes codificando GP63, respectivamente, apenas no cromossomo 10 (PEACOCK *et al.*, 2007).

Do ponto de vista da conservação das sequências dos genes codificantes de GP63, estudos mostraram que esta possui domínios envolvidos na adesão e interiorização dos parasitas aos macrófagos que são altamente conservados. Existem assim domínios estruturais e funcionais na GP63 que são altamente conservados ao longo de todo o gênero, e são de suma importância para a interação do parasita com células hospedeiras. Ao mesmo tempo, o sítio ativo ligante ao zinco e aos resíduos de metionina são menos conservados, assim como o local da âncora GPI que não é conservado em espécies de *Leishmania*. Os resíduos de superfície são ainda menos conservados do que os resíduos localizados no interior da proteína. De fato, uma representação da superfície sugere que a variabilidade na sequência é correlacionada com a flexibilidade estrutural da GP63. Acredita-se ainda que a heterogeneidade encontrada em algumas regiões pode estar relacionada com as funções invasiva e imunomoduladoras atribuída a metaloprotease (BRITTINGHAM *et al.*, 1999; MCGUIRE *et al.*, 2003), e isso pode ser refletido no resultado clínico da leishmaniose tegumentar por *L. braziliensis* (CUERVO *et al.*, 2008). Victoir *et al.* (2002), demonstraram em seus resultados para *Leishmania braziliensis* nas seqüências da GP63, que regiões que codificam o sítio catalítico apresentam-se conservadas, enquanto que as regiões de codificação de domínios de superfície, possivelmente envolvidos na interação parasito-hospedeiro (epítomos de células B e de células T),

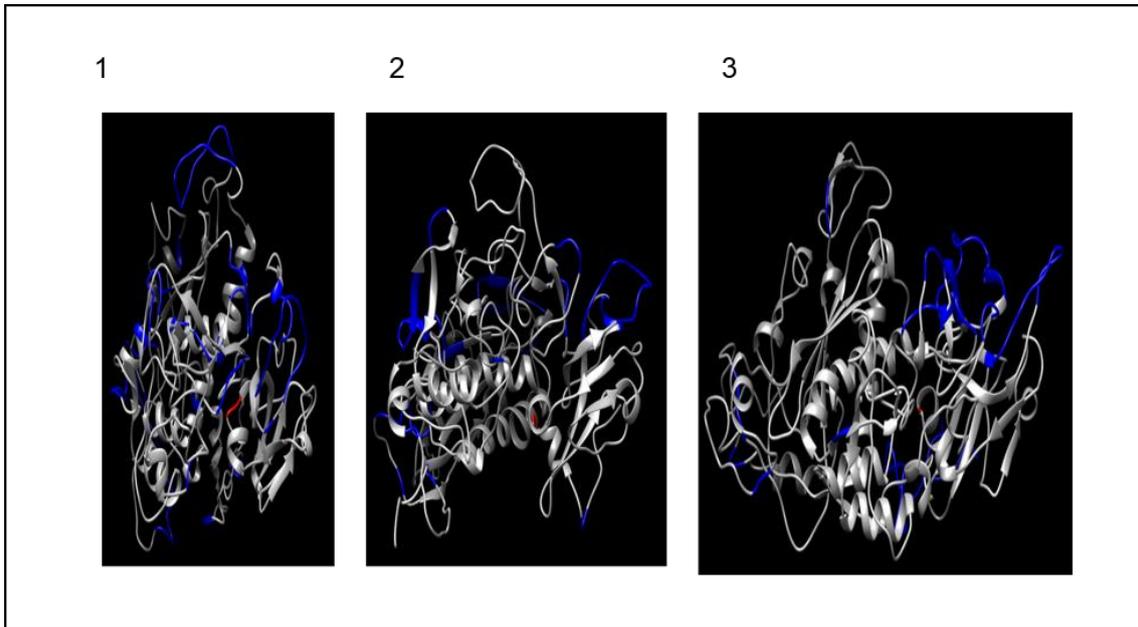
eram variáveis. Estes resultados reforçam a hipótese da variabilidade dos genes de GP63 ser uma estratégia adaptativa do parasita.

A GP63 é um dos candidatos promissores para a vacina de subunidade contra as leishmanioses. Ao considerar o progresso de bioinformática em modelagem proteica, junto com o avanço da biologia molecular podemos compreender melhor a sua estrutura e expressão, que pode revelar fatos ainda desconhecidos sobre sua interação e relação parasito hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

## **2.8 Resultados prévios**

Tendo em vista a maior quantidade de genes que codificam a GP63 em *L. braziliensis* e o impacto dessa espécie como a principal causadora da leishmaniose cutânea e suas variações no Brasil e nas Américas, estudos prévios desenvolvidos com estes parálogos de GP63 buscaram realizar análises de bioinformática voltadas à caracterização estrutural dos mesmos. Estas análises tiveram o intuito de se obter um maior entendimento do seu papel na relação parasito-hospedeiro e dos mecanismos de escape do sistema imune durante a infecção. Em relação à organização estrutural destes parálogos, foi observado que os modelos tridimensionais gerados apresentaram tanto estruturas semelhantes quanto distintas entre si. Além disso, em análises de sequência, foi observado que grande parte da variação de sequência existente entre esses parálogos encontrava-se na região externa da proteína. Ainda na região externa, foi possível identificar várias regiões preditas como possíveis epítomos para células B (Figura 7). Além dos dados de ação enzimática já relatados em outros estudos, esses dados podem indicar um possível mecanismo de escape do sistema imune, mediado pelas diferenças na própria estrutura proteica, gerado pela variação de sequência desses parálogos e baseado nos epítomos preditos.

**Figura 7 – Estrutura 3D e localização das regiões variáveis das sequências de GP63 de *L.braziliensis***



**Fonte:** Artur Leonel de Castro Neto (dados não publicados).

**Legenda:** (1) Lbr100470 – *L. braziliensis* cepa 2904; (2) Lbr100540 – *L. braziliensis* cepa 2904; (3) Lbr100590 – *L. braziliensis* cepa 2904.

### 3. JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Cutânea ou Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) tem alta incidência no Brasil e no estado de Pernambuco, sendo distribuída em áreas de atividade agrícola, com desmatamento e também em centros urbanos. As investigações sobre controle e tratamento das leishmanioses devem ser metas prioritárias na saúde pública, pois tem sido observado o aumento do número de casos da doença, a disseminação do parasito em bancos de sangue e sua co-infecção em pacientes com HIV. A doença afeta indivíduos adultos, jovens e até mesmo crianças. No Brasil tem-se observado um elevado crescimento do número de casos de LTA tanto em magnitude como em expansão geográfica (BRASIL, 2016). Logo, é necessário a melhor caracterização de moléculas de importância na patogenicidade de *Leishmania*, como a GP63 por exemplo, para melhor compreender sua interação com os hospedeiros e investigar a possibilidade do emprego destas moléculas como alvos para o desenvolvimento racional de fármacos e possíveis vacinas.

O emprego de inibidores de proteases no tratamento das leishmanioses ainda não é uma realidade, como é para o tratamento da AIDS e para outras doenças como enfisema pulmonar, hipertensão arterial e alguns tipos de cânceres e trombose. Para isso são necessários estudos mais extensivos para se entender melhor o papel das proteases na fisiologia do parasito, bem como na patogênese das leishmanioses. Uma vez que a GP63 tem sido avaliada como candidata a vacina e um protótipo medicamentoso contra leishmaniose, e de alguns estudos relatarem a importância dos mecanismos de escape da mesma, a demonstração de uma expressão diferenciada dos múltiplos genes de gp63 de *L. braziliensis* pode indicar um mecanismo de escape para o sistema imunológico humano, semelhante ao processo que ocorre no *Trypanosoma brucei* (NAMANGALA, 2011). Além disso, é importante reconhecer o quão distintas estas proteases são das proteases do hospedeiro para minimizar os tantos efeitos adversos induzidos pela terapia convencional.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Contribuir com a compreensão da relação parasito-hospedeiro e mecanismo de evasão do sistema imune através da avaliação do potencial imunogênico de diferentes parálogos de GP63 de *Leishmania braziliensis* em modelo murino.

### 4.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a expressão em *E. coli* de diferentes genes de GP63, identificando diferenças como mobilidade aparente em gel desnaturante de poliacrilamida;
- b) Avaliar a distribuição dos genes obtidos de GP63 de *Leishmania braziliensis* através da construção de uma árvore filogenética;
- c) Analisar a resposta imune humoral de camundongos contra antígenos presentes em extratos celulares brutos de *L. braziliensis*;
- d) Investigar o reconhecimento dos soros de camundongos imunizados com extratos brutos de *L. braziliensis* frente a diferentes parálogos recombinantes de GP63;

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Extração do DNA genômico

O DNA total foi extraído a partir de  $10^8$  de células de *Leishmania braziliensis*, cepa 2904, cultivadas em meio Schneider (pH = 7,2). Em seguida as células foram coletadas por centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos. Posteriormente foi realizada uma lavagem com PBS e foram centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Foi adicionado 1mL de DNAzol (Invitrogen) ao sedimento obtido, seguido de 500  $\mu$ L de etanol absoluto. A solução foi centrifugada a 4.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi resuspenso com 200 $\mu$ L de TE. A integridade do DNA extraído foi observada em gel de agarose 1%.

### 5.2 Construção dos oligonucleotídeos e amplificação dos genes

Para as reações de amplificação, foram desenhados cinco oligonucleotídeos, com base em alinhamentos dos genes codificantes de GP63 descritos nos bancos de dados (<http://tritypdb.org/tritypdb/>), baseados nas sequências mais variantes dentre esses. Foram utilizadas duas estratégias de PCR. Na primeira destas, os genes foram amplificados até a região KDELMAP (sequência de aminoácidos conservados nas GP63 de *L. braziliensis*), obtendo-se um inserto de aproximadamente 1000 pares de bases (pb). Na segunda estratégia foram amplificados genes até a região próxima da ligação da âncora GPI, obtendo-se um inserto de aproximadamente 16500 pb (Figura 8). Como os genes do cromossomo 10 possuem regiões bem conservadas, os oligonucleotídeos 3' utilizados foram os mesmos. O quadro 1 lista os oligonucleotídeos utilizados neste estudo.

A amplificação via PCR das sequências codificantes dos parálogos da proteína GP63 (região KDELMAP e GPI) foi realizada em termobloco *Mastercycler Gradient S* (Eppendorf) empregando-se uma concentração final de 20mM do mix, constituído de tampão GC, DMSO, solução de dNTPs, enzima *Phusion®* (*New England Biolabs*), solução de MgCl<sub>2</sub> (50mM) e DNA genômico de *L. braziliensis* juntamente com os oligonucleotídeos específicos, numa concentração final de 20mM.

A reação para obtenção do gene até a região KDELMAP foi realizada através da desnaturação inicial de 98°C por 3 minutos, seguida de 15 ciclos com desnaturação

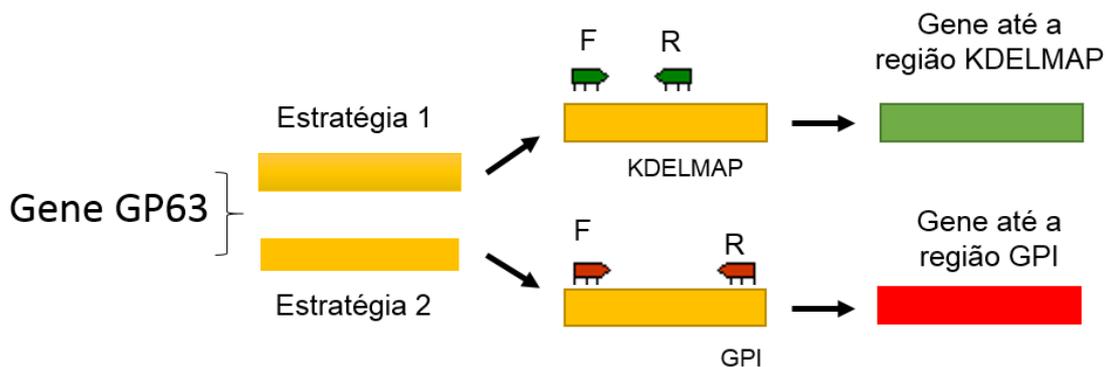
a 98°C por 30 segundos, anelamento numa reação denominada de *touchdown*, onde a temperatura de anelamento cai 1°C por ciclo, começando em 70°C e terminando em 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Por fim, era realizada uma extensão a 72°C por 5 minutos.

A amplificação dos genes utilizando os oligonucleotídeos que amplificariam até a região próxima a GPI, também foi realizada no termobloco *Mastercycler Gradient S* (*Eppendorf*), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 98°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de 98°C por 30 segundos, 71°C ou 67°C (dependendo da temperatura de anelamento do primer) por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Em seguida, os produtos das amplificações foram analisados através de corrida eletroforética a 100V, em gel de agarose a 1%, corado com *SYBER safe DNA 25X* (*Invitrogen*). A verificação do tamanho dos fragmentos amplificados foi realizada através de comparação com o marcador 1 Kb *Plus DNA Ladder* (*Invitrogen*). A visualização dos géis de agarose foram feitas através da fotografia, utilizando o sistema de documentação de gel, do mesmo sob iluminação ultravioleta.

**Figura 8 – Estratégias de PCR.**

### Estratégias de PCR



**Fonte:** A autora.

**Legenda:** Esquemas utilizados para amplificação dos genes GP63 em verde até a região KDELMAP e em vermelho até a região GPI.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação por PCR.

Gene	Oligo 5' – 3'	Tamanho predito
BamHI - Lbr. 10.0590 (5')	GGATCCATGCCCTCGACAGCAGCAG	1000 pb
XhoI - KDELMAP (3')	CTCGAGAGGTGCCATCAGCTCGTCCTTCGC	
BamHI - Lbr. 10.1620 (5')	GGATCCATGTCCCGCGACCGCAGCGT	1000 pb
XhoI - KDELMAP (3')	CTCGAGAGGTGCCATCAGCTCGTCCTTCGC	
BamHI - Lbr. 10.1640 (5')	GGATCCATGTCCCGCGACCGCAGCAG	970 pb
XhoI - KDELMAP (3')	CTCGAGAGGTGCCATCAGCTCGTCCTTCGC	
BamHI - Lbr. 31.2260 (5')	GGATCCATGTGCGCGGTACCCGTAGCGT	1 150 pb
XhoI - KDELMAP (3')	CTCGAGAGGTGCCATCAGCTCGTCCTTCGC	
BamHI - Lbr.10.1610 (5')	GGATCCATGTCCCGCGACCGCAGCAGC	1650 pb
XhoI – GPI (3')	CTCGAGGGCCTGGCACACCTCCACGTACGGC	

**Fonte:** A autora.

**Nota:** Os oligonucleotídeos representam os primers que vão se hibridizar na região 5' e 3' e seus respectivos tamanhos.

### 5.3 Purificação dos produtos amplificados

Uma vez confirmado o tamanho correto dos fragmentos de DNA obtidos, estes foram excisados do gel e purificados utilizando-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. O resultado da extração foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e quantificado no *Nanodrop* (Thermo Scientific).

### 5.4 Clonagem em vetor *pGEM-T easy*

Para uma correta e eficiente ligação dos produtos de PCR no vetor de clonagem *pGEM-T easy* fez-se necessária a modificação prévia destes através da introdução *in vitro* de uma adenina (A) em suas extremidades, mediante uma reação denominada adenilação, utilizando a enzima GoTaq® DNA polimerase (Promega). Aproximadamente 20 ng (5 µL) do inserto foram adicionados a 1,5 µL de dATP (2 mM), 3µL do tampão 5X Colorless GoTaq®, 1,5 µL de magnésio, 1,5 µL da enzima

citada e 2,5  $\mu\text{L}$  de água estéril. A reação foi colocada no termociclador *Mastercycler Gradient S* (Eppendorf) a 72° C por 25 minutos.

O sistema pGEM-T easy (Promega) contém um plasmídeo linear que possui uma deoxitimidina (T) em cada uma de suas extremidades (5' e 3') e que permite a inserção direta de produtos de PCR adenilados. As sequências codificantes dos genes de interesse, amplificadas, purificadas e adeniladas, foram inseridas no vetor pGEM-T easy. Utilizando 4  $\mu\text{L}$  do produto já adenilado, foi ligado utilizando 0,5  $\mu\text{L}$  do vetor, 5  $\mu\text{L}$  de 2X Rapid Ligation Buffer (Promega) e 0,5  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligase (Promega). A ligação foi incubada a 4°C por 16 horas.

Após o período de ligação, foi realizada a transformação por choque térmico de células *Escherichia coli* competentes da cepa TOP10, onde 5  $\mu\text{L}$  das reações de ligação foram adicionados a 50  $\mu\text{L}$  de células quimiocompetentes, que foram agitados gentilmente e mantidas em gelo por 30 minutos e logo após foram submetidas à incubação em banho-maria à 37°C, por 5 min. Em seguida, o produto da transformação foi plaqueado em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani sólido suplementado de ampicilina (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) onde foram submetidas ao sistema de seleção por IPTG/Xgal. Para essa seleção, antes do plaqueamento foi adicionado ao meio 20  $\mu\text{L}$  de IPTG (1 mM) e de 10  $\mu\text{L}$  X-gal (5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Logo após, a placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 18 horas.

Após o período de incubação, colônias brancas (possíveis recombinantes ou clones positivos) foram selecionadas a fim de realizar a extração dos seus DNAs plasmidiais e confirmação da clonagem. Estas colônias positivas foram inoculadas em tubos contendo 2 mL de meio LB líquido com ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os inóculos foram então colocados sob agitação constante em temperatura de 37°C por aproximadamente 18 horas. Após o crescimento, foram retiradas alíquotas de 1,5 mL dos inóculos para obtenção de um sedimento através de centrifugação a 12.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e com o sedimento foi realizado o protocolo da extração de DNA plasmidial em pequena escala, por lise alcalina, sendo o mesmo ressuspenso em 100  $\mu\text{L}$  de GTE, utilizando o agitador para tubos tipo vórtex (*Thermo Fisher Scientific*). Foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de uma solução SDS (1%)-NaOH (0,2N) e em seguida adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de potássio (3mM). A solução foi centrifugada a 11.200 g por 10 minutos. O sobrenadante foi precipitado com aproximadamente 45  $\mu\text{L}$  de NaCl (3 M) e com 1,5 mL de etanol

absoluto e deixado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 3 horas. A solução foi centrifugada a 11.200 g por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ficou exposto a temperatura ambiente por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso com 20  $\mu\text{L}$  de água estéril, contendo RNase (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A solução foi incubada em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.

## 5.5 Confirmação e clonagem e sequenciamento

As mini-preparações foram avaliadas em gel de agarose 1% e as clonagens foram confirmadas por digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI* (*New England Biolabs*) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 horas em banho-maria.

As amostras que liberaram uma banda no tamanho predito na digestão foram submetidas ao sequenciamento, realizado no equipamento ABI Prism 3100 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM-FIOCRUZ. As sequências obtidas a partir dos eletroferogramas gerados nas reações de sequenciamento foram analisadas no programa *EditSeq v 5.0* (*DNASStar-Lasergene*). Em seguida estas foram submetidas a uma busca realizada pelo BLAST (Altschul, *et al* 1990), para identificação do parálogo obtido.

## 5.6 Subclonagem nos vetores de expressão pGEX-tev ,pET21a e pRSET

Para as subclonagens, as construções plasmidiais no vetor pGEMT-easy contendo os genes (0590,1620,1650,312260 – KDELMAP e 1620 - GPI) que foram escolhidos por terem as sequências mais distintas entre si, foram individualmente digeridos com enzimas de restrição *BamHI*/*XhoI*, para obtenção dos fragmentos de DNA correspondente. Os diferentes fragmentos obtidos foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *Syber® Safe* (*Invitrogen®*) e visualizados em aparelho emissor de ultravioleta de ondas longas. As bandas de interesse foram excisadas e purificadas utilizando-se o sistema de purificação GFX (*GE Helthcare®*) conforme recomendação do fabricante.

Os vetores plasmidiais, pET21a, pGEX-tev e pRSET, foram usados para construção do plasmídeo recombinante através da ligação do plasmídeo digerido e fragmento purificado com a enzima T4 DNA ligase 0.4 U (*NEW ENGLAND*

*Biolabsinc.*), juntamente 1 µl de tampão10x (Ligase Buffer), 100 ng do vetor linearizado e água Milli-Q em quantidade suficiente para o volume final de 10 µl a 16°C por 18 horas. Reações contendo apenas o vetor linearizado, ou seja, sem os genes, foram utilizadas como controles negativos da ligação. As construções foram transformadas em bactérias *E. coli* cepa TOP10 competentes, através de choque térmico (30 minutos imersas em gelo e 5 minutos em banho-maria à 37°C) em solução tamponada de cloreto de magnésio. Em seguida, estas células, foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina na concentração de 100 µg/mL, crescendo durante 16 horas em estufa a 37°C. Após análise das placas, colônias de cada gene foram escolhidas aleatoriamente, isoladas e inoculadas em tubos contendo 3 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL). Os inóculos foram então colocados sob agitação constante em temperatura de 37°C por aproximadamente 16 horas. Após o crescimento, foram retiradas alíquotas de 1,5 mL dos inóculos, para obtenção de um sedimento através de centrifugação à 12.000 g por 3 minutos. A partir do sedimento foi realizado o protocolo da extração de DNA plasmidial (minipreparação) manual, e a análise dos plasmídeos obtidos realizada em gel de agarose a 1%.

#### 5.6.1 Utilização da Enzima de Modificação Antarctic Phosphatase

A enzima de modificação Antarctic Phosphatase (*NEW ENGLAND Biolabs*), possui a função de desfosforilar a extremidade 5' do DNA e sua utilização foi necessária para minimizar os eventos de religação de DNA plasmidial nas etapas de subclonagem, eventos estes induzidos pela presença de fragmentos resultantes de apenas uma das duas enzimas, *BamHI/XhoI*, utilizadas nas reações de subclonagem. Para fins de utilização dessa enzima foi seguida às instruções do fabricante. A escolha desta enzima (Antarctic Phosphatase) de modificação em relação a fosfatase alcalina tradicional (Calf Intestinal Phosphatase - CIP) se deu pelo fato da primeira possuir temperatura de inativação, facilitando assim seu uso e possibilitando um maior controle da reação.

#### 5.6.2 Confirmação de Subclonagem

A confirmação das subclonagens foi feita através da análise pela digestão (usando as enzimas *BamHI* e *XhoI*) e sequenciamento das minipreparações, realizado

por método de sanger automático, no equipamento ABI Prism 3100 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM-FIOCRUZ.

### 5.7 Árvore filogenética

Para a avaliação da distribuição dos genes de GP63 de *Leishmania braziliensis*, as sequências obtidas por PCR e as existentes no banco de dados foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética. As sequências selecionadas foram alinhadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) versão 7.2.5 e editadas pelo Trimal (CAPELLA-GUTIERREZ, SILLA-MARTINEZ, GABALDON, 2009), para manter somente os sítios filogenéticos informativos. O melhor modelo evolutivo para cada árvore foi predito pelo ProtTest (ABASCAL; ZARDOYA; POSADA, 2005), que foi usado para construir a árvore filogenética no programa PhyML 3.0, usando o método de máxima verossimilhança. O suporte dos ramos para as árvores foi dado por análises de *bootstrap* usando 1000 replicatas.

### 5.8 Expressão das proteínas recombinantes

Para a expressão das proteínas recombinantes os vetores de expressão pET21a, pRSET e pGEX-tev fusionado a proteína Glutathione S-transferase (GST), contendo os fragmentos gênicos de interesse foram transformados em cepas de células BL21 star (Invitrogen®) e Rosetta de *E. coli* através de transformação por choque térmico. Para a transformação, as bactérias foram incubadas por 30 minutos a 4° C, seguido de choque térmico a 37°C por 5 minutos, com subsequente semeio das células transformadas em placa de Petri contendo meio Agar LB (Luria-Bertani) sólido na presença de ampicilina (100 µg/µL) e incubadas a 37°C por 18 horas. As colônias obtidas foram inoculadas em 20 mL de meio LB líquido contendo antibiótico, como descrito anteriormente, e foram crescidas a 37°C sob agitação de 180 rpm por 18 horas. Para indução da expressão das proteínas recombinantes, alíquotas de 20 mL das culturas crescidas foram inoculadas em meio LB com antibiótico e crescidas a 37°C sob agitação de 180 rpm e o crescimento bacteriano foi acompanhado pela aferição em espectrofotômetro (comprimento de onda de 600 nm) até atingir uma densidade ótica (D.O.) entre 0,5 ou 0,8, dependendo da proteína a ser expressa. Em seguida foi adicionado o indutor de síntese de proteínas, IPTG (isopropil-β-D-tio-

galactosídeo - Sigma-Aldrich®), na concentração final de 0,1 mM e a cultura permaneceu sob agitação por 4 horas a 30°C (D.O. de 0,5). A visualização das expressões foram realizadas através da corrida em gel de SDS-PAGE através de eletroforese (300 V, 35Ma, 1h30m), em gel de poliacrilamida 15%.

Diferentes condições de expressão foram avaliadas como tempo de crescimento, concentração de IPTG adicionado e fase da cultura (densidade óptica) quando se induz a expressão das proteínas recombinantes.

## 5.9 Imunização dos camundongos

### 5.9.1 Animal Experimental

No protocolo experimental desta pesquisa foram utilizados camundongos *Mus musculus*, sendo seis fêmeas da linhagem isogênica BALB/c e seis da linhagem heterogênica SWISS, todas com 6 a 8 semanas de idade, pesando 20±2g, provenientes do biotério do Instituto Aggeu Magalhães/IAM, (FIOCRUZ/Recife). Os animais utilizados nessa pesquisa foram mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/Recife) em condições padronizadas de temperatura (±23°C) e luminosidade, recebendo água e alimentação *ad libitum* com dieta padrão comercial para camundongos (Nuvital, Curitiba, PR). A experimentação animal foi aprovada pela Comissão de Ética no uso de animais do Instituto Aggeu Magalhães/IAM, (FIOCRUZ/Recife), segundo o número do processo: 93/2015 (ANEXO C).

### 5.9.2 Obtenção dos extratos de *L.braziliensis*

Para imunização dos camundongos com o extrato de *L. (Viannia) braziliensis* cepa 2904 as formas promastigotas do parasita foram cultivadas em 5 mL de meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após dois dias de cultivo foram expandidas para 30 mL de meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino e logo mais 3 dias de cultivo, ao atingir 10<sup>6</sup> células/mL, a cultura foi colocada em tubos de 50mL e centrifugada a 3000 rpm por cinco minutos. Em seguida, para obtenção do extrato, o sedimento foi ressuspendido em 500 µL de PBS contendo inibidor de protease, centrifugado novamente da mesma forma já descrita. Em

seguida, foi ressuspenso em 500 µL de Tampão de Lise (APÊNDICE A), com subsequente cavitação. Sendo retirado 20 µL para quantificação por Bradford (5 µl do lisado; 800µl H<sub>2</sub>O MilliQ; 200 µl de Bradford) e verificação da integridade através do gel 15% de SDS-PAGE corado com azul de *Coomassie*, mantendo o restante do extrato em -80°C. O inóculo foi realizado por via intraperitoneal com 100 µg do lisado, adicionando 50 µl do adjuvante incompleto de Freund e completando para um volume final de 200 µl com PBS. Como controle, um camundongo de cada espécie Balb/c e SWISS respectivamente, foram imunizados utilizando 150 µl de PBS juntamente com 50 µl de adjuvante incompleto de Freund. Os reforços das doses foram realizados em intervalos de 15 dias, totalizando quatro doses, todas nas mesmas condições já citadas anteriormente.

### 5.9.3 Eutanásia dos camundongos e obtenção dos soros

Os camundongos foram submetidos à eutanásia por meio de sedação prévia através da administração de Tiopental na dose de 50 mg/kg, do peso do camundongo, pela via intraperitoneal, seguido do deslocamento cervical. Após a realização dos procedimentos de eutanásia, as carcaças foram congeladas, autoclavadas e congeladas novamente até o momento do descarte final. Para serem obtidos os soros dos camundongos, foram coletados de forma intracardíaca 1 mL de sangue total de cada animal e centrifugados em 3000 rpm/3 minutos. Os soros foram alíquotados na proporção de 1:1 com glicerol e preservados em -20°C.

### 5.10 Ensaio de *Western blotting*

Para verificação do reconhecimento antigênico foram realizados ensaios de *Western-blot* (Wb) com diversas diluições dos soros de camundongos produzidos através da imunização com o extrato total de *L. braziliensis* incubadas com as proteínas recombinantes.

### 5.10.1 Ensaio de *Western blotting* para verificação da produção de anticorpos dos soros dos camundongos Balb/c e Suíço

De início para confirmar a produção de anticorpos advindos da imunização com o extrato de *L. braziliensis* foram realizados ensaios de Wb com variadas diluições dos soros de camundongos (Balb/c e Suíço) e incubados com 5uL do próprio extrato de *L. braziliensis* diluídos em tampão de amostra para SDS-PAGE foram fracionadas através de eletroforese (300 V, 35Ma, 1h30m), em gel de poliacrilamida 15% (15x8cm). O gel foi colocado no tampão de transferência (ANEXO B) por 15 minutos e a membrana de PVDF (Immobilon-P Millipore®) foi cortada em dimensões ligeiramente superiores às do gel a ser transferido e ativada, submergindo-a por 15 segundos em metanol e em seguida hidratando com água destilada, após essa etapa a membrana também foi mantida em tampão de transferência por 15 minutos sob agitação. O papel de filtro (3 mm) para transferência foi cortado nas mesmas dimensões da membrana de PVDF. As folhas, após serem umedecidas em tampão de transferência (ANEXO B), foram montadas seguindo a ordem: 3 folhas de papel filtro, PVDF, gel de poliacrilamida e 3 folhas de papel filtro, em sistema de transferência semi-seco. Ligou-se a fonte em voltagem 35 V (corrente entre 100-150 mA), durante 1 hora. Após o tempo de transferência, a membrana foi submetida em solução bloqueadora com 5 g de leite em pó desnatado em 100 mL de TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH7,5) suplementado com Tween-20 (ANEXO A) a 1% por 3 horas. Posteriormente, foram incubadas com os soros em diferentes diluições finais, em solução de leite a 5% em TBS / Tween-20 a 1% variando o tempo de acordo com cada soro. As membranas foram lavadas três vezes, duas com solução de leite a 5% suplementado com TBS / Tween-20 a 1% e uma com TBS/ Tween-20 a 1% por 10 minutos cada. Realizou-se nova incubação, durante 1 hora, com o segundo anticorpo (anti IgG de camundongo, Jackson Immunoresearch Laboratories), marcado com peroxidase, numa diluição fixa de 1:10000 em solução de leite a 5% suplementado com TBS / Tween-20 a 1%. Em seguida, foram novamente lavadas três vezes com TBS / Tween-20 a 1% por 10 minutos. Após essas lavagens, as membranas foram banhadas numa solução de luminol 1,2 mM, iodofenol 0,4 mM e peróxido de hidrogênio 0,03% por 2 minutos, para realização da reação de quimioluminescência. Estas membranas foram, em seguida secas e, posteriormente, expostas a um filme de auto-radiografia durante 1 e 5 minutos. O filme foi revelado com uma solução de

Dektol (1:2) por 1 minuto e lavado em solução de ácido acético diluído e fixado por 3 minutos.

O soro controle foi submetido às mesmas condições de ensaio de western citadas anterior.

#### 5.10.2 Ensaio de *Western blotting* dos soros de camundongos (Balb/c e Suiço) incubados com as proteínas recombinantes

Dando sequência aos ensaios de Wb, diversas diluições dos soros de camundongos também foram incubadas com as proteínas recombinantes. Diante disso, 10 µL do extrato de proteína recombinante diluídos em tampão de amostra para SDS-PAGE foram fracionadas através de eletroforese (300 V, 35Ma, 1h30m), em gel de poliacrilamida 15% (15x8cm). O gel foi colocado no tampão de transferência (ANEXO B) por 15 minutos e a membrana de PVDF (Immobilon-P Millipore®) foi cortada em dimensões ligeiramente superiores às do gel a ser transferido e ativada, submergindo-a por 15 segundos em metanol e em seguida hidratando com água destilada, após essa etapa a membrana também foi mantida em tampão de transferência por 15 minutos sob agitação. O papel de filtro (3 mm) para transferência foi cortado nas mesmas dimensões da membrana de PVDF. As folhas, após serem umedecidas em tampão de transferência (ANEXO B), foram montadas seguindo a ordem: 3 folhas de papel filtro, PVDF, gel de poliacrilamida e 3 folhas de papel filtro, em sistema de transferência semi-seco. Ligou-se a fonte em voltagem 35 V (corrente entre 100-150 mA), durante 1 hora. Após o tempo de transferência, a membrana foi submetida em solução bloqueadora com 5 g de leite em pó desnatado em 100 mL de TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH7,5) suplementado com Tween-20 (ANEXO A) a 1% por 3 horas. Posteriormente, foram incubadas com os soros em diferentes diluições finais, em solução de leite a 5% em TBS / Tween-20 a 1% variando o tempo de acordo com cada soro. As membranas foram lavadas três vezes, duas com solução de leite a 5% suplementado com TBS / Tween-20 a 1% e uma com TBS/ Tween-20 a 1% por 10 minutos cada. Realizou-se nova incubação, durante 1 hora, com o segundo anticorpo (anti IgG de camundongo, Jackson Immunoresearch Laboratories), marcado com peroxidase, numa diluição fixa de 1:10000 em solução de leite a 5% suplementado com TBS / Tween-20 a 1%. Em seguida, foram novamente lavadas três vezes com TBS / Tween-20 a 1% por 10 minutos. Após essas lavagens, as

membranas foram banhadas numa solução de luminol 1,2 mM, iodofenol 0,4 mM e peróxido de hidrogênio 0,03% por 2 minutos, para realização da reação de quimioluminescência. Estas membranas foram, em seguida secas e, posteriormente, expostas a um filme de auto-radiografia durante 1 e 5 minutos. O filme foi revelado com uma solução de Dektol (1:2) por 1 minuto e lavado em solução de ácido acético diluído e fixado por 3 minutos.

O soro controle foi submetido às mesmas condições de ensaio de western citadas anterior.

## 6 RESULTADOS

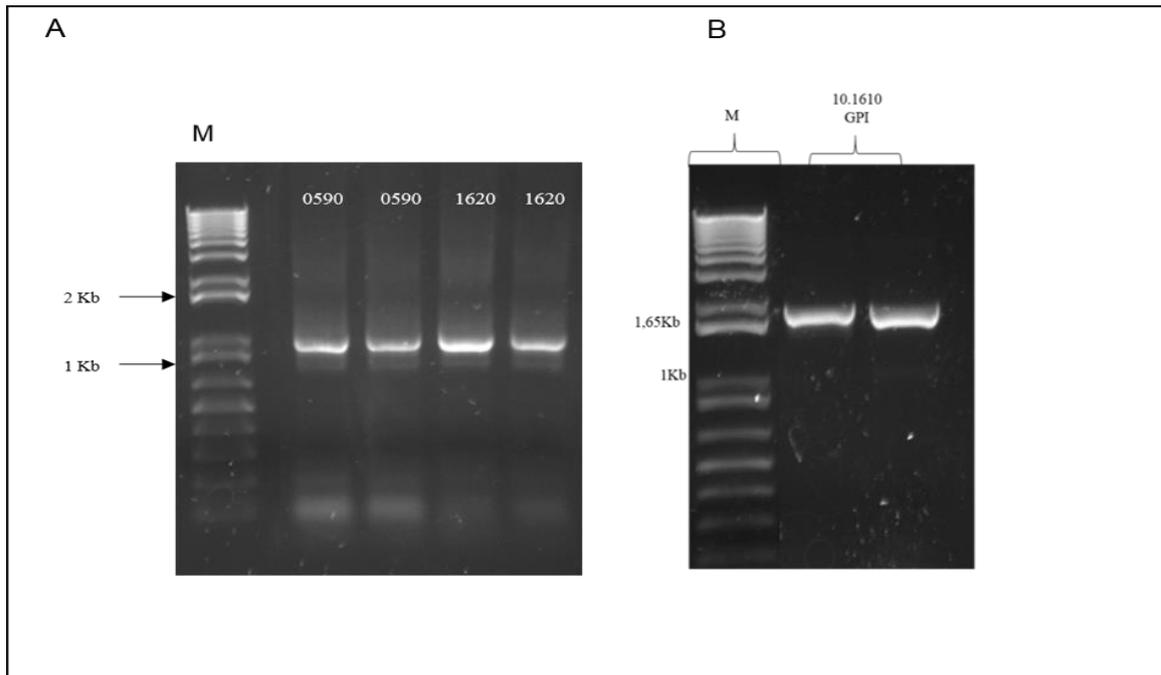
Como etapa preliminar a esse trabalho foram feitas análises de bioinformática em que as organizações estruturais de GP63 foram avaliadas e apresentaram semelhanças e distinções entre si. Ainda foi possível identificar regiões de sequência variáveis nessas estruturas, bem como identificar possíveis regiões preditas como epítopos de células B. Levando em consideração a grande quantidade de genes que codificam a GP63 em *L. braziliensis*, nosso estudo se propôs a realização da avaliação da expressão desses genes, bem como seu perfil imunogênico. Acredita-se que a identificação de uma expressão diferenciada entre esses genes, é indicativo de um mecanismo de escape ao sistema imune do hospedeiro, podendo ser mais um indício de um potencial alvo molecular.

No presente trabalho foram escolhidos cinco dos genes de GP63, sendo os mais divergentes entre si dentro da mesma espécie baseados no sequenciamento. Na primeira etapa dos procedimentos foi avaliada a distribuição desses genes na árvore filogenética. No segundo momento, foi observada as diferentes expressões das proteínas. E por fim, soros imunizados com extrato de *L. braziliensis* foram analisados quanto ao reconhecimento das proteínas. Dados da literatura indicam um alto perfil imunogênico da GP63, mas os dados apresentados não são conclusivos e precisam de uma reavaliação.

### 6.1 Amplificação e clonagem em *pGEM-T easy*

Na figura 9 estar representada em gel demonstrativo as bandas referentes à amplificação obtida pelo esquema de oligonucleotídeos 10.0590,10.1620-KDELMAP e o esquema 10.1610-GPI amplificados em seus tamanhos preditos. Para as amplificações até a região KDELMAP, as bandas se encontram em  $\approx 1$  Kb. Já para o gene até a região GPI a amplificação é de  $\approx 1,6$  Kb. Esse mesmo padrão foi observado em todos os genes de GP63 amplificados, nos esquemas descritos anteriormente, até o presente momento.

**Figura 9 - PCR dos genes de GP63.**



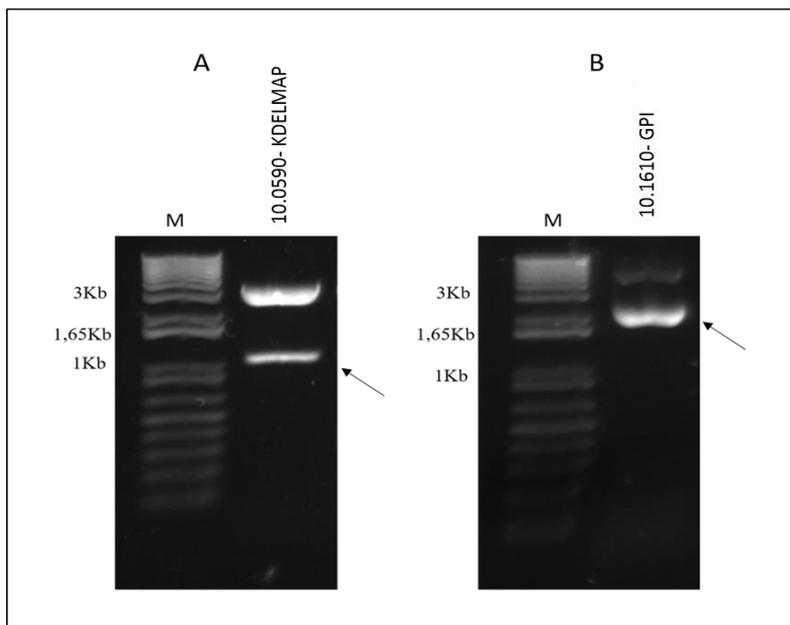
**Fonte:** A autora.

**Nota:** Figura demonstrativa da PCR dos esquemas de primers 10.0590 e 10.1620, demonstrando bandas de aproximadamente  $\approx 1$  Kb em (A) e em (B) esquema de oligos 10.1610, demonstrando bandas de aproximadamente  $\approx 1,6$  Kb. Marcador (M): 1 Kb plus (Invitrogen).

### 6.1.2 Clonagem em *pGEM-T easy* e confirmação

A Figura 10 mostra uma digestão realizada pelas enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI*, para a verificação da inserção dos genes amplificados de GP63 no plasmídeo. Os géis demonstram a digestão dos genes obtidos através do esquema de *oligos* 10.0590-KDELMAP e o inserto predito liberado em  $\approx 1$  Kb (A), seguido da digestão do gene 10.1610 até a região GPI, com o inserto predito liberado em  $\approx 1,65$  Kb (B). Os padrões de digestão foram reprodutíveis nos outros genes de GP63 e confirmados através de sequenciamento.

**Figura 10 - Digestão das clonagens dos genes gp63.**



**Fonte:** A autora.

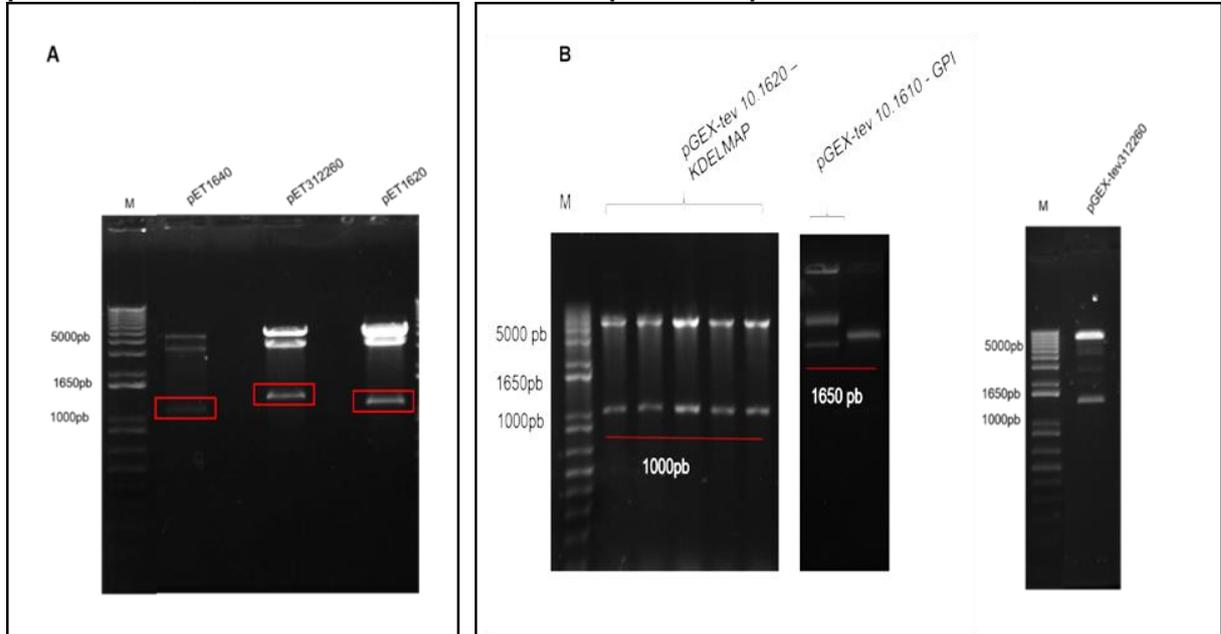
**Nota:** Digestão em gel de agarose 1%, com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I, demonstrando o inserto no tamanho esperado de 1000pb para o gene 10.0590 até a região KDELMAP (A) e para o gene de 10.1610 (1650pb) até a região GPI (B). Marcador (M): 1 Kb plus (Invitrogen).

## 6.2 Subclonagem nos vetores de expressão

Os genes divergentes baseados na sequência (0590,1620,1640,312260-KDELMAP e 1610-GPI) obtidos através da clonagem em pGEMT-easy foram purificados e confirmados através de sequenciamento. Para obtenção da expressão da proteína dos genes de GP63 foi necessária à sua subclonagem nos vetores de expressão pET21a e pGEX-tev. Para essas subclonagens, os plasmídeos pET21a e pGEX-tev, assim como os genes foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I. Em seguida os fragmentos (1000 pb e 1650pb) foram ligados ao vetor pET21a (5441 pb) e pGEX-tev (5069pb), transformados e a partir dos clones selecionados foi realizada a extração do DNA plasmidial (minipreparações) das construções, nas mesmas condições citadas anteriormente. Foi possível a confirmação das subclonagens através da digestão das mesmas utilizando as enzimas *Bam*HI e *Xho*I, com a liberação dos fragmentos nos tamanhos esperados de aproximadamente 1000 pb e 1600 pb para os genes 0590, 1620, 1640, 312260 e 1610 respectivamente, que podem ser avaliados através da figura demonstrativa 12, sendo a parte A as subclonagens com o vetor pET21a e a parte B com o vetor pGEX-tev. As construções

foram analisadas e confirmadas quanto a sua integridade por sequenciamento de DNA.

**Figura 11 - Confirmação de subclonagem dos genes 1640,312260,1620-KDELMAP no plasmídeo pET21a e 1620,312260-KDELMAP; 1610-GPI no plasmídeo pGEX-tev.**



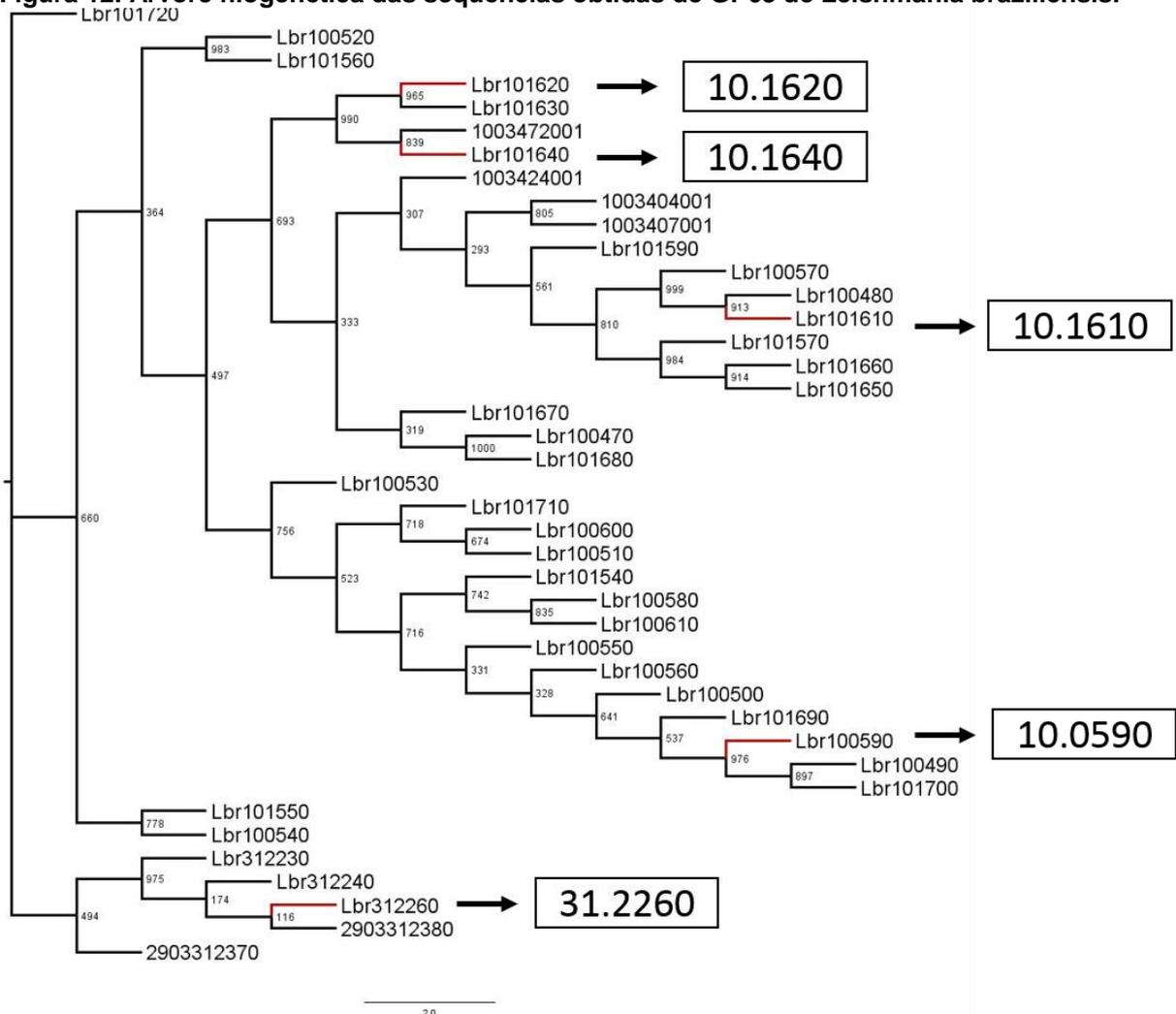
**Fonte:** A autora.

**Nota:** Géis de agarose demonstrativo após eletroforese dos fragmentos de DNA resultantes da reação de subclonagem. Digestão enzimática das minipreparações com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I verificando a liberação dos fragmentos no tamanho esperado de 1000 pb para os genes 1640, 312260,1620 (indicados por quadrados vermelhos) e 5441 pb, para o vetor plasmidial pET21a (A). Nas mesmas condições e enzimas os genes 1620,312260-KDELMAP, 1610-GPI foram liberados no tamanho esperado de 1000pb e 1650pb, respectivamente, e 5069pb do pGEX-tev. O tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular estão mostrados a esquerda.

### 6.3 Árvore filogenética

As cinco sequências obtidas pela PCR foram utilizadas para identificação da distribuição dos genes de GP63 quando comparadas as do banco de dados utilizando a árvore filogenética, com o intuito de ver a localização e distância entre eles. Na Figura 12, pode ser observada a Árvore que foi construída com as sequências de proteínas até as regiões KDELMAP (0590,1620,1640 e 312260) e GPI (1610), onde estão marcadas de acordo com sua localização. As demais sequências correspondem aos outros genes de GP63 obtidos no banco de dados *Trytrip*, de *L. braziliensis*.

**Figura 12. Árvore filogenética das sequências obtidas de GP63 de *Leishmania braziliensis*.**



**Fonte:** A autora.

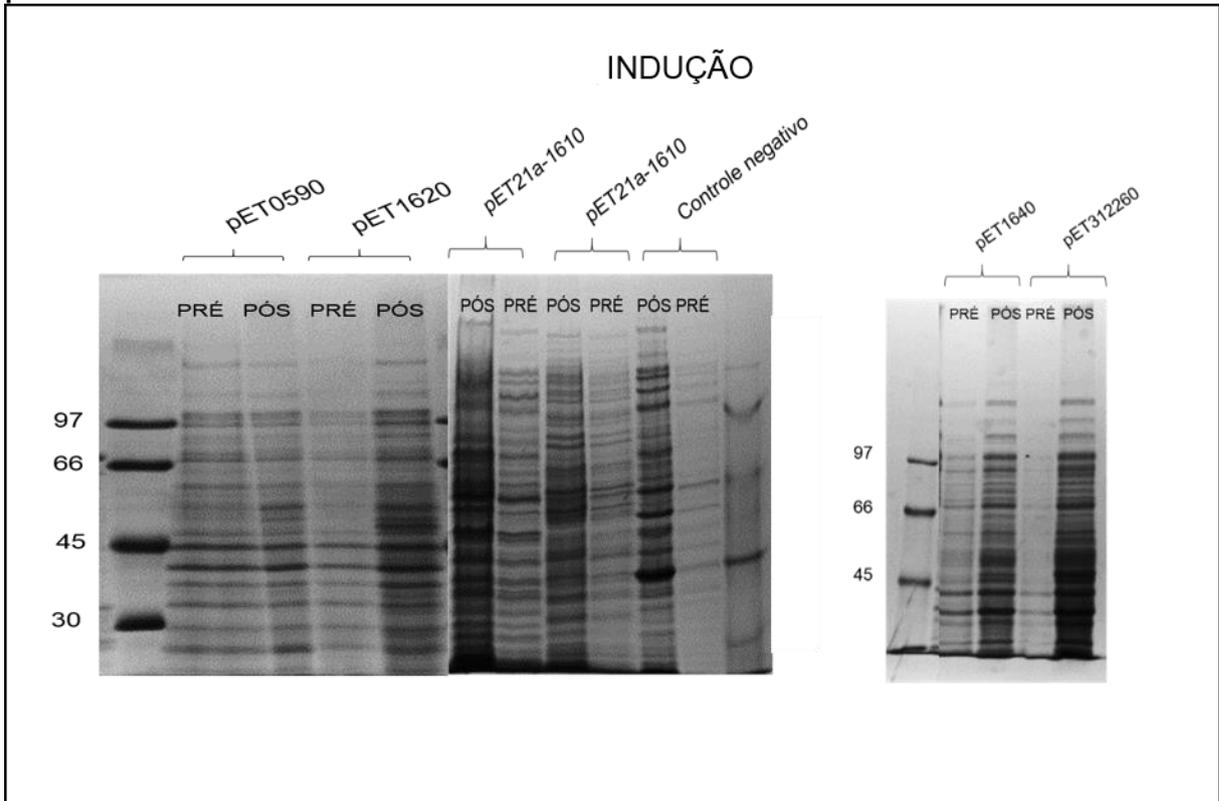
**Nota:** LbrXXX (L. braziliensis 2904). Os genes que foram escolhidos encontram-se destacados nos quadros.

#### 6.4 Expressão das proteínas GP63 fusionadas a GST

Após a confirmação das subclonagens, as construções obtidas (0590,1640,1620,312260- KDEL MAP; 1610 – GPI nos vetores de expressão pET21a e pGEX-tev) foram transformadas em células competentes de *E. coli* BL21 e Rosetta, induzidas na presença de isopropil-Beta-D-galactosídeo (IPTG), em diferentes condições de quantidades de meio de cultura, tempo e temperatura. Após o período de crescimento da expressão, extratos bacterianos totais de células expressando as diferentes proteínas foram fracionados em gel de SDS-PAGE 15%, seguido de coloração com Azul de Coomassie para a visualização das proteínas de interesse. Sendo a figura 13 uma tentativa de expressão em pET21a e como forma de confirmação da não expressão da proteína, foi feito um ensaio de western (Figura 14)

através do reconhecimento da anti-Histidina, onde apenas apareceu a banda do controle positivo (Lci13). A figura 15 constata as expressões em pGEX-tev, com exceção da construção 312260-KDELMAP/pGEX-tev, que não é nítida sua expressão.

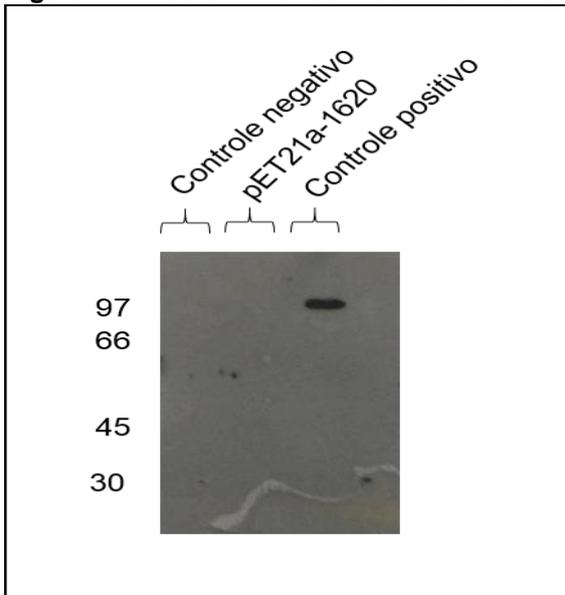
**Figura 13: Expressão da proteína 0590,1620,1640,312260-KDELMAP e 1610-GPI no plasmídeo pET21a.**



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Géis de SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie mostrando a tentativa de indução das proteínas 0590,1620,1640,312260-KDELMAP e 1610-GPI em pET21a. Para a indução das proteínas foi adicionado às culturas bacterianas IPTG (pós-IPTG) e como controle, foram crescidas culturas nas mesmas condições sem adição de IPTG (pré-IPTG) e também culturas com o plasmídeo fechado em célula competente *E.coli* BL21. O tamanho esperado das proteínas, seria de aproximadamente 43kDA. Os tamanhos dos marcadores de peso molecular estão expressos em kilodaltons (kDA) a esquerda.

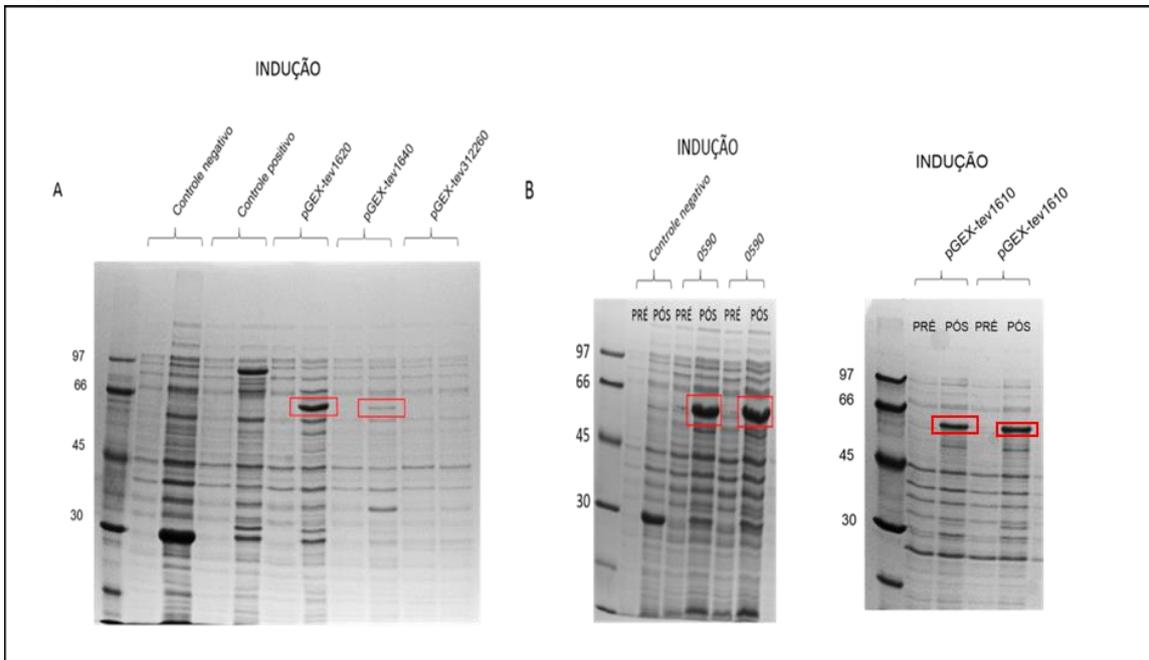
**Figura 14: Western blot do reconhecimento Anti-Histidina**



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Análise da proteína 1620-KDELMAP em pET21a através do reconhecimento da Anti-Histidina, onde foi utilizado como controle negativo o plasmídeo vazio e como controle positivo a proteína LCI 13, que é reconhecida pelo anticorpo anti-his. Esse mesmo padrão se manteve nas demais proteínas

**Figura 15: Expressão das proteínas 1620,1640,312260, 0590 - KDELMAP e 1610-GPI fusionados a GST.**



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Géis de SDS-PAGE corado com azul de Coomassie mostrando a indução das proteínas (1620,1640,312250,0590 – KDELMAP e 1610-GPI) fusionadas a GST, em célula *E.coli* cepa BL21. As amostras das induções estão indicadas nos quadros vermelhos. Para a indução das proteínas foi adicionado às culturas bacterianas IPTG (pós-IPTG), como controle positivo foi utilizada uma proteína com confirmada indução (fusionada a GST) e como controle negativo foi induzida uma cultura contendo apenas o plasmídeo fechado (pGEX-tev). O tamanho das proteínas foi de aproximadamente 63 KDa. Os tamanhos dos marcadores de peso molecular estão expressos em kilodaltons (kDa) à esquerda.

## 6.5 Reconhecimento das proteínas GP63 por anticorpos de camundongos através de ensaios de *Western blotting*

Os extratos bacterianos expressando os diferentes genes obtidos foram então usados em ensaios de *Western blot* visando confirmar a produção e reconhecimento de anticorpos produzidos através da imunização de camundongos Balb/c e Suiço frente as proteínas recombinantes. Foi utilizado como controle negativo o pGEX-tev induzido.

### 6.5.1 Reconhecimento dos soros versus extrato de leishmania braziliensis

Primeiramente os 12 soros, sendo seis de camundongos Balb/c e seis de Suiço, foram testados versus 15ug/mL de extrato total de *L. braziliensis*, junto com os soros controles (um soro Balb/c e um soro Suiço), que não tinham passado pelo processo de imunização com extrato de *L. braziliensis*. Estes soros foram avaliados quanto a produção de anticorpos e reconhecimento do extrato de *L. braziliensis*, onde os soros dos camundongos Balb/c, apresentaram reconhecimento. Porém sendo eles isogênicos, esperava-se um reconhecimento padrão entre eles e não foi esse o resultado demonstrado na figura 17. Os soros de camundongos SUIÇO também produziram anticorpos e reconheceram o extrato de *L. braziliensis* de forma heterogênea como o esperado, demonstrado na figura 18. Para uma melhor visualização do extrato total de *L. braziliensis*, este também foi corrido em gel de SDS-PAGE e corado com Azul de Coomassie, conforme visualizado na figura 16.

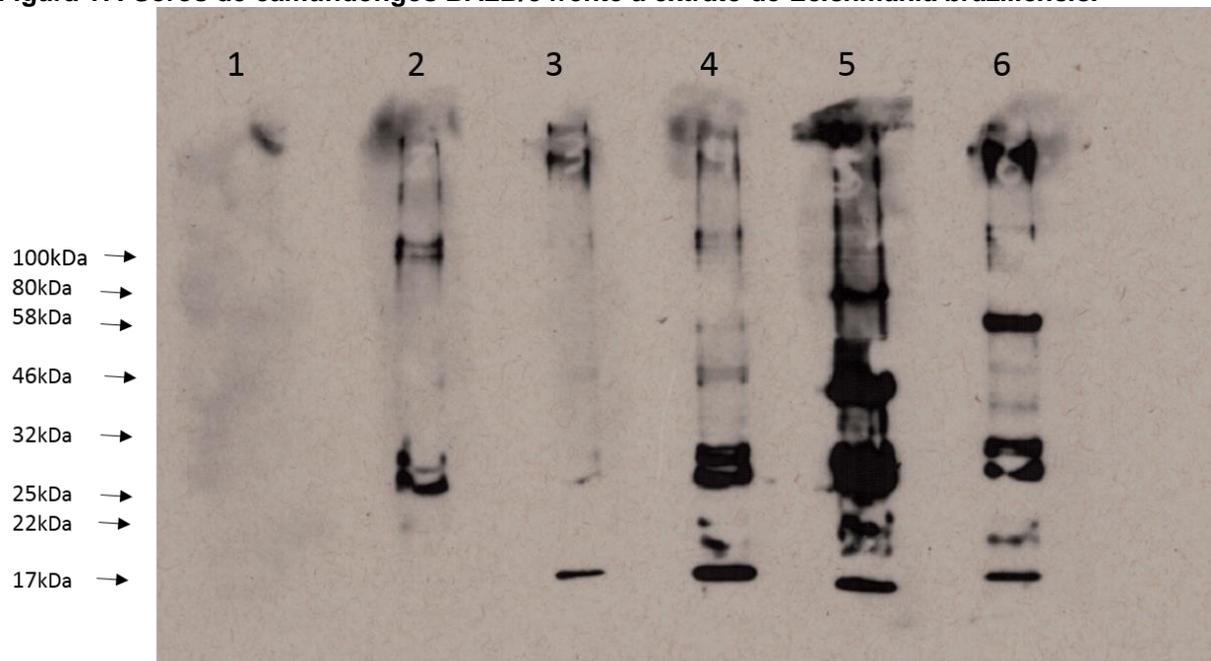
**Figura 16: Extrato total de *Leishmania braziliensis*.**



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Gel SDS-PAGE corado com azul de Coomassie mostrando a corrida com 10uL do extrato total de *L.braziliensis*, obtido através de cavitação.

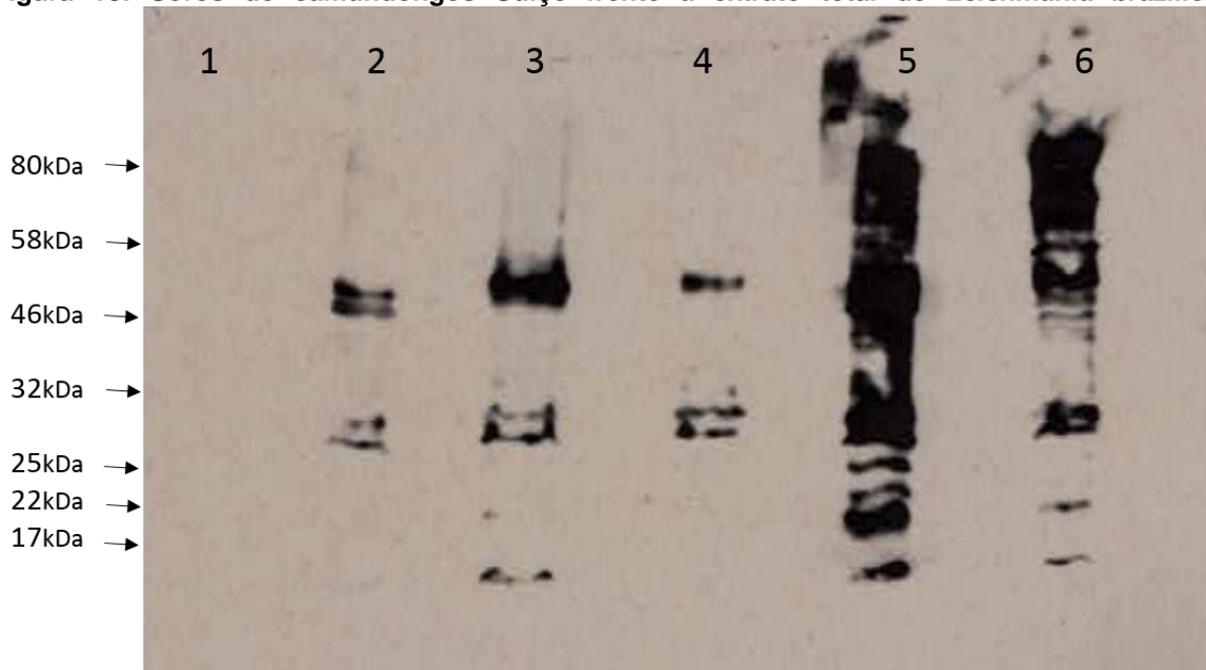
**Figura 17: Soros de camundongos BALB/c frente à extrato de *Leishmania braziliensis*.**



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Análise de soros de camundongos BALB/c por *Western blot*, com extratos de *Leishmania braziliensis* (soros de 2 a 6). (1) Controle negativo, camundongo não imunizado. Concentração do primeiro anticorpo 1: 2500, durante 3 horas.

**Figura 18: Soros de camundongos Suiço frente à extrato total de *Leishmania braziliensis*.**



**Fonte:** A autora.

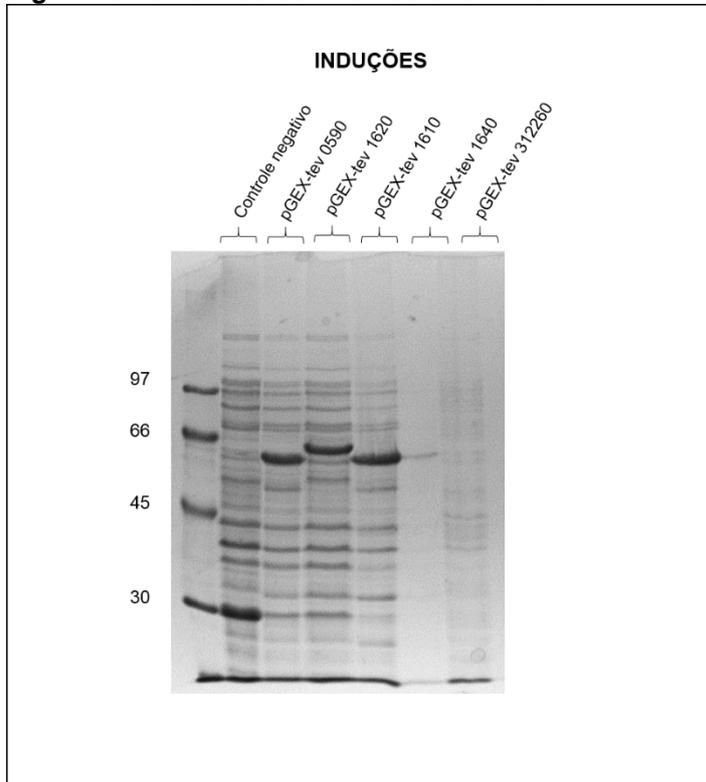
**Nota:** Análise de soros de camundongos Suiço por *Western blot*, com extrato total de *Leishmania braziliensis* (soros de 2 a 6). (1) Controle negativo, camundongo não imunizado. Concentração do primeiro anticorpo 1:2500, durante 3 horas.

### 6.5.2 Reconhecimento dos soros de camundongos Balb/c com extratos bacterianos das proteínas GP63

Em seguida os soros de camundongos BALB/c foram avaliados com os extratos bacterianos das proteínas GP63 (0590,1620,1640,312260-KDELMAP e 1610-GPI). A figura 19 mostra a ordem de corrida utilizada nos ensaios de *Western blot* tanto com os soros de BALB/c como SUIÇO. Como esperado, o soro controle de BALB/c na figura 20 não obteve reconhecimento das proteínas. Na figura 21, com o soro 2 foram testadas diluições entre 1:1000 e 1:5000, com presença de contrabandas em sua concentração mais forte, da mesma forma ocorreu nos soros 4 e 5 (figura 22). Tentou-se administrar esse evento com outras alternativas, como: tempo de bloqueio, mudança no tempo da incubação do primeiro anticorpo e pré-bloqueio em outra membrana na tentativa de diminuir as possíveis reações inespecíficas, porém os soros não reconheceram as proteínas na forma esperada. Quanto aos demais soros como demonstrado na figura 22 o soro 6, em geral nota-se a ausência de reconhecimento das proteínas nos tamanhos preditos e com presença de bandas inespecíficas provenientes da bactéria *E. coli*, no qual foram tomadas as mesmas medidas citadas

anteriormente com diluições entre 1:000 e 1:250, sem obtenção do reconhecimento das proteínas no tamanho esperado.

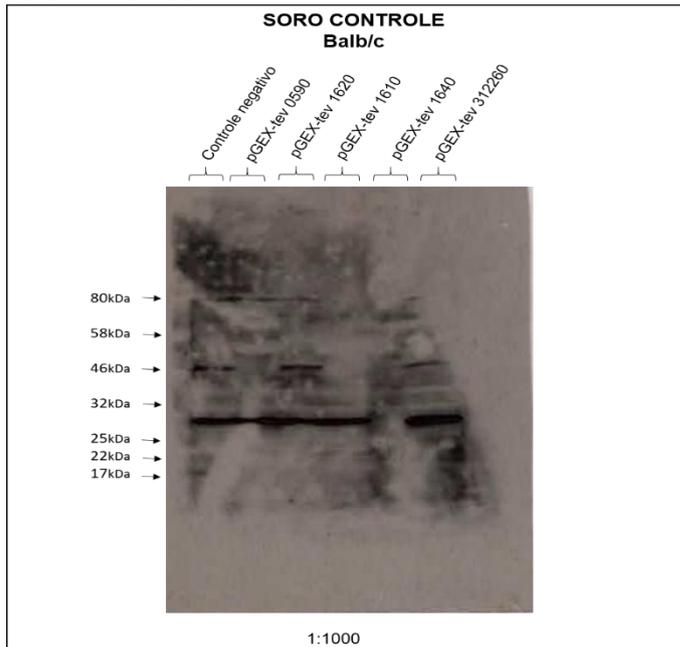
**Figura 19: Ordem de corrida dos ensaios de *Western Blot***



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Gel SDS-PAGE corado com azul de Coomassie mostrando a sequência em que as proteínas foram analisadas nos ensaios de Western blot. O tamanho das proteínas foi de aproximadamente 63 kDa. Os tamanhos dos marcadores de peso molecular estão expressos em kilodaltons (kDa) à esquerda.

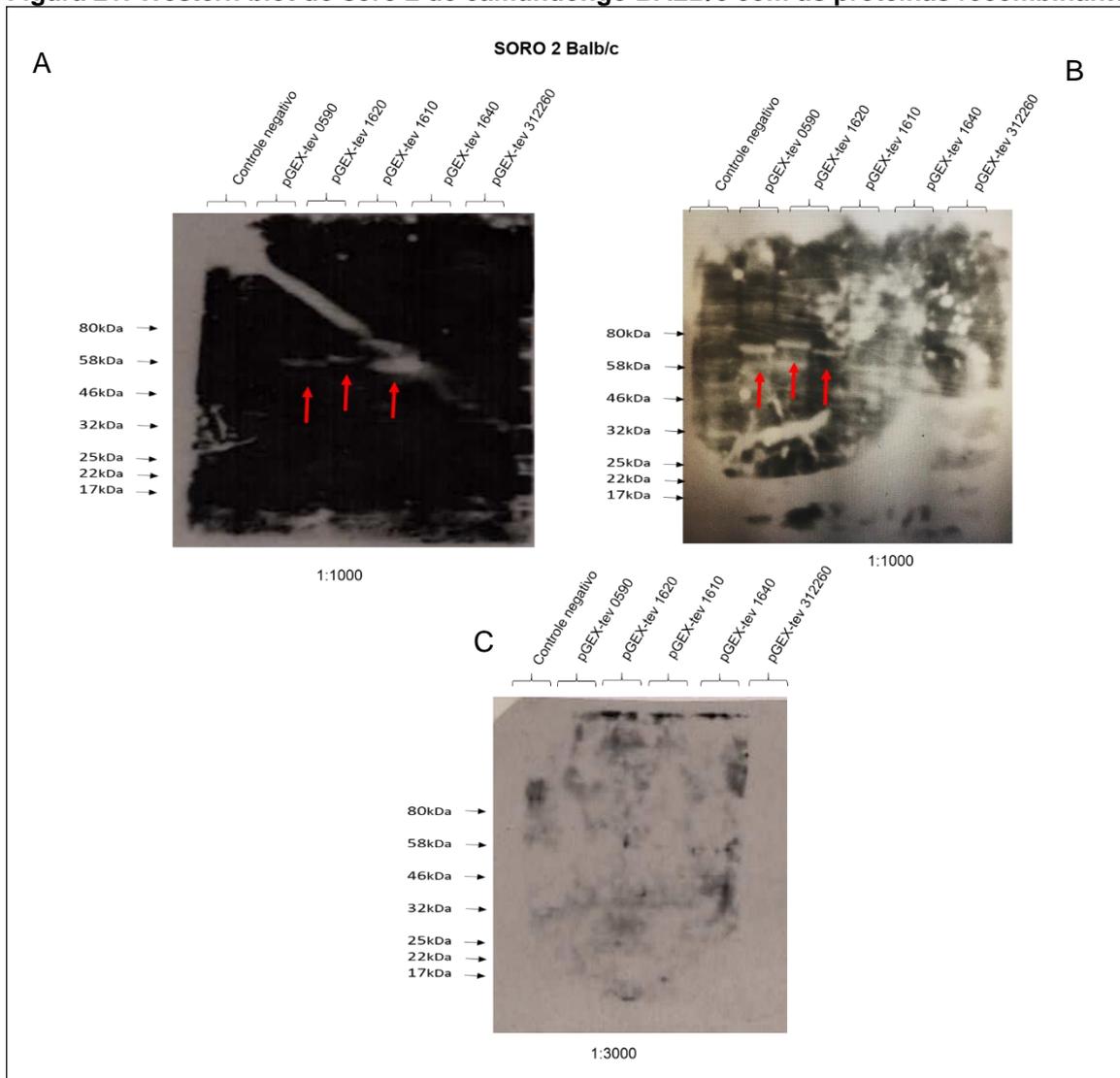
**Figura 20: Western blot do soro controle de camundongo BALB/c com as proteínas recombinantes**



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Análise do soro controle de camundongo BALB/c por *Western blot*, com extratos bacterianos das proteínas induzidas. Concentração do primeiro anticorpo 1: 1000, durante a noite. Controle negativo dos extratos: indução do plasmídeo fechado (pGEX-tev).

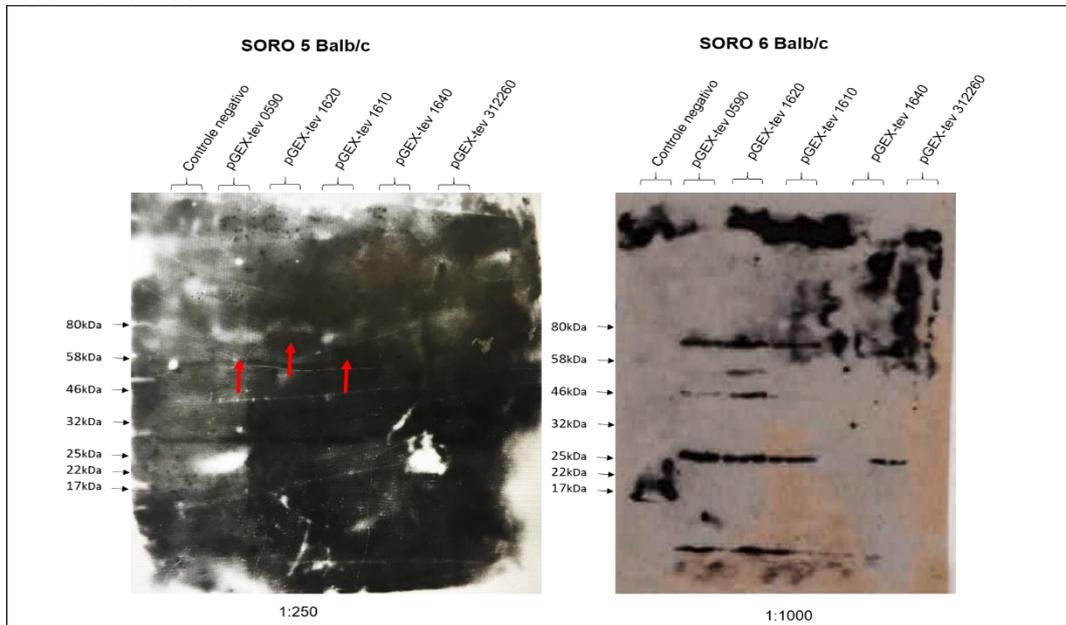
Figura 21: Western blot do soro 2 de camundongo BALB/c com as proteínas recombinantes.



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Análise do soro 2 de camundongo BALB/c por *Western blot*, com extratos bacterianos das proteínas induzidas. Na imagem A, a concentração do primeiro anticorpo foi de 1:1000, durante a noite, na imagem B foi realizada uma pré-incubação em outra membrana, sendo repassado o mesmo leite contendo o soro para a membrana de interesse incubada durante a noite na concentração do primeiro anticorpo de 1:1000. E na imagem C, a concentração foi diluída para 1:3000 durante a noite. Controle negativo: extrato da indução do plasmídeo fechado (pGEX-tev).

**Figura 22: Western blot dos soros 5 e 6 de camundongo BALB/c com as proteínas recombinantes.**



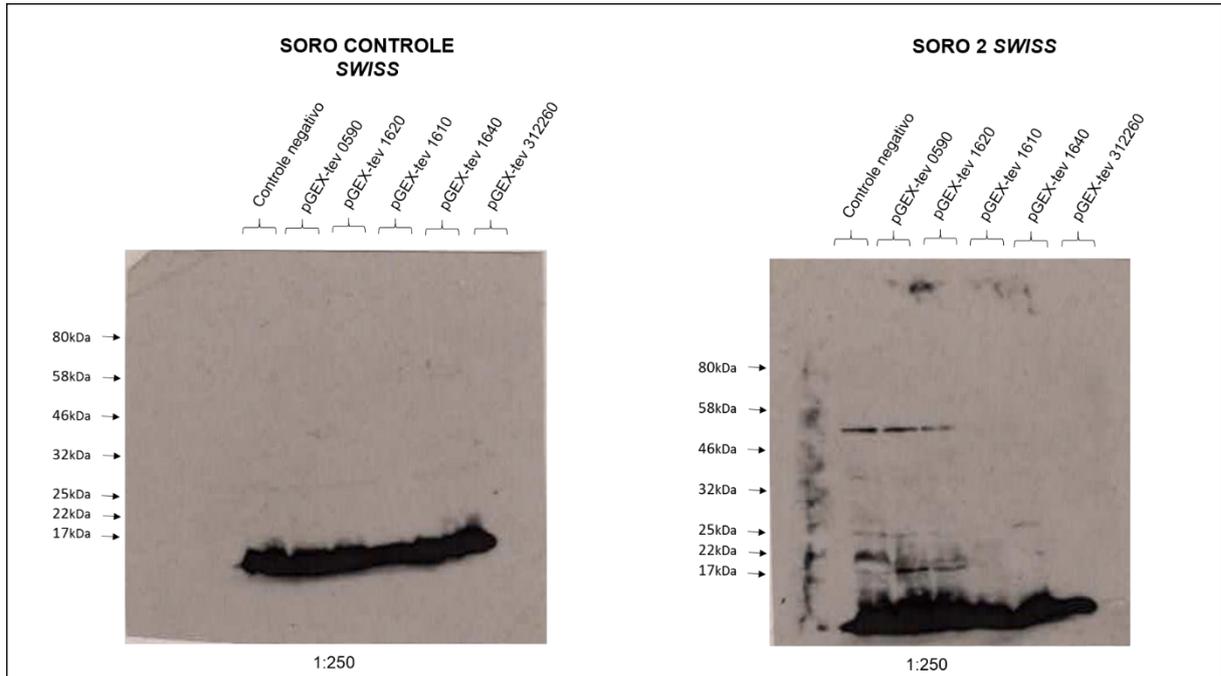
**Fonte:** A autora.

**Nota:** Análise dos soros 5 e 6 de camundongo BALB/c por *Western blot*, com extratos bacterianos das proteínas induzidas, com concentração do primeiro anticorpo de 1:250 e 1:1000, respectivamente. Com presença de contrabandas no soro 5, indicados com setas vermelhas e presença de bandas inespecíficas no soro 6. Controle negativo: extrato da indução do plasmídeo fechado (pGEX-tev).

### 6.5.3 Reconhecimento dos soros de camundongos SUIÇO com extratos bacterianos das proteínas GP63

Dando continuidade os soros de camundongos SUIÇO, sendo eles o primeiro anticorpo, foram avaliados com os extratos bacterianos das proteínas GP63. O soro controle de SUIÇO não reconheceu as proteínas recombinantes, como o esperado (Figura demonstrativa 23). Para os demais, nota-se também a ausência de reconhecimento das proteínas nos tamanhos preditos e com presença de bandas inespecíficas provenientes da bactéria *E.coli*. Na tentativa de contornar esse resultado utilizou-se diferentes estratégias, como: concentrações do soro, tempo de bloqueio, mudança no tempo de incubação do primeiro anticorpo e pré-bloqueio em outra membrana na tentativa de diminuir possíveis reações inespecíficas, porém os soros não reconheceram as proteínas.

**Figura 23: Western blot do soro controle e soro 2 de camundongo SUIÇO com as proteínas recombinantes.**



**Fonte:** A autora.

**Nota:** Análise do soro controle e soro 2 de camundongo SUIÇO por *Western blot*, com extratos bacterianos das proteínas induzidas. Ambos com concentração do primeiro anticorpo 1:250, durante a noite. Controle negativo dos extratos: indução do plasmídeo fechado (pGEX-tev).

## 7 DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que proteases de protozoários parasitos cumprem papéis na infecção, sobrevivência e patogenicidade (ROSENTHAL, 1999; SAJID; MCKERROW, 2002). Estas enzimas têm sido descritas em várias espécies de *Leishmania* (OLIVEIRA *et al.*, 2004; COOMBS, 1982; PUPKIS; COOMBS, 1984) e estão envolvidas no estabelecimento do parasitismo intracelular, assim como na inibição da resposta imune do hospedeiro (CHANG, 1986; RUSSELL; WILHELM, 1986; LIU; CHANG, 1992; MOTTRAM *et al.*, 1996; ALEXANDER *et al.*, 1998). As atividades de metaloproteases de espécies de *Leishmania* (*Leishmania*) têm sido amplamente avaliadas na literatura, contudo, a descrição das proteases nas espécies do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) ainda é escassa (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A principal glicoproteína de superfície de *Leishmania*, a GP63, (BOUVIER *et al.*, 1985; ETGES *et al.*, 1986), é uma metaloprotease dependente de zinco, expressa tanto por promastigotas quanto por amastigotas. A expressão desta enzima acompanha o ciclo de desenvolvimento do parasita, chegando a ser o principal componente da superfície celular de promastigotas metacíclicas (MEDINA-ACOSTA *et al.*, 1989, 1993; BOUVIER *et al.*, 1995). Já em amastigotas, a GP63 está localizada em grandes vacúolos (BAHR *et al.*, 1993; LLG *et al.*, 1993). Estudos têm demonstrado que a GP63 está envolvida na evasão do parasita aos fatores da resposta humoral, fazendo com que promastigotas sejam resistentes à citólise mediada por complemento (BRITTINGHAM *et al.*, 1995), além de estar envolvida na união das promastigotas aos macrófagos via endocitose mediada por receptor (CHANG, 1986; RUSSELL; WILHELM, 1986) e promover proteção contra degradação parasitária dentro do fagolisossomo do macrófago (CHAUDHURI *et al.*, 1989).

A LTA é difícil de tratar e se apresenta com manifestações graves, muitas vezes desfigurantes, e casos extremos podem até resultar na morte do paciente. O largo espectro das desordens causadas por estes protozoários sugere uma variabilidade intra-específica que pode afetar manifestações da doença (SCHRIEFER *et al.*, 2004). Neste presente estudo, buscamos avaliar o potencial imunogênico gerado em camundongos através da imunização de extrato total de *L. braziliensis* e o seu comportamento diante de diferentes parálogos de GP63, determinando se essas diferenças são significativas de acordo com o potencial de imunogenicidade de *Leishmania* visto que essa proteína é um importante fator de virulência.

O fato apresentado no nosso estudo, onde a GP63, pode ter apresentado uma baixa imunogenicidade visualizada nos ensaios de *Western blot*, apesar da sua abundância na superfície do parasita corrobora com o estudo de Silva-Almeida *et al.* (2012), que as proteínas GP63 não são essenciais para a infecciosidade do parasita. No estudo de Joshi *et al.* (1998) foi realizada a supressão de seis genes que codificam a GP63 ancorada a GPI em *Leishmania infantum* e o resultado foi que as promastigotas não tiveram diferença de crescimento ou desenvolvimento e nem diferença na sua capacidade de infectar macrófagos.

O genoma de *L. braziliensis* possui 5 e 33 genes, no cromossomo 10, bem como 3 e 6 no cromossomo 31 (PEACOCK *et al.*, 2007), que foi demonstrado que a expressão dos genes de GP63 podem variar de acordo com a fase de crescimento do parasita e do ciclo de vida da *Leishmania*. Por exemplo, em *L. mexicana* (10 cópias) os genes são mais expressos na fase promastigota (MEDINA-ACOSTA *et al.*, 1989) e em *L. major* o gene 6 é expresso tanto na fase promastigota quanto na fase amastigota. Devido a isto sugerimos a possibilidade que as proteínas que foram expressas durante a imunização não serem as mesmas proteínas recombinantes que produzimos, devido a diferente fase do ciclo de vida ou crescimento do parasita, visto que nossos soros não reconheceram as proteínas recombinantes.

A escolha dos 5 genes para prosseguimento do estudo, pode ter sido um quantitativo baixo e fator limitante, quando comparado ao número de cópias de genes que podem contribuir para alterações na expressão genética em resposta a condições ambientais no hospedeiro (ROGERS, 2011). Ou ainda relacionado a quantidade de genes de GP63 que a *L. braziliensis* possui e sua expressão diferenciada pode ser um indicativo de um dos seus mecanismos de escape ao sistema imune do hospedeiro (ISNARD *et al.*, 2012). Então ao expressar variadas GP63, o parasita dificulta o reconhecimento através dos linfócitos (B e T) e sua consequente produção de anticorpos, inibindo o reconhecimento das proteínas recombinantes que produzimos. Isso pode ser semelhante ao fenômeno observado em *Trypanosoma brucei*, que possui uma grande quantidade de genes codificantes de uma outra proteína de virulência, a VSG, uma proteína que pode ser modificada constantemente pelo processo de variação antigênica. Nesse caso, o *T. brucei* possui mecanismos intrínsecos que garantem que apenas um gene codificante de VSG seja transcrito, expressando novas variantes de antígeno ao longo do tempo e evitando as respostas imunitárias mediadas pelas células B e T. (NAMANGALA, 2011).

Estudos demonstram um potencial imunomodulador dos extratos de *Leishmania* (AFONSO; SCOTT, 1993), como foi esclarecido nas análises realizadas com os soros e os extratos totais de *L. braziliensis*. É interessante mencionar que os modelos murinos podem responder de forma diferente a uma mesma espécie de *Leishmania*, onde neste estudo tanto os camundongos de linhagem BALB/c e SUIÇO apresentaram respostas diversas tanto frente aos extratos totais de *L. braziliensis*, como frente às proteínas recombinantes. Sendo que em relação aos camundongos BALB/c era esperado um reconhecimento homogêneo, considerando que são isogênicos (ROGERS, 2011).

O fato dos soros terem sido policlonais contribuiu para inespecificidade das bandas (tanto de BALB/c como de SUIÇO), apresentadas nos ensaios de *Western blot*. Este resultado pode estar evidenciando um efeito biológico do extrato na ativação de linfócitos B policlonais comprovado através de dados da literatura que relacionam infecção por *L. chagasi* com a ativação policlonal inespecífica de linfócitos B, devido a possibilidade de epítomos diferentes (DEAK et al., 2010).

Há duas hipóteses possíveis para a ação imunossupressora dos genes de GP63 no extrato particulado: primeiro, os componentes responsáveis pelo aumento da produção de anticorpos específicos em leishmanioses podem estar presentes na forma amastigota do parasito e não na promastigota, que é a forma do parasito no inseto vetor. Na literatura, a utilização de estratégia do proteoma comparativo por intermédio de gel bidimensional (2D-SDS PAGE) mostra diferenças nas massas moleculares e nos perfis de bandas obtidas entre extratos de formas amastigotas e promastigotas da mesma espécie de *Leishmania* (COELHO et al., 2012). No entanto, sabe-se que estudos de formas amastigotas para o desenvolvimento de vacinas ou imunoterápicos é mais demorado e de baixo rendimento devido à sua obtenção a partir de lesões ou por cultivo *in vitro* em linhagens de macrófagos. Em conjunto com essa limitação, há o problema da contaminação do extrato de amastigotas com componentes do hospedeiro. Por isso inclusive estudos sobre a identificação de alvos de drogas em formas amastigotas de *Leishmania spp* são limitados (KUMARI et al., 2012), porém o fato de não ter avaliado a expressão dos variados genes em amastigotas pode ser considerado uma limitação do estudo. Segundo, componentes imunostimuladores presentes no parasito podem ter sua ação neutralizada por componentes imunomoduladores, já que se trata de um extrato total. Em estudos com isolados clínicos de *Leishmania donovani*, feitos por intermédio de técnicas

metabolômicas de cromatografia líquida associada à espectrometria de massa, observa-se que a maior classe de metabólitos identificada foi a dos lipídios (ZHENG *et al.*, 2010). Estudos feitos *in vitro* demonstram que lipofosfoglicano e glicoinositolfosfolipídeos de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* têm função inibidora sobre a resposta imunológica. (ASSIS *et al.*, 2012). A composição lipídica presente neste extrato também poderia interferir de outra maneira, pois se sabe que a interação entre lipídeos e proteínas pode modificar proteínas estrutural e funcionalmente (COSKUN; SIMONS, 2011).

Estudos adicionais aos resultados obtidos aqui, devem ser direcionados para a necessidade de usar diferentes proteínas recombinantes purificadas durante a imunização e uma análise com diferentes formas evolutivas, aumentando a especificidade e eficiência do estudo. Após a análise dos resultados constata-se que a GP63 é uma proteína de difícil expressão e que a busca pela sua especificidade é laboriosa. Este trabalho enriquece a literatura sobre o assunto, e gera a possibilidade de que, na continuidade das pesquisas aqui relatadas, outras abordagens sejam testadas para demonstrar a expressão e reconhecimento dos diversos genes de GP63.

## 8 CONCLUSÃO

- a) Proteínas recombinantes GP63 são de difícil expressão;
- b) Os soros policlonais imunizados com extrato total do parasito apresentaram um alto grau de inespecificidade nos ensaios de *Western blot* contra proteínas recombinantes de GP63;
- c) Não foi possível demonstrar a variabilidade de reconhecimento de diferentes parálogos de GP63 através da imunização de extrato total de *L. braziliensis* em camundongos;

## REFERÊNCIAS

- ABASCAL, F.; ZARDOYA, R.; POSADA, D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 9, p. 2104-2105, 2005.
- ABU-DAYYEH, I. *et al.* *Leishmania*-induced IRAK-1 inactivation is mediated by SHP-1 interacting with an evolutionarily conserved KTIM motif. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, 2008. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000305>>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonenses*. **Infect. Immun.**, Washigton, v. 61, p. 2952- 2959, 1993.
- ALEXANDER, B; YOUNG, D. G. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 3, p. 397- 403, 1992.
- ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. *Leishmania Mexicana* cysteine proteinase –deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **J. Immunol**, 1998. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/161/12/6794.long>>. Acesso em: 22 nov. 2016.
- ALIAGA, L. *et al.* Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. **Medicine (Baltimore)**, Hagerstown, v. 82, n. 3, p. 147-158, 2003.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, London, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVAR, J. *et al.* Case study for a vaccine against leishmaniasis. **Vaccine**, Guildford, v. 31, p. 244 – 249, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X12017318>>. Acesso em: 12 dez. 2016.
- ALVAR, J. *et al.* The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washigton, v. 21, n. 2, p. 334- 359, 2008.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE.**, San Francisco, n. 7, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671>>. Acesso em: 12 dez. 2016.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends. Parasitol.**, Oxford, v. 22, p. 552 – 557, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004> >. Acesso em: 10 out. 2016.
- ALVAREZ-VALIN, F.; TORT, J. F.; BERNARDI, G. Nonrandom spatial distribution of synonymous substitutions in the GP63 gene from *Leishmania*. **Genetics**, Califórnia n. 155, p. 1683–1692, 2000.

AMATO, V. S. *et al.* Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Acta Trop.**, Basel, v. 105, n. 1, p. 1- 9, 2008.

ANTONELLI, L. R.V. *et al.* Activated inflammatory T cells correlate with lesion size human cutaneous leishmaniasis. **Imunoll. Lett.**, Amsterdam, v. 101, n. 2, p. 226-230, 2005.

ASSIS, R. R. *et al.* Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **Plos. Negl. Dis.**, San Francisco, v. 6, p. 1543, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001543>>. Acesso em: 23 set. 2016.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as model zoonoses. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, London, v. 91, n. 7, p. 693-701, 1997.

AWASTHI, A. *et al.* Immune response to *Leishmania* infection. **Indian. J. Med. Res.**, New Delhi, v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.

AZULAY, R. D.; AZULAY JUNIOR, D. R. Imune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.**, Los Angeles, n. 34, p. 303-307, 1995.

BACELLAR, O. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect. Immun.**, Washington, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.

BLANCHETTE, J. *et al.* *Leishmania* induced increases inactivation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, n. 29, p. 3737–3744, 1999.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Leishmaniose tegumentar americana*. **Rev. Bras. Epidemiol.**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int. J. Parasitol.**, Liverpool, v. 37, n. 3, p. 1097–1106, 2007.

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr. Mol. Med.**, Omaha, v. 4, n. 6, p. 601-609, 2004.

BRASIL. Leishmanioses. **Drogas para Doenças Negligenciadas**. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/leishmanioses.html>>. Acesso em: 23 nov. 2016.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 2010. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia\\_Vig\\_Epid\\_novo2.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Guia_Vig_Epid_novo2.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2016.

BRASIL. Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**. Brasília, 2011. Disponível em: <[http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/1577/1/td\\_1607.pdf](http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/1577/1/td_1607.pdf)>. Acesso em: 08 jan. 2017.

BRASIL. Saúde de A a Z. **Ministério da Saúde**. Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/peste/contatos-da-area/954-saude-de-a-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11324-descricao-da-doenca>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Infect. Dis. Soc. of America**, Chicago, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BERMAN, J. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Curr. Opi. in Infect. Dis.**, London, v. 16, n. 5, p. 397-401, 2003.

BERN, C.; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000313>>. Acesso em: 19 out. 2017.

BERN, C. *et al.* Risk factors for kala-azar in Bangladesh. **Emerg. Infect. Dis.** Atlanta, n. 5, p. 655-662, 2005.

BESTEIRO, S. *et al.* Protein turnover and differentiation in Leishmania. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v. 37, p. 1063-1075, 2007.

BOTELHO, A. C.; MAYRINK, W.; OLIVEIRA, R. C. Alterations in phenotypic profiles of peripheral blood cells from patients with human American cutaneous leishmaniasis following treatment with an antimonial drug and a vaccine. **Acta Trop.**, Basel, v.112, n.2, p. 143-148, 2009.

BOUVIER, J.; ETGES, R. J.; BORDIER, C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of Leishmania promastigotas. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 260, n. 29, p. 15504-15509, 1985.

BOUVIER, J. *et al.* Characterization of the promastigote surface protease of Leishmania as a membrane-bound zinc endopeptidase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 37, n. 2, p. 235-245, 1989.

BRITTINGHAM, A. *et al.* Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 155, n. 6, p. 3102-3111, 1995.

- BRITTINGHAM, A. *et al.* Interaction of Leishmania gp63 with cellular receptors for fibronectin. **Infect. Immun.**, Bethesda, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96767/>>. Acesso em: 9 jan. 2017.
- CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microb. Infect.**, Paris, n. 5, p. 1231-1240, 2003.
- CAPELLA-GUTIÉRREZ, S.; SILLA-MARTÍNEZ, J. M.; GABALDÓN, T. TrimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 15, p. 1972-1973, 2009.
- CARVALHO, E. M. *et al.* Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 53, n. 3, p.273- 277, 1995.
- CARVALHO, E. M. *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta. Trop.**, Basel, v. 56, n. 4, p. 315-325, 1994.
- CASTELLANO, L. R. C. Resposta imune anti-Leishmania e mecanismos de evasão Anti-Leishmania immune response and evasion mechanisms. **Vit. Acad. bioméd. Digit.**, Caracas, n. 25, 2005. Disponível em: <<http://www.bioline.org.br/pdf?va05017>>. Acesso em: 12 jan. 2017.
- CDC. Parasites – Leishmaniasis. **Centers for Disease Control and Prevention.** Atlanta, 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>>. Acesso em: 21 jan. 2017.
- CDC. Parasites – Leishmaniasis. **Centers for Disease Control and Prevention.** Atlanta, 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 21 jan. 2017.
- CHAKRABARTY, R. *et al.* Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of Leishmania donovani into macrophages: a possible role of virulence molecules (GP63 and LPG). **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 82, n. 4, p. 632- 635, 1996.
- CHANG, C. S., CHANG, K. P. Monoclonal antibody affinity purification of a Leishmania membrane glycoprotein and its inhibition of leishmania- macrophage binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 83, n. 1, p. 100 - 104, 1986.
- CHANG, K. P.; CHAUDHURI, G.; FONG, D. Molecular determinants of Leishmania virulence. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 44, p. 499-529, 1990.
- CHAUDHURI, G. *et al.* Surface acid proteinase (GP63) of *Leishmania mexicana*. A metallo enzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 264, 7483–7489, 1988.
- CHAUDHURI, G.; CHAUDHURI, M.; CHANG, K. P. Surfaceacid proteinase (gp63) of Leishmania Mexicana. A metalloenzyme capable of protectinliposome-encapsulated

proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 264, p. 7483-7488, 1989.

CHEN, D. Q. *et al.* Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotas and their infection of macrophages in vitro. **Infect. Immun.**, Bethesda, v. 68, n. 1, p. 80 – 86, 2000.

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an emerging infection. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, Cambridge, v.6, n. 3, p. 175- 182 2001.

COELHO, V. T. S. *et al.* Identification of proteins in promastigote and amastigote-like *Leishmania* using an immunoproteomic approach. **Plos Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 6, p. 1430, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001430>>. Acesso em: 5 fev. 2017.

COLLIN, S. *et al.* Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, n.38, p. 612–619, 2004.

COOMBS, G. H. Proteinases of *Leishmania Mexicana* and other flagellate protozoa. **Parasitology**, London, v. 84, n. 1, p. 149 - 155, 1982.

COSKUN, U.; SIMONS, K. Cell membranes: the lipid perspective. **Structure**, London, v. 19, p. 1543 – 1548, 2011.

CUERVO, P. *et al.* Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. **Acta Trop.**, v. 106, n. 3, p.143 -148, 2008.

CUPOLILLO, E. *et al.* A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitol Today**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 142-144, 2000.

CUPOLILLO, E. *et al.* Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **J. ClinMicrobiol.**, Washigton, v. 41, n. 7, p. 3126-3132, 2003.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Ther.**, Copenhagen, v. 22, n. 6, p. 491- 502, 2009.

DEAK, E. *et al.* Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 40, p. 1355 - 1368, 2010.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **Wor. Hea. Stat. Q.**, Genève, v. 4, p. 267-275, 1992.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nat. Rev. Microbiol.**, London, 2004. Disponível em: <[10.1038/nrmicro988](http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro988)>. Acesso em: 20 nov. 2016.

DESJEUX, P. Prevention of *Leishmania donovani* infection: **BMJ**. England, v. 341, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/bmj.c6751>>. Acesso em: 12 jan 2017.

ELLIS, M. *et al.* Processing and trafficking of *Leishmania mexicana* GP63: analysis using GPI8 mutants deficient in glycosylphosphatidyl inositol protein anchoring. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 27, p. 27968–27974, 2002.

ETGES, R.; BOUVIER, J.; BORDIER, C. The major surface protein of *Leishmania promastigotas* is a protease. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 261, n. 20, p. 9098-9101, 1986.

ETGES, R.J. *et al.* Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam v. 14, n. 2, p. 141-149, 1985.

FIROOZ, A. *et al.* Imiquimod in combination with meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis: a randomized assessor-blind controlled trial. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.142, n. 12, p. 1575- 1579, 2006.

FONG, D., CHANG, K. P. Surface antigenic change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: Identification by monoclonal antibodies. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, Washigton, v. 79, n. 23, p. 7366-7370, 1982.

GARCIA, M. R. *et al.* Epitope cleavage by *Leishmania* endopeptidase(s) limits the efficiency of the exogenous pathway of major histocompatibility complex class I-associated antigen presentation. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, 1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.1830270430/epdf>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

GATHANY, J. Parasites Leishmaniasis. **Centers for disease Control and Prevention**. Atlanta, 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>>. Acesso em: 02 nov. 2016.

GOMEZ, C. *et al.* Regulation of gene expression in protozoa parasites. **J. Biomed. Biotechnol.**, Akaron, p. 726045, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2010/726045>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

GOMEZ, M. A. *et al.* *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. **Sci. Signal.**, Washigton, n. 2, p. 58, 2009.

GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washigton, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. **Parasite Immunol.**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 367 – 376, 2014.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acid. Symp. Ser.**, Oxford, n. 45, p. 95-98, 1999.

HOTEZ, P.J.; FERRIS, M.T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, Guildeford, v. 24, p. 5787-5799, 2006.

HOTEZ, P.J. *et al.* Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. **Clin. Infect. dis.**, Chicago, v. 38, p. 871-78, 2004.

HOTEZ, P. J. Stigma: the stealth weapon of the NTD. **PLoS negl. Trop. Dis.**, San Francisco, n. 2, p. 230, 2008.

ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metallo protease GP63 on macrophage signaling. **Front. Cell. and Infect. Microb.**, Lausanne, n. 2, p.72, 2012.

IVENS, A. C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, New York, v. 309, p. 436-442, 2005.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and leishmania parasites: friends or foes? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 22, n. 9, p. 439-445, 2006.

KASSI, M. *et al.* Marring leishmaniasis: the stigmatization and the impact of cutaneous leishmaniasis in Pakistan and Afghanistan. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, 2008. Disponível em: < 10.1371/journal.pntd.0000259>. Acesso em: 16 jan. 2017.

KATO, H. *et al.* Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. **Int. J. Environ. Res. Public. Health**, Basel, n. 7, p. 814-826, 2010.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Rev. Nat. Microbiol.**, London, n. 9, p. 604-615, 2011.

KHALIL, E. A. *et al.* Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. **Lancet**, London, v. 356, n. 9241, p. 1565-1569, 2000.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. **Curr Med Chem.**, Schiphol, v. 19, n. 10, p. 1443-1474, 2012.

KUMARI, S. *et al.* *Leishmania donovani*: immunostimulatory cellular responses of membrane and soluble protein fractions of splenic amastigotes in cured patient and hamsters. **Plos One**, San Francisco, v. 7, p. 30746, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22292030>>. Acesso: 20 dez 2016.

- KZHYSHKOWSKA, J. *et al.* Alternatively activated macrophages regulate extracellular levels of the hormone placental lactogen via receptor-mediated uptake and transcytosis. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 180, n. 5, p. 3028-3037, 2008.
- JANNIN, *et al.* Leishmaniasis impact and treatment. **Clin Microbiol Infect.**, Paris, n. 17, p. 1471–1477, 2011.
- JOSHI, P. B. *et al.* Targeted gene deletion of *Leishmania major* genes encoding developmental stage-specific leishmanolysin (GP63). **Mol. Microbiol.**, Oxford, n. 27, p. 519–530, 1998.
- LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, p. 421-424, 1987.
- LIEKE, T. *et al.* *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. **Clin. Exp. Immuno.**, Oxford, v. 153, n. 2, p. 221-230, 2008.
- LIU, X.; CHANG, K. P. Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (gp63) – deficient *Leishmania* increases their binding to macrophages. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 89, p. 4991-4995, 1992.
- MACHADO, P. R. *et al.* Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS Neglect. Trop. Dis.**, San Francisco, 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000912>>. Acesso em: 23 jan. 2017.
- MACDONALD, M. H.; MORRISON, C. J.; MCMASTER, W.R. Analysis of the active site and activation mechanism of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, 1995. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00155-5](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00155-5)>. Acesso em: 06 dez. 2016.
- 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. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, p. 8802–8809, 2002.
- MCGWIRE, B. S. *et al.* Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surfacemetalloprotease gp63. **Infect. Immun.**, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC145380/>>. Acesso em: 11 jan. 2017.
- MCMASTER, W. R. *et al.* Mutational and functional analysis of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases. **Parasitology**, London, v. 108, p. S29-S36, 1994.

MEDINA-ACOSTA, E. *et al.* The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. **Mol. Bioch. Parasitol.**, Amsterdam, v. 37, n. 2, p. 263- 273, 1989.

MOMENI, A. Z. *et al.* A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. **Vaccine**, Guildford, v. 17, n. 5, p. 466- 472, 1999.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **J. Immunol.**, Baltimore, 1985. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/135/4/2785>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

MOTTRAM, J.C. *et al.* Evidence from disruption of the *Imepb* gene array of *Leishmania Mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 93, p. 6008-6013, 1996.

MUKHERJEE, S.; GHOSH, C.; BASU, M. K. *Leishmania donovani*: role of microviscosity of macrophage membrane in the process of parasite attachment and internalization. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 66, n. 1, p. 18-26, 1988.

MURRAY, H. W. *et al.* Advances in leishmaniasis. **PubMed.**, London, n. 366, p. 1561-15677, 2005.

NAMANGALA, B. How the African trypanosomes evade host immune killing. **Parasit. Immunol.**, Oxford, v., 33, p. 430–437, 2011.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. Considerações sobre a Dispersão da Leishmaniose Tegumentar Americana nas Américas. **Rev. Percorso**, Maringá, v. 1, n. 1, p. 85-103, 2009.

NEVES, D. **Parasitology Human**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NOAZIN, S. *et al.* Efficacy of killed whole-parasite vaccines in the prevention of leishmaniasis: a meta-analysis. **Vaccine**, Guildford, n. 27, v. 35, p. 4747-4753, 2009.

PEACOCK, C. S. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat. Genet.**, New York, n. 39, p. 839–847, 2007.

PUPKIS, M. F., COOMBS, G. H. Purification and characterization of proteolytic enzymes of *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes and promastigotas. **J. Gen. Microbiol.**, London, 1984. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-130-9-2375>>. Acesso em: 17 set. 2016.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, London, v. 136, n. 14, p. 1915-1934, 2009.

OLIVEIRA, C. C. *et al.*; Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface. **Acta Trop.**, Basel, v. 90, n. 2, p. 155- 162, 2004.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis**. Geneva, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish.html>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis**. Geneva, 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of leishmaniasis**. Report of a WHO Expert Committee. Geneva, 1990. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf)>. Acesso em: 20 dez. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis: the vector**. Geneva, 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 19 dez. 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Statistics**. Geneva, 1993. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/117823/1/16\\_1\\_2010\\_0089\\_0093.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/117823/1/16_1_2010_0089_0093.pdf)>. Acesso em: 12 jan. 2016.

OUMEISH, O. Y. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. **Clin. Dermatol.** Philadelphia, v. 17, n. 3, p. 249-254, 1999.

REY, Luís. Leishmaníase Visceral. Bases da Parasitologia Médica. 2ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008. cap. 6, p. 63-70.

ROGERS, M. B. *et al.* Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Res.**, New York, v. 21, n. 12, p. 2129–2142, 2011.

ROSENTHAL, P. J. Proteases of protozoan parasites. **Adv. Parasitol.**, London, n. 43, p. 105-109, 1999.

RUSSEL, D. G.; WILHELM, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) os *Leishmania* promastigotas in attachment to macrophages. **J. Immunol**, Baltimore, 1986. 136: Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/136/7/2613.full-text.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2016.

RUSSELL, D. G.; TALAMAS-ROHANA, P.; ZELECHOWSKI, J. Antibodies raised against synthetic peptides from the Arg-Gly-Asp-containing region of the *Leishmania* surface protein gp63 cross-react with human C3 and interfere with gp63-mediated binding to macrophages. **Infect. Immun.**, Washington, v. 57, n. 2, p. 630-632, 1989.

SANJAY, K. R. et al. Post-Kala-azar dermal leishmaniasis: A histopathological study. **Indian. J. Dermatol. Venereol. Leprol.**, New Dehli, v. 71, n. 4, p. 250 – 253, 2005.

SAJID, M.; MCKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002.

SCHMIDT, G. D.; ROBERTS, L.S. **Foundations of Parasitology**. 8. ed. St. Louis McGraw-Hill, 2009.

SARAVIA, N.G. et al. Epidemiologic, Genetic, and Clinical Association among Phenotypically Distinct Populations of Leishmania (Viannia) in Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 59, n. 1, p. 86–94, 1998.

SCHRIEFER, A. et al. Multiclonal Leishmania braziliensis Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemic American Tegumentary Leishmaniasis (ATL). **Infect. Immun**, Washigton, v. 72, n. 1, p. 508-514, 2004.

SHAW, P. J. Characterization of human malaria parasite Plasmodium falciparum eIF4E homologue and mRNA 5' cap status. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 155, n. 2, p. 146-155, 1998.

SHARIFI, I. et al. Randomised vaccine trial of single dose of killed Leishmania major plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. **Lancet**, London, v. 351, n. 9115, p. 1540- 1543, 1998.

SILVA-ALMEIDA, M. et al. Proteinases as virulence factors in Leishmania spp. infection in mammals. **Parasite vectors**. London, v. 5, p. 1756 – 3305, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3436776>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annu. Rev. Microbiol.**, Paulo Alto, v. 41, p. 363-382, 1987.

SOTO, J. et al. Efficacy of permethrin-impregnated uniforms in the prevention of cutaneous leishmaniasis in Iranian soldiers. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 21, n. 3, p. 509 – 602, 1995.

STEINKRAUS, H. B. et al. Sequence heterogeneity and polymorphic gene arrangements of the Leishmania guyanensis gp63 genes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 173-185, 1993.

STOCKDALE, L.; NEWTON, R.A. Review of preventative methods against human leishmaniasis infection. **PLoS Negl Trop Dis.**, San Francisco, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3699930/>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

SUTHERST, R. W. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. **Rev. Clin. Microbiol.**, Washigton, n. 17, p. 136–153, 2004.

VIANA, A. G. *et al.* Histopathological and immunohistochemical aspects of American Cutaneous leishmaniasis before and after different treatments. **An. Bras. Dermatol**, Rio de Janeiro, n. 88, p. 32-40, 2013.

VICTOIR, K.; DUJARDIN, J. C. How to succeed in parasitic life without sex? Asking Leishmania. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 81-85, 2002.

WEISE, F. *et al.* Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. **J. Cell. Sci.**, London, n. 113, p. 4587–4603, 2000.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Mol. Biochem. Parasitol.** Amsterdam, n. 132, p. 1-16, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14563532>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

ZIJLSTRA, E. E.; EL-HASSAN, A. M.; ISMAEL, A. Endemic kala-azar in eastern Sudan:post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.52, n.4, p. 299-305, 1995.

ZHENG, L. *et al.* Profiling of lipids in *Leishmania donovani* using hydrophilic interaction chromatography in combination with Fourier transform mass spectrometry. **Rapid. Commun. Mass Spectrom.**, London, v. 24, p. 2074- 2082, 2010.

**APÊNDICE A – TAMPÃO DE LISE**

20mM Hepes KOH pH 7,4 ( preparação no fluxo)

$$1000\text{mM} \cdot V_i = 20\text{mM} \cdot 100$$

$$V_i = 2\text{mL}$$

75mM Acetato de potássio

$$75 \cdot 10^{-3} = m / 98,17 \cdot 0,10$$

$$m = 0,74\text{g}$$

4mM Acetato de Magnésio

$$4 \cdot 10^{-3} = m / 217,4 \cdot 0,10$$

$$m = 0,086\text{g}$$

2mM DTT

$$1000 \cdot V_i = 2 \cdot 100$$

$$V_i = 200 \text{ uL}$$

## ANEXO A – SOLUÇÕES PARA O WESTERN BLOT

### PBS 10X PH 7,4

NaCl.....: 80g  
 KCl.....: 2g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 7H<sub>2</sub>O.....:11g fosfato de sódio dibasico  
 Ou  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anidro.....:6,1g  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....:2g fosfato de potássio dibasico

*H<sub>2</sub>O Asp — 1000 ml.  
 de 0,9%*

#### Modo de preparo:

Dissolver no agitador e ajustar o Ph com HCl, armazenar em frasco âmbar na geladeira temperatura 4°C.

### TBS 10X + TWEEN PH7,5

NaCl.....: 87,66g  
 TRIS.....: 60,55g  
 TWEEN 20 .....: 5mL

*H<sub>2</sub>O Asp — 1000 ml.  
 de 0,9%*

#### Modo de preparo:

Dissolver no agitador e ajustar o Ph com HCl, armazenar em frasco âmbar na geladeira temperatura 4°C.

## ANEXO B – TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA

### TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA PARA WEST BLOT

Glicina.....: 14,41g  
TRIS Base.....: 3,03g  
Metanol.....: 200mL  
Qsp água destilada.: 1000**mL**

#### Modo de preparo:

Dissolver no agitador e armazenar na geladeira 4°C.  
Após dissolvido acrescenta 100mL de SDS (10%) e completa com água para dois litros da solução, armazenar em temperatura ambiente..

## ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

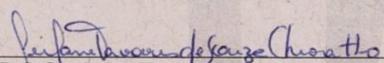
#### Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: “ESTUDO DOS MÚLTIPLOS PARÁLOGOS DE GP63 DE *leishmania braziliensis* E SEU PAPEL NA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO” protocolado sob nº 93/2015 pelo (a) pesquisador (a) Dr **Oswaldo Pompílio de Melo Neto** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 15/06/2016. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até junho de 2020.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo heterogênico Swiss fêmea	60
Camundongo isogênico BALB/c fêmea	60
Coelho Nova Zelândia Macho e/ou Fêmea	20
<b>TOTAL</b>	<b>140</b>

We certify that project “ESTUDO DOS MÚLTIPLOS PARÁLOGOS DE GP63 DE LEISHMANIA BRAZILIENSIS E SEU PAPEL NA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO” (CEUA Protocol nº 93/2015) coordinated by **OSVALDO POMPÍLIO DE MELO NETO** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on June, 15, 2016. In present version this project is licensed and valid until June 2020.

Recife (PE, BRAZIL) May, 20, 2016



Dr<sup>a</sup> Gerlane Tavares de Souza Chioratto  
 Vice-Coordenadora CEUA/CPqAM

Dr<sup>a</sup> Gerlane Tavares de Souza Chioratto  
 Vice-coordenadora da Comissão de Ética  
 no Uso de Animais – CEUA  
 Mat. SIAPE 1831156 / CRMV: PE 2073  
 e-mail: gerlane@cpqam.fiocruz.br  
 CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE  
 Recife - PE - CEP: 50.670-420  
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911  
 www.cpqam.fiocruz.br

