

SANDRA KALIL PERDOMO

Caracterização funcional da proteína LRR17 em
Leishmania (Leishmania) major

Dissertação apresentada ao Departamento de
Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

SANDRA KALIL PERDOMO

Caracterização funcional da proteína LRR17 em
Leishmania (Leishmania) major

Dissertação apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:

Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Silvia Reni Bortolin Uliana

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Perdomo, Sandra Kalil.

Caracterização funcional da proteína LRR em *Leishmania*
(*Leishmania*) major / Sandra Kalil Perdomo. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Silvia Reni Bortolin Uliana.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de
concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de
pesquisa: Bioquímica e biologia molecular de *Leishmania*.

Versão do título para o inglês: Functional characterization of the
Leishmania (*Leishmania*) major LRR17 protein.

Descritores: 1. *Leishmania* 2. Repetições ricas em leucina 3.
Fatores de virulência 4. Infecção 5. Hiperexpressão gênica
6. Transfecção I. Uliana, Silvia Reni Bortolin II. Universidade de São
Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação
em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0184/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Sandra Kalil Perdomo.

Título da Dissertação: Caracterização funcional da proteína LRR em *Leishmania* (*Leishmania*) major.

Orientador(a): Silvia Reni Bortolin Uliana.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Aos meus pais, José e Aydee, exemplos de trabalho e constância...

AGRADECIMENTOS

À Professora Silvia Reni Bortolin Uliana, pela oportunidade, ensino e paciência.

À Jenicer K. U. Yokoyama-Yasunaka, pela simpatia, organização e as muitas risadas.

Ao Danilo C. Miguel pela amizade, companhia, conselhos, ensino, disponibilidade e bom humor.

A os demais colegas do laboratório, Rogéria Zauli, Alessandro Rodrigues, Cristiane Trinconi e Vivian Bonano.

Ao Ariel Mariano Silber, pela amizade, palavras e tempo.

Ao Juan Diego Rojas e Lina Borda pela amizade, companhia e preocupação.

Aos demais professores, alunos e funcionários do Departamento de Parasitologia.

A CNPq pelo apoio financeiro.

Não encontre um defeito, encontre uma solução.

Henry Ford

RESUMO

Kalil S. Caracterização funcional da proteína LRR17 em *Leishmania (Leishmania) major*. [dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

As proteínas que contêm domínios ricos em leucina (LRR) mediam interações macromoleculares que estão envolvidas em muitos processos biológicos como transdução de sinal, adesão celular, processamento de RNA, apoptose, resistência a patógenos e resposta imune. Estudos anteriores em nosso laboratório identificaram um gene que codifica uma proteína contendo 6 LRRs (*LaLRR17*) em *L. (L.) amazonensis*. O *LaLRR17* é um gene com expressão estágio regulada, detectando-se maior abundância do mRNA em amastigotas. A proteína *LaLRR17* é secretada e é encontrada no citoplasma da célula hospedeira. Seqüências homólogas ao gene *LaLRR17* foram encontradas em todas as espécies de *Leishmania* analisadas. Esse trabalho tem como objetivo a caracterização da proteína homóloga em *L. (L.) major* (*LmLRR17*). Anticorpos obtidos contra seqüências conservadas das proteínas *LaLRR17* e *LmLRR17* permitiram o estudo da abundância protéica em diferentes estágios do parasita. Curiosamente, a proteína *LmLRR17* foi encontrada em maior abundância em promastigotas procíclicos em vez de amastigotas. Em promastigotas, a proteína *LmLRR17* é secretada. Linhagens de *L. (L.) major* hiperexpressoras da proteína *LmLRR17* ou expressoras da proteína *LaLRR17* em fusão com o epitopo viral *myc* foram obtidas. As proteínas quiméricas foram expressas seguindo o mesmo padrão de regulação observado na cepa selvagem. A presença do epitopo viral *myc* permitiu demonstrar que a proteína *LmLRR17* está presente no citoplasma de promastigotas e não é detectada em amastigotas. O fenótipo desses mutantes foi avaliado mediante infecções de macrófagos *in vitro*. A hiperexpressão da proteína *LmLRR17* em *L. (L.) major* não resultou em alterações fenotípicas marcantes. Por outro lado, a expressão da proteína heteróloga, *LaLRR17*, em *L. (L.) major*, levou a incremento na virulência com maior número de células infectadas e de parasitas por célula. Esses resultados indicam que a proteína *LmLRR17* de *L. (L.) major* é regulada de forma distinta da proteína homóloga em *L. (L.) amazonensis* e que a expressão da proteína *LaLRR17* em *L. (L.) major* leva a um aumento na infectividade.

Palavras-chave: *Leishmania*. Repetições ricas em leucina. Fatores de virulência. Infecção. Hiperexpressão gênica. Transfecção.

ABSTRACT

Kalil S. Functional characterization of the *Leishmania (Leishmania) major* LRR17 protein. Master thesis (Parasitology). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Proteins containing leucine rich repeats (LRR) are known to be involved in macromolecular interactions in many processes such as signal transduction, cell-adhesion, RNA processing, apoptosis, disease resistance and immune response . A previous study in our laboratory identified a *L. (L.) amazonensis* gene encoding a protein containing 6 LRRs (LaLRR17). *LaLRR17* is a stage-regulated gene expressed with increased abundance in the amastigote stage. The LaLRR17 protein is secreted to the cytoplasm of the host cell. Highly conserved homologues of *LaLRR17* were found in all *Leishmania* species analyzed. The aim of this study was to characterize the homologous protein of *L. major* (LmLRR17). Antibodies raised against peptide sequences common to LaLRR17 and LmLRR17 allowed the study of the steady-state protein abundance. Interestingly, LmLRR17 protein was found to be up-regulated in procyclic promastigotes, instead of amastigotes. The protein LmLRR17 is secreted by promastigotes. Mutants of *L. (L.) major* overexpressing a myc-tagged version of LmLRR17 or of LaLRR17 protein were obtained. In these parasites, the chimeric proteins were expressed following the same pattern of expression observed in the wild type parasites. The chimeric protein was localized to the cytoplasm of promastigotes in the transfected lines and was not detected in intracellular amastigotes. The phenotype of these mutants was assessed *in vitro* through macrophage infections. Overexpression of LmLRR17 protein in *L. (L.) major* resulted in an unaltered phenotype. On the other hand, overexpression of LaLRR17 in *L. (L.) major* induced an increase in virulence with a higher number of infected cells and intracellular parasites. These results indicate that LRR17 proteins in *L. (L.) major* and *L. (L.) amazonensis* are stage-regulated in a different manner and that the expression of the LaLRR17 protein in *L. (L.) major* increased infectivity *in vitro*.

Key words: *Leishmania*. Leucine rich repeats. Virulence factors. Infection. Gene overexpression. Transfection.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
μCi/mMol	Microcurie por milimol
μF	Microfaraday
μg	Micrograma
μL	Microlitro
AA	Aminoácidos
BIR	Domínio de repetições de inibição de baculovírus
BSA	Albumina sérica bovina
CARD	Domínio recrutador de caspases
CI ₅₀	Concentração inibitória para 50% da cultura
CI ₉₀	Concentração inibitória para 90% da cultura
cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Gás carbônico
D.O	Densidade ótica
Da	Dalton
DHFRTS	Dehidrofolato redutase timidilato sintase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
g	Gramas
GIPL	Glicoinositol fosfolípídeo
Gp63	Glicoproteína 63
h	Hora
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina

iNOS	Óxido nítrico sintase
Kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
kDNA	DNA mitocondrial
kV	Quilovolt
LPG	Lipofosfoglicano
LRR	Repetições ricas em leucina
mA	Miliampères
mA.cm ²	Miliampère por centímetro quadrado
Mb	Megabase
mg	Miligrama
MHC II	Complexo maior de histocompatibilidade de classe II
min	Minuto
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetitiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
N	Normal
Neo	Neomicina fosfotransferase
ng	Nanograma
NK	<i>Natural killers</i>
NLR	Receptores Nod-like
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOD	Domínio de oligomerização e união de nucleotídeos
nt	Nucleotídeos
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
pb	Pares de bases

PBS	Salina em tampão fosfato
PGE2	Prostaglandina E2
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoruro
PPD	Pata posterior direita
PPE	Pata posterior esquerda
PPG	Proteofosfoglicano
PRM	Moléculas de reconhecimento padrão
PSA2	Antígeno de superfície de promastigotas
RNA	Ácido ribonucléico
ROI	Radicais livres de oxigênio
RPM	Revoluções por minuto
SDS – PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Seg	Segundo
SFB	Soro fetal bovino
SL	<i>Spliced leader</i>
SSC	Tampão citrato de sódio/cloreto de sódio
TAE	Tampão Tris - acetato - EDTA
TEMED	N, N, N', N' - tetrametilnodiamina
TGF-β	Fator de crescimento tumoral - beta
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral – alfa
Tris	Tris (hidroximetilaminometano)
URL	Unidades relativas de luz
UTR	Regiões não codificantes
UV	Ultravioleta
v/v/v	porcentagem volume/volume/volume

$x g$

Gravidade

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estruturas da família das proteínas Nod	31
Figura 2. Caracterização da abundância do transcrito LRR17 em <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) major</i> ... 32	
Tabela 1-Graus de conservação da proteína LRR17 de <i>L. (L.) major</i>	55
Figura 3. Alinhamento da seqüência de AA das proteínas LmLRR17 (LmjF17.0900) com as proteínas de <i>L. (L.) amazonensis</i> (ACJ66722), <i>L. (L.) infantum</i> (LinJ17_V3.1000) e <i>L. (V.) braziliensis</i> (LbrM17_V2.0920).....	56
Figura 4. Padrão de expressão da proteína LRR17 em <i>L. (L.) major</i>	57
Figura 5. Detecção da proteína nativa em sobrenadante de cultura de promastigotas de fase logarítmica de <i>L. (L.) major</i>	58
Figura 6. Esquema representativo da construção pXG1-Luc.....	60
Figura 7. Esquema representativo das construções usadas para a obtenção de clones recombinantes usando o vetor de transfecção pXG1	61
Figura 8. Curva de crescimento de <i>L. (L.) major</i> e de linhagens transfectadas.....	63
Figura 9. Caracterização genômica dos transfectantes por <i>southern blot</i> usando a Sonda NEO.	64
Figura 10. Caracterização genômica dos transfectantes.....	65
Figura 11. Atividade de luciferase do clone Lm[Luc]......	66
Figura 12. Caracterização das linhagens Lm[Lm]1 e Lm[La]1.....	68
Figura 13. Caracterização das linhagens Lm[Lm]1 e Lm[La]1.....	69
Figura 14. Caracterização das linhagens Lm[Lm]1 e Lm[La]1 em infecções <i>in vitro</i>	71
Figura 15. Expressão diferencial da proteína recombinante da linhagem Lm[Lm]1 em infecções <i>in vitro</i> usando soros α -myc (1:150).....	72
Figura 16. Análise da cepa selvagem e das linhagens recombinantes Lm[Lm]1, Lm[La]1 e Lm[Luc] em infecções <i>in vitro</i>	75
Figura 17. Análise da cepa selvagem e das linhagens recombinantes Lm[Lm]2, Lm[La]2 e Lm[pX] em infecções <i>in vitro</i>	76
Figura 18. Análise da cepa selvagem e das linhagens transfectadas em infecções <i>in vivo</i>	77

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Família Trypanosomatidae	16
1.1.1 Gênero <i>Leishmania</i>	16
1.1.1.1 Leishmaniose e sua distribuição	17
1.2 O parasita	18
1.3 A doença	20
1.4 Estrutura genômica dos tripanosomatídeos	22
1.4.1 Regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos	23
1.5 Regulação estágio específica em <i>Leishmania</i>	24
1.6 Fatores de virulência em <i>Leishmania</i>	25
1.7 Modulação da resposta do macrófago por <i>Leishmania</i>	27
1.8 Proteínas com repetições ricas em leucina (LRR)	29
2 OBJETIVOS	34
Objetivos gerais:	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 MATERIAIS	37
3.1.1 Organismos empregados	37
3.1.1.1 Bactérias	37
3.1.1.1.1 <i>Escherichia coli</i> , cepa DH5 α	37
3.1.1.2 <i>Leishmania</i> sp.	37
3.1.1.3 Camundongos	37
3.1.2 Plasmídeos	37
3.1.3 Enzimas de restrição e T4 DNA ligase	38
3.2 MÉTODOS	38
3.2.1 Cultivo de <i>Leishmania</i> sp.	38
3.2.2 Purificação de DNA genômico de <i>Leishmania</i>	38
3.2.3 Purificação de DNA genômico em pequena escala	39

3.2.5 Extração de DNA plasmidial em pequena escala	40
3.2.6 Eletroforese de DNA	41
3.2.7 <i>Southern Blot</i>	41
3.2.7.1 Eletroforese e transferência de DNA genômico	41
3.2.7.2 Marcação de sondas	42
3.2.7.3 Hibridização	42
3.2.8 Clonagem molecular	43
3.2.8.1 Preparação do vetor	43
3.2.8.2 Preparação do inserto	43
3.2.8.3 Ligaçãõ	43
3.2.8.4 Transformação e plaqueamento	43
3.2.9 <i>Western blot</i>	44
3.2.9.1 Eletroforese e transferência protéica	44
3.2.9.2 <i>Imunoblotting</i>	44
3.2.10 Imunofluorescência	45
3.2.11 Ensaios de viabilidade celular pelo teste de MTT	46
3.2.12 Transfecção de <i>L. (L.) major</i>	46
3.2.12.1 Construções	46
3.2.12.2 Eletroporação	47
3.2.12.3 Obtenção de clones	48
3.2.13 Indução da perda do epissomo	48
3.2.14 Atividade de luciferase	48
3.2.15 Análise de proteínas presentes em sobrenadante de cultura de promastigotas	49
3.2.16 Infecção de macrófagos	49
3.2.16.1 Obtenção de macrófagos a partir de monócitos de medula óssea	49
3.2.16.2 Infecção de macrófagos	50
3.2.16.3 Obtenção de amastigotas a partir de culturas de macrófagos	50

3.2.17 Infecção <i>in vivo</i>	51
3.2.17.1 Infecção de camundongos BALB/c	51
3.2.17.2 Isolamento de amastigotas de lesão	51
3.2.18 Imunização de camundongos BALB/c com DNA plasmidial	52
3.2.18.1 Obtenção de soro	52
3.2.19 Análise estatística	52
4 RESULTADOS	53
4.1 Caracterização da proteína LRR17 de <i>L. (L.) major</i>	54
4.1.1 Análise da seqüência primária da proteína LmLRR17	54
4.1.2 Análise do padrão de expressão da proteína LmLRR17	56
4.1.3 Secreção em promastigotas	58
4.2 Estudo funcional da proteína LRR17 em <i>L. (L.) major</i>	59
4.2.1 Obtenção de linhagens de <i>L. (L.) major</i> expressores de luciferase	59
4.2.2 Obtenção de linhagens de <i>L. (L.) major</i> hiperexpressores do gene LmLRR17 ou expressores do gene LaLRR17.....	61
4.2.3 Caracterização das linhagens Lm[Lm], Lm[La] e Lm[Luc]	62
4.2.4 Caracterização das linhagens recombinantes Lm[Luc], Lm[Lm] e Lm[La].....	66
4.2.5 Infectividade das linhagens recombinantes Lm[Lm] e Lm[La] <i>in vitro</i>	70
4.2.6 Análise das linhagens transfectadas em infecções <i>in vivo</i>	74
5 DISCUSSÃO	78
5.1 Caracterização do padrão de expressão da proteína LmLRR17	79
5.2 Localização da proteína LmLRR17	81
5.3 Obtenção e caracterização de linhagens recombinantes	84
5.4 Fenótipo das linhagens recombinantes em infecções <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	86
6 CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae inclui numerosas espécies de parasitas em humanos, animais vertebrados, plantas e insetos. Os parasitas mais importantes desta família, do ponto de vista da saúde humana, pertencem aos gêneros *Leishmania*, agentes causais da leishmaniose e *Trypanosoma*. Espécies representativas do gênero *Trypanosoma* são *T. cruzi*, que é o agente causal da doença de Chagas e *T. brucei*, causador da tripanosomíase africana ou doença do sono (Hughes e Piontkivska, 2003). Esta família apresenta tanto parasitas monogenéticos, que parasitam um hospedeiro invertebrado, quanto digenéticos, capazes de parasitar tanto o hospedeiro invertebrado quanto o vertebrado (Gull, 2001).

1.1.1 Gênero Leishmania

Este gênero está constituído por dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, que são produto da bifurcação de um ancestral, apresentando diferenças tanto na distribuição geográfica como na localização quando coloniza o intestino do vetor (Lainson e Shaw, 1987). *Leishmania* é o subgênero que está disseminado tanto no novo como no velho mundo (Shaw, 2002) e inclui espécies que desenvolvem-se no intestino médio e anterior do vetor (Lainson e Shaw, 1987). O subgênero *Viannia* está presente no novo mundo (Shaw, 2002) e as espécies pertencentes a ele localizam-se no intestino posterior do vetor (Lainson e Shaw, 1987). Cada subgênero conglomera diferentes espécies que apresentam morfologias muito semelhantes. No homem esses protozoários são os agentes causais da leishmaniose, uma doença que pode apresentar três formas clínicas principais: leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral (Murray et al., 2005).

Em 1974, Lumsden adotou critérios definidos para diferenciação de espécies de *Leishmania*. Esses critérios foram baseados em fatores extrínsecos do parasita tais como forma clínica, o desenvolvimento no meio de cultura, a localização no vetor, a patologia

apresentada em animais de laboratório (Shaw, 2002) e o lugar de onde foi isolado, por exemplo, *L. (V.) guyanensis* (isolado da Guiana), *L. (V.) peruviana* (isolada do Peru), *L. (L.) infantum* (isolada de criança na Tunísia) e *L. (L.) gerbilli* (isolada de roedores) (Banuls, Hide e Prugnonle, 2007).

1.1.1.1 Leishmaniose e sua distribuição

A leishmaniose é uma doença que tem diversas manifestações clínicas provocando lesões ulceradas na pele, inflamação e destruição na mucosa ou infecção visceral disseminada. A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a leishmaniose como uma das seis doenças mais importantes no mundo, por sua alta prevalência e pelas deformidades que ela provoca. Anualmente ocorrem de 1.5 a 2 milhões de casos sintomáticos de leishmaniose cutânea e 500 mil de leishmaniose visceral, sendo atribuídas cerca de 70 mil mortes por ano a essa doença. Aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose cutânea estão distribuídos em países como Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Algéria, Irã, Brasil e Peru. A mesma porcentagem de casos de leishmaniose visceral estão concentrados na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (Desjeux, 2004). A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada já que sua localização geográfica é na maior parte das vezes coincidente com focos de pobreza (Yamey e Torreele, 2002).

Os agentes etiológicos que produzem a leishmaniose cutânea são *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) aethiopica* (leishmaniose cutânea do velho mundo), *L. (L.) infantum* (regiões do mar Mediterrâneo e Cáspio) e *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) guyanensis* (leishmaniose cutânea do novo mundo), entre outras. Diversas espécies causadoras de leishmaniose visceral encontram-se distribuídas em praticamente todos os continentes, *L. (L.) donovani* predomina na Ásia e África; *L. (L.) infantum* na região mediterrânea e Ásia central e *L. (L.) infantum chagasi* na América do sul. Outras espécies como *L. (L.) tropica* (Oriente médio) e *L. (L.) amazonensis* (América do sul), podem ser viscerotrópicas (Desjeux, 2004; Guerin et al., 2002).

A situação epidemiológica da leishmaniose cutânea no Brasil tem grande importância devido à frequência de casos manifestados e pela possibilidade de produzir deformidades, gerando um impacto tanto psicológico no ser humano quanto no campo social e econômico. Desde a década de 80, tem se reportado o aumento no número de casos: de 3000 (1980) para 35748 (1995) registros. Picos de transmissão são apresentados a cada cinco anos, quando começam a se implementar ações de vigilância e controle da leishmaniose cutânea no Brasil. No ano 2003 foi confirmada a presença da doença em todos os estados brasileiros.

No período de 2001 a 2003 a maior densidade de casos por Km² foi registrada nos estados pertencentes à Amazônia legal. Aproximadamente 90% dos casos ocorreram em pessoas maiores de 10 anos. Apesar disso, em estados como Rondônia, Acre, Amazonas, Amapá, Roraima, Paraíba, Pernambuco e Alagoas, os casos de leishmaniose cutânea em menores de 10 anos foram superiores à média nacional. Um registro de 4,71% de todos os casos de leishmaniose cutânea no Brasil incluíram acometimento de mucosas (Ministério da Saúde, 2007).

1.2 O parasita

Leishmania é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida. É um microorganismo que alterna seu ciclo de vida entre hospedeiros vertebrados e invertebrados e é transmitido pela picada de insetos da ordem Diptera ao ser humano ou a mamíferos terrestres. Os vetores invertebrados de leishmaniose são classificados na subfamília *Phlebotominae*, com seis gêneros já descritos, dos quais unicamente dois possuem grande importância médica: *Phlebotomus*, característico do velho mundo e dividido em 12 subgêneros e *Lutzomyia*, do novo mundo, dividido em 25 subgêneros (Banuls et al., 2007). Particularmente, *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus argentipes* são vetores com potencial para transmissão de um grande número de espécies de *Leishmania* (Kamhawi et al., 2000; Pimenta et al., 1994; Rogers et al., 2004; Sadlova et al., 2003).

O parasita possui três estágios principais: fase intracelular infectiva (amastigota), fase replicativa não infectiva (promastigota procíclico) e fase infectiva não replicativa (promastigota metacíclico). A transmissão começa quando o inseto alimenta-se de um mamífero infectado e as formas amastigotas são conduzidas ao seu intestino médio. Do material sugado, a água é removida e o sangue permanece retido dentro da membrana peritrófica. A primeira transformação do parasita ocorre nas primeiras 12 a 18h. As formas amastigotas dão lugar a formas promastigotas procíclicas, que morfologicamente são curtas, ovóides e levemente móveis. Uma clara multiplicação das formas procíclicas se observa de 18 a 24h, atingindo uma máxima taxa entre 36 a 60h. A progênie resultante migra para o tubo digestivo e é nesse lugar onde ocorre a segunda diferenciação a formas conhecidas como nectomônadas. Passadas aproximadamente 60 a 72h, as nectomônadas são empacotadas na parte anterior do intestino médio do vetor, se aderindo à superfície das células epiteliais com ajuda do seu flagelo. A digestão total do sangue tarda aproximadamente sete dias e as nectomônadas migram para a válvula cardíaca e a válvula estomodeal. Essa migração provoca a terceira diferenciação gerando duas formas: haptomônadas e promastigotas metacíclicos. As haptomônadas são formas curtas que, diferentemente dos promastigotas metacíclicos, ocasionalmente se replicam. Os promastigotas metacíclicos se caracterizam pela estrutura delgada, alta mobilidade proporcionada por um flagelo que tem o dobro do tamanho do corpo do parasita e também pela ausência de divisão celular. As haptomônadas se unem via hemidesmossomas à cutícula do interior da válvula estomodeal ou entre eles por uma matriz viscosa que evita sua mobilidade. Alguns parasitas, principalmente os metacíclicos, migram além da válvula estomodeal e chegam ao esôfago, à faringe e à probóscide. Os promastigotas metacíclicos são então inoculados no hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo (Sacks e Kamhawi, 2001), permitindo a invasão ou fagocitose por células do sistema imune. Uma vez dentro do hospedeiro, os promastigotas metacíclicos se transformam a formas amastigotas, que se caracterizam pelo formato ovóide e pela ausência de flagelo proeminente. Neste caso localizam-se no vacúolo parasitóforo, onde se replicam e posteriormente, infectam maior número de macrófagos se disseminando pelo sangue (Murray et al., 2005).

O desenvolvimento do parasita no vetor pode ser parcialmente reproduzido *in vitro*. Em cultura, considera-se que a população presente na fase logarítmica represente os promastigotas replicativos, ou procíclicos. Na fase estacionária, uma parte da população se diferencia em promastigotas metacíclicos.

Diferentes ordens de mamíferos como Rodentia, Canidae, Edentata e Procyonidae podem desenvolver infecções naturais por *Leishmania* (Lainson e Shaw, 1987). Esses hospedeiros mamíferos são em sua grande maioria animais silvestres que habitam a mata nativa, podendo ser considerados reservatórios contínuos do parasita, o que destaca o papel na transmissão do parasita gerando um impacto direto dificultando o controle dessa parasitose. O homem é considerado hospedeiro acidental do parasita (Banuls et al., 2007).

1.3 A doença

A forma clínica mais freqüente de leishmaniose é a forma cutânea ou tegumentar, com acometimento da pele e nódulos linfáticos próximos. As lesões produto da leishmaniose cutânea se iniciam com uma pápula no lugar da picada do inseto que posteriormente forma um nódulo duro ou uma úlcera aberta que espontaneamente pode sarar ou não (Murray et al., 2005), curando por reepitelização deixando cicatrizes. As lesões produzidas por espécies do velho mundo podem ser observadas como placas hiperqueratóticas similares a verrugas. Geralmente os pacientes que sofrem este tipo de doença são viajantes ou militares que apresentam uma, duas ou até uma dúzia de lesões em partes do corpo onde a pele é exposta. As lesões ulcerativas são características da doença produzida por espécies de *Leishmania* do novo mundo. A infecção por *L. (L.) major* causa lesões únicas, que se curam após alguns meses e é conhecida popularmente como Botão do Oriente. Após a cura os pacientes desenvolvem proteção imune somente à reinfeção homóloga (Grimaldi, 1982). As lesões geralmente cicatrizam espontaneamente em dois a quatro meses em infecções por *L. (L.) major*, após três meses na maioria dos casos (>75%) de infecções por *L. (L.) mexicana*, de seis a quinze meses as produzidas por *L. (L.) tropica* e em maior tempo para infecções por *L.*

(*V.*) *braziliensis* e *L. (V.) panamensis* (Murray et al., 2005). Algumas espécies que produzem leishmaniose cutânea podem provocar lesões localizadas na mucosa nasal e orofaríngea, apresentando múltiplos nódulos na pele ou ainda, podem colonizar o fígado, baço, medula óssea e nódulos linfáticos distantes (Murray et al., 2005). Cada espécie de *Leishmania* evidencia tropismos diferentes (Zhang et al., 2003), assim como a capacidade para a imunoevasão e persistência no hospedeiro (Engwerda, Ato e Kaye, 2004; McDowell et al., 2002), além da sensibilidade a mudanças no ambiente (Reithinger et al., 2005).

A leishmaniose mucocutânea é uma complicação da leishmaniose cutânea, causada pela disseminação dos parasitas com colonização das mucosas oral e nasal. A doença começa com um eritema que evolui para ulceração na mucosa do nariz e/ou boca, provocando perfuração do septo nasal e conseqüentemente, lesões inflamatórias destrutivas como a destruição da laringe e faringe (Franke et al., 1990). Produto da deformação, as vias respiratórias são afetadas apresentando infecções secundárias e desnutrição. Diferentemente da leishmaniose cutânea, a leishmaniose mucocutânea não cicatriza espontaneamente.

A leishmaniose visceral é a forma mais severa da leishmaniose, porém, a maioria das infecções com espécies viscerotrópicas é assintomática. Na ausência do tratamento, 100% dos casos sintomáticos terminam em óbito nos dois primeiros anos. Diversos fatores determinam a suscetibilidade do hospedeiro como a idade, o estado nutricional e a eficácia das respostas imunes inata e adquirida. Febre, palidez, hepatomegalia, esplenomegalia e perda de peso são os sintomas característicos da leishmaniose visceral (Murray et al., 2005). As formas amastigotas do parasita circulam livremente na leishmaniose visceral ativa (Paraguai de Souza et al., 2001) e a parasitemia é bastante freqüente em pacientes imunodeficientes sendo associado a infecções pelo vírus da imunodeficiência humano (Pintado et al., 2001).

1.4 Estrutura genômica dos tripanosomatídeos

O genoma dos tripanosomatídeos *L. (L.) major*, *T. brucei* e *T. cruzi* é diplóide, abarcando um tamanho que vai desde 25 a 55 megabases (Mb) e contidos entre 11 a 36 cromossomos. Calcula-se a presença de cerca de 8100 genes codificadores de proteínas em *L. (L.) major*, 8300 em *T. brucei* e 12000 em *T. cruzi*. Particularmente, os genomas de *T. brucei* e *L. (L.) major* mostram um grande número de zonas sintênicas em arranjos de genes ortólogos. El-Sayed et al. (2005) afirmam que essa sintenia representa em *L. (L.) major* 19,9 Mb e em *T. brucei* 30,7 Mb dos seus genomas, tendo em comum que aproximadamente 40% dos pontos de quebra de sintenia estão associados a amplificação de famílias multigênicas, retroelementos ou genes que codificam RNAs estruturais. Entretanto, 910 genes de *L. (L.) major* não tem genes ortólogos nos genomas de *Trypanosoma*. Os genes exclusivos presentes em *L. (L.) major* geralmente são encontrados em posições próximas ao telômero, em regiões adjacentes às regiões de *switch* de transcrição e em pontos de quebra da sintenia (El-Sayed et al., 2005). Esses genes restritos em *Leishmania* geram características únicas dentro do seu gênero, diferenciando-o de *T. brucei* e *T. cruzi* metabolicamente. As diferenças radicam em transportadores, enzimas e componentes da síntese de glicoconjugados (Ivens et al., 2005). Os tripanosomatídeos, além de possuírem características particulares no seu genoma, apresentam organelas únicas tais como os glicossomos, que funcionam como reservatórios de enzimas glicolíticas e o cinetoplasto.

O cinetoplasto contém o DNA mitocondrial (kDNA) em tripanosomatídeos. É uma estrutura única composta por DNAs circulares entrelaçados entre si, formando uma rede altamente compactada que se localiza próxima ao corpúsculo basal. Dois tipos de DNAs circulares compõem o kDNA, conhecidos como maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos estão presentes em poucas dúzias de cópias do total da rede e apresentam tamanhos que variam de 20 a 40 Kb. O seu material genético é análogo ao DNA mitocondrial em outros eucariotos, codificando RNAs ribossomais e muitas proteínas envolvidas na transdução de energia. Por outro lado, os minicírculos variam de 0.5 a 2.9 Kb e representam 90% da rede total do kDNA estando presentes em milhares de cópias. O DNA tanto dos maxicírculos

como dos minicírculos, codificam pequenos RNAs guias que permitem a especificidade da edição do RNA gerando moléculas funcionais de mRNA (Shapiro e Englund, 1995).

A organização genômica dos tripanosomatídeos é constituída por arranjos em tandem. Os genes são transcritos de forma policistrônica (pré mRNA), em ausência de promotores da RNA polimerase II e fatores de transcrição típicos. Diferentes processos, como edição de RNA, *trans splicing* e poliadenilação, estão envolvidos no processamento do transcrito e posterior expressão protéica (Campbell, Thomas e Sturm, 2003; Cruz e Tosi, 1996).

O genoma de *L. (L.) major* está composto por 32.819.678 pares de bases (pb) em 36 cromossomos (Ivens et al., 2005) e com um conteúdo aproximado de GC de 60%. A elevada plasticidade do genoma em *Leishmania* resulta na alta variabilidade do cariótipo das espécies e subespécies.

1.4.1 Regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos

O processamento por *trans splicing* foi inicialmente descoberto em *T. cruzi* (Murphy, Watkins e Agabian, 1986), quando se observou que vários mRNAs que codificavam glicoproteínas de superfície tinham em comum uma seqüência de 39 nucleotídeos (nt) no extremo 5'. Essa seqüência metilada foi chamada de *Spliced leader* (SL) ou gene do *miniexon* e foi verificado que acabaria inserida a um dinucleotídeo AG no extremo 5' do mRNA (Bangs et al., 1992; Clayton e Shapira, 2007; Liang et al., 2003). Por outro lado, no extremo 3' do mRNA se localiza uma seqüência que varia de aproximadamente 100 a 300 nt que permite a poliadenilação, oferecendo maior estabilidade ao transcrito maduro (Clayton e Shapira, 2007).

A estabilidade de transcritos em tripanosomatídeos desempenha um papel importante na regulação da expressão nesses organismos. A degradação do transcrito é iniciada basicamente por deadenilação que estimula o *decapping* e subsequente degradação

do mRNA por exonucleases. Essas enzimas fazem parte de um complexo chamado exossoma, onde a temperatura é um fator importante na estabilidade tanto dos transcritos como das proteínas codificadas (Haile e Papadopoulou, 2007). A baixa abundância de transcrito pode ser devido a que a rapidez da degradação do precursor (pré mRNA) seja maior que a do processo do *splicing* (Clayton e Shapira, 2007). O primeiro passo da degradação do mRNA é a deadenilação feita pela deadenilase. A deadenilase é uma nuclease que degrada sentido 3'→5' e posteriormente, o mRNA é degradado pelo exossoma, composto por 11 diferentes proteínas. A ação da helicase prossegue, eliminando a metilação do 5' do transcrito. Nas regiões 3' não traduzidas (UTR *untranslated regions*) dos mRNAs, encontram-se seqüências ou elementos ricos em AU conhecidos como ARES. Essas seqüências são reconhecidas por proteínas regulatórias que determinam a estabilidade do transcrito, permitindo a sua estabilização ou desestabilização por degradação ou conservação da cauda de adeninas ou poliA. Os mRNAs que estão destinados à degradação são armazenados em organelas (*P bodies*) onde posteriormente, serão eliminados (Clayton e Shapira, 2007).

1.5 Regulação estágio específica em *Leishmania*

Estudos realizados nos últimos anos verificaram que grande proporção dos genes codificadores de proteínas em *Leishmania* são expressos constitutivamente. Entretanto, em alguns casos encontram-se RNAs estágio regulados. Os produtos gênicos que resultam dessa regulação estágio específica estão envolvidos em diferentes vias funcionais na célula, como proteínas estruturais, transportadores, metabolismo, amastina, proteínas de choque térmico e de superfície (Cohen-Freue et al., 2007). Algumas dessas proteínas estágio reguladas, são consideradas fatores de virulência e tem um papel fundamental na sobrevivência e multiplicação tanto no hospedeiro vertebrado como no invertebrado.

1.6 Fatores de virulência em *Leishmania*

A invasão de macrófagos por *Leishmania* é mediada por moléculas localizadas na superfície do parasita. Pelo menos duas das mais abundantes moléculas de superfície de promastigotas estão implicadas na sua virulência: as glicoproteínas de 63 kDa (gp63) e o lipofosfoglicano (LPG). A superfície celular de *Leishmania* está coberta por uma capa de glicocálix, presente em maior abundância na fase promastigota metacíclica, tendo não menos de 17 nm de espessura. A capa de glicocálix é mais delgada em promastigotas procíclicas, estando quase ausente em formas amastigotas. Esta estrutura está composta por diferentes moléculas que permitem o estabelecimento, viabilidade e o sucesso da infecção por *Leishmania*.

A molécula mais abundante presente no glicocálix é o LPG. Com aproximadamente cinco milhões de cópias por célula, o LPG foi o primeiro fator de virulência a ser caracterizado em *Leishmania*. A sua composição consiste em repetições de Gal β 1,4Man-PO₄ ancoradas à membrana celular mediante uma molécula de 1-O-alkil-2-lisofosfatidil(mio)inositol. O LPG varia no número de repetições de oligossacarídeos, diferenciando espécies de *Leishmania*. Dentro do inseto, a molécula de LPG em formas procíclicas de *Leishmania* é longa tendo aproximadamente 15 repetições, enquanto o número de repetições é duplicado em formas metacíclicas (Descoteaux e Turco, 1999). O LPG cumpre um papel muito importante na proteção de formas metacíclicas do parasita, evitando o ataque das proteínas do sistema do complemento que faz parte da resposta imune inata do vertebrado.

Estudos demonstraram que promastigotas procíclicas de *L. (L.) major* não resistem ao ataque do complemento ao passo que promastigotas metacíclicas conseguem evadi-lo. Essa resistência é atribuída à diferente composição do LPG na superfície celular das diferentes formas do parasita. Por essa razão, promastigotas metacíclicas de *L. (L.) major* estabelecem com sucesso a infecção no hospedeiro mamífero. Somado a isso, o LPG evita a lise celular por inibição da união das subunidades C5b e C9 do sistema complemento (Olivier, Gregory e

Forget, 2005). Particularmente, *L. (L.) donovani* adere à sua superfície a subunidade inativa C3bi, impedindo a formação da convertase C5 e modulando a resposta imune do hospedeiro vertebrado (Puentes et al., 1989). O LPG, além de evitar a lise mediada pelo complemento, também interage com receptores que permitem a adesão dos promastigotas no macrófago. Esse reconhecimento é realizado via receptores manose-fucose, ligando resíduos de manose presentes no LPG (Blackwell et al., 1985). Adicionalmente, o LPG se une aos receptores do macrófago como o receptor para proteína C reativa (CRP), permitindo a fagocitose (Culley et al., 1996). Curiosamente, nos estágios iniciais da infecção por *Leishmania*, o LPG é muito importante para a sobrevivência dos promastigotas, função reforçada ainda mais ao se levar em consideração que em amastigotas este não é expresso.

Além do LPG, a gp63 é outra molécula importante localizada na superfície de *Leishmania*. Trata-se de uma ecto-metaloprotease presente em promastigotas (McGwire et al., 2002) e sua expressão é inibida na fase amastigota (Schneider et al., 1992). A gp63 é encontrada em abundância aproximadamente dez vezes menor que o LPG e o tamanho da molécula é pequeno, sendo coberta pelas estruturas do LPG em toda a superfície celular (Sacks e Kamhawi, 2001). Em hospedeiros mamíferos, a gp63 de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* evita a lise celular, inativando a subunidade C3b (C3bi) do complemento, favorecendo a opsonização e internalização no macrófago (Brittingham et al., 1999). A opsonização *in vivo* de promastigotas metacíclicos de *Leishmania* por C3b e C3bi, permite a interação com receptores tipo 1 do macrófago (CR1) e CR3 respectivamente (Olivier et al., 2005).

Outra molécula importante que faz parte da superfície celular da *Leishmania* é o glicoinositol fosfolipídeo (GIPL). Essa molécula é 10 vezes mais abundante que o LPG e está localizada na membrana do parasita (Olivier et al., 2005). Ainda não é muito conhecido que papel tem essa molécula na interação parasita-macrófago (Ferguson, 1997), no entanto é sabido que o GIPL tem uma meia vida longa e acredita-se que possa ter um papel protetor na superfície dos promastigotas (Proudfoot, O'Donnell e Liew, 1995).

Na fase amastigota de *Leishmania*, existe uma proteína que é considerada fator de virulência, conhecida como A2. A proteína A2 de *L. (L.) donovani* é expressa em altos níveis em amastigotas e em baixos níveis em promastigotas, sendo requerida para a sobrevivência

do parasita em camundongos (Matlashewski, 2001; Zhang e Matlashewski, 1997). Estudos foram realizados avaliando-se o fenótipo de mutantes de *L. (L.) major* contendo o gene A2 de *L. (L.) donovani* e observou-se um notável aumento na sobrevivência desse parasita em órgãos viscerais de camundongos BALB/c (Zhang et al., 2003). Esses resultados sugerem que o gene A2 tem um papel importante na sobrevivência de amastigotas de *L. (L.) donovani* em órgãos viscerais, fato que sugere a relevância deste gene no processo de visceralização da leishmaniose.

1.7 Modulação da resposta do macrófago por *Leishmania*

O processo de fagocitose parece ser uma estratégia bem sucedida utilizada pelos parasitas do gênero *Leishmania* para alcançar a diferenciação e subsequente multiplicação no hospedeiro vertebrado. Esse processo implica na modulação ou em direcionamento da resposta imune do hospedeiro por parte do parasita, que deve possuir mecanismos que permitam esse controle. Existem compostos secretados pelos macrófagos que são letais para *Leishmania*, como o óxido nítrico (NO) e os radicais livres de oxigênio (ROI).

A produção de óxido nítrico é o mecanismo mais eficiente na eliminação de *L. (L.) major*, no entanto o parasita tem a capacidade de inibir a síntese da óxido nítrico sintase (iNOS). A iNOS permite a produção de NO em resposta à presença de IFN- γ e lipopolissacarídeo (LPS). Quando essa enzima é inibida pela *Leishmania*, verifica-se a incapacidade de controle da infecção pelos macrófagos (Proudfoot et al., 1996; Proudfoot et al., 1995). Por outro lado, os radicais livres de oxigênio gerados pela célula têm um papel menos crucial no controle da infecção. Ensaio utilizando camundongos deficientes na secreção de ROI, revelaram o controle total na infecção por *Leishmania* (Murray e Nathan, 1999). Adicionalmente, o processo de inibição de ROI parece ser dependente da interação com as moléculas de superfície gp63 e LPG (Descoteaux e Turco, 1999; Sorensen, Hey e Kharazmi, 1994).

Entre outros mecanismos de sobrevivência em *Leishmania* está a capacidade de infectar macrófagos sem permitir a indução de citocinas pró inflamatórias. A ativação da resposta inflamatória é caracterizada principalmente pela secreção de IL-1, do fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL-12 para a ativação dos linfócitos T. A função principal de *Leishmania* em modular a resposta imune está centrada na inibição da IL-12. A IL-12 é imprescindível para a ativação dos linfócitos T e secreção de INF- γ que, por sua vez, permite a ativação dos macrófagos e produção de moléculas microbidas. Essa modulação foi demonstrada em ensaios *in vivo* com camundongos BALB/c (Belkaid, Butcher e Sacks, 1998), no entanto o mecanismo molecular ainda não está completamente elucidado.

A secreção de TGF- β é induzida por varias espécies de *Leishmania*. A produção dessa proteína está correlacionada com o retardo na expressão da iNOS e na atividade reduzida das células *natural killer* (NK) no linfonodo (Scharton-Kersten et al., 1995). A produção do TGF- β portanto, inibe a ação microbicida do macrófago e a produção de INF- γ por parte das células NK (Kaye e Bancroft, 1992).

Outros moduladores da resposta inflamatória são afetados pela infecção, como a prostaglandina E2 (PGE2), que parece ser secretada por macrófagos infectados por *Leishmania* e favorece a multiplicação e viabilidade do parasita (Farrell e Kirkpatrick, 1987), ou os metabólitos do ácido araquidônico, que têm sido reportados como causadores da inibição na proliferação de macrófagos e supressão na produção de TNF- α , IL-1 e ROS (Belley e Chadee, 1995).

Um outro mecanismo de modulação descoberto em *Leishmania* é a habilidade de inibir a apresentação de antígeno por parte do macrófago a outros componentes do sistema imune (Reiner, Ng e McMaster, 1987). Particularmente, *L. (L.) donovani* reprime a expressão do gene do complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC II) e inibe a produção de IFN- γ (Reiner et al., 1987, 1988). Em contraste, os níveis de transcrito desse gene são normais em infecções por *L. (L.) amazonensis* (Prina et al., 1993). Mesmo assim, em infecções por essa espécie ocorre inibição da apresentação de antígeno atribuído ao seqüestro no fagolisossomo dos antígenos e/ou da molécula de MHC II (Kima et al., 1996; Lang et al., 1994), evitando seu processamento. Por outro lado, amastigotas de *L. (L.)*

amazonensis possuem a capacidade de internalizar e degradar as moléculas do MHC II, conseguindo evadir a resposta do hospedeiro (De Souza Leao et al., 1995).

O estudo das vias de sinalização produto da ativação de receptores celulares em infecções por *Leishmania* tem adquirido muita importância. Estudos recentes mostraram que *Leishmania* tem a capacidade de interagir com receptores da família *Toll-like* (TLR), composta por diferentes proteínas capazes de induzir a ativação de diferentes vias de sinalização. Foi demonstrado que o sucesso de infecções por *L. major* em modelo murino é modulado pela interação com os receptores TLR 2, 4 e 9 (de Veer et al., 2003; Kropf et al., 2004; Liese, Schleicher e Bogdan, 2007; Ribeiro-Gomes et al., 2007). O LPG parece estar fortemente implicado na interação com TLR2 (de Veer et al., 2003). A interação com esses receptores parece ser indispensável para a produção de citocinas pró-inflamatórias e indução de respostas citotóxicas.

Com a ajuda das moléculas de superfície de *Leishmania* para ser fagocitada, o parasita é capaz de modular múltiplas funções do macrófago para sua sobrevivência e multiplicação. No entanto, vale ressaltar que os mecanismos intracelulares pelos quais os sinais são comunicados ainda não são completamente conhecidos.

1.8 Proteínas com repetições ricas em leucina (LRR)

Uma das vias utilizadas pelo hospedeiro para a detecção de moléculas associadas a patógenos é constituída por proteínas que possuem domínios de repetições ricas em leucina (LRR) associadas a receptores celulares. As LRR possuem uma grande versatilidade funcional, mediando interações macromoleculares muito diversas. Algumas proteínas contendo LRR foram relacionadas à resposta contra a invasão de patógenos em plantas e em mamíferos. A primeira estrutura tridimensional determinada para uma proteína contendo LRRs foi a da proteína inibidora de RNase de porco. Entretanto, com as diversas funcionalidades encontradas nos domínios LRR, pouco se sabe sobre o dobramento e o controle da estabilidade da estrutura (Truhlar e Komives, 2008).

Dentre as proteínas contendo LRRs estão as proteínas Toll like e NOD (*nucleotide-binding and oligomerization domain*). Os receptores Toll like estão associados à membrana celular, reconhecendo patógenos no ambiente fora da célula, em contraste às proteínas NOD, que pertencem a uma família de receptores intracelulares recentemente identificados e denominados NLR (*Nod-like receptors*) (Schuster e Nelson, 2000). Tanto os receptores Toll-like como os Nod-like estão inclusos em um conjunto de receptores ou moléculas de reconhecimento de padrões (PRM: *pattern recognition molecules*), que podem diretamente distinguir estruturas moleculares conservadas ou PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) produzidos por microorganismos. Os PAMPs são estruturas muito conservadas e essenciais para a sobrevivência microbiana como lipopolissacarídeos, carboidratos, peptidoglicanos, flagelinas, ácidos nucléicos e estruturas peptídicas e lipídicas (Janeway e Medzhitov, 2002).

Os NLR foram inicialmente encontrados em plantas, codificados por genes de resistência (R). Os genes R codificam proteínas que induzem alterações metabólicas, secreção de moléculas antimicrobianas, morte celular localizada e gerando uma resposta de hipersensibilidade (Dangl e Jones, 2001).

Em humanos o grupo dos NLR está composto de uma família de 23 proteínas citosólicas caracterizadas pela presença dos domínios NOD e LRR (Inohara et al., 2005). Os NLR são proteínas multidomínios (Figura 1) compostas de um extremo amino terminal variável, contendo uma região efetora que consiste em um domínio de interação proteína-proteína como CARD (domínio recrutador de caspases), PYD (domínio pyrin) ou BIR (domínio de repetições de inibição de baculovírus); na região central possui um domínio NOD com atividade ATPase intrínseca e crítico para a ativação do receptor (Mathews, Sprakes e McDermott, 2008) e na região carboxi terminal está localizado o domínio LRR, que está envolvido na detecção microbiana (Inohara et al., 2005).

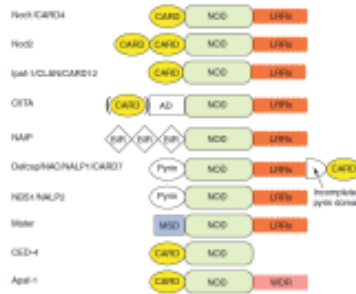


Figura 1. Estruturas da família das proteínas Nod. Proteínas multidomínios com um extremo amino-terminal variável, uma região central que permite a ativação do receptor e um extremo carboxi-terminal capaz do reconhecimento de invasores.
Fonte: Inohara, Ogura e Nunez (2002).

Muito pouco se sabe sobre as proteínas que contêm LRRs em *Leishmania*. No entanto seu estudo é particularmente importante já que podem participar de diversas interações proteína-proteína. No genoma de *L. (L.) major* encontram-se genes que codificam mais de 100 proteínas que contêm domínios LRR, a maior parte delas com função não conhecida (Genest et al., 2008). Exemplos de proteínas de *L. (L.) major* contendo LRR já caracterizadas incluem o antígeno de superfície PSA2 (*parasite surface antigen 2*) e o componente protéico dos proteofosfoglicanos (PPG). Tanto a proteína PSA2 como os PPG estão presentes ancorados na membrana plasmática e são também secretados. Em ambos os antígenos, a região LRR parece estar relacionada à ligação com o receptor CR3 de macrófagos (Kedzierski et al., 2004). Um outro exemplo já caracterizado refere-se a uma proteína de *L. (L.) infantum*, rica em LRRs que foi relacionada ao desenvolvimento de resistência a antimônio (Genest et al., 2008).

No cromossomo 17 de *L. (L.) amazonensis* foi encontrado um gene que codifica uma proteína contendo LRRs e que é predominantemente expresso em amastigotas. Esse gene foi denominado *LaLRR17* e codifica uma proteína de 72 kDa, que apresenta 6 domínios LRR na sua região central e possui similaridade com a proteína NOD3 humana (Franco, 2008). Genes homólogos ao *LaLRR17* foram identificados nos genomas de *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) braziliensis* (Franco, 2008).

Em ensaios de imunolocalização, a proteína LaLRR17 foi detectada em todo o corpo celular, enquanto que para macrófagos infectados com essa mesma espécie, a proteína está presente no amastigota e no citoplasma da célula hospedeira (Franco, 2008). Esses resultados permitem sugerir uma função dessa proteína na interação com a célula hospedeira durante a fase amastigota de *L. (L.) amazonensis*. Com o propósito de se avaliar uma possível função dessa proteína na sobrevivência intracelular de *L. (L.) amazonensis*, foram obtidas linhagens recombinantes de *L. (L.) amazonensis* expressoras do gene LRR de *L. (L.) major* (*LmLRR17*). Essas linhagens mutantes resultaram ser mais infectivas em macrófagos *in vitro* quando comparadas com a linhagem selvagem (Franco, 2008). Assim, era possível supor que a proteína LRR17 estaria interagindo com moléculas do macrófago através dos motivos LRR e modulando a resposta celular para favorecer a sobrevivência do parasita.

Quanto aos estudos para se identificar qual seria o padrão de regulação da expressão da LaLRR17 no longo do ciclo do parasita, foi visto que enquanto o RNA mensageiro do gene *LaLRR17* é encontrado em maior abundância em amastigotas (Figura 2A), em *L. (L.) major* encontra-se RNA do gene *LmLRR17* mais abundante em promastigotas de fase logarítmica do que em amastigotas (Figura 2B), revelando um padrão de regulação distinto.

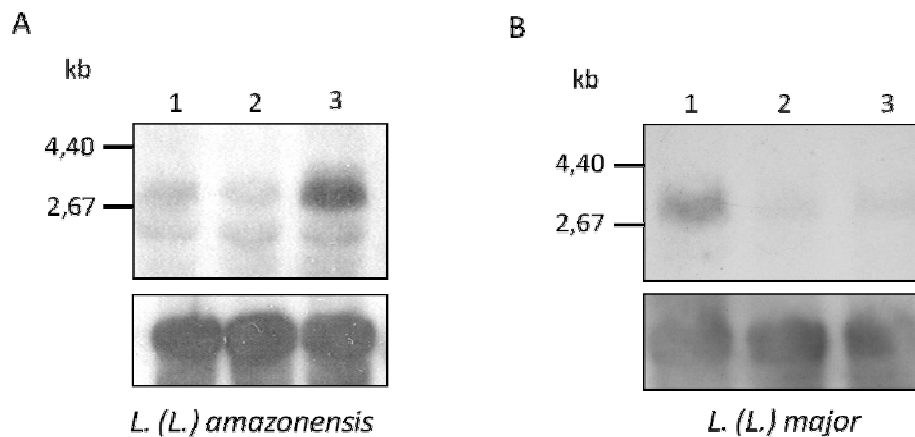


Figura 2. Caracterização da abundância do transcrito LRR17 em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*. Northern blots contendo aproximadamente 5 µg de RNA total purificado de promastigotas de fase logarítmica (1) ou estacionária (2) e de amastigotas de lesão (3) de *L. (L.) amazonensis* (A) ou de *L. (L.) major* (B). Os blots foram hibridizados com um fragmento da

ORF do gene *LaLRR17* (painéis superiores) e com um fragmento do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossômico.

Fonte: Franco (2008).

A caracterização da proteína LaLRR17 em *L. (L.) amazonensis* mostrou aspectos relevantes que sugerem sua importância na interação parasita-hospedeiro: abundância do RNA em amastigotas e secreção para o citoplasma do macrófago (Franco, 2008). Assim, esse trabalho visa caracterizar o gene homólogo em *L. (L.) major* e contribuir ao entendimento de mecanismos envolvidos na infectividade do parasita, considerando as características patológicas diferentes entre *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*.

2 OBJETIVOS

Objetivos gerais:

1. Caracterizar a proteína LRR17 de *L. (L.) major* quanto a seu padrão de expressão e localização.
2. Investigar o papel da proteína LRR17 na infecção por *L. (L.) major*.

Objetivos específicos:

1. Determinar o padrão de expressão da proteína LmLRR17.
2. Caracterizar a localização da proteína LmLRR17 em promastigotas e amastigotas de *L. (L.) major*.
3. Obter mutantes de *L. (L.) major* hiperexpressores de proteína LmLRR17 e LaLRR17.
4. Verificar se a hiperexpressão das proteínas LRR17 em *L. (L.) major* é capaz de alterar o padrão de infecção por este agente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Organismos empregados

3.1.1.1 Bactérias

3.1.1.1.1 Escherichia coli, cepa DH5 α

Células competentes da cepa DH5 α (F ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17* (*r_k⁻m_k⁺*) *deoR thi-1 pHoA supE44 λ^- gyrA96 relA1*) (Gibco-BRL) foram obtidas segundo protocolo descrito por (Sambrook, 2001) e conservadas a -70 °C em glicerol (concentração final 20%).

3.1.1.2 Leishmania sp.

Foi usada a cepa de *Leishmania (Leishmania) major* (MHOM/IL/1981/Friedlin).

3.1.1.3 Camundongos

Camundongos BALB/c fêmeas de 4 semanas provenientes do biotério de Experimentação do Departamento de Parasitologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, ICB-USP) foram utilizados neste estudo. A utilização dos camundongos seguiu as normas preconizadas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB-USP.

3.1.2 Plasmídeos

Plasmídeos	Descrição	Fonte
pT7	Vetor de clonagem que contém a ORF da luciferase <i>Luc</i> .	Promega

pCITE-2a(+)	Vetor de clonagem.	Novagen
pXG1	Vetor de expressão.	Cedido por Dr. Stephen Beverley
pcDNA3	Plasmídeo de expressão em células de mamíferos.	Invitrogen

3.1.3 Enzimas de restrição e T4 DNA ligase

As enzimas de restrição (New England BioLabs (USA); Fermentas) e a T4 DNA ligase (Invitrogen) foram empregadas segundo as especificações de cada um dos fabricantes.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cultivo de *Leishmania* sp.

Promastigotas de *Leishmania* sp foram cultivadas em meio 199 (Gibco-BRL) acrescidos de HEPES 40 mM pH 7,4, adenina 0,1 mM, hemina 0,005%, soro fetal bovino (SFB) 10% e 100 µg/mL penicilina/estreptomicina) além de 2% de urina masculina filtrada e incubados a 25 °C.

3.2.2 Purificação de DNA genômico de *Leishmania*

Em tubos Falcon foram coletados promastigotas de 40 a 50 mL de cultura em fase exponencial e centrifugados a 700 x g por 10min. O sedimento obtido foi lavado três vezes com PBS 1X sendo que antes da terceira lavagem as células foram contadas em câmara de Neubauer. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, após ser pesado, foi ressuspenso em solução de NaCl 0,15 M (1.0 mL/g de células). Paralelamente, o tampão TES (Tris-HCl 150 mM pH 7,5, EDTA 50 mM pH 8,0 e SDS 1%) foi aquecido a 65 °C e a suspensão de NaCl

contendo as células foi aplicada gota a gota com agitação leve (20 mL/g células). A seguir foi adicionado pronase (0,2 mg/ml), incubando-se por 2h a 45 °C sob agitação ocasional. Posteriormente, adicionou-se um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1,v/v/v) e agitou-se a mistura lentamente durante 1h a temperatura ambiente. Os tubos foram centrifugados a 11200 x *g* por 10min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e transferido a um béquer. O sobrenadante foi precipitado com 0,1 volume de NaOAc 3 M pH 7,0 e dois volumes de etanol 100% gelado. O DNA genômico foi enrolado em pipeta Pasteur e dissolvido em 2 mL de água bidestilada estéril. Incubou-se o DNA com RNase (20 µg/mL) a 37 °C por 1h e adicionou-se NaCl 0,2 M, SDS 0,5% e proteinase K (50 µg/mL) mantendo a mistura por 1h a 37 °C. Acrescentou-se um volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) à mesma mistura e agitou-se lentamente durante 1h a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada a 11200 x *g* por 10min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado com uma pipeta Pasteur e transferido a um béquer de 10 mL. O sobrenadante foi precipitado com 0,1 volume de NaOAc 3 M a pH 7,0 e dois volumes de etanol 100% gelado. O DNA obtido foi enrolado e lavado com etanol 70%, ressuspenso em água e armazenado a 4 °C.

3.2.3 Purificação de DNA genômico em pequena escala

Um método alternativo de extração de DNA genômico de tripanosomatídeos, baseado no protocolo experimental de (Medina-Acosta e Cross, 1993) foi também utilizado. Foram coletadas 1×10^8 células e centrifugadas a 700 x *g* por 10min, descartando-se o sobrenadante. O sedimento obtido foi ressuspenso em 150 µL de TELT (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM pH 9,0, LiCl 2,5 M e Triton X-100 4% (v/v)). A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5min. Adicionou-se 150 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e misturou-se por inversão. Em seguida centrifugou-se a mistura a 13040 x *g* durante 5min e o sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 300 µL de etanol 100% gelado e incubado a temperatura ambiente por 5min. Para finalizar, o extrato foi centrifugado por 18980 x *g* por 5min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento seco foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8,0) com RNase a uma concentração final de 0,2 mg/mL, incubado durante 1h a 37 °C e em seguida estocado a 4 °C.

3.2.4 Extração de DNA plasmidial em larga escala

A extração de DNA plasmidial em larga escala foi realizada de acordo com as especificações do kit Nucleobond® Xtra Maxi (Macherey-Nagel) partindo-se de uma colônia de *E. coli* DH5α cultivada em 3 mL de meio LB com o antibiótico apropriado e incubada a 37 °C durante toda a noite. Uma alíquota da cultura inicial diluída 1/1000 vezes foi adicionada a meio LB com antibiótico e mantida a 37 °C por 16h em agitação a 300 RPM. Após a incubação, a densidade óptica (D.O) foi avaliada e a cultura foi centrifugada a 5500 x *g* por 10min a 4 °C. O sedimento obtido foi ressuspenso em 24 mL de tampão “RES” com RNase A e homogeneizado vigorosamente. O mesmo volume de tampão de lise “LYS” foi adicionado à suspensão que foi homogeneizada por inversão e incubada a temperatura ambiente por 5min. Paralelamente, foi equilibrada a coluna com 25 mL de tampão de equilíbrio “EQU”. À amostra foi adicionado 24 mL de tampão de neutralização “NEU” e homogeneizada imediatamente por inversão de 10 a 15 vezes. A suspensão obtida foi transferida à coluna e esta foi lavada com 15 mL de tampão de equilíbrio “EQU”. Após coletar todo o filtrado, o filtro da coluna foi descartado e adicionou-se 25 mL de tampão de lavagem “WASH” à coluna. O DNA plasmidial foi eluído com 15 mL de tampão de eluição “ELU” e coletado em tubos de centrífuga de 50 mL. O DNA plasmidial obtido foi precipitado com 10,5 mL de isopropanol, misturado em agitador tipo vortex e mantido por 2min a temperatura ambiente, seguido de uma centrifugação a 15000 x *g* por 30min a 4 °C. Adicionou-se 5 mL de etanol 70% ao extrato plasmidial final, centrifugando-o a 15000 x *g* por 5min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o DNA ressuspenso em água estéril ou tampão “TE”.

3.2.5 Extração de DNA plasmidial em pequena escala

A extração de DNA plasmidial foi realizada com o método modificado de Birnboim e Dolly (1979). A cultura foi submetida a centrifugação durante 1min a 21910 x *g* para sedimentação das bactérias. O sobrenadante foi descartado e o sedimento obtido foi ressuspenso em 300 µL da solução I (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0 e RNase 100 µg/mL) por agitação em vortex. A seguir, adicionou-se 600 µL da solução II (NaOH 0,2 N

e SDS 1%) e, finalmente, 450 µL de solução III (KOAc 5M e ácido acético glacial 11,5%). Essa suspensão foi misturada por inversão e mantida em gelo por 5min para posterior centrifugação a 21910 x *g* por 8min. O sobrenadante, que contém o DNA plasmidial, foi transferido para um novo tubo tipo eppendorf. Ao sobrenadante foi acrescentado 750 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e misturado por inversão. Centrifugou-se o material a 21910 x *g* por 2min e foi recuperada a fase aquosa e transferida para um novo tubo, no qual foi adicionado isopropanol (2/3 do volume) para homogeneização por inversão. Incubou-se o extrato a temperatura ambiente por 15 min para centrifugação pelo mesmo tempo a 18890 x *g* a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e 700 µL de etanol 70% gelado foi adicionado. O extrato homogeneizado foi centrifugado por 2min a 13520 x *g*. O sobrenadante foi descartado e, após o DNA secar a temperatura ambiente, foi ressuspenso em água bidestilada estéril e armazenado a -20 °C.

3.2.6 Eletroforese de DNA

Fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 0,5X (Tris-acetato 20 mM e EDTA 0,5 mM pH 7,0) contendo brometo de etídio (0,75 µg/mL). Os géis foram visualizados em um transiluminador ultravioleta e fotografados em Eagle Eye (Stratagene). O marcador de 1 kb (Gibco BRL) e o fago lambda λ (Gibco BRL) digerido com a enzima *Hin* dIII foram usados como marcadores de peso molecular.

3.2.7 Southern Blot

3.2.7.1 Eletroforese e transferência de DNA genômico

DNA genômico purificado foi digerido com a enzima *Sma* I e em seguida separado em gel de agarose 0,8%. Após a corrida do gel foi incubado em solução denaturante (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) por 20min. Posteriormente incubou-se o gel em solução neutralizante (Tris-HCl 1 M pH 7,4, NaCl 1,5 M) durante 20min e, finalmente, em SSC 10X (NaCl 1,5 M e C₆H₅Na₃O₇·2H₂O 0,15 M). O gel foi transferido a uma membrana de nylon Hybond N⁺ (GE

Healthcare) em um sistema semi-seco durante toda a noite e o DNA foi fixado a $1200 \times 100 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ usando um Spectro Linker™X-1000 (Spectronics Corp).

3.2.7.2 Marcação de sondas

A obtenção de DNA para marcação radioativa foi mediante digestão com a enzima *Spe I* do vetor pXG1 para a liberação da ORF que codifica a *Neomicina fosfotransferase* (*Neo*). Paralelamente, foi obtido o fragmento correspondente à ORF do gene *LmLRR17* por digestão com *Bam HI* da construção pXG1*LmLRR17*. Uma vez separadas as bandas por eletroforese, usando L.M.P agarose (*Low Melting Point*) (GIBCO-BRL) 0,8%, foi recuperada cada banda esperada de DNA e coletadas em tubos tipo eppendorf. A marcação de sondas foi feito com o kit de marcação de DNA HexaLabel™ (Fermentas®) seguindo o método desenvolvido por Feinberg e Vogelstein (1983), na presença de $5 \mu\text{l}$ [α - ^{32}P]-dATP (Amersham-Pharmacia, atividade específica de $3.000 \mu\text{Ci}/\text{mMol}$).

3.2.7.3 Hibridização

Para isso, as membranas Hybond-N+ (Amersham®) foram incubadas em 10 mL de tampão de pré-hibridação (formamida 50%, SSC 5X, Denhardt 5X e SDS 1%) por 2h a 42°C . Em seguida, $500 \mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de salmão adicionada à sonda marcada foram fervidos a 100°C por 5min e adicionados a 10 mL de tampão de pré-hibridação. Em uma sacola plástica, deixou-se hibridizando a sonda com a membrana a 42°C durante toda a noite. A membrana foi lavada duas vezes durante 15min com uma solução de SSC 2X e SDS 0,1% a temperatura ambiente e, em seguida, mais duas vezes com uma solução de SSC 0,5X e SDS 0.1% a 60°C durante 15min. Finalizadas as lavagens, a membrana foi exposta a filmes para raios X Kodak®. O controle positivo foi realizado misturando-se 50 ng de DNA com $1 \mu\text{L}$ de solução desnaturante, incubando-se a mistura por 10min a temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se $2 \mu\text{L}$ de solução neutralizante. A totalidade da solução foi aplicada em 1 cm^2 da membrana de nylon Hybond N+ (Amersham), secada ao ar e fixada sob luz UV.

3.2.8 Clonagem molecular

3.2.8.1 Preparação do vetor

Foram usados os vetores descritos previamente e enzimas empregadas para liberação do inserto.

3.2.8.2 Preparação do inserto

Os fragmentos a serem subclonados foram isolados por eletroforese em géis de agarose e purificados com o kit de extração *QIAquick* (QIAGEN). Após a eletroforese das amostras, o fragmento de interesse foi cortado e transferido a um tubo tipo eppendorf. Adicionou-se três volumes de tampão “QG” para incubação a 50°C por 10min, homogeneizando vigorosamente a cada 2min. Em seguida, foi aplicado um volume de isopropanol e a totalidade da solução foi transferida a uma coluna *QIAquick*. Essa foi centrifugada, por 1min a 21910 x *g* e o filtrado foi descartado. Adicionou-se 750 µL de tampão “PE” para lavagem da coluna, centrifugou-se por 1min descartando-se o filtrado. A coluna foi colocada em um tubo tipo eppendorf e o DNA aderido foi eluído com 50 µL de água destilada estéril e guardado a -20 °C.

3.2.8.3 Ligação

A reação de ligação foi realizada em tampão de ligação 1X (Invitrogen®) (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 101 mM e polietilenoglicol-8000 2,5%) na presença de 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen). A reação foi incubada a 16 °C durante toda a noite. Todas as ligações foram realizadas mantendo-se a relação molecular de 4:1 (inserto:vetor).

3.2.8.4 Transformação e plaqueamento

Volumes de 200 µL de células competentes foram misturados com 50 ng da ligação e incubados em gelo por 20min. Em seguida incubou-se a mistura a 42 °C por 90seg para

posterior incubação em gelo por 3min. Foi adicionado 800 µL de meio líquido LB às células e estas foram incubadas por 1h a 37 °C. Transcorrido este tempo, a cultura foi plaqueada em meio LB com o antibiótico apropriado e incubada a 37 °C durante 16h.

3.2.9 *Western blot*

3.2.9.1 Eletroforese e transferência protéica

Extratos protéicos totais de parasitas foram obtidos ressuspensando-se células lavadas três vezes em PBS 1X, em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, SDS 2%, fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM, benzamidina 2 mM, leupeptina 10 mM, fenantrolina 5 mM e aprotinina 1 µg/mL) de tal forma que 3×10^7 células fossem ressuspensas em 5 µL de tampão. As amostras foram fervidas por 3min, centrifugadas a $21910 \times g$ durante 10min e o sobrenadante foi misturado com um volume de tampão de amostra 2X (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, glicerol 20% e β -mercaptoetanol 200 mM) para SDS-PAGE e submetidas à separação em SDS-PAGE 12%. As proteínas separadas foram transferidas a membranas de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare®) em tampão de transferência (Tris-HCl 65 mM pH 7,6, glicina 194 mM, SDS 0,037% e metanol 20%) utilizando um sistema semi-seco (BIORAD). Para a transferência foi usada amperagem constante correspondente à fórmula: área da membrana $\times 0,8 \text{ mA.cm}^{-2}$, durante 75min. Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau S 0,5% em ácido acético 1% para evidenciar a correta transferência e separação das proteínas.

3.2.9.2 *Imunoblotting*

Uma vez as proteínas foram transferidas à membrana, esta foi descorada completamente com tampão de transferência e lavada com TBST (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%). Para o bloqueio, a membrana foi incubada em solução de leite desnatado 5% (Nestle®) em TBST por pelo menos 1h a temperatura ambiente ou durante toda a noite a 4 °C. Descartou-se a solução de bloqueio e a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído em uma solução de leite desnatado 3% dissolvido em TBST

durante 1h sob agitação leve. Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com TBST durante 5min e incubada com anticorpo secundário (*Affinity Purified Antibody peroxidase Labeled Goat anti-rabbit IgG (H+L)*; *Affinity Purified Antibody peroxidase Labeled Goat anti-mouse IgG (H+L)* *Human Serum Absorbed/KPL*) durante 1h sob agitação leve. Terminada a incubação, a membrana foi lavada duas vezes por 10min com TBST e uma vez com TBS (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e NaCl 150 mM). Após as lavagens, foi adicionado o substrato quimioluminescente (SuperSinal West Pico Chemiluminiscent Substrate, Pierce), levando-se em conta que para cada cm² da membrana foi aplicado 0,1 mL da solução, deixando-se incubar por 5min no escuro. Transcorrido esse tempo, foi removido o excesso e a membrana foi exposta por diferentes tempos a filme Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare) para posterior revelação e fixação.

3.2.10 Imunofluorescência

Para os ensaios de localização da proteína LmLRR17 ou LaLRR17 de clones transfectados, coletaram-se 3x10⁶ parasitas que foram lavados três vezes com PBS 1X durante 5min a 700 x g. O sedimento final foi ressuspenso em PBS 1X. Da suspensão de parasitas, foram retiradas alíquotas de 10 µL e adicionadas em cada um dos poços de lâminas para microscopia (24 orifícios). Após 15min, retirou-se o excesso e deixou-se secar a temperatura ambiente. As células foram fixadas com metanol 100% por 1min. As lâminas secas foram lavadas com PBS 1X. As células fixadas foram bloqueadas e permeabilizadas com 10 µL de BSA 3% diluída em PBS 1X, Triton-X100 0,1% durante 45min em câmara úmida. O anticorpo primário foi diluído em uma solução de BSA 3% em PBS 1X, Triton-X100 0,1% para incubação durante toda a noite a 4 °C em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS 1X, Triton-X100 0,1% durante 5min. A seguir, foi adicionado 10 µL do conjugado Alexa Fluor 488 (*goat anti-mouse IgG antibody*; *goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody/Invitrogen*) diluído em uma solução de BSA 3% em PBS 1X, Triton-X100 0,1% e incubadas a temperatura ambiente em câmara úmida durante 1h, protegidas da luz. Transcorrido o tempo de incubação, foram lavadas as lâminas uma vez com PBS 1X, Triton-X100 0,1% e três vezes com PBS 1X. Adicionou-se 10 µL de DAPI (4',6-diamidino-2-

phenylindole, dihydrochloride, 5 µg/mL) diluído em PBS 1X, sendo incubando por 5min protegido da luz. Finalmente, foram feitas três lavagens com PBS 1X e montaram-se as lâminas adicionando uma gota de Fluoromount™ (EMS) ao poço ainda úmido. Como controles positivos utilizaram se soros α -*L. (L.) amazonensis* a um título de 1:150, que foram obtidos a partir de camundongos BALB/c infectados com 1×10^6 promastigotas metacíclicos de *L. (L.) amazonensis*.

3.2.11 Ensaios de viabilidade celular pelo teste de MTT

Com o objetivo de se estabelecer as concentrações inibitórias do antibiótico de seleção Geneticina (G418) (Invitrogen) para culturas de promastigotas de *L. (L.) major* transfectadas, foi utilizado o teste de MTT em microplaca de 96 poços descrito por Zauli-Nascimento et al. (2010). Para isso, aproximadamente 3×10^6 promastigotas foram cultivadas em placas de 96 poços (volume final de 150 µL de meio 199) na ausência ou na presença das seguintes concentrações de G418: 0,74; 2,2; 6,6; 20 e 60 µg/mL a 25 °C por 24h. Após o período de incubação, foi adicionado em cada poço 30 µl de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetitiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio; USB Corporation) a 5 mg/mL. A placa foi mantida a 25 °C por 2h e, em seguida, adicionou-se 50 µl de SDS 20% para lise celular. Os valores de D.O. das suspensões celulares foram obtidos espectrofotometricamente medindo-se a absorbância a 595 nm. Os valores de D.O. foram convertidos para porcentagens de viabilidade celular em relação à D.O. do grupo controle que não recebeu a droga. As concentrações de G418 necessárias para inibir as culturas em 50% e 90% (CI_{50} e CI_{90}) foram calculadas utilizando-se o software Origin 7.5 (OriginLab Data Analysis and Graphing Software, USA).

3.2.12 Transfecção de *L. (L.) major*

3.2.12.1 Construções

O fragmento de 1649 pb flanqueado com *Bam* HI e *Sac*I do pT7 contendo a ORF do gene *Luc* foi extraído e inserido nos sítios *Bam*HI e *Sac*I do vetor pCITE-2^a(+) e designado

pCITE-*Luc*. Um fragmento de 1715 pb gerado pela digestão *Bam* HI e *Bgl* II foi então inserido no vetor pXG1, linearizado com *Bam* HI. A construção final (pXG1-*Luc*), tem um tamanho de 8536 pb.

3.2.12.2 Eletroporação

Linhagens mutantes de *L. (L.) major* foram obtidos utilizando-se o protocolo de transfecção de tripanosomatídeos desenvolvido por Coburn e Beverley (1990). Resumidamente, promastigotas de fase exponencial de crescimento de *L. (L.) major* foram submetidas a centrifugação a 700 x *g* por 10min. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento obtido foi ressuspenso em 10 mL de tampão de eletroporação (EPB) (HEPES 21 mM pH 7,5, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0,7 mM e glicose 6 mM) para posterior centrifugação sob as mesmas condições, desprezando-se o sobrenadante. As células foram ressuspenso em EPB a uma densidade de 10⁸/mL e mantidas em gelo. Em tubos tipo eppendorf, foram misturados 400 µl da suspensão celular (equivalente a 4x10⁷ células) e 50 µg das diferentes construções de DNA (pXG1-*LmLRR17*, pXG1-*LlLRR17*, pXG1-*Luc* e pXG1), exceto para o grupo controle que não recebeu DNA. A mistura foi transferida a cubetas de 0,2 cm mantidas em gelo e a eletroporação realizada em voltagem de 0,45 kV (2,25 kV/cm) e 500 µF de capacitância. Em seguida, as cubetas foram mantidas em gelo e o volume total da cultura transfectada foi transferido a 10 mL de meio 199 sem antibiótico para ser incubadas por 24h a 25 °C. Transcorridas 24h, a droga de seleção foi adicionada às culturas. As células transfectadas foram mantidas em meio líquido por aproximadamente um mês, com troca de meio a cada 4 a 7 dias e posteriormente foram plaqueadas com alça de Drigalski em meio semi-sólido (meio 199, biopterina 1,2 µg/ml, ágar 1% e urina 2%) de modo que a superfície permanecesse úmida. As placas foram vedadas para evitar desidratação e contaminação. A seleção de colônias foi realizada entre o quarto e décimo dia para culturas controle sem antibiótico e após cerca de 12 dias para células transfectadas em meio contendo o antibiótico G418 (60 µg/ml).

3.2.12.3 Obtenção de clones

As colônias de *Leishmania* foram coletadas e transferidas para placas de 96 poços, usando ponteira estéril e ressuspensas em meio 199 contendo urina 2% e o antibiótico de seleção. As culturas foram posteriormente expandidas em placas de 24 poços. Por último, foram transferidas a garrafas de 25 cm².

3.2.13 Indução da perda do epissomo

Clones transfectados com diferentes construções (pXG1-*LmLRR17*, pXG1-*LaLRR17*, pXG1-*Luc* e pXG1) foram cultivados por até 20 passagens em meio 199 na ausência de antibiótico de seleção G418 a 25°C. Após este período foram realizadas diluições seriadas em meio 199 na presença e ausência do antibiótico G418 (150 µg/mL) de cada um das linhagens recombinantes e da cepa selvagem em placas de cultura de 96 poços. As culturas foram mantidas a 25 °C. O ensaio foi feito em quadruplicata e após uma semana de incubação foi avaliada a viabilidade de todas as linhagens por microscopia óptica.

3.2.14 Atividade de luciferase

A atividade de luciferase foi avaliada a partir do protocolo delineado por (Roy et al., 2000) e das instruções descritas pelo fabricante do kit *Luciferase Assay System* (Promega). Basicamente, as células expressando o gene da luciferase foram centrifugadas a 700 x *g* durante 10min para lavagem com PBS 1X. Após duas lavagens em PBS 1X, o sedimento obtido foi diluído 1/10 em série em tampão de lise (*Luciferase Assay System*, Promega), para se obter 10⁷ até 10¹ parasitas. As diluições foram homogeneizadas em agitador tipo vortex por 15seg e centrifugadas por 12000 x *g* durante 15seg a temperatura ambiente. Em diferentes tubos BD arredondados de 5 mL (Falcon®) contendo 100 µL de substrato de luciferase (*Luciferase Assay System*, Promega) mantidos em gelo, foram adicionadas alíquotas de 20 µl do sobrenadante de cada diluição. As amostras foram analisadas imediatamente em luminômetro (Luminometer Lumat LB 9507) e os valores obtidos

expressam as unidades relativas de luz (RLU) para as reações enzimáticas em cada um dos tubos.

3.2.15 Análise de proteínas presentes em sobrenadante de cultura de promastigotas

A análise de proteínas foi realizada usando o kit Amicon Ultra-15 seguindo as especificações do fabricante. O sobrenadante de 2×10^7 promastigotas de fase logarítmica de *L. (L.) major* foi aplicado dentro de cada coluna até concentrar o volume mínimo possível dentro da amostra para ser submetida a análise por *western blot*.

3.2.16 Infecção de macrófagos

3.2.16.1 Obtenção de macrófagos a partir de monócitos de medula óssea

Camundongos BALB/c foram sacrificados em câmara de CO₂. Os fêmures de cada animal foram retirados, conservando-se as epífises. Em ambiente estéril, os ossos foram lavados com PBS 1X e em seguida foram cortadas cada uma das epífises. Com uma seringa contendo 5 mL de meio R2030 (meio RPMI 1640 acrescido de 30% de sobrenadante de cultura de células L929 e 20% de SFB) inseriu-se uma agulha de 21G na luz do canal medular para lavagem de seu conteúdo. O material foi coletado em placas de Petri plásticas e incubado a 37 °C com 5% CO₂ durante 6 ou 7 dias sendo que no terceiro ou quarto dia, foi adicionado meio fresco R2030 (5 a 6 mL). Ao final de uma semana as placas de Petri foram incubadas em gelo por 15min e os macrófagos diferenciados foram descolados adicionando-se 6 mL de meio R105 (meio RPMI 1640 acrescido de 10% de sobrenadante de cultura de células L929 e 5% de SFB) gelado, por raspagem com *scraper*. A suspensão contendo os macrófagos foi centrifugada a 700 *g* por 10min a 4 °C e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio R105 para contagem em câmara de Neubauer.

3.2.16.2 Infecção de macrófagos

Aproximadamente 3×10^5 macrófagos derivados de monócitos de medula óssea de camundongos (300 μ L) foram adicionados em cada um dos orifícios de placas de 24 poços contendo uma lamínula circular de 13 mm de diâmetro. Os macrófagos foram incubados por 24h a 37 °C com atmosfera de 5% CO₂ para que aderissem às lamínulas. Após este período foi descartado o sobrenadante e cada poço foi lavado três vezes com PBS 1X aquecido. Em seguida foram adicionados promastigotas de *L. (L.) major* selvagem ou de clones transfectados com diferentes construções (pXG1-*LmLRR17*, pXG1-*LaLRR17*, pXG1-*Luc* e pXG1) respeitando-se a proporção de 15 parasitas por macrófago. As culturas foram incubadas por períodos de 16 e 72h de infecção a 33 °C com atmosfera de 5% CO₂. Transcorridas as primeiras 16 horas, foi retirado o meio e as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X morno e posterior adição de meio R105 para infecções de tempos superiores. Após a infecção, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS 1X morno, fixadas durante 1min com metanol 100% e coradas com o kit *Instant Prov* (Newprov). As lâminas coradas foram observadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E200 para contagem de células infectadas e número de amastigotas por macrófago. O índice de infecção foi calculado multiplicando-se a porcentagem de células infectadas pelo número médio de amastigotas em 100 células infectadas.

3.2.16.3 Obtenção de amastigotas a partir de culturas de macrófagos

Macrófagos de medula óssea foram infectados com *L. (L.) major* selvagem e com as linhagens transfectadas obtidas com as diferentes construções (pXG1-*LmLRR17*, pXG1-*LaLRR17*, pXG1-*Luc* e pXG1); mantendo-se a proporção de 15 parasitas para cada macrófago. Em placas de Petri, os macrófagos foram infectados durante 16 horas a 33 °C em meio R105 em atmosfera de 5% CO₂. Após este período o meio de cultura foi descartado. A superfície da placa com os macrófagos infectados aderidos foi lavada uma vez com PBS 1X aquecido e foi adicionado meio R105 para incubação por mais 48 horas sob as mesmas condições. Finalizado o tempo, os macrófagos infectados foram lavados com PBS 1X aquecido,

adicionando-se em seguida 5 mL de PBS 1X para sua descolagem com *scraper*. O conteúdo recuperado foi homogeneizado e transferido para um novo tubo para adição de SDS 0,01% e submetido a 8 passagens por seringa (agulha 29G). Em seguida a solução foi centrifugada a $64 \times g$ por 8min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, transferindo-se a fração sobrenadante que continha as formas amastigotas para um novo tubo e centrifugando o material a $690 \times g$ durante 10min. O sedimento obtido foi ressuspensão em 1 mL de RPMI e os amastigotas foram contados em câmara de Neubauer para subsequente inoculação em camundongos BALB/c.

3.2.17 Infecção *in vivo*

3.2.17.1 Infecção de camundongos BALB/c

Cerca de 1×10^6 promastigotas ou amastigotas de *L. (L.) major* selvagem ou de clones obtidos de transfeções, ressuspensos em 50 μL de PBS 1X foram inoculados por via subcutânea na pata posterior esquerda (PPE) de fêmeas de camundongos BALB/c (5 animais por grupo). As espessuras da pata infectada e da pata posterior direita (PPD) não infectada foram medidas semanalmente a partir da quarta semana da infecção. A espessura da lesão foi representada pela diferença entre as medidas da PPE e PPD.

3.2.17.2 Isolamento de amastigotas de lesão

Após o sacrifício dos animais, as lesões foram removidas com um bisturi. O material interno foi recuperado, raspando e cortando em pequenos pedaços. O tecido infectado recuperado foi homogeneizado em PBS utilizando-se um homogeneizador de tecido e a seguir foi centrifugado a $64 \times g$ durante 8min, recuperando-se o sobrenadante que foi submetido a 8 passagens por seringa (agulha de 25G). Em seguida a solução foi centrifugada a $40 \times g$ por 8min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, transferindo-se a fração sobrenadante que continha as formas amastigotas para um novo tubo e centrifugando o material a $700 \times g$ durante 10min. O sedimento obtido foi ressuspensão em 1 mL de PBS 1X e os amastigotas foram contados em câmara de Neubauer para subsequente extração de proteínas totais.

3.2.18 Imunização de camundongos BALB/c com DNA plasmidial

Alíquotas de 50 µg de DNA do vetor de expressão em células de mamíferos (pcDNA) contendo a ORF do gene *LmLRR17* foram inoculadas em cada músculo tibial posterior de camundongos BALB/c por via intramuscular. Foram realizadas três imunizações a cada 15 dias e o soro coletado 10 dias após a última imunização.

3.2.18.1 Obtenção de soro

O sangue coletado de 5 camundongos BALB/c foi incubado durante 1h a 37 °C, seguido de 1h a 4 °C e centrifugado a 11180 x *g* por 10min. O sobrenadante obtido foi transferido a um tubo novo, adicionando-se glicerol a uma proporção de 1:1 e guardado a -20°C.

3.2.19 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism, CA, USA (one-way ANOVA e Bonferroni's post test). O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da proteína LRR17 de *L. (L.) major*

4.1.1 Análise da seqüência primária da proteína LmLRR17

A seqüência do gene LmLRR17 foi obtida no banco de dados do genoma de *L. (L.) major* (LmjF17.0900). O gene *LmLRR17* codifica uma proteína de 675 aminoácidos (AA) com uma massa predita de 73212.2 Da e um PI teórico de 5,54. A análise da seqüência primária de aminoácidos predita mostra ausência de sítios para adição de âncoras de glicofosfatidilinositol. Também não foram encontradas regiões de localização transmembrana. Por outro lado, na seqüência de AA predita foi identificado um domínio de repetições ricas em leucinas contendo 6 cópias do motivo *Leucine-rich repeat, ribonuclease inhibitor subtype* (IPR003590), também denominado cd00116 (LRR_RI - *Leucine-rich repeats, ribonuclease inhibitor-like subfamily*). Essas repetições estão presentes na região central da proteína aproximadamente compreendida entre os AA 300 e 460.

A análise da seqüência primária quanto à presença de sítios para proteólise permitiu a identificação de vários sítios susceptíveis à clivagem por diversas enzimas (Bairoch et al., 2005). Dentre esses, podemos ressaltar seqüências que permitem clivagem por Caspase 1 (posição 371), por prolina-endopeptidase (posições 253, 360, 419 e 553) e por trombina (posição 110).

Na seqüência predita da proteína LmLRR17 não foi encontrado peptídeo sinal. Foram encontrados na seqüência de AA 18 possíveis sítios de fosforilação em resíduos de Serina, 12 de Treonina e 3 de Tirosina, como também 5 sítios preditos para O-glicosilação.

A comparação da seqüência de AA com outras seqüências disponíveis em bancos de dados, através do programa *BlastP*, permitiu identificar dentre as proteínas com altas porcentagens de similaridade, as proteínas homólogas de *L. (L.) amazonensis* (ACJ66722), *L.(L.) infantum* (LinJ17_V3.1000) e *L. (L.) braziliensis* (LbrM17_V2.0920). Seqüências similares

à proteína LmLRR17 (LmjF17.0900) também foram encontradas em *T. brucei* (Tb927.5.2270) e *T. cruzi* (Tc00.1047053511315.30) (Tabela 1).

Tabela 1-Graus de conservação da proteína LRR17 de *L. (L.) major* (LmjF17.0900), de *L. (L.) amazonensis* (ACJ66722), *L. (L.) infantum* (LinJ17_V3.1000), *L. (V.) braziliensis* (LbrM17_V2.0920), *T. brucei* (Tb927.5.2270) e *T. cruzi* (Tc00.1047053511315.30).

Identidade de AA (%)	LmjF17.0900	ACJ66722	LinJ17_V3.1000	LbrM17_V2.0920	Tb927.5.2270	Tc00.1047053511315.30
LmjF17.0900	100	92	94	78	38	40
ACJ66722		100	92	79	38	40
LinJ17_V3.1000			100	78	38	39
LbrM17_V2.0920				100	38	41
Tb927.5.2270					100	55
Tc00.1047053511315.30						100

Similaridade de seqüências também foi identificada com proteínas chamadas *t-complex-associated testis-expressed protein*, presentes em mamíferos e com homólogos hipotéticos em *Xenopus (Silurana) tropicalis* (NCBI XP_002942200.1) (valor de $E = 6e^{-26}$, identidade 30% (121/406), similaridade 44% (175/406). Outro grupo de proteínas também apontado como apresentando similaridade com a proteína LmjF17.0900 foram as proteínas da família NOD. Por exemplo, a comparação com a proteína da família NLR contendo o domínio CARD3 de *Bos taurus* (NCBI XP_584462.3) resulta em valor de $E = 3e^{-09}$, identidade de 33% (54/167) e similaridade de 51% (85/167).

4.1.2 Análise do padrão de expressão da proteína LmLRR17

Para obter anticorpos específicos que reagissem com a proteína LmLRR17 foi desenhado um peptídeo sintético, escolhido com base no alinhamento de seqüências correspondentes às proteínas LRR17 de *L. (L.) major* (LmjF17.0900), *L. (L.) amazonensis* (ACJ66722), *L. (L.) infantum* (LinJ17_V3.1000) e *L. (V.) braziliensis* (LbrM17_V2.0920) (Figura 3).

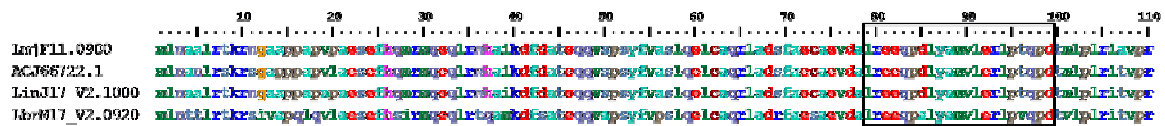


Figura 3. Alinhamento da seqüência de AA das proteínas LmLRR17 (LmjF17.0900) com as proteínas de *L. (L.) amazonensis* (ACJ66722), *L. (L.) infantum* (LinJ17_V3.1000) e *L. (V.) braziliensis* (LbrM17_V2.0920). O peptídeo sintetizado correspondente aos AA 79 a 99 da seqüência de *L. (L.) amazonensis*, assinalada pelo quadro preto. Alinhamento obtido através do programa BioEdit.

O anti-soro foi obtido através da imunização de coelhos (soro α -LRR-N). Esse anti-soro, quando utilizado em ensaios de *immunoblotting* contra extratos totais de *L. (L.) major*, confirmou a presença da proteína nativa com a massa predita de 72 kDa nas formas promastigotas de fase logarítmica e estacionária e em amastigotas de *L. (L.) major*. Foi demonstrada maior expressão protéica na fase logarítmica, evidenciando um aumento de 1,8 vezes quando comparado à expressão na fase estacionária. O aumento da expressão em parasitas de fase logarítmica foi ainda mais notável em relação à expressão em formas amastigotas (2,3 vezes). Um soro obtido contra extrato total de *Leishmania* foi usado como normalizador para a quantidade de proteína aplicada a cada canaleta (Figura 4A).

Por outro lado, foram observadas bandas de tamanho molecular superior a 72 kDa em extratos protéicos de todas as fases, com maior abundância na fase logarítmica. É possível que essa marcação seja produto de uma insuficiente dissociação protéica levando a

uma migração anormal dessas proteínas. A abundância desses complexos correlaciona-se com a diferença de expressão nos diferentes estágios do parasita. Além disso, foi observada uma banda com tamanho molecular aparente de aproximadamente 50 kDa nos extratos das fases logarítmica e amastigota, com maior expressão na fase amastigota, sugerindo que a proteína LmLRR17 possa sofrer processamento por clivagem (Figura 4A). Por outro lado, não podemos excluir que a detecção dessa proteína seja resultado da reatividade inespecífica do anticorpo.

O soro pré-imune reagiu fracamente com algumas proteínas em parasitas de fase logarítmica de *L. (L.) major* (Figura 4B), mas as bandas produto dessa reação cruzada não se sobrepõem às bandas reveladas pelo soro imune.

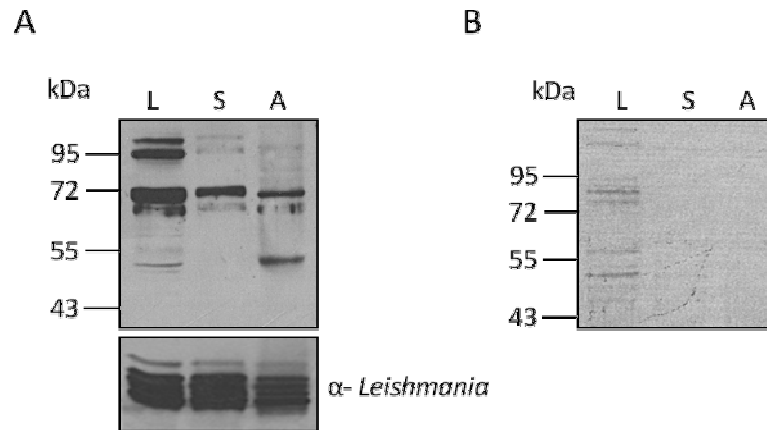


Figura 4. Padrão de expressão da proteína LRR17 em *L. (L.) major*. Extratos protéicos totais de 2×10^7 promastigotas de fase logarítmica (L), estacionária (S) e de amastigotas purificados de lesão de camundongo BALB/c (A). Os extratos protéicos foram separados em SDS-PAGE 12% e transferidos para membranas de nitrocelulose. A membrana foi incubada com o soro α -LRR-N (A) ou com o soro pré-imune (B) diluídos 1:2000. Como normalizador foi utilizado soro obtido de coelho imunizado com antígeno total de *Leishmania* (1:3000).

4.1.3 Secreção em promastigotas

Com ajuda do soro α -LRR-N foi evidenciada a secreção da proteína LmLRR17 em promastigotas de fase logarítmica de *L. (L.) major* (Figura 5). Para isso, parasitas foram incubados por 24 horas em meio de cultura sem SFB. Ao final desse período, 97,3% dos parasitas estavam móveis e, portanto, viáveis. O sobrenadante concentrado foi analisado por *immunoblotting*. A banda imunoreativa com aproximadamente 72 kDa foi observada tanto no extrato de parasitas como no sobrenadante (Figura 5), indicando que a proteína LmLRR17 é secretada. As bandas protéicas menores presentes no extrato obtido a partir do *pellet* de parasitas são produto do possível processamento da proteína nativa de *L. (L.) major* ou da reação inespecífica. A incubação de réplicas das membranas com soro α -GAPDH mostrou ausência de reatividade no sobrenadante, como esperado para uma proteína citosólica não secretada (Figura 5).

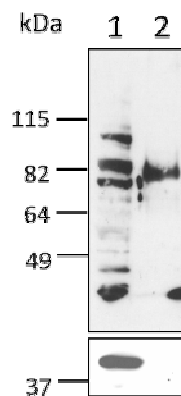


Figura 5. Detecção da proteína nativa em sobrenadante de cultura de promastigotas de fase logarítmica de *L. (L.) major*. Extratos protéicos totais de 2×10^7 promastigotas de fase logarítmica (1) e sobrenadante concentrado a partir do volume de cultura contendo 2×10^7 parasitas de fase logarítmica (2). Os extratos protéicos foram separados em SDS-PAGE 12% e transferidos para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os soros α -LRR-N (1:2000). Como controle foi usado um soro α -GAPDH (1:3000).

O soro α -LRR-N também foi utilizado em experimentos de imunofluorescência com promastigotas ou macrófagos infectados para determinar a localização subcelular da proteína nativa em *L. (L.) major*. Apesar da reatividade dos soros nos ensaios de *western blot*, em ensaios de imunofluorescência não se obtiveram os resultados esperados. Foi observada uma elevada reatividade do soro pré-imune quando comparada com a evidenciada com os soros α -LRR-N, assim não podiam ser usados para a determinação da localização subcelular (dados não apresentados).

4.2 Estudo funcional da proteína LRR17 em *L. (L.) major*

A análise funcional das proteínas LmLRR17 e LaLRR17 foi realizada mediante o estudo do fenótipo apresentado em linhagens recombinantes de *L. (L.) major*, hiperexpressoras da cópia nativa *LmLRR17* e expressoras do gene *LaLRR17*. Foi utilizado o vetor de expressão pXG1 para a obtenção de linhagens recombinantes de *Leishmania*. Esse vetor pXG1 contém um gene de resistência à G418 flanqueado por regiões 5' e 3' UTRs do gene *dehidrofolato redutase timidilato sintase (DHFRS)* de *L. (L.) major* e possui também um sítio de clonagem flanqueado por uma região 5'UTR que permite a maturação do mRNA. Como controle experimental foi também obtida uma linhagem de *L. (L.) major* expressando *luciferase (Luc)*.

4.2.1 Obtenção de linhagens de *L. (L.) major* expressores de luciferase

Construiu-se um plasmídeo controle contendo o gene da *luciferase*. A fase aberta de leitura do gene que codifica a *luciferase* de *Photinus pyralis* tem 1700 pb e foi isolada do plasmídeo pT7 (Promega) a partir da digestão com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Sac* I. O fragmento obtido foi purificado e clonado no vetor pCITE-2a(+) igualmente digerido com as mesmas enzimas para sua posterior ligação, obtendo uma construção [pCITE-2a(+) *Luc*]. Em

seguida foi digerida essa última construção com as enzimas *Bam* HI e *Bgl* II, para permitir a liberação da ORF do gene *Luc* mais uma pequena seqüência do plasmídeo de clonagem, que permitiu a inserção no vetor pXG1 tanto no sitio 5' como no 3' com a enzima *Bam* HI. Obteve-se uma construção final de 8500 pb chamada pXG1-*Luc* (Figura 6).

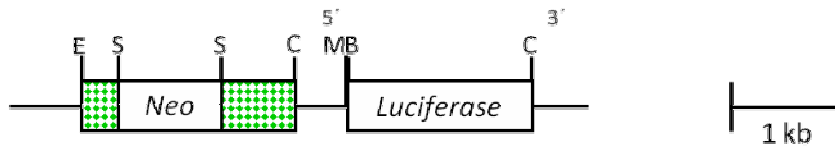


Figura 6. Esquema representativo da construção pXG1-*Luc*. O gene *Neomicina fosfotransferase* (*Neo*) presente no vetor foi usado como marcador de seleção. Regiões 5' e 3' UTR do gene *DHFR-TS* são representados pelas caixas verdes. Sítios de restrição são indicados pelas letras: E, *Eco* RI, S, *Spe* I, C, *Sac* I, B, *Bam* HI e M, *Sma* I.

Promastigotas de *L. (L.) major* foram então transfectados com a construção pXG1-*Luc* e selecionadas em concentrações de 60 µg/ml de G418, correspondente ao IC₉₀ do parasita. Às culturas controle, transfectadas na ausência de DNA, foi adicionado o antibiótico e, após uma semana, observou-se a morte dos parasitas que resistiram ao choque elétrico, confirmando dessa maneira que *L. (L.) major* não possui resistência ao antibiótico de seleção.

Por outro lado, as células que foram transfectadas com o plasmídeo resistiram à adição de G418. Aproximadamente um mês após a transfecção, foram plaqueadas as células para a obtenção de clones e da mesma forma, observou-se que o controle não prosperou em meio semi-sólido com antibiótico. Clones resultantes das transfecções com a construção pXG1-*Luc* foram expandidos em meio líquido e apresentaram morfologia normal e mobilidade celular característica de *Leishmania*. De duas transfecções individuais, foram então obtidos clones de *L. (L.) major* contendo o gene *Luc* que foram chamados de *Lmj*[pXG1 *Luc*].

4.2.2 Obtenção de linhagens de *L. (L.) major* hiperexpressores do gene *LmLRR17* ou expressores do gene *LaLRR17*

As construções contendo a ORF que codifica as proteínas LRR de *L. (L.) major* (Figura 7A) e *L. (L.) amazonensis* (Figura 7B) se encontravam disponíveis no nosso laboratório. Essas construções foram feitas amplificando-se a ORF dos genes nativos *LmLRR17* e *LaLRR17* com oligonucleotídeos complementares ao início da ORF, que continham sítios para as enzimas de restrição *Hind* III e *Bam* HI e oligonucleotídeos complementares ao final da ORF, que foram desenhados para excluir o códon de terminação e continham um sítio para *Hin* dIII. Os fragmentos de aproximadamente 2028 pb em *L. (L.) major* e 2016 pb em *L. (L.) amazonensis* foram amplificados a partir do DNA genômico, digeridos com *Hin* dIII e clonados no vetor pBS contendo a seqüência codificadora do epítipo viral *myc*. O propósito de se utilizar a seqüência codificadora do epítipo viral *myc* é permitir a diferenciação entre a proteína nativa e a proteína exógena expressa pelo epissomo. Dessa maneira foram obtidas as construções pBS[*LmLRR17 myc*] e pBS[*LaLRR17 myc*] que posteriormente foram digeridas com *Bam* HI, purificando-se os fragmentos [*LmLRR17 myc*] e [*LaLRR17 myc*]. Os fragmentos purificados contendo as duas diferentes ORFs foram clonados no vetor de transfecção pXG1, obtendo-se construções finais nomeadas [pXG1 *LmLRR17 myc*] (Figura 7A) e [pXG1 *LaLRR17 myc*] (Figura 7B).

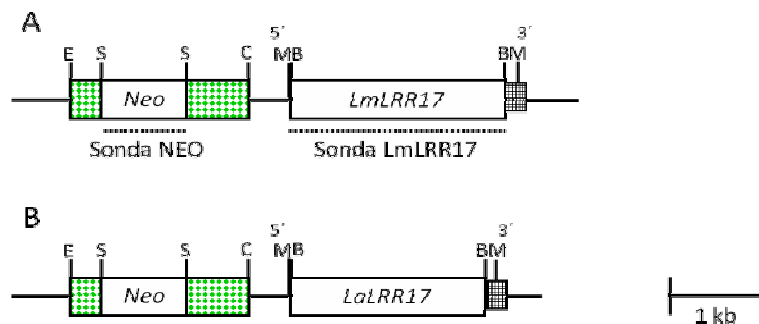


Figura 7. Esquema representativo das construções usadas para a obtenção de clones recombinantes usando o vetor de transfecção pXG1. As linhas pontilhadas representam as sondas que foram usadas para a confirmação de clones recombinantes. Regiões 5' e 3' UTR do gene *DHFR-TS* estão representados pelas caixas verdes. Sítios de restrição são indicados pelas

letras: E, *Eco* RI, S, *Spe* I, C, *Sac* I, B, *Bam* HI, G, *Bgl* II, M, *Sma* I. A caixa quadriculada representa a seqüência que codifica o epítipo viral *myc*. Construção pXG1 *LmLRR17 myc* (A). Construção pXG1 *LaLRR17 myc* (B).

Promastigotas de *L. (L.) major* transfectados com as diferentes construções e com o vetor vazio foram selecionados a uma concentração de 60 µg/ml de G418. De duas transfecções diferentes foram então obtidos clones de *L. (L.) major* contendo o epissomo que foram chamados de *Lmj*[pXG1 *LmLRR17 myc*]1, *Lmj*[pXG1 *LmLRR17 myc*]2, como também, clones de *L. (L.) major* contendo o gene *LaLRR17* que foram chamados de *Lmj*[pXG1 *LaLRR17 myc*]1 e *Lmj*[pXG1 *LaLRR17 myc*]2. Nas próximas seções essas linhagens transfectadas serão denominadas Lm[Lm]1, Lm[Lm]2, Lm[La]1, Lm[La]2, respectivamente. As linhagens controle transfectadas serão chamadas Lm[pX] (contendo o plasmídeo vazio) e Lm[Luc] (contendo o gene *luc*).

4.2.3 Caracterização das linhagens Lm[Lm], Lm[La] e Lm[Luc]

O desenvolvimento de cada uma das linhagens obtidas foi avaliado mediante curvas de crescimento por 7 dias. Todas as linhagens transfectadas apresentaram curvas de crescimento muito semelhantes à da linhagem selvagem. Os clones Lm[Lm]1, Lm[Lm]2, Lm[La]1 e Lm[La]2 apresentaram um crescimento discretamente mais lento quando comparado às linhagens Lm[pX] e Lm[Luc]. Contudo, a cepa selvagem apresentou um comportamento muito similar àquele verificado para as linhagens expressoras das proteínas *LmLRR17* e *LaLRR17* (Figura 8).

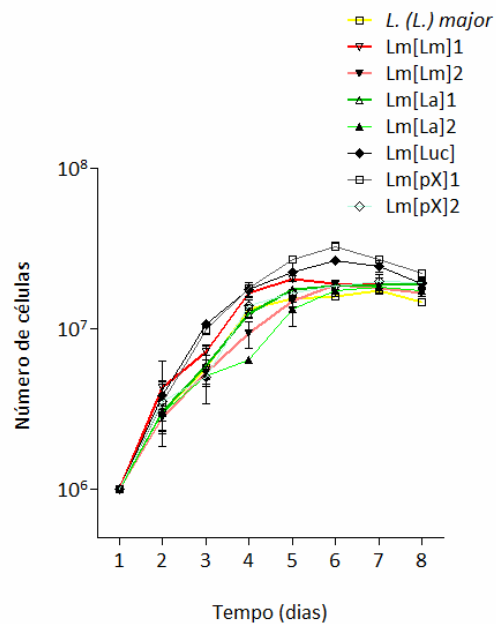


Figura 8. Curva de crescimento de *L. (L.) major* e de linhagens transfectadas. As culturas foram iniciadas a uma densidade de 1×10^6 parasitas por mL. O resultado foi obtido em triplicata e seguido em câmara de Neubauer. As barras representam o desvio padrão.

Foram realizados ensaios de *southern blot* utilizando DNA genômico das linhagens recombinantes Lm[Lm]1, Lm[Lm]2, Lm[La]1, Lm[La]2, Lm[Luc] e Lm[pX] e da cepa *L. (L.) major* digeridos com a enzima *Sma* I, hibridizados com 2 sondas diferentes. Três diferentes controles, a cepa selvagem *L. (L.) major*, a linhagem recombinante Lm[Luc] e por último, a linhagem recombinante transfectada com o vetor vazio Lm[pX], foram utilizados. Inicialmente, as linhagens recombinantes foram mantidas a uma concentração de 60 $\mu\text{g/ml}$ de G418. Usou-se como sonda um fragmento do gene da *neomicina fosfotransferase* (*Neo*) (Sonda NEO) que corresponde a 0.9 kb obtida da digestão com a enzima *Spe* I do plasmídeo de expressão pXG1 (Figura 7A).

Os DNAs genômicos de cada clone foram hibridizados com a Sonda NEO, o que revelou a presença da banda de aproximadamente 6.5 kb nos clones Lm[Lm]1, Lm[Lm]2, Lm[La]1, Lm[La]2 e Lm[pX] e uma banda de 8.5 kb no clone Lm[Luc]. Essa diferença de

tamanhos das bandas é produto da liberação do inserto tanto de *LmLRR17* como do *LaLRR17* já que dentro da seqüência do *myc* existe um sítio de restrição para a enzima *Sma* I. Não foi observada nenhuma hibridização na canaleta contendo DNA genômico digerido da cepa selvagem, confirmando mais uma vez que *L. (L.) major* não possui resistência à G418 (Figura 9).

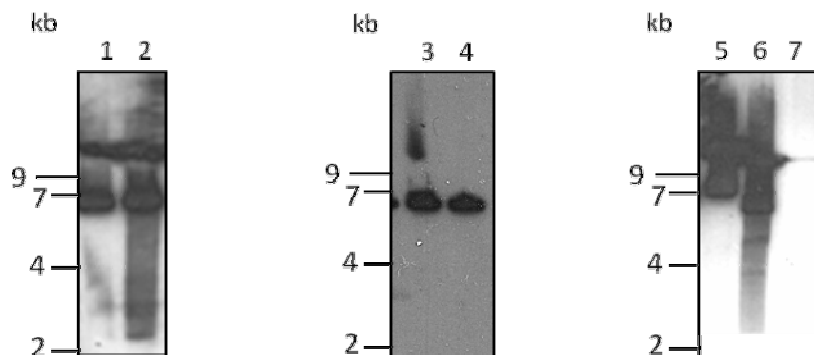


Figura 9. Caracterização genômica dos transfectantes por *southern blot* usando a Sonda NEO. DNA genômico purificado de clones de Lm[Lm]1 (1), Lm[Lm]2 (2), Lm[La]1 (3), Lm[La]2 (4), Lm[Luc] (5), Lm[pX] (6) e *L. (L.) major* (7) foram digeridos com *Sma* I e separados por eletroforese em gel de agarose. Os blots resultantes foram hibridizados com a Sonda NEO. Clones mantidos a uma concentração final de G418 de 60 µg/ml.

Um clone de cada construção foi então escolhido para análise detalhada após cultivo aumentando-se a concentração de G418 de 60 µg/ml a 150 µg/ml. Da mesma forma, foram hibridizados os DNAs genômicos digeridos dos clones Lm[Lm]1, Lm[La]1, Lm[Luc] e *L. (L.) major* com a Sonda NEO. A banda de aproximadamente 6,8 kb foi evidenciada como esperado (Figura 10A) e confirmando o resultado da figura 9. No entanto, observou-se a presença de uma banda de tamanho não esperado com aproximadamente 2,6 kb nos clones Lm[Lm]1, Lm[La]1 e Lm[Luc] hibridizados com a Sonda NEO (Figura 10A), o que poderia ser explicado por uma digestão parcial ou por uma possível integração do epissomo ou fragmentos deste no genoma de *L. (L.) major*.

Por outro lado, foi usada a Sonda LmLRR17 (Figura 7A) para evidenciar o inserto correspondente ao gene *LmLRR17*. Observou-se a presença da cópia genômica

correspondendo à banda de 8 kb em todas as linhagens testadas e a presença do inserto de aproximadamente 2 kb. A presença de uma banda adicional com aproximadamente 2,8 kb pode representar a digestão parcial do epissomo nos clones Lm[Lm]1 e Lm[La]1 (Figura 10B).

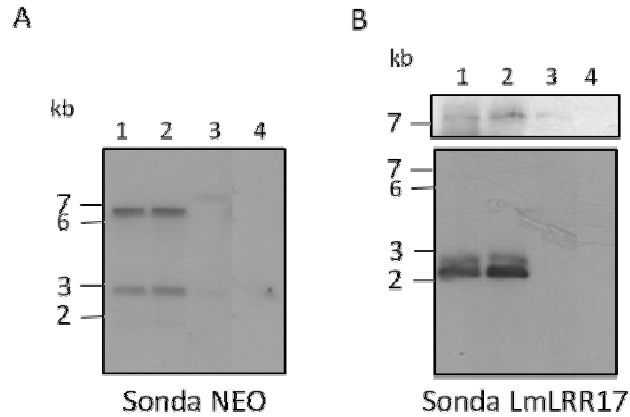


Figura 10. Caracterização genômica dos transfectantes. *Southern blot* contendo DNA genômico de clones de Lm[Lm]1 (1), Lm[La]1 (2), Lm[Luc] (3) e *L. (L.) major* (4), digeridos com *Sma* I. *Blot* hibridizado com a Sonda NEO (A) e a Sonda LmLRR17 (B). Clones mantidos a uma concentração final de geneticina de 150 µg/ml. O painel superior em B mostra uma exposição mais longa da mesma hibridização.

A hibridização com a sonda confirmou a presença do epissomo nas linhagens obtidas de Lm[Lm]1, Lm[La]1, Lm[Luc] e Lm[pX]. Com a possibilidade de ter integração no cromossomo, tentou-se “curar” essas linhagens (permitir a eliminação do epissomo), mantendo cada clone em cultura contínua sem droga de seleção por aproximadamente 25 repiques consecutivos. Essas culturas foram então submetidas a diluições seriadas e cultivadas em presença e ausência de G418. A avaliação de viabilidade após a adição do antibiótico demonstrou que os diferentes clones recombinantes mantiveram-se resistentes a G418, com exceção do clone Lm[Luc] e da cepa selvagem. Com base nesses resultados, parece provável que tenha havido inserção do epissomo no genoma de *Leishmania*, incluindo as linhagens transfectadas apenas com o plasmídeo vazio, sugerindo que a integração seja favorecida pelo esqueleto do plasmídeo e não pelo inserto LRR17.

4.2.4 Caracterização das linhagens recombinantes Lm[Luc], Lm[Lm] e Lm[La]

A avaliação da expressão da luciferase do clone Lm[Luc] foi feita mediante ensaios de atividade enzimática. A atividade enzimática de luciferase é baseada na oxidação da luciferina catalisada pela enzima luciferase, produzindo oxiluciferina que emite luz e pode ser quantificada em luminômetro, de forma sensível e rápida. Clones *Lmj*[pXG1 *Luc*] foram submetidos a diluições seriadas e observou-se uma excelente correlação de atividade e número de células. Foi detectada alta sensibilidade no ensaio, permitindo a detecção da atividade de uma única célula (6,67 unidades relativas de luz (URL)) (Figura 11).

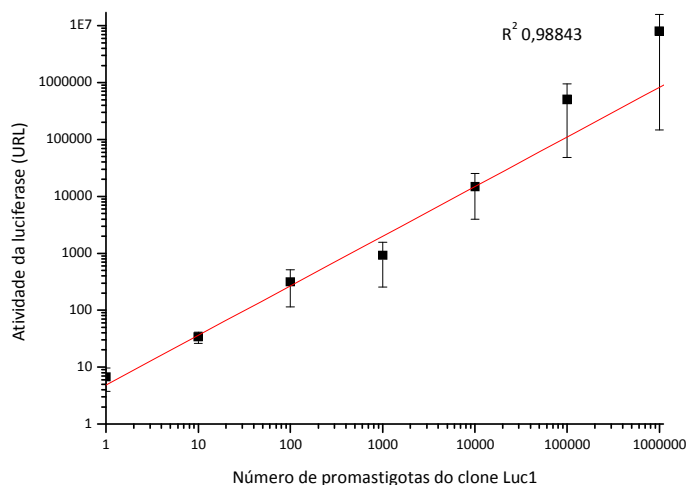


Figura 11. Atividade de luciferase do clone Lm[Luc]. Extratos obtidos a partir de um número conhecido de promastigotas foram ensaiados e a luz emitida foi medida por 45 segundos/amostra. Os dados foram obtidos a partir de uma curva feita com amostras em triplicata. As barras representam os desvios padrão.

A expressão da proteína LRR17 nas linhagens recombinantes Lm[Lm]1 e Lm[La]1 foi evidenciada através de reatividade tanto com o anticorpo produzido contra o peptídeo derivado da região amino-terminal como com anticorpos que reconhecem o epítopo *myc*.

Para confirmar a expressão das proteínas LRR expressas a partir do epissomo foram usados anticorpos α -myc contra extratos protéicos das linhagens recombinantes e da cepa selvagem. Extratos protéicos da linhagem selvagem não reagiram com α -myc, como esperado e a proteína nativa de 72 kDa foi detectada apenas quando se utilizou o soro α -LRR-N (Figura 12A). Em extratos das linhagens Lm[Lm]1 (Figura 12B) e Lm[La]1 (Figura 12C), a incubação com anticorpos α -myc evidenciou a presença de uma banda com tamanho superior a 72 kDa, com aproximadamente 75 kDa. Esse achado está de acordo com o tamanho predito para a proteína de fusão expressa a partir do epissomo. Os mesmos extratos, quando incubados com o soro α -LRR-N, mostraram a presença da proteína nativa de 72 kDa, majoritária e de uma banda de menor intensidade, correspondente à proteína de aproximadamente 75 kDa. Os dois produtos protéicos encontram-se em maior abundância em parasitas de fase logarítmica, como pode ser atestado pela reatividade com o anticorpo normalizador α -GAPDH. Esses resultados foram confirmados pelo ensaio de um segundo clone de cada linhagem mutante (dados não mostrados). Dessa forma, ficou demonstrado que as linhagens transfectadas expressam a proteína de fusão com o epítipo *myc*. A abundância da proteína de fusão é menor do que a da proteína nativa e, surpreendentemente, segue o padrão de regulação do gene endógeno.

A localização subcelular das proteínas recombinantes nos clones transfectados foi analisada por imunofluorescência usando anticorpos α -myc. Não foram vistos parasitas fluorescentes na incubação de anticorpos α -myc contra *L. (L.) major* (Figura 13A), mostrando a alta especificidade do anticorpo. Foi possível observar uma marcação difusa no citoplasma e ausência de marcação do flagelo nos clones Lm[Lm]1 (Figura 13B) e Lm[La]1 (Figura 13C). Soros α -tubulina foram usados como controle do experimento (Figura 13D).

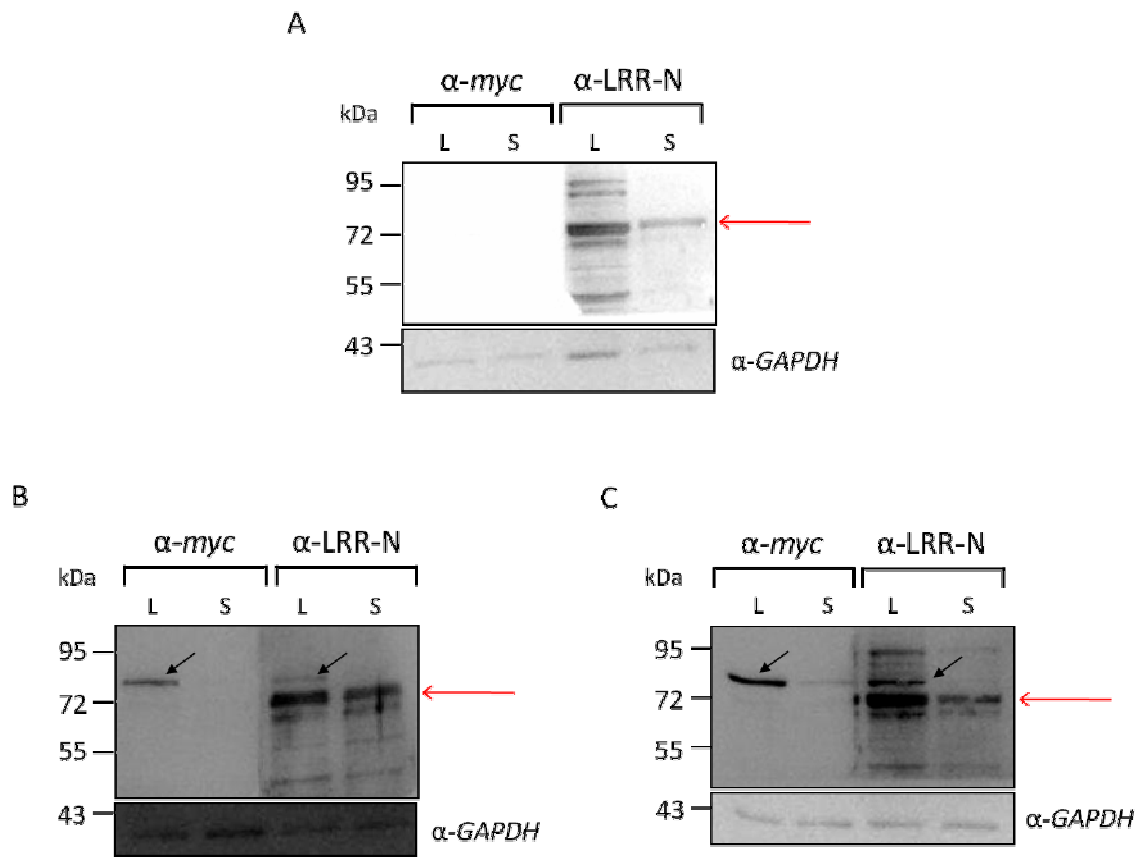


Figura 12. Caracterização das linhagens Lm[Lm]1 e Lm[La]1. Soros α -myc (1:1000) e α -LRR-N (1:2000) contra extratos protéicos de fase logarítmica (L) e estacionária (S) de *L. (L.) major* (A), linhagem Lm[Lm]1 (B) e Lm[La]1 (C). Foram usados anticorpos α -GAPDH (1:3000) como normalizador. Os extratos protéicos de linhagens transfectadas foram obtidos a partir de culturas mantidas com 150 μ g/ml de G418.

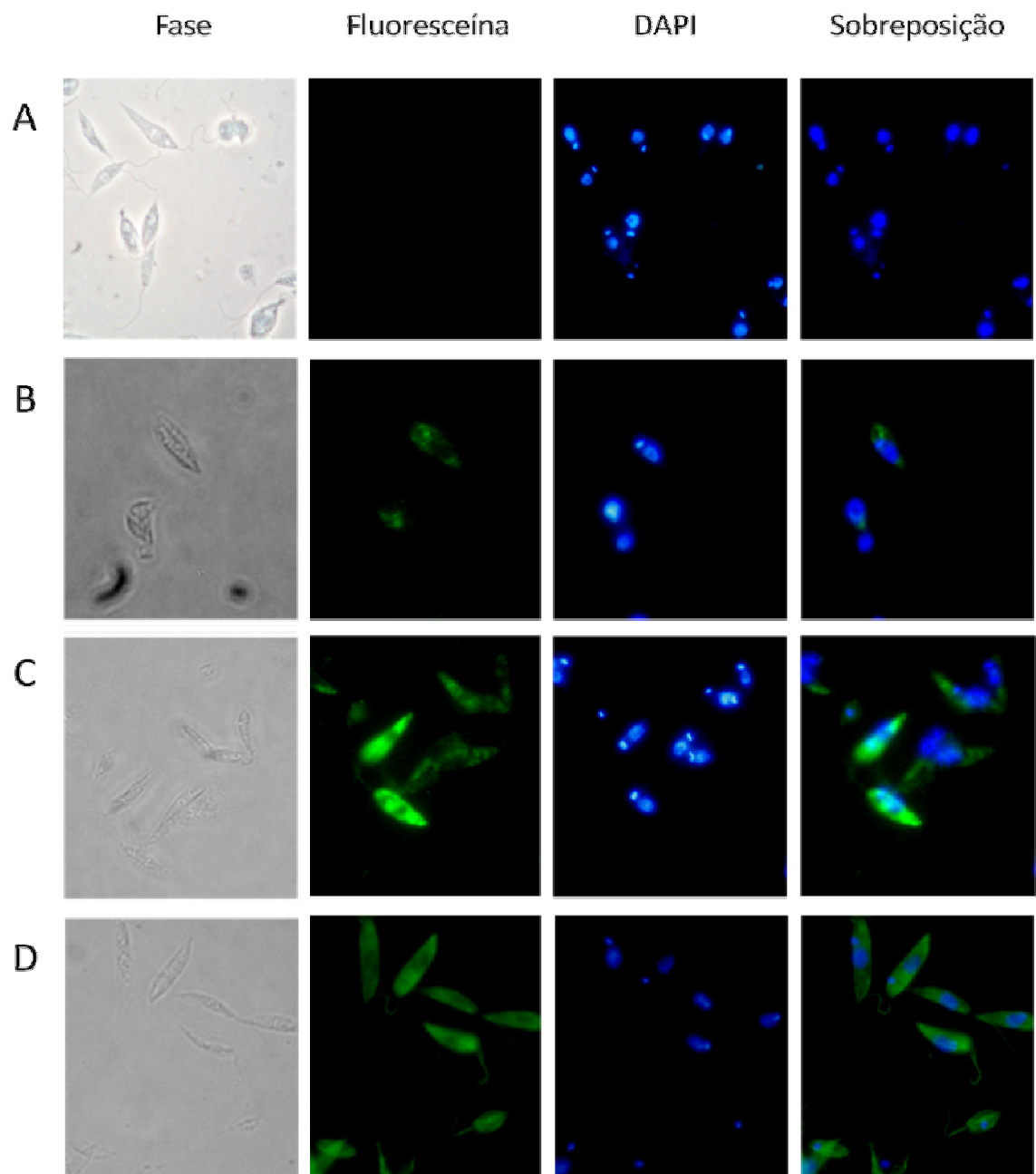


Figura 13. Caracterização das linhagens Lm[Lm]1 e Lm[La]1. Reações de imunofluorescência com soro α -myc (1:150) contra promastigotas de quinto dia de cultura de *L. (L.) major* (A), linhagem Lm[Lm]1 (B), Lm[La]1 (C) e soro α -tubulina (1:80) contra *L. (L.) major* (D).

Os anticorpos α -myc também foram usados para estudar a localização das proteínas recombinantes em ensaios de infecção de macrófagos com as linhagens Lm[Lm]1 e Lm[La]1. A cepa selvagem foi usada como controle negativo sendo que não se observou fluorescência tanto no parasita como na célula hospedeira (Figura 14A). A proteína recombinante não foi detectada em amastigotas das linhagens Lm[Lm]1 (Figura 14B) e Lm[La]1 (Figura 14C), ou no citoplasma da célula hospedeira. Foram usados soros α -*Leishmania* como controle do experimento (Figura 14D).

Esses resultados foram confirmados quando se realizaram reações de imunofluorescência em macrófagos após diferentes tempos de infecção. Formas promastigotas fluorescentes da linhagem Lm[Lm]1 foram encontradas aderidas ou sendo fagocitadas pelo macrófago em infecções de 2 horas (Figura 15A). Em tempos superiores de infecção a proteína LmLRR-myc não foi detectada pelos anticorpos α -myc (Figura 15C). Esses resultados sugerem que a proteína LRR encontra-se ausente ou em quantidades não detectáveis nas formas amastigotas em *L. (L.) major*.

4.2.5 Infectividade das linhagens recombinantes Lm[Lm] e Lm[La] *in vitro*

Foram realizadas infecções de macrófagos extraídos de medula óssea de camundongos BALB/c com a cepa selvagem e com as linhagens transfectadas obtidas. A capacidade de invasão dos parasitas foi avaliada após 16 h de infecção. Foram usados como controles as linhagens selvagem e Lm[Luc]. Altas porcentagens de infecção foram observadas em todas as linhagens testadas (Figura 16A).

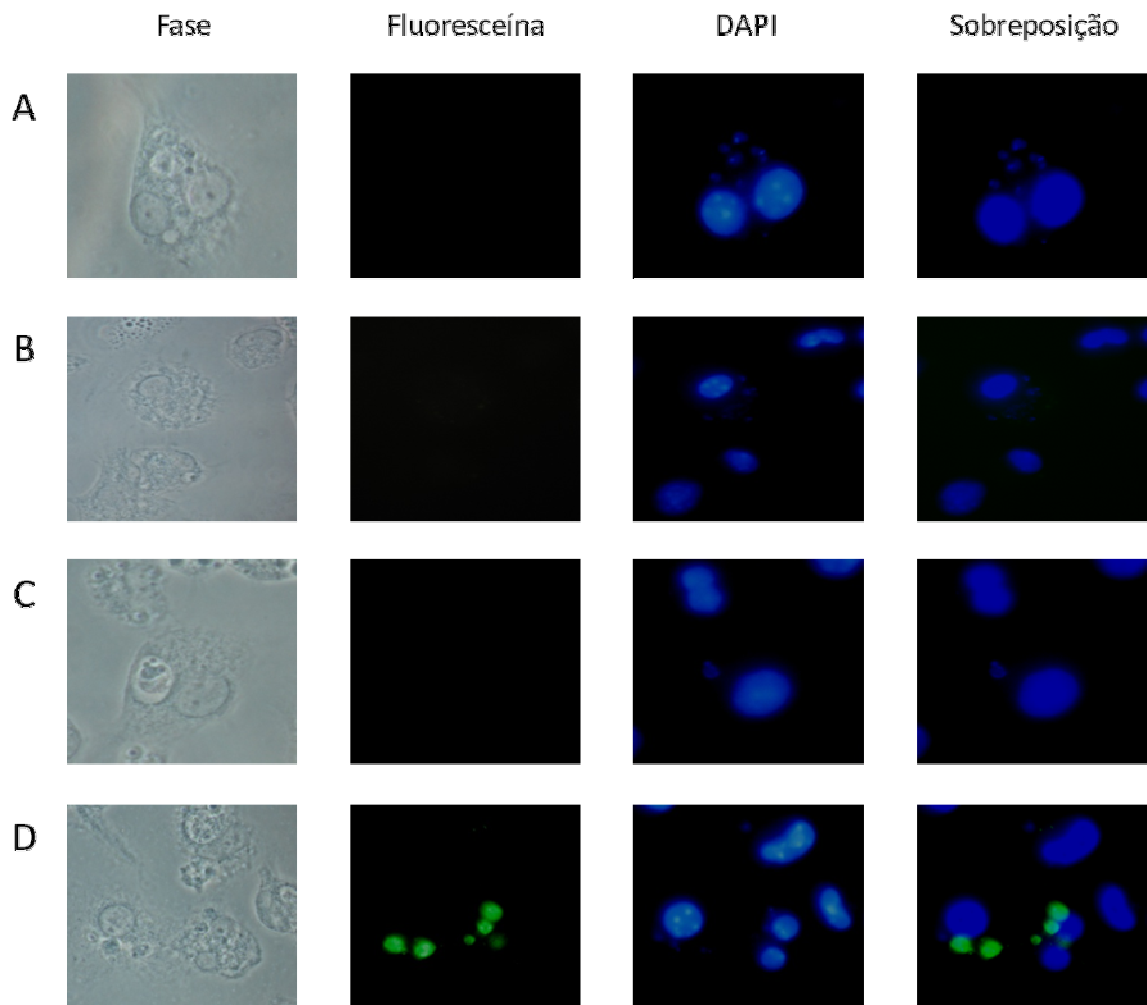


Figura 14. Caracterização das linhagens Lm[Lm]1 e Lm[La]1 em infecções *in vitro*. Macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. (L.) major* (A) e (D), linhagem Lm[Lm]1 (B), Lm[La]1 (C). Após 72h, as células foram fixadas e ensaiadas com soro α -myc (1:150) (A-C) ou soro α -*Leishmania* (1:800) (D).

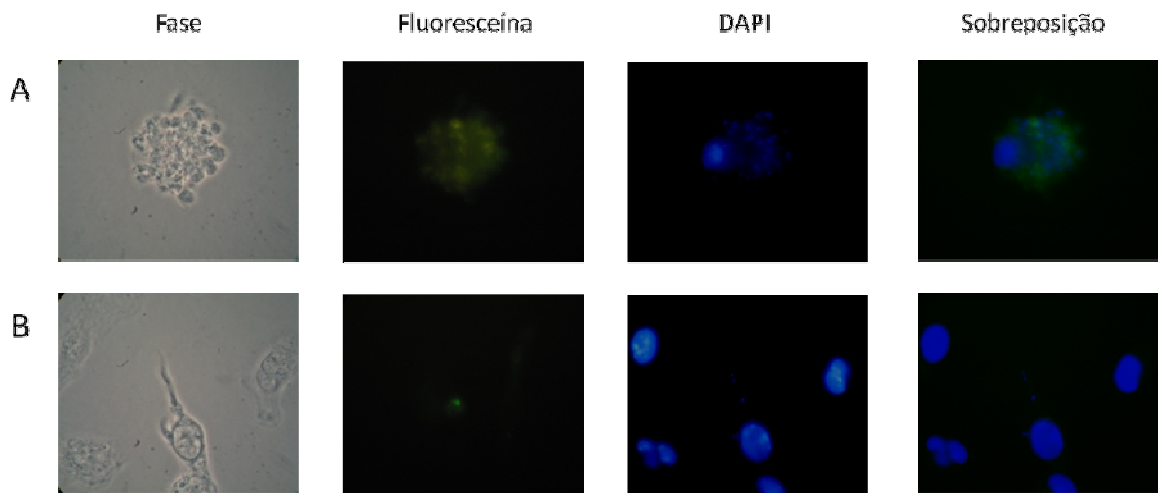


Figura 15. Expressão diferencial da proteína recombinante da linhagem Lm[Lm]1 em infecções *in vitro* usando soros α -myc (1:150). Infecções de 2 horas (A) e 16 horas (B).

Após 72h de infecção (Figura 16B) foi observada redução na porcentagem de células parasitadas em comparação com as infecções obtidas após 16h, indicando que parte considerável dos parasitas fagocitados ou aderidos aos macrófagos nos tempos curtos de infecção não sobreviveram. A avaliação comparativa das infecções após 72h mostrou, em 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicata, que a sobrevivência do transfectante Lm[Luc] foi discretamente reduzida em relação à linhagem selvagem (redução de 3 a 16 % em experimentos independentes, resultados não apresentados).

Observamos ainda aumento significativo na porcentagem de células infectadas com o clone expressando a proteína heteróloga Lm[La]1, tanto em relação à cepa selvagem (14%, $P < 0.05$) como em relação ao controle transfectado Lm[Luc] (25.8%, $P < 0.001$). Por outro lado, observamos que a linhagem hiperexpressora da proteína homóloga Lm[Lm]1, mostrou uma redução na porcentagem de células infectadas após 72h, em comparação com a linhagem selvagem e com a linhagem Lm[Luc] (26.5%, $P < 0.001$ e 14.7%, $P < 0.05$, respectivamente).

A avaliação do número de parasitas intracelulares após 72h de infecção mostrou um predomínio de células com maior número de parasitas nas infecções com a linhagem Lm[La]1, em relação aos controles, evidenciada pela maior porcentagem de células contendo de 3 a 9 parasitas. Por outro lado, efeito inverso foi observado com a linhagem Lm[Lm]1 que resultou em maior porcentagem de células com 1 a 2 amastigotas (Figura 16C). A conversão dos dois parâmetros anteriores (porcentagem de células infectadas e número de parasitas por célula infectada) em índice de infecção permite evidenciar que as linhagens transfectadas Lm[Lm]1 e Lm[La]1 apresentaram comportamentos opostos, sendo observado um aumento de virulência para a linhagem expressora da proteína heteróloga e diminuição de infectividade para a linhagem Lm[Lm]1 (Figura 16D).

Decidimos então confirmar esses resultados utilizando um segundo clone de cada linhagem transfectada (Figura 17A) (obtidos de experimentos de transfecção independentes). Como havíamos observado uma redução de infectividade na linhagem Lm[Luc], decidimos utilizar como controle transfectado um clone portando o plasmídeo vazio, Lm[pX]. A figura 17 mostra os resultados de um experimento realizado em quadruplicata utilizando os clones Lm[pX], Lm[Lm]2 e Lm[La]2 e a cepa selvagem. O comportamento do clone hiperexpressor da proteína heteróloga Lm[La]2 foi idêntico ao observado com o primeiro clone (Figuras 16B e 17B), com aumento na porcentagem de células infectadas, aumento no número de amastigotas por célula e no índice de infecção, também observados em 3 experimentos independentes.

O clone Lm[Lm]2, entretanto, apresentou um comportamento diverso do observado anteriormente. Em 3 experimentos realizados com essa linhagem observamos variabilidade nos resultados, sendo que a porcentagem de infecção após 72h foi por vezes igual e por vezes inferior à observada para a linhagem selvagem e para o controle Lm[pX]. Os resultados de um desses experimentos são apresentados na figura 17. Assim, pudemos confirmar que a expressão da proteína LaLRR17 em *L. (L.) major* resulta em aumento de infectividade para macrófagos. A hiperexpressão da proteína homóloga LmLRR17 não tem esse efeito e é responsável por um fenótipo inalterado ou talvez até por redução na virulência.

4.2.6 Análise das linhagens transfectadas em infecções *in vivo*

As linhagens recombinantes Lm[Lm]1 e Lm[La]1 foram usadas para infectar camundongos BALB/c. Estas infecções foram comparadas com grupos de camundongos infectados com a linhagem selvagem e com as linhagens recombinantes Lm[Luc] e Lm[pX]. Formas promastigotas de fase estacionária e formas amastigotas derivadas de infecção *in vitro* de cada linhagem foram usadas em experimentos individuais e as medidas das patas foram feitas semanalmente a partir da quinta semana após a infecção por 15 semanas. Não foram observadas lesões em camundongos infectados tanto com promastigotas de fase estacionária (Figura 18A) como com amastigotas (Figura 18B) das diferentes linhagens estudadas.

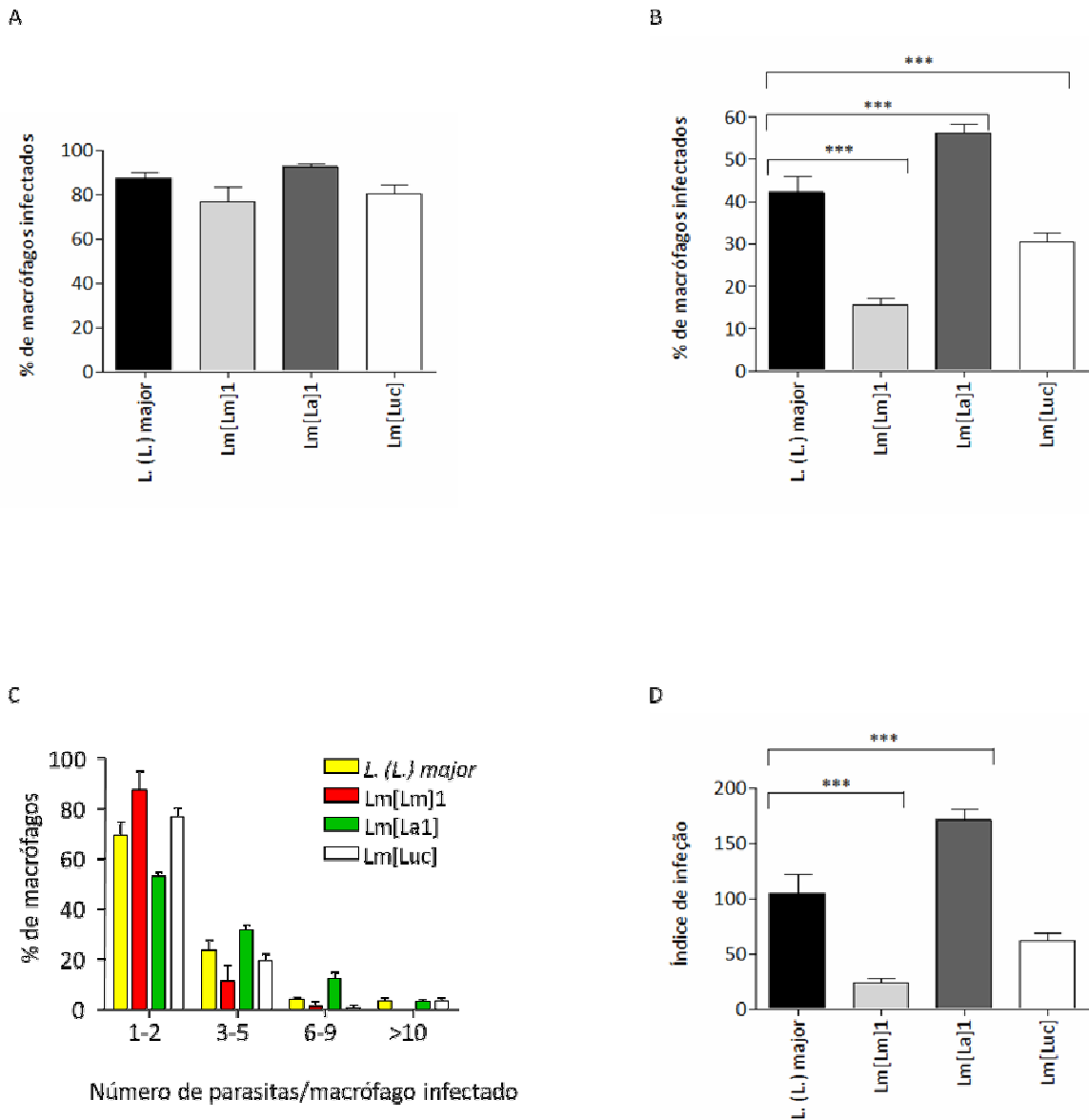


Figura 16. Análise da cepa selvagem e das linhagens recombinantes Lm[Lm]1, Lm[La]1 e Lm[Luc] em infecções *in vitro*. Promastigotas de fase estacionária (em uma proporção de 15 parasitas por macrófago), foram utilizados para infectar macrófagos. São mostradas as porcentagens de células infectadas após 16 horas (A), 72 horas (B), análises do número de amastigotas por célula após 72 horas de infecção (C) e índice de infecção (D). Os dados representam a média e o desvio padrão de quadruplicatas em um experimento representativo de 3 experimentos independentes.

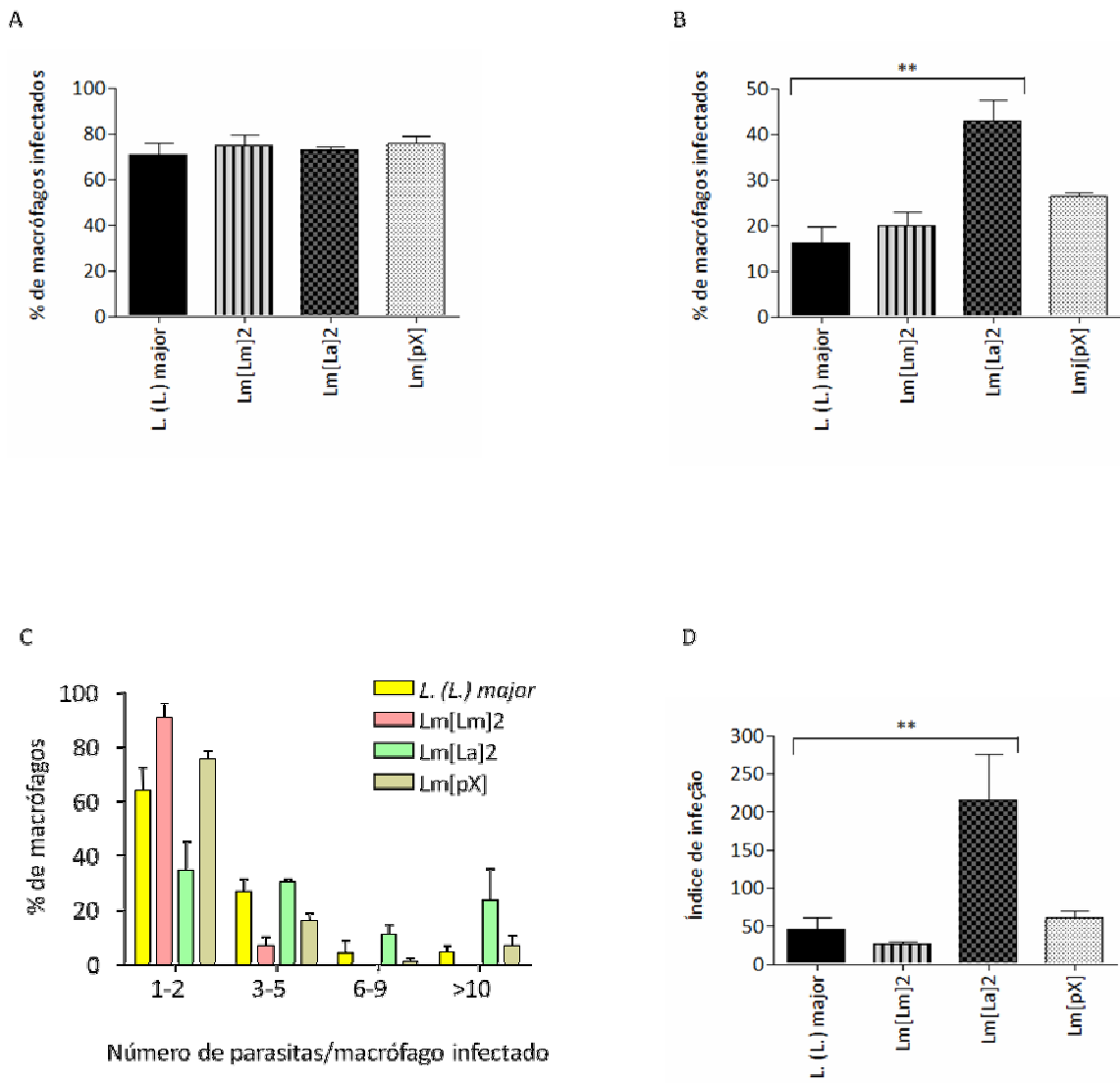


Figura 17. Análise da cepa selvagem e das linhagens recombinantes Lm[Lm]2, Lm[La]2 e Lm[pX] em infecções *in vitro*. Promastigotas de fase estacionária em infecções por 16 horas (A), 72 horas (B) e análises do número de amastigotas por célula após de 72 horas de infecção (C) e índice de infecção (D). Dados obtidos um ensaio feito em triplicata, utilizando-se a proporção de 15 parasitas por macrófago para cada infecção.

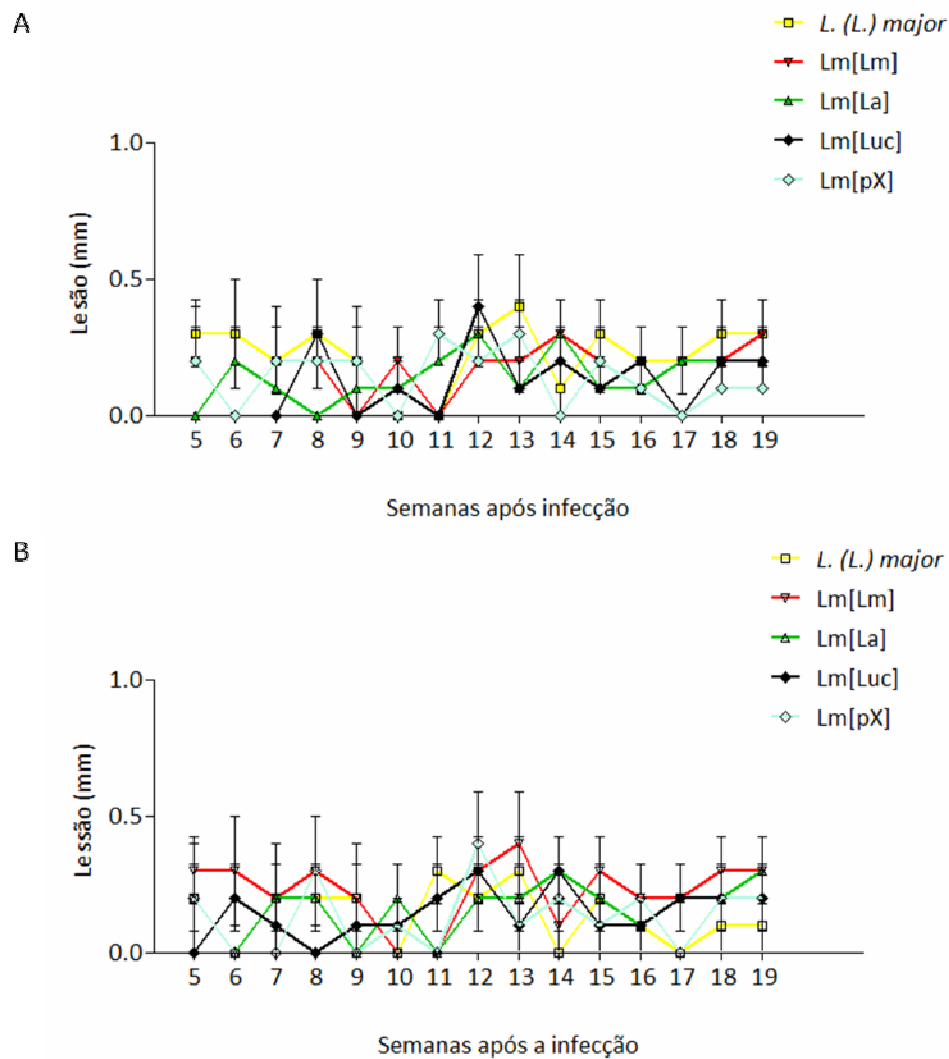


Figura 18. Análise da cepa selvagem e das linhagens transfectadas em infecções *in vivo*. Grupos de cinco camundongos BALB/c foram infectados com 1×10^7 promastigotas de fase estacionária da cepa selvagem e dos clones Lm[Lm]1, Lm[La]1 e Lm[Luc] (A). Grupos de 5 camundongos BALB/c foram infectados com 1×10^6 amastigotas da cepa selvagem e dos clones Lm[Lm]1, Lm[La]1 e Lm[Luc] (B). As infecções foram feitas na pata posterior esquerda. As medidas representam a diferença entre a medida da pata posterior esquerda e a posterior direita a partir da quinta semana após a infecção.

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do padrão de expressão da proteína LmLRR17

Durante as diferentes fases do ciclo de vida de *L. (L.) major*, a proteína LmLRR17, com uma massa molecular de 72 kDa, foi predominantemente reconhecida. Assim mesmo, foi reconhecida também uma proteína de 50 kDa em estágios replicativos. Experimentos posteriores realizados utilizando linhagens recombinantes nas quais a proteína LmLRR17 foi expressa em fusão com o epítipo viral *myc* na extremidade carboxi-terminal confirmaram a presença da proteína de 72 kDa mas não revelaram a banda de 50 kDa. Estes resultados em conjunto indicam que a proteína de 50 kDa poderia ser produto de uma clivagem da proteína nativa, gerando um polipeptídeo contendo o seu extremo amino-terminal. Esse processamento poderia ser produto da clivagem por *Caspase 1* no AA número 387, evidenciando uma banda contendo o extremo amino-terminal da proteína LmLRR17. O tamanho molecular predito é de aproximadamente 43 kDa, embora a banda evidenciada seja maior. A diferença do tamanho predito com o experimental pode ser consequência das modificações que possa ter a proteína, seja por fosforilação ou glicosilação. Entretanto, não podemos excluir que a banda de 50 kDa represente reatividade inespecífica do anticorpo.

Embora a proteína LmLRR17 seja expressa ao longo de todo o ciclo de vida, apresenta uma expressão regulada, mostrando maior abundância na fase logarítmica do que na fase estacionária e em amastigotas. Esse padrão de expressão protéica é compatível com a abundância de transcritos previamente descrita para o gene *LmLRR17*. Como se sabe, a vasta maioria dos genes de *Leishmania* são constitutivamente transcritos em todos os estágios do ciclo e os genes com expressão diferenciada, representam uma minoria dentro do genoma de *Leishmania* (Cohen-Freue et al., 2007).

É bem sabido também, que a maioria dos genes de *Leishmania* são regulados a nível pós-transcricional (Clayton e Shapira, 2007). Mesmo que se saiba que processos de *trans splicing* e poliadenilação regulam a abundância do transcrito processado, as maiores modificações acontecem em nível pós-transcricional e pós-traducional. Dentre essas últimas, podem se destacar a fosforilação, glicosilação, lipidação para estabilização ou ativação protéica na espécie *Leishmania* (Acestor et al., 2002; Ivens et al., 2005). Em estudos

comparativos feitos em géis bidimensionais com extratos protéicos de diferentes espécies de *Leishmania*, observaram-se diferenças nos perfis proteômicos, sendo essas diferenças possivelmente responsáveis pelas patologias associadas a cada um desses agentes infecciosos (Acestor et al., 2002; Brobey et al., 2006; El-Sayed et al., 2005; Leifso et al., 2007). Apesar de que várias dessas modificações pós-traducionais foram preditas *in silico* para a proteína LmLRR17, não é possível afirmar que as mesmas ocorram na proteína nativa.

Tem se demonstrado que proteínas ortólogas à LmLRR17, possuem um padrão de expressão diferente. Resultados prévios comprovaram que, apesar da alta porcentagem de identidade com o gene *LmLRR17*, o gene LRR17 de *L. (L.) amazonensis* apresenta um padrão de expressão muito diferente, sendo o seu transcrito mais abundante em amastigotas (Franco, 2008). Essa regulação diferencial vista nos genes LRR de *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, pode ser produto de diferenças nas seqüências que apresentam a menor identidade entre esses genes, neste caso as regiões 3' UTR (86% de identidade).

A relevância das regiões 3' UTR na regulação gênica de tripanossomatídeos está bastante bem documentada. A análise de genes expressos exclusivamente no estágio intracelular de *Leishmania* tem sido bastante usada no entendimento de mecanismos regulatórios tanto do transcrito quanto da proteína. Um dos genes usados para o estudo da regulação estágio específica é o gene que codifica uma proteína conhecida como amastina, considerada um fator de virulência em amastigotas de *Leishmania spp.* (Teixeira et al., 1994). Foi visto em linhagens recombinantes, usando a *luciferase* como gene repórter clonada à montante da região 3' UTR do transcrito da amastina, que esta não está envolvida nem na estabilidade nem na abundância do transcrito (Teixeira et al., 1994). Porém, esses resultados são controversos, já que Boucher et al., (2002) mostraram que essas seqüências podem estar envolvidas na estabilidade do transcrito e apresentar funções fundamentais no processo de tradução, especificamente associados a estágios intracelulares. Outros genes com regulação diferencial associados a estágios infectivos do parasita têm sido estudados (Coulson e Smith, 1990; Flinn e Smith, 1992; Uliana et al., 1999).

Em *T. brucei* existem seqüências repetitivas denominadas ARES na região 3' UTR do gene que codifica a fosfoglicerato quinase (PGKB). Essas seqüências desestabilizam o

transcrito nas formas sanguíneas, mas não nas formas replicativas do parasita (Quijada et al., 2002). Também foi visto que elementos 16 mer e 26 mer na região 3' UTR de outras proteínas desse parasita (as prociclínas, EP), contribuem à estabilidade e eficiência de tradução (Furger et al., 1997).

Especificamente em *L. (L.) major*, tem sido descritos outros genes com regulação diferencial. Por exemplo, nucleases que tem uma função central no transporte e metabolismo de purinas que é crítico para a sobrevivência da forma intracelular do parasita (Farajnia et al., 2004; Kar et al., 2000). Considerando a versatilidade funcional que parecem ter as regiões 3' UTR, essas seqüências merecem ser investigadas mais profundamente para uma melhor compreensão de processos biológicos cruciais como a regulação da expressão gênica e protéica nestes parasitas.

De maneira geral, as análises de transcriptomas vem dando suporte às pesquisas sobre a expressão diferencial das moléculas que poderiam estar envolvidas em funções biológicas específicas dos diferentes estágios do parasita (Brobey et al., 2006). No entanto, devido ao fato já mencionado de que a regulação da expressão parece ser predominantemente pós-transcricional, como é o caso da LmLRR17, os estudos de expressão ao nível protéico poderiam ser mais úteis nestes organismos (El Fakhry, Ouellette e Papadopoulou, 2002).

5.2 Localização da proteína LmLRR17

Com o objetivo de deduzir a possível função da proteína LmLRR17 de *L. (L.) major*, foi investigada primeiramente a sua possível secreção para o meio extracelular e a sua possível localização no interior da célula. Para isso, foi analisada a presença da proteína em sobrenadantes de meio de cultura e em extratos totais de formas promastigotas de *L. (L.) major*. Foi evidenciada a abundante secreção da LmLRR17 em meio de cultura proveniente de culturas de fases logarítmica. A evidência de uma única banda secretada e com igual tamanho (72 kDa) à observada em extratos totais do parasita sugere uma ausência de

processamento da proteína. O fato de que análises *in silico*, não mostraram a presença de um peptídeo sinal na seqüência de AA poderia parecer contraditório com os resultados que mostram que a proteína é secretada.

A secreção protéica em ausência de peptídeo sinal tem sido bastante reportada (Nickel e Seedorf, 2008), embora os mecanismos e componentes moleculares envolvidos nesse tipo de secreção sejam pouco conhecidos. Na via clássica de secreção a participação do retículo endoplasmático tem um papel fundamental na liberação e processamento protéico (Schatz e Dobberstein, 1996). Por outro lado, na via não convencional estão envolvidas organelas como os exossomas que podem ser excretadas como corpos multivesiculares ou lisossomos secretores (Simpson, Jensen e Lim, 2008). Dentro desse tipo de secreção estão incluídas as citocinas, fatores de crescimento e moléculas que participam na sinalização em processos fisiológicos como diferenciação e proliferação celular, inflamação e angiogênese (Prudovsky et al., 2008).

Como mencionado anteriormente, além de ter sido encontrada no meio de cultura, a LmLRR17 foi encontrada também associada às células. Portanto foi feita a tentativa de investigar a localização subcelular da proteína nativa. Para isso, foram feitos ensaios de imunofluorescência indireta, usando soros imune α -LRR-N e pré-imune. Para nossa surpresa a proteína nativa, apesar de ter sido reconhecida em ensaios de *western blot*, não foi reconhecida nestes ensaios de imunofluorescência. Por sua vez, o soro pré-imune, mostrou um padrão de marcação não específico. É provável que o anticorpo obtido, reconheça epítomos lineares, que estariam expostos nas proteínas desnaturadas, corridas eletroforéticamente e imobilizadas sobre membranas de nitrocelulose, mas não nas proteínas fixadas em conformações mais próximas da nativa. Estes resultados nos levaram a desenvolver outras estratégias para a obtenção de soros que permitissem o reconhecimento da proteína em diferentes conformações.

Com o intuito de desenvolver um novo soro contra a LmLRR17 de *L. (L.) major*, se procedeu a estabelecer as condições para a produção da proteína recombinante em *Escherichia coli*. Apesar de ter induzido com sucesso a expressão da proteína, não foi possível obtê-la em forma solúvel nem purificá-la a partir dos corpos de inclusão. Como

alternativa, se considerou a idéia de imunizar camundongos usando os corpos de inclusão obtidos contendo a proteína induzida, no entanto, isso não foi realizado devido à demora na obtenção de resultados.

Alternativamente, foi aplicada a técnica de imunização com ácidos nucleicos, que representam uma alternativa para a obtenção de imunização contra antígenos específicos. Consideradas imunomoduladoras, as regiões CpG do DNA plasmidial estimulam este tipo de resposta (Pertmer, Roberts e Haynes, 1996). Tem sido reportados vários estudos, confirmando a imunidade protetora gerada por diferentes antígenos de *Leishmania* usando este método (Fragaki et al., 2001; Ghosh, Labrecque e Matlashewski, 2001; Mendez et al., 2001; Rafati et al., 2001; Sjolander et al., 1998; Walker et al., 1998; Xu e Liew, 1995). Particularmente, a proteína LACK de *L. (L.) major* induz uma resposta natural Th2 que é transformada a Th1 por imunização com DNA (Gurunathan et al., 1997). Entretanto, a imunização de camundongos com plasmídeo contendo a ORF do gene *LmLRR17* não resultou em produção de anticorpos no soro dos animais imunizados. Soros contra a proteína LmLRR17 recombinante já foram obtidos (Franco, 2008), descartando a possibilidade da proteína apresentar baixa antigenicidade.

Em vista das limitações durante os processos de obtenção de soros, foram então utilizados anticorpos comerciais. Anticorpos α -myc foram usados para estudos de localização subcelular da proteína expressa a partir do DNA exógeno em linhagens transfectadas. Como evidenciado nas imunofluorescências, a proteína está disseminada por todo o corpo celular e sem marcação no flagelo. Deve ser destacado que a ausência de sítios tanto para ser ancorada à membrana quanto de peptídeo sinal, são compatíveis com a localização subcelular no parasita. Ainda que a estratégia usada não reconheça a proteína nativa, o *tag myc* não altera as características evidenciadas pela análise *in silico* da proteína LmLRR17. Ao contrário do observado com a proteína LRR17 de *L. (L.) amazonensis*, em *L. (L.) major* não foi evidenciada a presença da proteína no citoplasma de macrófagos infectados com a linhagem transfectada Lm[Lm].

5.3 Obtenção e caracterização de linhagens recombinantes

A abordagem genética é crucial para o esclarecimento de aspectos pouco usuais na expressão gênica em protozoários. Desde o desenvolvimento da técnica de transfecção na década de 90, diferentes genes têm sido avaliados com respeito à função na biologia do organismo. A transformação genética usando esta técnica resulta da inserção de DNA exógeno seja por recombinação homóloga ou por DNA epissomal. Na transfecção utilizando plasmídeos, são usados vetores contendo seqüências que permitem uma replicação autônoma tanto em tripanosomatídeos quanto em bactérias. Em tripanosomatídeos patogênicos, o método de transfecção estável foi inicialmente aplicado em *Leishmania* (Kapler et al., 1990), seguida de outros patógenos em humanos como *T. brucei* (ten Asbroek et al., 1990) e *T. cruzi* (Lu e Buck, 1991).

Em *L. (L.) amazonensis* foi usada a técnica de *knock out* gênico para o gene *LaLRR17* onde foi observado que esse gene tem um papel essencial na sobrevivência do parasita, visto que não foi possível obter clones defectivos para esse gene (Franco, 2008). A alta similaridade apresentada entre os genes *LRR17* de *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, sugere que o gene *LmLRR17* também represente um gene indispensável na sobrevivência do parasita.

Estudos feitos por Franco (2008), usando linhagens recombinantes de *L. (L.) amazonensis* expressores da proteína *LmLRR17*, mostraram um aumento da virulência em relação à evidenciada com a cepa selvagem. Demonstrado também em infecções *in vitro*, que tanto a proteína *LaLRR17* quanto a *LmLRR17* conseguem acessar ao citosol da célula hospedeira. Em contraste com a proteína nativa em *L. (L.) major* que não é secretada ao citoplasma do macrófago, de forma que é mantida no interior do parasita.

As linhagens construídas neste trabalho foram feitas para estudar a funcionalidade e a influência das proteínas *LmLRR17* e *LaLRR17* na biologia de *L. (L.) major*. Assim tentar elucidar que aspectos influem no aumento da virulência do parasita quando expressa a proteína ortóloga de *L. (L.) amazonensis*. Com as linhagens usadas como controle, *Lm[pX]* e

Lm[Luc], permitiu-se inferir que a virulência vista é atribuída às proteínas LRR e não à presença do vetor ou de um inserto diferente. O gene da *luciferase* além de ser um controle adequado no estudo da virulência das proteínas LRR, tem sido usado como gene *reporter*. Existem relatos que demonstram que transfecções estáveis (Misslitz et al., 2000; Roy et al., 2000; Sereno et al., 2001) assim como transientes da *luciferase* (Gay, Wilson e Donelson, 1996), facilitam a busca de drogas leishmanicidas (Roy et al., 2000). Por outro lado, tem sido também usado para o estudo da regulação do nível protéico em *L. (L.) major* (Madeira da Silva et al., 2009; Teixeira et al., 1994). Essas diferentes abordagens descritas levam ao maior entendimento da biologia de *Leishmania* e sua interação com a célula hospedeira.

Com sucesso foram obtidas as linhagens recombinantes de *L. (L.) major* expressoras das proteínas recombinantes. Curiosamente, os clones Lm[Lm] e Lm[La] evidenciaram uma regulação na expressão das proteínas recombinantes. Essa ocorrência é infreqüente na medida em que as regiões responsáveis pela transcrição e tradução do gene exógeno, estão presentes no plasmídeo e não representam as seqüências nativas dos genes LRRs de *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*. O anterior resultaria na expressão constitutiva nos diferentes estágios de *Leishmania*, como observado, por exemplo, em estudos feitos hiperexpressando uma proteína (SHERP) predominantemente expressa em fase estacionária do parasita (Knuepfer et al., 2001). Cabe destacar que a expressão da proteína a partir do epissomo dos dois clones estudados, foi pequena em comparação com a proteína nativa. Por outro lado, cabe destacar que a expressão da proteína LaLRR17-myc foi notavelmente maior do que a da proteína LmLRR17-myc. Essa característica foi observada tanto nos ensaios de *immunoblotting* como em imunofluorescência.

Como mencionado anteriormente, em *L. (L.) amazonensis*, a proteína LaLRR17 é expressa em amastigotas e secretada para o citoplasma do macrófago. Utilizando o soro α -myc em infecções de macrófagos com as linhagens transfectadas não observamos a presença das proteínas LaLRR17 ou LmLRR17 nas células infectadas. Observamos em infecções com a linhagem Lm[Lm], uma redução no sinal de fluorescência na medida que formas promastigotas vão entrando no macrófago. Uma vez transformadas a formas

intracelulares, a proteína não é mais detectada pelos anticorpos α -*myc*, possivelmente pela pouca expressão nesta fase do parasita.

Analisando a informação obtida a partir do transcrito gênico dos genes nativos LRR nas duas espécies de *Leishmania*, sua correspondente expressão protéica e a mudança no padrão de expressão em clones recombinantes, sugerem que exista um mecanismo de estabilização independente das regiões reguladoras do transcrito. Esses mecanismos ainda desconhecidos, podem ser modificações pós-traducionais assim como, a presença de seqüências estabilizadoras dentro da proteína LaLRR17.

5.4 Fenótipo das linhagens recombinantes em infecções *in vitro* e *in vivo*

A infecção de macrófagos por *Leishmania* envolve a adesão do parasita à superfície do macrófago, sua entrada, subsequente sobrevivência, transformação em amastigota e multiplicação celular. Esses aspectos foram avaliados minuciosamente em infecções *in vitro* com cada um dos clones obtidos, considerando a regulação e expressão vista nos genes LRRs. A observação do fenótipo em linhagens expressoras da proteína LaLRR17 e hiperexpressores da proteína nativa LmLRR17 não parece alterar a entrada do parasita no macrófago. O tempo de 16 horas de infecção evidenciou porcentagens de infecção elevadas em todos os clones testados.

Transcorridas 72 horas de infecção, a expressão da proteína heteróloga LaLRR17 no clone Lm[La], parece estar envolvida na replicação e sobrevivência de formas intracelulares do parasita. Particularmente, as linhagens expressoras de proteína LaLRR17 diferem significativamente na sobrevivência e replicação em macrófagos de medula óssea, dados confirmados com 2 clones independentes. Em contraste, a presença da cópia extra do gene nativo LmLRR17 no clone Lm[Lm] parece conferir uma desvantagem na sobrevivência do parasita, observando pela quantidade e/ou persistência de formas amastigotas nas células infectadas. A susceptibilidade observada no clone Lm[Lm] pode ser produto da saturação da maquinaria regulatória da célula por hiperexpressão do transcrito, que a sua vez pode ser

tóxico (Colasante et al., 2006). Essa abundância do transcrito pode influir na inserção ou deleção de seqüências decorrendo em um processamento incorreto e conseqüentemente, afetando a sua expressão protéica (Colasante et al., 2006).

A observação do fenótipo dessas linhagens foi finalizada quando comparado com o comportamento das linhagens controle utilizadas, tanto a cepa selvagem como o clone Lm[Luc] e Lm[pX]. Ao contrário do que se esperava, as linhagens controle transfectadas parecem apresentar alterações em sua infectividade. Embora com o anterior fato, foi atribuída às proteínas LRR de *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* o comportamento diferenciado em infecções *in vitro*.

Devido ao fato da regulação e expressão diferencial dos genes LRR em *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, precisa-se aprofundar no estudo da abundância do transcrito nas linhagens obtidas. Essa diferença no padrão observado pode ser otimizada na análise do transcrito por RT-PCR ou ensaios de *Northern blot*, usando como sondas os genes *myc* e *LRR*. Dessa maneira, tentar esclarecer se o mecanismo da expressão diferencial se atribui à abundância do transcrito ou a modificações pós-traducionais das proteínas expressas.

O fenótipo visto em experimentos *in vitro* não se correlaciona com os resultados obtidos *in vivo*, provavelmente devido à grande diferença entre o controle do ambiente artificial e os múltiplos fatores que são envolvidos quando se trabalha com modelo animal. Os lotes de camundongos BALB/c infectados com formas promastigotas metacíclicas da cepa selvagem e as diferentes linhagens recombinantes, não evidenciaram nenhum tipo de lesão ainda oito meses após a infecção. Da mesma forma, foi visto o mesmo comportamento em infecções com formas amastigotas de cada um dos clones, refletindo na possibilidade de que infectando com formas completamente diferenciadas se obteria informação do fenótipo analisado. A ausência de lesão em camundongos BALB/c pode ser explicada por duas possíveis razões. A primeira atribui-se à infecção com baixo número de parasitas que produz uma hipersensibilidade do tipo retardado (DTH) (Parish, 1972). O DTH faz referencia à estimulação com baixíssimas dose infecciosas para a produção de anticorpos. No trabalho feito por Bretscher et al. (1992), provaram a alteração na susceptibilidade de camundongos BALB/c a infecções por promastigotas de *L. (L.) major*. Com baixa dose de patógeno e

monitorando o tamanho das lesões produzidas confirmaram que com 10^4 células de *L. (L.) major* pode gerar proteção a camundongos susceptíveis BALB/c e aumentar a resistência em camundongos C57Bl/6 e a injeção com 10^6 promastigotas de *L. (L.) major* gera uma lesão com incremento progressivo.

Considerando a possibilidade de ter feito a infecção com menor número de formas infecciosas de cada um dos clones de *L. (L.) major* e observando a ausência de lesão em camundongos susceptíveis, repetimos o experimento utilizando amastigotas obtidos de infecções *in vitro*. Mesmo assim, não foi evidenciado o aparecimento de lesões. A segunda razão tem a ver com fatores externos que incluem particularmente manutenção dos animais no biotério, alimentação e ambiente livre de patógenos que poderiam ter alterado o estado imunológico dos animais que influencia diretamente no estabelecimento e resposta às infecções por *L. (L.) major*. Tem sido demonstrado que o tratamento em camundongos BALB/c com IL-12, aumenta a atividade de células NK (Laskay et al., 1995) e protege contra infecção por *L. (L.) major* (Bogdan, Gessner e Rollinghoff, 1993; Sacks e Noben-Trauth, 2002). Esse tipo de proteção visto, poderia ter sido provocado por algum estímulo produto da invasão por qualquer outro patógeno, ativando células do sistema imune e eliminando o parasita. É necessário ainda considerar que a cepa de *L. (L.) major* utilizada nos experimentos de transfecção pode ter tido sua virulência reduzida por múltiplas passagens *in vitro*. De fato, observamos que a linhagem selvagem utilizada nos experimentos de infecção foi incapaz de produzir infecção clínica em camundongos C57Bl/6 *knock out* para produção de INF- γ (dados não mostrados).

Considerando as diferenças entre os genes *LaLRR17* e *LmLRR17*, tanto na abundância do transcrito, expressão protéica nativa, secreção em infecções *in vitro*, abundância da proteína expressa a partir do epissomo e talvez, na expressão protéica em amastigotas das proteínas *LaLRR17* e *LmLRR17*, é de particular interesse o estudo do mecanismo que está envolvido no padrão de regulação diferente. Conhecendo o anterior, poderia se corroborar a dualidade descrita na literatura, atribuindo a expressão diferenciada às regiões 3'UTR do gene ou a estabilizações a nível pós-traducional da proteína.

Como foi mencionado, a proteína LmLRR17 possui seis domínios de repetições de leucina (domínios LRR) que podem representar sítios de interação proteína-proteína. Tem sido demonstrado que os domínios LRR estão envolvidos em diversas funções biológicas, que incluem desde o reconhecimento de patógenos por receptores celulares até a implicação de eles nos eventos de regulação pós-traducionais críticos na diferenciação celular. Recentes estudos demonstram que os domínios LRR fazem parte também de proteínas que estão envolvidas na regulação de processos celulares importantes. Por exemplo, a proteína TgLRR1, está composta por 11 repetições desses domínios e tem um papel fundamental na inibição da atividade da fosfatase que é requerida para permitir a divisão celular em *Toxoplasma gondii* (Daher et al., 2007). Em organismos como *Dictyostelium*, foi caracterizada a MLP1 que contém 6 LRRs, essencial na fosforilação a nível de substrato provocando a correta mobilidade celular e quimiotaxia do parasita (Rodriguez et al., 2008). Por outro lado, domínios LRR compõem o motivo LPXTG, que faz parte de moléculas consideradas fator de virulência em *Listeria monocytogenes* (Sabet et al., 2005). A molécula do LPXG está ancorada à superfície da bactéria, permitindo sua adesão a células epiteliais e colonizando o trato intestinal e urogenital (Seepersaud et al., 2005). Em estudos feitos com *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. (L.) major*, os domínios LRR fazem parte de proteínas catalíticas possivelmente envolvidas na regulação de eventos estágio específicos e no ciclo celular (Brenchley et al., 2007). Apesar da similaridade entre as proteínas LmLRR17 e receptores NOD e Toll like, não foram encontrados domínios efetores nem domínios de oligomerização de nucleotídeos, responsáveis pela ativação do receptor e desencadeamento da resposta imune.

As diferenças demonstradas entre as duas proteínas, vistas também no padrão de infecção *in vitro*, indicam claramente o envolvimento das proteínas LRR no estabelecimento da infecção. Assim, pudemos confirmar que a expressão da proteína LaLRR17 em *L. (L.) major* resulta em aumento de infectividade para macrófagos. A hipereexpressão da proteína homóloga LmLRR17 não tem esse efeito e é responsável por um fenótipo inalterado ou talvez até por redução na virulência.

6 CONCLUSÕES

- A proteína LmLRR17 encontra-se presente em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) major*.
- A proteína LmLRR17 apresenta expressão diferencial, estando presente em maior abundância na fase promastigota procíclica do que e promastigotas de fase estacionária e amastigotas.
- Formas promastigotas procíclicas de *L. (L.) major* são capazes de secretar a proteína LmLRR17 ao meio extracelular.
- Não foi possível caracterizar a localização da proteína LmLRR17 usando soros α -LRR-N em *L. (L.) major*.
- Foram obtidos com sucesso clones expressores da LaLRR17 e hiperexpressores da proteína nativa em *L. (L.) major* mediante transfecção estável.
- Em formas promastigotas das linhagens transfectadas, a proteína quimérica encontra-se disseminada em todo o corpo do parasita, estando ausente no flagelo.
- Em formas intracelulares das linhagens transfectadas não foi detectada a proteína quimérica.
- A proteína quimérica é regulada de igual forma à proteína nativa em *L. (L.) major*.
- A hiperexpressão da proteína nativa LmLRR17 em *L. (L.) major* é responsável por um fenótipo inalterado ou talvez por pouca redução na virulência.
- A expressão da proteína LaLRR17 em *L. (L.) major* induz um incremento na virulência, em infecções *in vitro*.

REFERÊNCIAS

Acestor N, Masina S, Walker J, Saravia NG, Fasel N, Quadroni M. Establishing two-dimensional gels for the analysis of Leishmania proteomes. *Proteomics*. 2002;2(7):877-9.

Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, et al. The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Database issue):D154-9.

Bangs JD, Crain PF, Hashizume T, McCloskey JA, Boothroyd JC. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J Biol Chem*. 1992;267(14):9805-15.

Banuls AL, Hide M, Prugnolle F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*. 2007;64:1-109.

Belkaid Y, Butcher B, Sacks DL. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in Leishmania-infected cells. *Eur J Immunol*. 1998;28(4):1389-400.

Belley A, Chadee K. Eicosanoid production by parasites: from pathogenesis to immunomodulation? *Parasitol Today*. 1995;11(9):327-34.

Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979;7(6):1513-23.

Blackwell JM, Ezekowitz RA, Roberts MB, Channon JY, Sim RB, Gordon S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind Leishmania in the absence of serum. *J Exp Med*. 1985;162(1):324-31.

Bogdan C, Gessner A, Rollinghoff M. Cytokines in leishmaniasis: a complex network of stimulatory and inhibitory interactions. *Immunobiology*. 1993;189(3-4):356-96.

Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M, et al. A common mechanism of stage-regulated gene expression in Leishmania mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem*. 2002;277(22):19511-20.

Brenchley R, Tariq H, McElhinney H, Szoor B, Huxley-Jones J, Stevens R, et al. The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics*. 2007;8:434.

Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science*. 1992;257(5069):539-42.

Brittingham A, Chen G, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun*. 1999;67(9):4477-84.

Brobey RK, Mei FC, Cheng X, Soong L. Comparative two-dimensional gel electrophoresis maps for promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. *Braz J Infect Dis*. 2006;10(1):1-6.

Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect*. 2003;5(13):1231-40.

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

Coburn C, Beverley S. *Procedures for Transfection of Higer Trypanosomatids*. Boston: Harvard Medical School; 1990.

Cohen-Freue G, Holzer TR, Forney JD, McMaster WR. Global gene expression in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 2007;37(10):1077-86.

Colasante C, Ellis M, Ruppert T, Voncken F. Comparative proteomics of glycosomes from bloodstream form and procyclic culture form *Trypanosoma brucei brucei*. *Proteomics*. 2006;6(11):3275-93.

Coulson RM, Smith DF. Isolation of genes showing increased or unique expression in the infective promastigotes of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 1990;40(1):63-75.

Cruz AK, Tosi LR. Molecular biology. *Clin Dermatol*. 1996;14(5):533-40.

Culley FJ, Harris RA, Kaye PM, McAdam KP, Raynes JG. C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. *J Immunol.* 1996;156(12):4691-6.

Daher W, Oria G, Fauquenoy S, Cailliau K, Browaeys E, Tomavo S, et al. A *Toxoplasma gondii* leucine-rich repeat protein binds phosphatase type 1 protein and negatively regulates its activity. *Eukaryot Cell.* 2007;6(9):1606-17.

Dangl JL, Jones JD. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* 2001;411(6839):826-33.

De Souza Leao S, Lang T, Prina E, Hellio R, Antoine JC. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci.* 1995;108 (Pt 10):3219-31.

de Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, et al. MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur J Immunol.* 2003;33(10):2822-31.

Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1455(2-3):341-52.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27(5):305-18.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science.* 2005;309(5733):404-9.

El Fakhry Y, Ouellette M, Papadopoulou B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics.* 2002;2(8):1007-17.

Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2004;20(11):524-30.

Farajnia S, Alimohammadian MH, Reiner NE, Karimi M, Ajdari S, Mahboudi F. Molecular characterization of a novel amastigote stage specific Class I nuclease from *Leishmania major*. *Int J Parasitol*. 2004;34(8):899-908.

Farrell JP, Kirkpatrick CE. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *J Immunol*. 1987;138(3):902-7.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem*. 1983;132(1):6-13.

Ferguson MA. The surface glycoconjugates of trypanosomatid parasites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1997;352(1359):1295-302.

Flinn HM, Smith DF. Genomic organisation and expression of a differentially-regulated gene family from *Leishmania major*. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(4):755-62.

Fragaki K, Suffia I, Ferrua B, Rousseau D, Le Fichoux Y, Kubar J. Immunisation with DNA encoding *Leishmania infantum* protein papLe22 decreases the frequency of parasitemic episodes in infected hamsters. *Vaccine*. 2001;19(13-14):1701-9.

Franco FA. Caracterização da região META 1 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e comparação com a região ortóloga de *L. (L.) major* [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Franke ED, Wignall FS, Cruz ME, Rosales E, Tovar AA, Lucas CM, et al. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann Intern Med*. 1990;113(12):934-40.

Furger A, Schurch N, Kurath U, Roditi I. Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. *Mol Cell Biol*. 1997;17(8):4372-80.

Gay LS, Wilson ME, Donelson JE. The promoter for the ribosomal RNA genes of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;77(2):193-200.

Genest PA, Haimeur A, Legare D, Sereno D, Roy G, Messier N, et al. A protein of the leucine-rich repeats (LRRs) superfamily is implicated in antimony resistance in *Leishmania infantum* amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 2008;158(1):95-9.

Ghosh A, Labrecque S, Matlashewski G. Protection against *Leishmania donovani* infection by DNA vaccination: increased DNA vaccination efficiency through inhibiting the cellular p53 response. *Vaccine*. 2001;19(23-24):3169-78.

Grimaldi G, Jr. [Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1982;77(2):195-215.

Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(8):494-501.

Gull K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *Int J Parasitol*. 2001;31(5-6):443-52.

Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, et al. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med*. 1997;186(7):1137-47.

Haile S, Papadopoulou B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(6):569-77.

Hughes AL, Piontkivska H. Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18S rRNA and protein phylogenies. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2003;2(1):15.

Inohara N, Chamailard M, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:355-83.

Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 2002;5(1):76-80.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 2005;309(5733):436-42.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.

Kamhawi S, Modi GB, Pimenta PF, Rowton E, Sacks DL. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. *Parasitology*. 2000;121(Pt 1):25-33.

Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol*. 1990;10(3):1084-94

Kar S, Soong L, Colmenares M, Goldsmith-Pestana K, McMahon-Pratt D. The immunologically protective P-4 antigen of *Leishmania amastigotes*. A developmentally regulated single strand-specific nuclease associated with the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2000;275(48):37789-97.

Kaye PM, Bancroft GJ. *Leishmania donovani* infection in scid mice: lack of tissue response and in vivo macrophage activation correlates with failure to trigger natural killer cell-derived gamma interferon production in vitro. *Infect Immun*. 1992;60(10):4335-42.

Kedzierski L, Montgomery J, Bullen D, Curtis J, Gardiner E, Jimenez-Ruiz A, et al. A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. *J Immunol*. 2004;172(8):4902-6.

Kima PE, Soong L, Chicharro C, Ruddle NH, McMahon-Pratt D. *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells. *Eur J Immunol*. 1996;26(12):3163-9.

Knuepfer E, Stierhof YD, McKean PG, Smith DF. Characterization of a differentially expressed protein that shows an unusual localization to intracellular membranes in *Leishmania major*. *Biochem J*. 2001;356(Pt 2):335-44.

Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, et al. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun*. 2004;72(4):1920-8.

Lainson R, Shaw J. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press Inc; 1987. 120 p.

Lang T, de Chastellier C, Frehel C, Hellio R, Metezeau P, Leao Sde S, et al. Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Cell Sci*. 1994;107(Pt 1):69-82.

Laskay G, Varhelyi T, Dale RE, Dexter TM. Role of interleukin-3 in the regulation of intracellular K⁺ homeostasis in cultured murine haemopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;214(2):348-53.

Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;152(1):35-46.

Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*. 2003;2(5):830-40.

Liese J, Schleicher U, Bogdan C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol*. 2007;37(12):3424-34.

Lu HY, Buck GA. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;44(1):109-14.

Lumsden, W. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1974;68:74-75.

Madeira da Silva L, Owens KL, Murta SM, Beverley SM. Regulated expression of the *Leishmania major* surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(18):7583-8.

Mathews RJ, Sprakes MB, McDermott MF. NOD-like receptors and inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(6):228.

Matlashewski G. Leishmania infection and virulence. *Med Microbiol Immunol.* 2001;190(1-2):37-42.

McDowell MA, Marovich M, Lira R, Braun M, Sacks D. Leishmania priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. *Infect Immun.* 2002;70(8):3994-4001.

McGwire BS, O'Connell WA, Chang KP, Engman DM. Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked Leishmania surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. *J Biol Chem.* 2002;277(11):8802-9.

Medina-Acosta E, Cross GA. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. *Mol Biochem Parasitol.* 1993;59(2):327-9.

Mendez S, Gurunathan S, Kamhawi S, Belkaid Y, Moga MA, Skeiky YA, et al. The potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against Leishmania major evaluated using low-dose, intradermal challenge. *J Immunol.* 2001;166(8):5122-8.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Ministério da Saúde; 2007. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf. [2010 junho 28].

Misslitz A, Mottram JC, Overath P, Aebischer T. Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in Leishmania amastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;107(2):251-61.

Murphy WJ, Watkins KP, Agabian N. Identification of a novel Y branch structure as an intermediate in trypanosome mRNA processing: evidence for trans splicing. *Cell.* 1986;47(4):517-25.

Murray HW, Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med*. 1999;189(4):741-6.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496):1561-77.

Nickel W, Seedorf M. Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008;24:287-308.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):293-305.

Paraguai de Souza E, Esteves Pereira AP, Machado FC, Melo MF, Souto-Padron T, Palatnik M, et al. Occurrence of *Leishmania donovani* parasitemia in plasma of infected hamsters. *Acta Trop*. 2001;80(1):69-75.

Parish CR. The relationship between humoral and cell-mediated immunity. *Transplant Rev*. 1972;13:35-66.

Pertmer TM, Roberts TR, Haynes JR. Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J Virol*. 1996;70(9):6119-25.

Pimenta PF, Saraiva EM, Rowton E, Modi GB, Garraway LA, Beverley SM, et al. Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(19):9155-9.

Pintado V, Martin-Rabadan P, Rivera ML, Moreno S, Bouza E. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. *Medicine (Baltimore)*. 2001;80(1):54-73.

Prina E, Jouanne C, de Souza Lao S, Szabo A, Guillet JG, Antoine JC. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. *J Immunol.* 1993;151(4):2050-61.

Proudfoot L, O'Donnell CA, Liew FY. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol.* 1995;25(3):745-50.

Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei WQ, Ferguson MA, Brimacombe JS, et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(20):10984-9.

Prudovsky I, Tarantini F, Landriscina M, Neivandt D, Soldi R, Kirov A, et al. Secretion without Golgi. *J Cell Biochem.* 2008;103(5):1327-43.

Puentes SM, Dwyer DM, Bates PA, Joiner KA. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J Immunol.* 1989;143(11):3743-9.

Quijada L, Guerra-Giraldez C, Drozd M, Hartmann C, Irmer H, Ben-Dov C, et al. Expression of the human RNA-binding protein HuR in *Trypanosoma brucei* increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(20):4414-24.

Rafati S, Salmanian AH, Taheri T, Vafa M, Fasel N. A protective cocktail vaccine against murine cutaneous leishmaniasis with DNA encoding cysteine proteinases of *Leishmania major*. *Vaccine.* 2001;19(25-26):3369-75.

Reiner NE, Ng W, McMaster WR. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol.* 1987;138(6):1926-32.

Reiner NE, Ng W, Ma T, McMaster WR. Kinetics of gamma interferon binding and induction of major histocompatibility complex class II mRNA in *Leishmania*-infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(12):4330-4.

Reithinger R, Mohsen M, Wahid M, Bismullah M, Quinnell RJ, Davies CR, et al. Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2005;40(8):1148-55.

Ribeiro-Gomes FL, Moniz-de-Souza MC, Alexandre-Moreira MS, Dias WB, Lopes MF, Nunes MP, et al. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol*. 2007;179(6):3988-94.

Rodriguez M, Kim B, Lee NS, Veeranki S, Kim L. MPL1, a novel phosphatase with leucine-rich repeats, is essential for proper ERK2 phosphorylation and cell motility. *Eukaryot Cell*. 2008;7(6):958-66.

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*. 2004;430(6998):463-7.

Roy G, Dumas C, Sereno D, Wu Y, Singh AK, Tremblay MJ, et al. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;110(2):195-206.

Sabet C, Lecuit M, Cabanes D, Cossart P, Bierne H. LPXTG protein InIj, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infect Immun*. 2005;73(10):6912-22.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:453-83.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(11):845-58.

Sadlova J, Hajmova M, Volf P. *Phlebotomus (Adlerius) halepensis* vector competence for *Leishmania major* and *Le. tropica*. *Med Vet Entomol*. 2003;17(3):244-50.

Sambrook PM, Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: CSHL; 2001.

Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol.* 1995;154(10):5320-30.

Schatz G, Dobberstein B. Common principles of protein translocation across membranes. *Science.* 1996;271(5255):1519-26.

Schneider P, Rosat JP, Bouvier J, Louis J, Bordier C. *Leishmania major*: differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Exp Parasitol.* 1992;75(2):196-206.

Schuster JM, Nelson PS. Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease. *J Leukoc Biol.* 2000;67(6):767-73.

Seepersaud R, Hanniffy SB, Mayne P, Sizer P, Le Page R, Wells JM. Characterization of a novel leucine-rich repeat protein antigen from group B streptococci that elicits protective immunity. *Infect Immun.* 2005;73(3):1671-83.

Sereno D, Roy G, Lemesre JL, Papadopoulou B, Ouellette M. DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1168-73.

Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:117-43.

Shaw J. New world leishmaniasis: the ecology of Leishmaniasis and the diversity of Leishmanial species in Central and South America. In: Farrel JP, editor. *Leishmania*. Pennsylvania: Kluwer Academic Publishers; 2002. p. 193.

Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics.* 2008;8(19):4083-99.

Sjolander A, Baldwin TM, Curtis JM, Handman E. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. *J Immunol.* 1998;160(8):3949-57.

Sorensen AL, Hey AS, Kharazmi A. Leishmania major surface protease Gp63 interferes with the function of human monocytes and neutrophils in vitro. *APMIS*. 1994;102(4):265-71.

Ten Asbroek AL, Ouellette M, Borst P. Targeted insertion of the neomycin phosphotransferase gene into the tubulin gene cluster of *Trypanosoma brucei*. *Nature*. 1990;348(6297):174-5.

Teixeira SM, Russell DG, Kirchhoff LV, Donelson JE. A differentially expressed gene family encoding "amastin," a surface protein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *J Biol Chem*. 1994 Aug;269(32):20509-16.

Truhlar SM, Komives EA. LRR domain folding: just put a cap on it! *Structure*. 2008;16(5):655-7.

Uliana SR, Goyal N, Freymuller E, Smith DF. Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. *Exp Parasitol*. 1999;92(3):183-91.

Walker PS, Scharton-Kersten T, Rowton ED, Hengge U, Bouloc A, Udey MC, et al. Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. *Hum Gene Ther*. 1998;9(13):1899-907.

Xu D, Liew FY. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology*. 1995;84(2):173-6.

Yamey G, Torreele E. The world's most neglected diseases. *BMJ*. 2002;325(7357):176-7.

Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, et al. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health*. 2010;15(1):68-76.

Zhang WW, Matlashewski G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(16):8807-11.

Zhang WW, Mendez S, Ghosh A, Myler P, Ivens A, Clos J, et al. Comparison of the A2 gene locus in *Leishmania donovani* and *Leishmania major* and its control over cutaneous infection. *J Biol Chem.* 2003;278(37):35508-15.