**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**Investigação de genes potencialmente implicados
no controle de virulência em *Leishmania major***

Paula Andrea Castañeda Londoño

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

**Investigação de genes potencialmente implicados
no controle de virulência em *Leishmania major***

Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências: Biologia Celular e Molecular

Paula Andrea Castañeda Londoño

Orientadora: Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz

Ribeirão Preto

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Castañeda, Paula Andrea Londoño

Investigação de genes potencialmente implicados no controle de virulência em *Leishmania major*. Ribeirão Preto, 2015

62 p.: il 30cm.

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Cruz, Angela Kaysel

1. *Leishmania L. major*; 2. Virulência; 3. Infecção; 4. Expressão gênica.

Aluno: **Castañeda , Paula Andrea Londoño**

Título: **Investigação de genes potencialmente implicados no controle de virulência em *Leishmania major***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular. Orientadora: Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

A mi madre y su amor infinito

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa Angela Kaysel Cruz pela orientação científica e acadêmica. Pelas recomendações e críticas e principalmente por permitir que eu desenvolvesse com liberdade meu trabalho em seu laboratório.

Agradeço a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da Bolsa de Mestrado e Reserva técnica no projeto 2013/10294-1. Agradeço também ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo suporte financeiro no primeiro ano da pesquisa descrita, no âmbito do projeto 130049/2013-1.

Aos membros da banca examinadora da defesa desta tese de Mestrado pela disponibilidade.

Aos meus amigos do grupo de parasitologia molecular que fizeram parte da minha vida pessoal e acadêmica. Lucas Lorenzon (Camundongo), Felipe Freitas (Felipon) e Mateus Rodrigues (Concho). “Infinitas obrigadas por todo!! Me llevo una parte de ustedes conmigo”. E aos meus colegas do Laboratório Eliza Ferreira e Camila Pinzon pela ajuda com os ensaios de infecção. Tiago Ferreira, Juliana Garcia Patrícia Ruy, Natalia malquie, Viviane Ambrósio e Tânia Defina, obrigada por fazer parte de minha história no Brasil e por toda ajuda quando eu precisei. Agradeço também os antigos membros do grupo que desde a distância sempre estiveram me apoiando, Ramon Freitas e Monica Terrão.

Agradeço especialmente a meus amigos de longe e especialmente a meus dois grandes amigos no Brasil, Ligia Prado pela amizade incondicional e sincera. **Rohit Sharma** pelas longas discussões sobre a vida e ciência, pelo tempo e paciência, críticas e constantes incentivos que foram cruciais nos momentos bons e ruins, e sobretudo por acreditar sempre em mim.

A ti por el amor y apoyo, que solo se fortalece con la distancia, Gracias por dejarme siempre volar lejos y soñar siempre a mi lado.

"All I'm gonna do is just go on and do what I feel."
→ *Jimi Hendrix*

RESUMO

Castañeda, P. L. **Investigação de genes potencialmente implicados no controle de virulência em *Leishmania major***. Ribeirão Preto, 2015. 62p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

As infecções humanas com *Leishmania spp* dão origem a um amplo espectro de manifestações clínicas que vão desde lesões tegumentares até comprometimento visceral. O fenótipo da doença está intimamente relacionado com o tipo de resposta do hospedeiro mamífero à infecção do parasito e à variabilidade genética entre as espécies. Neste contexto, a identificação e caracterização de genes que regulam a virulência no fenótipo de *Leishmania* são essenciais para a compreensão dos mecanismos patogênicos do hospedeiro-parasita. Estudos anteriores realizados no laboratório mostraram a atenuação da virulência através da superexpressão do SL RNA em transfectantes de *Leishmania (L.) major* e *Leishmania (V.) braziliensis* em modelo murino. Para entender as mudanças fenotípicas encontradas em *Leishmania (L.) major*, a análise do perfil de expressão de genes permitiu identificar seis genes *down-regulados* e *up-regulados*, que poderiam contribuir individualmente com um padrão de virulência. Seis genes foram selecionados, os quais estão diferencialmente expressos entre as linhagens controle e transfectante. Para identificar genes específicos que poderiam compensar parcialmente a perda de virulência, foram analisados o fenótipo da infecção *in vivo* em camundongos suscetíveis. O conjunto de nossos dados sugerem que os genes estudados (LmjF 12.066 proteína fosfatase serina/treonina (PP2A); LmjF 36,5640 semelhante a ciclina; LmjF 36,4740 PIG-P (fosfatidilinositol N-acetilglucosaminil transferase - subunidade P) podem afetar negativamente a virulência de *Leishmania (L.) major in vivo*. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,005$) entre os transfectantes contendo o vetor vazio e os transfectantes superexpressores, embora a caracterização do crescimento em condições axênicas não mostrou alterações. A localização destas proteínas superexpressas sugerem uma localização citoplasmática. Os resultados apresentados indicam que os altos níveis de expressão destes genes comparado com as linhagens controle afetam negativamente a capacidade de linhagens virulentas, induzam lesões quando são injetadas em camundongos susceptíveis.

Palavras-chave: *Leishmania (L.) major*, virulência, infecção, expressão gênica.

ABSTRACT

Castañeda, P. L. **Searching for genes potentially involved in virulence control in *Leishmania major***. Ribeirão Preto, 2015. 62p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Human infections with *Leishmania spp* give rise to a spectrum of clinical manifestations ranging from tegumentary lesions to a visceral disease. The phenotype of the disease is closely related to the type of parasite mammalian host response to infection and genetic variability among species. In this context, the identification and characterization of genes that regulate virulence in *Leishmania* phenotype is essential to the understanding of the pathogenic mechanisms of host-parasite. Previous studies conducted in the laboratory showed attenuation the virulence due to overexpression of the SL RNA in transfectants of *Leishmania (L.) major* and *Leishmania (V.) braziliensis* in a murine model. To understand the phenotypic changes found in *Leishmania (L.) major*, analyzes gene expression profile allowed to identify genes over- or under-expressed that may individually contribute to the virulence pattern. Six genes were selected which are differentially expressed between the control lines and transfectant. To identify specific genes can partly compensate for the loss of virulence, were analyze the phenotype of infection *in vivo* susceptible mice. Our results suggest that the studied genes (LmjF. 12.0660- Serine/threonine protein phosphatase (PP2A); LmjF. 36.5640 *cycline-like*; LmjF. 36.4740 PIG-P (phosphatidyl inositol N-acetylglucosaminyl transferase subuni P) had a negative effect over virulence of *Leishmania (L.) major in vivo*. Significant differences were observed $p < 0.005$ between parental; transfectants with vector alone and overexpressor, although growth profile in axenic conditions has not shown any change. All the proteins were detected in the cytoplasm. The results presented here indicate that high levels of these proteins affect negatively the ability of a virulent line to induce lesions when injected in susceptible mice.

Keywords: *Leishmania (L.) major*, virulence, infection, gene expression.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg- micrograma

µL- microlitro

µm- micrômetro

µM- micromolar

ATP- trifosfato de adenosina

DNA- ácido desoxirribonucléico

DAPI- 4,6-diamidino-2-fenilindol

dNTP- desoxirribonucleotídeo trifosfato

DL₅₀- dose letal mediana

EDTA- ácido etilenodiamino tetracético

g- unidade de medida da força centrífuga relativa

GFP - *green fluorescent protein*

GPI - glicosilfosfatidilinositol

h- horas

HEPES- 2-4-(2-hidroxietil)-piperazinil-(1) ácido etanosulfônico

ID- identidade

IL - interleucina

kDa- kilo Dalton

LB- Luria broth (meio de cultura)

L- litro

M- molar

mg- miligrama

min- minutos

mL- mililitro

mM- milimolar

mRNA- ácido ribonucleico mensageiro

mm- nanômetro

NEO-neomycin (G418)

°C- graus Celsius

p- *p*- valor estadístico

pb- pares de base de nucleotídeos

PBS- tampão fosfato salino

PCR- reação em cadeia da polimerase

pg- picograma

PMSF- fluoreto de metilfenilsulfonila

rpm- rotação por minuto

RNA- ácido ribonucleico

s- segundos

SDS- dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SL-*spliced Leader*

SL- RNA- transcrito doador de *spliced Leader*

Taq- *Thermus aquaticus* (bactéria termofila)

Th- *T helper cell type*

Tris- tris-(hidroximetil) aminometano

TBS-tampão tris salino

U- unidades

UV- Ultravioleta

V- volts

WT- wild type

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> no hospedeiro mamífero e no vetor biológico.....	5
Figura 2. Transcrição e processamento dos mRNA em <i>Leishmania</i>	7
Figura 3. Modelo de virulência: Interação entre as moléculas do parasita e hospedeiro para o estabelecimento da infecção.....	10
Figura 4. Perfil de expressão diferencial do transcrito do superexpressor de minixon.....	16
Figura 5. Busca de domínios conservados nas sequências proteicas, por BLASTp..	28
Figura 6. Geração dos plasmídeos no vetor pSPBT1YNEO α para a superexpressão dos genes em estudo.....	;
Figura 7. Detecção das proteínas expressas nas linhagens de <i>L. major</i> por Western Blotting com anticorpo anti-HA.....	;
Figura 8. Curso da infecção em camundongos BALB/c infectados com os transfectantes das duas linhagens de <i>L. major</i> (CC1) e (LV39).....	37
Figura 9. Infecção <i>in vivo</i> em BALB/c com os transfectantes de <i>L. major</i> LV39 portando os genes CyL, PIG-P e PP2A a 100X (clone 2) e 200X (clone2) a DL ₅₀	38
Figura 10. Curva de crescimento dos transfectantes PP2A, CyL e PIG-P de <i>L. major</i> LV39 em diferentes concentrações de G418.	40
Figura 11. Proteínas PP2A; CDK e PIG- foram detectadas no citoplasma de promastigotas de <i>L. major</i>	41
Figura 12. Confirmação da presença e anatomia dos plasmídeos nos transfectantes de <i>L. major</i> LV39..	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos genes diferencialmente expressos em Lm[cLHYGME] obtida na análise de microarranjo e pesquisa de Termos GO de acordo com o algoritmo GO <i>Mapper</i> , desenvolvido no laboratório.....	15
Tabela 2. Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.	19
Tabela 3. Ciclos térmicos das PCR.....	20
Tabela 4. Lista de genes avaliados e proteínas correspondentes.	30

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS	vi
SUMÁRIO	i
1. INTRODUÇÃO	1
1.2. Resposta imune.....	2
1.3. Diagnóstico e tratamento	3
1.4. Ciclo de vida do parasita	4
1.5. Regulação da expressão gênica	5
1.5.1 Regulação a nível da maturação do RNA.....	7
1.5.2 Mudanças na estabilidade do RNA	8
1.5.3Regulação traducional e pós-traducional.....	8
1.6.Virulência em <i>Leishmania</i>	9
1.7. Estudos sobre virulência de <i>Leishmania</i> por genética reversa	13
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Cultivo de promastigotas de <i>Leishmania</i>	18
3.2. Extração de DNA genômico e plasmidial	18
3.3. Construções de DNA.....	18
3.4. Transfecção em <i>L. major</i>	21
3.5. Sequenciamento de DNA	21

3.6. SDS-PAGE e <i>Western blotting</i>	22
3.7. Eletroforese de gel em campo pulsado (PFGE).....	22
3.8. <i>Southern Blotting</i>	23
3.9. Digestão de DNA genômico.....	23
3.10. Imunofluorescência indireta	24
3.11. Infecções <i>in Vivo</i>	25
4. RESULTADOS	26
4.1. Caracterização funcional <i>in silico</i> dos genes diferencialmente expressos no transfectantes de SL RNA de.....	26
4.1.1 <i>Cyclin-Like</i>	26
4.1.2. Proteína de direcionamento ao flagelo, putativa kharon1 (KH1)	26
4.1.3. PIG-P (subunidade P da fosfatidil inositol N-acetilglicosaminiltransferase)	27
4.1.4. Proteína hipotética conservada	29
4.1.5. Fosfoproteína fosfatase PP2A	29
4.1.6. <i>Mitochondrial carrier protein-like protein</i>	30
4.2. <i>Clonagem e superexpressão dos genes em linhagens de L. major</i>	31
4.3. Superexpressão dos genes diferencialmente expressos no transfectantes de <i>SL RNA</i> de <i>L. major</i> 33	
5.5. A curva de crescimento dos promastigotas dos transfectantes de <i>L. major</i> LV39 não foi afetada em cultivo axênico.....	39
5.6. Padrão de distribuição das proteínas PP2A, CyL e PIG-P em promastigotas de <i>L.</i> <i>major</i> 41	
5.7. Caracterização molecular parcial dos transfectantes de <i>L. major</i>	42
6. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença negligenciada, transmitida por insetos vetores e causada por um protozoário flagelado do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida) (Herwaldt, 1999); sendo endêmica em ao menos 98 países, em cinco continentes (Alvar et al., 2012). Aproximadamente 2 milhões de pessoas são diagnosticadas a cada ano com a doença, enquanto 350 milhões estão em risco de serem infectadas (segundo a Organização Mundial de Saúde, OMS). Cerca de 20 espécies de *Leishmania* infectam humanos e mais de 30 espécies de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia spp* são responsáveis pela transmissão epidemiológica (Desjeux, 2004) deste parasita, que produz um amplo espectro de manifestações clínicas que variam desde lesões cutâneas de cura espontânea até lesões em mucosas ou comprometimento visceral fatal (Kalazar) (Davies et al., 2003; Herwaldt, 1999; Murray et al., 2005).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença, atingindo aproximadamente entre 0,7 e 1,3 milhões de pessoas anualmente, segundo estimativa de 2015 (WHO, 2015) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. É causada por parasitas dos subgêneros *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e *L. guyanensis*) e *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. amazonensis*) no continente americano, e somente subgênero *Leishmania* (*L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*) nos países dos continentes Europeu, Africano e Asiático. A LC se caracteriza pela presença de pápulas, nódulos ou lesões ulcerativas na pele, dependendo da espécie infectante e pode curar-se de maneira espontânea em poucos meses, desde o início dos sintomas, ou retroceder (Murray et al., 2005; Reithinger et al., 2007). A leishmaniose (LM) muco-cutânea é causada por parasitas do subgênero *Viannia*, sendo particularmente importante epidemiologicamente, a *L. braziliensis*; essa forma clínica manifesta-se em aproximadamente 10% dos casos de infecção por *L. braziliensis* e tem como característica o aparecimento tardio em relação à infecção primária, progredindo de forma grave para a destruição das mucosas naso-orofaríngeas e de difícil tratamento (David and Craft, 2009; Desjeux, 2004). A forma fatal da doença calazar, responsável pela morte anual de aproximadamente 20 milhões de pessoas é causada pelas espécies do complexo *donovani*: *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. A doença se caracteriza pela invasão do sistema retículo endotelial; medula óssea, linfonodos, baço e fígado (Chappuis et al., 2007).

1.2. Resposta imune

Os parasitos do gênero *Leishmania* desenvolvem numerosos mecanismos sofisticados para sobreviver e evadir-se dos mecanismos de defesa dos macrófagos. Entre eles estão incluídos a inibição das funções dos macrófagos tais como: (i) a ativação dos agentes antimicrobianos tais como o óxido nítrico (NO), responsável pelo controle da infecção, (ii) a capacidade da célula hospedeira em apresentar antígenos de parasitas a outros componentes do sistema imune e (iii) a ativação e produção de citocinas, particularmente as envolvidas na resposta inflamatória (IL – 1, fator de necrose tumoral alfa TNF - α) ou na ativação de linfócitos T (IL - 12). Mais do que isso, o contato entre os parasitas e os macrófagos induzem alterações tanto no feedback positivo como negativo dos reguladores das diferentes vias de sinalização do macrófago (Olivier et al., 2005).

Estas estratégias de escape por parte do parasito são de complexas e podem envolver padrões variáveis de resposta imunológica de um hospedeiro para outro e entre espécies de *Leishmania*. Uma resposta imune tipo Th1 está associada com a eliminação dos parasitas, enquanto uma resposta com predominância tipo Th2 leva à persistência da infecção. *Leishmania* são capazes de inibir a produção de uma resposta tipo Th1 promovida por as citocinas IL-1, IL-12 e TNF- α (Bogdan and Röllinghoff, 1998; Olivier et al., 2005). Em modelos de infecção *in vivo* de *L. major* e *L. donovani* observou-se uma clara diferença na indução no início da infecção de citocinas pró-inflamatórias (Olivier et al., 2005). Em análises de expressão gênica usando como modelo macrófagos infectados com *L. chagasi*, verificou-se que os genes que modulam uma resposta tipo Th1 encontram-se menos expressos do que genes envolvidos em resposta antiinflamatória tipo Th2 indicando assim, que determinada espécie de *Leishmania* é capaz de modular a expressão do sistema imune pela regulação da resposta tipo Th1/Th2 dos macrófagos do hospedeiro mamífero (Rodriguez et al., 2004).

1.3. Diagnóstico e tratamento

A visualização direta dos amastigotas por microscopia em amostras clínicas é o padrão ouro para o diagnóstico das leishmanioses (Murray et al., 2005). A sensibilidade do diagnóstico varia com a natureza do material biológico (Guerin et al., 2002; Ramírez et al., 2000) e depende da combinação de uma adequada coleta do material biológico (procedimentos invasivos), número de parasitos na amostra e habilidades técnicas (Murray et al., 2005). Para as formas cutâneas e mucocutâneas, o diagnóstico é principalmente feito pela intradermoreação de Montenegro (IDRM), mas também pode ser baseado em PCR e em provas sorológicas (Reithinger et al., 2007). Para a forma visceral, as técnicas sorológicas baseadas na detecção de anticorpos como: IFA, (*Indirect fluorescent antibody*), ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), *Western Blot*, hemaglutinação indireta e aglutinação (DAT, do inglês *Direct Agglutination Test*) são empregadas em combinação com o diagnóstico clínico, devido às limitações apresentadas em indivíduos soropositivos não-infectados em zonas endêmicas (Chappuis et al., 2007).

Como tratamentos para todas as formas das leishmanioses, os antimoniais pentavalentes ainda são a droga de escolha, sendo usada há mais de 70 anos. Embora esses compostos sejam efetivos e curem o paciente, a necessidade de administração endovenosa em ambiente hospitalar, a duração do tratamento, a alta toxicidade, além do aparecimento de parasitas resistentes dificulta seu uso. Tendo em vista estas desvantagens, outras drogas tais como anfotericina B (custosa), pentamidina (tóxica) e miltefosina (teratogênica) que apresentam as mesmas dificuldades, tem sido empregadas para tratar as diferentes formas da doença. No entanto, a efetividade de cada droga, varia de acordo a espécie, manifestações clínicas e regiões geográficas (Croft et al., 2006).

1.4. Ciclo de vida do parasita

Durante o ciclo de vida, *Leishmania* alterna entre o hospedeiro mamífero e o trato digestivo do inseto vetor, um flebotomíneo (Figura 1). O ciclo de vida começa quando o inseto pica um mamífero infectado. Os amastigotas são liberados após a lise dos fagócitos infectados, diferenciam-se em promastigotas procíclicos no trato digestivo do inseto, que se aderem, via glicoconjugados de superfície no epitélio que recobre o intestino médio do intestino. Posteriormente, esses promastigotas diferenciam-se em promastigotas nectomonas que migram para a parte anterior do trato digestório onde promastigotas leptomonas, passam por novo ciclo de replicação. É nesse estágio de desenvolvimento que o parasito secreta filamentos de proteofosfoglicanos que formam o *plug* (PSGP; *promastigote secretory gel plug*), se diferenciam em promastigotas metacíclicos, a forma infectiva (Gossage et al., 2003). Este processo dura entre 6-9 dias dependendo da espécie de *Leishmania* (Kamhawi, 2006). O PSGP contendo os metacíclicos é regurgitado no momento do repasto sanguíneo. Neste processo cerca de 1000 promastigotas metacíclicos são inoculados na pele (Rogers et al., 2004). Estes são rapidamente fagocitados por macrófagos e outros fagócitos residentes, como as células dendríticas. Após a fusão dos fagossomos com lisossomos, os promastigotas se diferenciam nos amastigotas, formas arredondadas com flagelo restrito à bolsa flagelar, que se multiplicam no ambiente ácido dos fagolisossomos. Estes parasitos permanecem aderidos à membrana do vacúolo e se multiplicam lentamente, especula-se que para não ocasionar a ruptura do vacúolo rapidamente (Chang et al., 2003). O mecanismo pelo qual os parasitos são liberados não está completamente claro; se o macrófago se rompe devido a uma pressão física pela quantidade de amastigotas ou se os parasitos induzem a maquinaria de exocitose dos macrófagos para ocasionar sua liberação (Rittig and Bogdan, 2000). Uma vez que são liberados dos macrófagos, invadem outras células. Assim, quando o flebotomíneo faz seu repasto sanguíneo e se alimenta de células infetadas o ciclo se repete (Bañuls et al., 2007).

Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania* no hospedeiro mamífero e no vetor biológico. (Lipoldová and Demant, 2006)

1.5. Regulação da expressão gênica

Uma das características mais notáveis no genoma dos tripanossomatídeos é a organização dos genes que codificam proteínas. Estes genes encontram-se organizados em unidades de transcrição policistrônica, que se diferenciam dos policistrons presentes em bactérias, pois os genes não se encontram relacionados funcionalmente. Nestes grupos, o cluster de genes direcionais (DGC, do inglês *Directional Gene Cluster*) encontra-se separado por regiões de troca de fita (SSR, do inglês *Strand Switch Region*) divergentes ou convergentes, as quais são ricas em bases A-T (Ivens et al., 2005). Acredita-se que estas regiões contêm os sítios de iniciação e terminação da transcrição (Martínez-Calvillo et al., 2004) e foi demonstrado que o início da transcrição dos genes que codificam proteínas é mais pronunciado nestes sítios (SSR) em *L. major* (Martínez-Calvillo et al., 2004; Martínez-Calvillo et al., 2003).

Foi postulado que o sítio promotor para Pol II em *L. major* tem início nas regiões divergentes e termina nas regiões convergentes dos DGCs (Martínez-Calvillo et al., 2003). Algumas marcas epigenéticas, como por exemplo, a presença de histonas acetiladas (H4K10ac), metiladas H3 (H3K4met), variantes de histona H2A e H2B, são associadas aos sítios de iniciação da transcrição (divergente) (Siegel et al., 2005). Porém, os sítios de terminação (convergentes), parecem ser regulados pela presença da base J, em um processo específico em *Leishmania* (van Luenen et al., 2012). Algumas timinas (T) no DNA de tripanosomas e *Leishmania* sofrem modificações (hidroxilação e glicosilação) convertendo-se na base J (β -D-glicosil-hidroximetiluracila) (Reynolds et al., 2014).

Em *Leishmania*, os transcritos que serão traduzidos devem ser processados por um mecanismo acoplado de *trans-splicing* e poliadenilação (Figura 2)(LeBowitz et al., 1993). O mecanismo de *trans-splicing*, inicia-se no sítio acceptor de trans-splicing (SAS) composto por um dinucleotídeo AG, localizado a jusante de uma trilha de polipirimidinas. O processo consiste na adição de uma sequência de 39 nucleotídeos, denominado minixon ou *spliced leader* RNA (SL RNA) na extremidade 5' do mRNA mediante um processo de trans-esterificação (Benz et al., 2005; Liang et al., 2003). Desta forma, cada mRNA contém na extremidade 5' uma estrutura CAP (7 metil-guanosina). A maquinaria que determina o sítio de trans-splicing de um gene, determina o local de clivagem do transcrito à montante, em que ocorrerá a adição da cauda poli-A. Como os tripanosomatídeos não possuem sequências consenso AAUAA para a clivagem e poliadenilação (Agabian, 1990), o modelo sugere que a maquinaria que promove o *splicing* está envolvida na determinação do segundo sítio de clivagem do RNA, que definirá a extremidade 3' do gene a montante (entre 100 e 300 nucleotídeos) (LeBowitz et al., 1993). Apesar da organização genética, no genoma dos tripanossomatídeos raramente encontra-se íntrons. Quatro genes que contêm íntrons foram identificados em *L. major* (Ivens et al., 2005). Um deles codifica para poli(A) polimerase (PAP) pelo processo de *cis-splicing* (Mair et al., 2000).

Figura 2. Transcrição e processamento dos mRNA em *Leishmania*.

1.5.1 Regulação a nível da maturação do RNA

Sabendo que em *Leishmania* e outros tripanossomatídeos não se conhecem promotores canônicos para a RNA polimerase II (Pol II) (Clayton and Shapira, 2007) e o fato de que o processo de transcrição seja policistônico, e que de um mesmo policistron, os transcritos apresentem diferentes níveis de expressão durante o ciclo de vida, indicam que a regulação da expressão gênica nesses organismos acontece principalmente no nível pós-transcricional (Clayton, 2002). São descritos vários mecanismos de regulação pós-transcricional (Figura 2).

Um ponto de controle da regulação da expressão gênica acontece ao nível da maturação do RNA (LeBowitz et al., 1993). Um exemplo clássico é a regulação dos genes fosfoglicerato quinase (PGK) em *T. brucei*. No genoma desses parasitas existem três cópias gênicas de PGKA, PGKB, PGKC, que são co-transcritos em uma mesma molécula de RNA policistônico. Esta molécula de RNA apresenta níveis muito baixos de mRNA para o gene PGKA, em contrapartida dos genes PGKB e PGKC, os quais

apresentam níveis mais elevados. Esta expressão diferencial se deve a uma baixa eficiência no *splicing* no primeiro gene do precursor policistrônico de PGK (Kapotas and Bellofatto, 1993).

1.5.2 Mudanças na estabilidade do RNA

Vários trabalhos descrevem a variação dos níveis dos mRNA diante de diferentes estímulos nas fases do ciclo de vida de *Leishmania*, como consequência de alterações na sua estabilidade. Estas diferenças se devem a fatores proteicos que se ligam a determinadas regiões dos transcritos, principalmente nas 3'UTR, aumentando ou diminuindo sua meia-vida. Em *L. chagasi* os genes que codificam a glicoproteína de superfície (GP63) regulam sua expressão pelo controle dos níveis dos mRNAs (Purdy et al., 2005). Tais mRNAs se expressam principalmente em promastigotas em fase logarítmica de crescimento e a inibição da síntese das proteínas do parasito provoca um aumento dos seus níveis. A sequência responsável por esse comportamento localiza-se entre os nucleotídeos 303 e 505 da 3'UTR, ocasionando a desestabilização dos mRNA, devido a ligação de um fator proteico lábil. Outros exemplos de genes que são regulados mediante a estabilização-desestabilização dos mRNAs são os genes A2, GP46, vários transportadores de glicose, HSP83 e HSP70 (Aly et al., 1994; Beetham et al., 1997; Burchmore and Landfear, 1998; Charest et al., 1996; Larreta et al., 2004; Quijada et al., 2000).

1.5.3 Regulação traducional e pós-traducional

O controle da eficiência na tradução de um mRNA junto com a estabilidade da proteína gerada constituem outro ponto crucial na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos. Anteriormente foi demonstrado que os genes da amastina expressos em amastigotas de *L. infantum*, apresentam um mecanismo de regulação de estabilidade de seus mRNA que envolve elementos cis presentes na 3'UTR (Wu et al., 2000). Além disso, foi descrito um segundo mecanismo de regulação destes genes que operaria a nível traducional (McNicoll et al., 2005). Na 3'UTR destes mRNAs existem dois elementos de 450 e 100 nucleotídeos, que de forma sinérgica, promovem sua tradução no estágio amastigota, sendo este mecanismo de ação independente daquele que controla a estabilidade dos mRNAs.

Nos genes HSP83 de *L. amazonensis* também já foi descrito o envolvimento de uma região compreendida entre os nucleotídeos 201 e 472 da 3'UTR, em uma maior eficiência de tradução dos transcritos HSP83 quando os promastigotas são expostos a choque térmico (Zilka et al., 2001); esta regulação também ocorre nos genes HSP83 de *L. infantum* (Larreta et al., 2004). Os genes que codificam as histonas de *L. infantum* não apresentam variações nos níveis de seus mRNAs nas diferentes fases do ciclo celular, porém a síntese de proteínas aumenta na fase S, de forma paralela ao processo de replicação de DNA. Foi postulado que as mudanças na taxa de tradução dos transcritos de histonas estariam associadas a um repressor traducional durante a fase G1, que se liberaria na fase S, permitindo a união dos transcritos aos ribossomos para sua tradução (Soto et al., 2004).

As modificações pós-traducionais constituem outro possível nível de regulação da expressão gênica em *Leishmania*. Em *L. infantum*, foi caracterizado um gene GP63 que dá lugar a uma molécula de mRNA de 3kb; no entanto, a expressão deste gene dá lugar a dois polipeptídeos de 58 e 60 kDa. A proteína de 60 kDa está claramente presente durante as diferentes fases de crescimento dos promastigotas (logarítmica e estacionária), enquanto que a expressão do polipeptídeo de 58 kDa é mínima na fase logarítmica, alcançando seu máximo de expressão em promastigotas estacionários. Ambos polipeptídeos diferem no seu padrão de glicosilação, que estaria associado com a expressão diferencial de ambos (González-Aseguinolaza et al., 1997).

1.6. Virulência em *Leishmania*

Todas as formas de leishmaniose começam com a mesma via de entrada (pele), infectam a mesma célula alvo e causam resposta inflamatória no hospedeiro mamífero. No entanto, por mecanismos desconhecidos, algumas espécies são capazes de promover infecções que vão desde lesões cutâneas de cura espontânea, inflamação das mucosas oral e nasal, até comprometimento visceral fatal se não for tratada (Murray et al., 2005). O grau de patogenicidade, tradicionalmente definido como "virulência", é manifestado com o conjunto de manifestações clínicas encontradas nas leishmanioses (Chang and McGwire, 2002). Fatores associados ao parasito e à variabilidade genética de cada espécie infectiva assim como a resposta imune do hospedeiro e sua genética influenciam o fenótipo de virulência (Rivas et al., 2004).

O fenômeno de virulência em *Leishmania* é um processo complexo e dinâmico, onde todas as formas clínicas de leishmaniose envolvem uma fase de infecção, apresentação dos sintomas e cura. De acordo com o modelo de "Virulência" proposto por Chang e colaboradores (Chang et al., 1999; Chang and McGwire, 2002) o resultado de cada fase está determinado pelas interações de um grupo de moléculas do parasita com os determinantes do sistema imune do hospedeiro. As moléculas no parasita são classificadas dentro de três grupos: (i) moléculas invasivas/evasivas, usualmente conhecidas como "fatores de virulência", que permitem que o parasita, além do escape do sistema imune, estabeleça-se nos macrófagos do hospedeiro; (ii) moléculas "pato-antigênicas" que são expostas durante a infecção ou (iii) moléculas "protetoras", que reduzem os efeitos dos pato-antígenos e causam a resolução da doença. O resultado de uma interação negativa entre (i) e (ii) com o sistema imunológico do hospedeiro, causa a imunopatologia manifestada com os sintomas encontrados nas leishmanioses (Figura 3).

Figura 3. Modelo de virulência: Interação entre as moléculas do parasita e hospedeiro para o estabelecimento da infecção, doença e cura. α = Contra (Chang and McGwire, 2002).

Os determinantes invasivos/evasivos são conhecidos como fatores de virulência que podem ser encontrados na superfície ou podem ser secretados. Estes se encontram em todas as espécies de *Leishmania* spp e contribuem indiretamente para o fenótipo de virulência (Chang et al., 1990; Chang and McGwire, 2002; Matlashewski, 2001; Olivier et al., 2012). Já foram caracterizadas várias moléculas envolvidas na virulência em *Leishmania* como o glicosilfosfatidilinositol (GPI), glicosilfosfolipideo (GILP), lipofosfoglicano (LPG), proteína A2, cisteína peptidase, glicoproteína de 63 kDa, GP63 (Chang et al., 1990; Chang and McGwire, 2002; Matlashewski, 2001), mas as moléculas de superfície predominantemente estudadas são os LPGs e a GP63 (também nomeada leishmanolisina).

Os lipofosfoglicanos (LPG), das mais abundantes moléculas de superfície dos promastigotas tem se mostrado como um fator de virulência atuante em *L. major* (Späth et al., 2000). Sua composição pode variar entre espécies de *Leishmania* (Turco et al., 2001) e também nas diferentes formas de vida (Sacks et al., 1990). Sua função é facilitar a adesão na membrana dos macrófagos, proteger a célula dos ataques pelo sistema do complemento e proteolíticos da célula hospedeira, desacelerar a maturação do fagossomo, permitindo assim a diferenciação em estágio amastigota (Olivier et al., 2005). No entanto, LPG em algumas espécies como *L. mexicana* aparentemente não está envolvido com o fenótipo de virulência (Ilg, 2000; Turco et al., 2001), ao contrário do que foi descrito para *L. major*, com parasitas nocaute para o gene *lpg1* (Späth et al., 2003).

A GP63, uma protease também abundante na superfície de *Leishmania*, é uma metalopeptidase ancorada via GPI (Bouvier et al., 1989; Olivier et al., 2012). Sua abundância é reduzida em amastigota comparada com a forma promastigota (Frommel et al., 1990; Medina-Acosta et al., 1989). Esta proteína de 63 kDa está envolvida na interação direta dos promastigotas com os receptores dos macrófagos e com o sistema de complemento (Brittingham et al., 1995; Joshi et al., 2002; McGwire et al., 2003; Russell and Wilhelm, 1986). Atua também como aceitor primário para o receptor C3, que melhora a fagocitose e sobrevivência no macrófago (Russell, 1987) modulando as vias de sinalização e funções dentro do macrófago (Gomez et al., 2009; Isnard et al., 2012; Olivier et al., 2012). Apesar de a GP63 das diferentes espécies de *Leishmania* compartilhar uma alta similaridade na sequência, existem algumas diferenças. Um resíduo de cisteína essencial para a atividade proteolítica à sequência pro-peptídica (Yao et al., 2003), de forma interessante, não é observada na espécie não patogênica, *L. tarantolae* (Campbell et al., 1992). Por outro lado, tem-se observado que a GP63 em *L. major* é ativa em pH neutro e alcalino, enquanto em *L.*

mexicana é mais ativa em pH ácido (Bouvier et al., 1990). Por último, foi relatado que em várias espécies de *Leishmania* a glicoproteína GP63 pode existir seja na superfície, internamente ou livre. Estas três formas podem ser transportadas separadamente. As proteínas de superfície, por exemplo, interagem rapidamente com a célula hospedeira, enquanto as que se encontram internamente servem como reserva para a liberação depois da inoculação dos promastigotas metacíclicos na pele (Yao et al., 2007).

Das proteínas secretadas, várias peptidases têm sido reconhecidas como fatores de virulência em *Leishmania* (Mottram et al., 2004). A cisteína protease é capaz de manipular a sinalização das interleucinas, assim suprimindo a resposta protetora tipo Th1, facilitando assim a sobrevivência dos parasitas (Buxbaum et al., 2003; Mottram et al., 2004; Weinheber et al., 1998).

Ao contrário das moléculas ligadas na superfície, os pato-antígenos são altamente imunogênicos. Estas moléculas são proteínas citoplasmáticas solúveis de estrutura conservada as quais se incluem: (i) as proteínas de choque térmico que estão envolvidas na função de montagem, localização intracelular, secreção, regulação, estabilização e degradação de outras proteínas nas células eucariotas e procariotas (Young et al., 2004); (ii) proteínas ribossômicas, (iii) histonas (iv) LACK (*Leishmania* homologue of receptors for activated C kinase) e rK39 (Requena et al., 2000). Os autores especulam que os assim chamados pato-antígenos são expostos ao sistema imune do hospedeiro depois da lise dos amastigotas intracelulares. Os antígenos são apresentados ao sistema imune, usando a via de MHC. Não está claro se alguns amastigotas lisados dentro da célula intacta podem apresentar por si só ao sistema imune usando o sistema MHC classe I, ou se a célula hospedeira os desintegra liberando-os para serem endocitados por outros fagócitos e posteriormente apresentados pelo sistema MHC classe II de uma maneira independente (Chang et al., 2003; Requena et al., 2000). Alguns destes antígenos podem ser espécie-específicos como, por exemplo, a K39 que é uma proteína intracelular motora (cinesina) expressa só nos amastigotas de todas as espécies do complexo *L. donovani* (Burns et al., 1993) e LCK que só se encontra em *L. major* mas não em *L. mexicana* (Torrentera et al., 2001).

1.7. Estudos sobre virulência de *Leishmania* por genética reversa

Na busca por explicações sobre mecanismos e fatores de virulência e sua relação com o desenvolvimento das leishmanioses, nos últimos anos uma variedade de técnicas de manipulação genética (Beverley, 2003a; Roberts, 2011), em associação com os resultados dos projetos de genoma de várias espécies de *Leishmania* (Downing et al., 2011; Ivens et al., 2005; Llanes et al., 2015; Peacock et al., 2007; Rogers et al., 2011), permitiram ampliar o conhecimento sobre a biologia desses parasitos e sua interação parasito-hospedeiro. Análises comparativas entre os genomas revelaram um alto grau de conservação no conteúdo de genes e arquitetura entre as espécies do subgênero *Viannia* e *Leishmania* (Peacock et al., 2007). Apenas um pequeno grupo de genes espécie-específicos difere entre as espécies e codificam para proteínas de função desconhecida (Llanes et al., 2015; Peacock et al., 2007). O estudo desses genes poderia contribuir para a compreensão do mecanismo da patogênese das leishmanioses.

Os genes associados a virulência têm um profundo impacto na biologia do parasita, por isso são considerados alvos potenciais de vacinação ou quimioterapia (Duncan et al., 2011). A genética reversa, que consiste na manipulação do gene de interesse por diferentes aspectos, permite identificar aqueles genes ou proteínas cuja função é parcialmente ou totalmente desconhecida. Uma das mais poderosas técnicas é a geração de parasitos nocaute; a deleção do gene é feita por substituição do gene endógeno por marcadores de resistência a drogas, via recombinação homóloga entre as sequências flaqueadoras do gene residente com aquelas flanqueando o marcador de seleção. Parasitos nocaute em associação com o emprego de modelos de infecção *in vivo* e *in vitro*, vem permitido investigar correlações entre os genes investigados e o padrão de virulência do parasito. Outra abordagem de manipulação genética é a complementação funcional, episomal ou cromossômica, que permite a geração de linhagens superexpressoras. Ainda, mas somente em *Leishmania* do subgênero *Viannia*, tornou-se possível promover a diminuição acentuada do nível de genes alvo (*knockdown*) por RNA de interferência (Beverley, 2003b; Roberts, 2011). Todas estas técnicas representam formas robustas de caracterização genética que permitem identificar e investigar genes associados a virulência (Alexandratos et al., 2013; Antoniazi et al., 2000; Zhang and Matlashewski, 2010) ou estudar a regulação da expressão gênica (Brooks et al., 2001; Lahav et al., 2011; Mishra et al., 2003); identificar genes essenciais para a sobrevivência

(Cruz et al., 1991; Cruz et al., 1993; Hassan et al., 2001; Price et al., 2003) ou envolvidos nos mecanismos de aquisição de resistência a drogas (Coelho et al., 2003; Ouellette et al., 1998). A superexpressão pode ainda ser empregada para a produção de proteínas (Breitling et al., 2002; Kapler et al., 1990; Niimi, 2012) ou identificação e expressão de antígenos de superfície com um alto grau de especificidade (Bras-Gonçalves et al., 2014; LeBowitz et al., 1993).

Nos estudos de manipulação genética, a identificação de genes ou moléculas associadas a “virulência” devem obedecer aos postulados de Koch: (i) O gene deve estar associado a patogenicidade e infecção (ii) a ausência do gene deve ocasionar a perda significativa da virulência e (iii) a restauração funcional do gene deve restaurar a patogenicidade (Beverley and Turco, 1998). Por exemplo, foi demonstrado que os lipofosfoglicanos (LPG) de superfície de *L. major* cumprem os três postulados porque: (i) após a infecção do hospedeiro mamífero, o LPG participa na resistência ao complemento, adesão, entrada e proteção dos produtos tóxicos do macrófago, assim como a modulação das vias críticas de sobrevivência do macrófago (Turco and Descoteaux, 1992); (ii) a deleção de gene responsável pela síntese de LPG, o *LPG1*, em *L. major*, ocasionou uma perda da virulência em infecções *in vivo* e *in vitro* e (iii) a virulência só foi restaurada depois da introdução do gene *LPG1* (Späth et al., 2000). Outro exemplo é o gene A2 que é abundante particularmente em amastigotas de *L. donovani*, mas ausente em promastigotas (Charest and Matlashewski, 1994). Empregando RNA *antisense*, foi demonstrado que o gene A2 cumpre com os três critérios e representa o primeiro gene amastigota-específico identificado como fator de virulência em *L. donovani* (Zhang and Matlashewski, 1997).

Essas ferramentas de manipulação genética permitiram investigar organização e mecanismos genéticos/moleculares de *Leishmania* incluindo a caracterização de genes envolvidos na patogênese. Em nosso laboratório, empregando como estratégia a superexpressão do gene miniexon em promastigotass de *L. major* e *L. braziliensis* foi observada uma atenuação dos níveis de virulência em infecções em camundongos BALB/c e hamsters (Antoniuzzi et al., 2000; de Toledo et al., 2009). Análise do proteoma dos transfectantes de *L. major* indicaram que a atenuação da virulência é decorrência do estresse molecular causado pela superexpressão de SL RNA que é acompanhado por um

incremento da tradução das proteínas e de vias proteolíticas específicas (Toledo et al., 2010). Adicionalmente, uma análise do transcriptoma desse transfectante revelou uma lista de 68 genes diferencialmente expressos que, segundo a classificação em termos GO, estariam associados a processos metabólicos, vias de biossíntese, tradução, modificação de ácidos nucleicos e proteínas (Ferreira, 2010). Um dos genes que apresentou expressão acentuadamente diminuída codifica para uma arginina N-metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina, a PRMT7 (LmjF.06.0870). Estudos funcionais conduzidos por Tiago Ferreira, no laboratório, revelaram uma correlação negativa entre o nível de expressão desse gene e o nível de virulência em *L. major* (Ferreira et al., 2014). Ao analisar os extremos da expressão diferencial entre as linhagens controle e os transfectantes de SL RNA de *L. major* em busca de outros genes que poderiam modular a virulência em *L. major*, foram identificados seis genes (Figura 4, Tabela 1) que poderiam, de acordo com sua função predita, estar envolvidos na modulação de virulência de *L. major*.

Tabela 1. Lista dos genes diferencialmente expressos no superexpressor do miniexon em *L. major* obtida por análise de microarranjo e pesquisa de Termos GO (Vasconcelos et al., 2012).

Downregulated Genes	FC†	log2FC	LmjF gene description	GO ID	GO description	Most general GO Term
LmjF. 36.5640*	0.457723081	-1.127453052	hypothetical protein, conserved			
LmjF. 36.5850*	0.325308504	-1.620119558	hypothetical protein, conserved			
LmjF. 36.4750*	0.515349625	-0.956376573	hypothetical protein, conserved			
Upregulated Genes						
LmjF. 12.0660	2.512941329	1.329376988	serine/threonine protein phosphatase-like protein	GO:0016787	hydrolase activity	molecular_function
LmjF. 23.1370	-	-	mitochondrial carrier protein-like protein	GO:0016020	membrane	cellular_component
LmjF. 32.1380*	7.008363511	2.809077607	hypothetical protein, conserved			

†FC: vezes de expressão vetor vazio / superexpressor do miniexon em *L. major*

- : valor já mencionado acima

*: genes sem GO ID

Adaptado (Ferreira, 2010)

Figura 4. Perfil de expressão diferencial do transcriptoma do superexpressor de miniexon (Ferreira, 2010). Gráfico *volcano* representando os resultados obtidos pela comparação com o vetor vazio na análise de microarranjos. Os pontos cinzas indicam os genes que apresentaram taxa de expressão diferencial abaixo do limite de corte, mas estatisticamente significativa; os pontos pretos representam os genes positivos como resultado principal e os quadrados vermelhos, representam os genes avaliados em este estudo (extraído de T. Ferreira, 2010).

2. OBJETIVOS

Para investigar a hipótese de que os genes que apresentaram expressão diferencial no transcrito dos transfectantes de SL RNA de *L. major* estão potencialmente envolvidos em virulência, realizamos uma varredura funcional *in vivo* empregando parasitos construídos para superexpressar cada um dos seis genes de interesse. Para cumprir esse objetivo, nossos objetivos específicos foram:

- ✓ Fazer as construções moleculares para superexpressar os genes LmjF. 12.0660; LmjF. 36.5640; LmjF. 36.4740; LmjF 23.1370; LmjF 36.4750; LmjF 32.1380 (marcados com HA) que foram identificados nos transfectantes de SL RNA de *L. major*.
- ✓ Transfectar esses genes em linhagens virulenta e não virulenta de *L. major*.
- ✓ Avaliar o padrão de expressão protéica global dos superexpressores de *L. major* e seus efeitos em cultivos de promastigotas axênicos.
- ✓ Analisar o perfil de infecção *in vivo* em camundongos BALB/c, utilizando como controle a mesma linhagem transfectada apenas com o vetor.
- ✓ Avaliar a distribuição intracelular das proteínas por microscopia de fluorescência.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo de promastigotas de *Leishmania*

Promastigotas de *L. major* da cepa virulenta LV39 (MRHO/SU/59/P) e da cepa não virulenta CC1 (MHOM/IR/83/LT252) foram cultivados a 25°C em M199 (Sigma-Aldrich), com 10% de soro fetal bovino, 100 µM adenina, 10 mg/mL de hemina, 50µg/mL biotina, 40 mM HEPES pH 7.4, 50 unidades/mL penicilina, 50 mg/mL de estreptomicina (Kapler et al., 1990). Para a manutenção do plasmídeo, os transfectantes gerados foram mantidos na presença de droga de seleção a partir de 10µg/mL (10xDL₅₀) até 200µg/mL (200xDL₅₀) de G418 (Sigma-Aldrich).

3.2. Extração de DNA genômico e plasmidial

O DNA genômico de promastigotas de *L. major* LV39 mantidas em cultivo axênico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989). Para a extração de plasmídeos, foi empregado o Plasmidprep Mini Spin (GE Healthcare) e PlasmidMaxi KiT (Qiagen). Os protocolos de extração foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

3.3. Construções de DNA

As sequências codificadoras de cada gene foram obtidas a partir do banco de dados TriTrypDB para a geração dos iniciadores empregando o software Geneious R6 (Biomatters Ltda). Cada iniciador contém um sítio de restrição na sua extremidade 5' para *Bam*HI (iniciador *forward*) e para *Hind*III (iniciador *reverse*). Os iniciadores *reverse* contêm também na extremidade 5' um marcador (*tag*) com uma sequência de nucleotídeos que codificam para alguns resíduos de aminoácidos da proteína Hemaglutinina da gripe humana (HA-Tag) (Tabela 2).

Tabela 1. Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.

Nome do iniciador	Sequência
LmjF. 12.0660_Fw	GTTggatccAAGTTGCTCGCCCGGACTGC
LmjF. 12.0660_Rv	GTTAagcttTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACACGTGGAAATCGTGGGTGAGGT
LmjF. 36.5850_Fw	GTTggatccACGGAGGGTAACAGGGGCCA
LmjF. 36.5850_Rv	GTTAagcttTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACGAAGATGTGCCGGGGTCGT
LmjF. 36.5640_Fw	GTTggatccCGGTTGCGGTGGTCGGTCTC
LmjF. 36.5640_Rv	GTTAagcttTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGCGGCTAGTGCCGAGGCCAG
LmjF. 36.4750_Fw	GTTggatccGAGCCAAGGCCTGGTGAGCG
LmjF. 36.4750_Rv	GTTAagcttTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATCGCACTTTCTCATTCCACGGCT
LmjF. 32.1380_Fw	GTTggatccTTGTGCGCGTGACACCTGCT
LmjF. 32.1380_Rv	GTTAagcttTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATCAAAGCGATGCTCGAACGG
LmjF. 23.1370_Fw	GTTggatccGGTGTTCCGGGTGACCGCTCT
LmjF. 23.1370_Rv	GTTAagcttTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACTTGCGGTGATGGCGACGAC

As sequências em letras minúsculas indicam reconhecimento por enzimas de restrição :

Oligonucleotido Fw_ *Bam* HI

Oligonucleotido Rv_ *Hin* dIII

HA-Tag (Vermelho)

Para os experimentos de reação de PCR, 1 ng de DNA genômico e 1 ng de DNA do plasmídeo pSBT1YNEO foi adicionado à mistura de amplificação que contém tampão 1X (Invitrogen); 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen); 0.2 µM de cada iniciador (Invitrogen); Taq DNA polimerase, 0.05 U/µl (Invitrogen); 1 mM de MgCl₂ (Invitrogen). O ajuste para o volume final de 50 µl foi feito com água estéril. As reações foram amplificadas no termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* em diferentes condições (Tabela 2). O gene LmjF.12.0660 foi amplificado em uma reação de PCR modificada (Hot Start) Desnaturação sem Taq polimerase e iniciadores. Um controle negativo de mistura de amplificação com água foi incluído em cada reação de PCR. Os amplicons obtidos foram purificados a partir de gel de agarose 0.8%, utilizando o kit Gel Band Purification (GE Healthcare) e posteriormente subclonados no vetor pTZ57R/T (Fermentas) por clonagem T/A. Por digestão dupla com *Bam*HI e *Hind*III os fragmentos foram obtidos e subclonados no vetor de expressão em *Leishmania* pSBT1YNEO.

Tabela 2. Ciclos térmicos da PCR

Genes	Temperatura/Tempo						
	Ativação	Denaturação	Alinhamento	Extensão	Extensão final	Esfriamento	# Ciclos
LmjF. 32.1380	95 C/ 5min	94 C/45 seg	64 C /30 seg	72 C / 1.30 min	72 C/ 10 min	16/ hold	25
LmjF. 23.1370	95 C/ 5min	94 C/45 seg	63 C /30 seg	72 C / 1.20 min	72 C/ 10 min	16/ hold	25
LmjF. 12.0660**	95 C/ 5min	95 C/45 seg	64 C /30 seg	72 C / 1.30 min	68 C/ 10 min	16/ hold	25
LmjF. 36.4750	95 C/ 5min	95 C/1min	63 C /30 seg	72 C / 1.20 min	72 C/ 10 min	16/ hold	25
LmjF. 36.5850*	95 C/ 5min	95 C/1min	63 C /30 seg	68 C / 3 min	68 C/ 10 min	16/ hold	25
LmjF. 36.5640*	95 C/ 5min	95 C/1min	63 C /30 seg	68 C / 3 min	68 C/ 10 min	16/ hold	25

*Taq polimerase High Performance

**PCR Hot Start

Para a reação de ligação dos amplicons no vetor, foram utilizados 50 ng do vetor e 55 ng de inserto, 1 µl da enzima T4 DNA ligase (New England Biolab) por 16 h a 10°C, em volume final de 20 µl de reação de ligação. Os produtos de ligação foram precipitados a -70°C por 1 hora utilizando 3 volumes de etanol (100%) e 1M de acetato de sódio (3M). Posteriormente foi centrifugada a 20000 por 40 min a 4°C. Os precipitados foram lavados com 500µl de etanol 70% a 10000 por 5 min e desidratados e posteriormente ressuspensos em 10µl de água Milli-Q. As construções recombinantes foram transformadas em *Escherichia coli* DH10B por eletroporação (pulso de 2,5 kV/cm; capacitância de 25 µF) no aparelho Gene Pulser (Bio-Rad).

As células foram posteriormente recuperadas em meio líquido LB em agitação a 37°C por 1 h. Depois da recuperação, 100 µl da reação de transformação foram plaqueados em meio LB sólido (1,5% de Ágar) com ampicilina (100 µg/mL) como droga de seleção. A partir das colônias positivas, foram extraídos o DNA plasmidial e os clones confirmados por perfil de restrição com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (New England Biolabs) e posterior sequenciamento (ABI3100, Applied Biosystems) pelo método de Sanger (Sanger et al., 1992).

As construções, confirmadas pelo sequenciamento e perfil de restrição, foram novamente digeridas com as enzimas de restrição (*Bam*HI - *Hind*III), o inserto foi purificado e clonado no vetor de expressão de *Leishmania*, pSPBT1YNEOα (McNicoll et al., 2006; Padmanabhan et al., 2012) que contém o gene da neomicina fosfotransferase que confere resistência ao aminoglicosídeo G418. A reação de ligação (50 ng vetor e 20 ng de inserto) foi realizada com a enzima DNA ligase (New England Biolabs) por 16 h a 4°C de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de ligação foram precipitados, seguido de transformação de *Escherichia coli* DH10B; os clones foram

selecionados com o antibiótico ampicilina. O DNA plasmidial foi extraído (PlasmidMidi KiT (Qiagen®) e mantido em condições estéreis para a transfecção em duas linhagens de *L. L. major*.

3.4. Transfecção em *L. major*

Promastigotas (4×10^7 células) da linhagem virulenta (LV39) e da não virulenta (CC1) de uma cultura em fase logarítmica de crescimento foram transfectadas por eletroporação (500 μ F e voltagem 2.25 kV/cm) (Cruz et al., 1991). A eletroporação foi feita em Gene pulser (Bio-Rad) com 10 μ g do vetor de expressão pSPBT1YNEO α empregando tampão EPB (HEPES 21mM, pH 7,5; NaCl 137mM; KCl 5mM; Na₂HPO₄ 0,7 mM; Glicose 6 mM) de acordo com o protocolo estabelecido por Kapler e colaboradores. Posteriormente, as células foram plaqueadas e selecionadas com (1 μ g/ μ l) 10XDL₅₀ de G418 (Sigma-Aldrich) em meio semi-sólido M199. Transfectantes que contêm o vetor vazio foram gerados como controle dos experimentos de infecção.

3.5. Sequenciamento de DNA

Para confirmação das clonagens e determinação da sequência correta de nucleotídeos foi utilizado protocolo adaptado a partir do original descrito por Sanger (Sanger et al., 1992). As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando o “*BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1*” (Applied Biosystems), 5 μ M dos iniciadores T7 e 300-500 ng de DNA plasmidial. As condições foram as seguintes: 1 min a 95°C, seguidos de 39 ciclos com desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 50°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 min. Após a precipitação dos produtos em isopropanol 75% o DNA foi solubilizado em tampão formamida Hi-Di (Applied Biosystems) e eletroinjetados em sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

3.6. SDS-PAGE e *Western blotting*

Promastigotas (3×10^7 células) em fase logarítmica foram centrifugados (10 min, 2000 x g, 4°C) e lavados com 1 ml de PBS (137 mM NaCl; 8 mM Na₂HPO₄; 2.7 mM KCl; 1.5 mM KH₂PO₄; pH 7.0). O extrato celular obtido foi suspenso e homogeneizado em 30 µl de tampão SDS (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,001%; SDS 2%; β-mercaptoetanol 0,28M) e incubados a 95°C por 10 min. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) a 200 V e 4°C usando um padrão de massa molecular de proteínas (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards- Biorad).

As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond™ ECL™), a qual foi bloqueada com 5% de leite desnatado em tampão Tris-Tween 20 (10 mM Tris; 100 mM de NaCl; 0.1% Tween 20) a 4°C, *overnight*. O anticorpo primário comercial policlonal de coelho anti-HA (Invitrogen) e o secundário comercial anti-IgG de coelho conjugado com a peroxidase de rábano (GE Healthcare) na diluição de 1:10000 foram empregados para todos os ensaios, seguindo as instruções do fabricante. Para avaliar o controle de carregamento de proteínas no gel, foi utilizado o anticorpo comercial policlonal de camundongo anti-β tubulina e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Invitrogen) na diluição de 1:10000. ECL caseiro (Luminol 250 mM; ácido-p-cumárico 90 mM) foi empregado como reativo de detecção de quimiluminescência em todos os ensaios. As aquisições das imagens foram feitas com equipamento Image Scanner III (GE-Healthcare).

3.7. Eletroforese de gel em campo pulsado (PFGE)

Promastigotas (4×10^8 células/ml) em fase logarítmica foram centrifugados (10 min, 2000 x g, 4°C) e ressuspensos em 1ml de meio M199 sem soro; meio volume da solução PSG 2X (NaCl 130mM; Na₂HPO₄ 142 mM; NaH₂PO₄ 8mM; Glicose 2,2%) e meio volume de agarose *low melting* 2% a 45°C. Dessa suspensão, 63µl da solução foram adicionados em molde acrílico para formar os *plugs* contendo o DNA genômico intacto. Durante 48 horas os blocos de agarose foram mantidos em 5ml de solução de lise (EDTA 0,5 M pH 9,0; Lauril sarcosinato de sódio 1%; proteinase K 0,5 mg/ml) a 45°C. Passadas as 48 horas, os *plugs* foram lavados com tampão TE (Tris 200mM; EDTA 100 Mm) por 48 horas sob agitação constante, com uma troca de tampão. O DNA genômico embebido

na agarose foi submetido à Eletroforese de Campo Pulsátil em gel de agarose 1% e tampão TBE 1X (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM; pH 8,3, em CHEF DRII, Bio-Rad). As condições de eletroforese para fracionamento apenas do DNA circular, obedeceu ao protocolo descrito por Antoniazi e colaboradores, 5-10 segundos de alternância de pulso por 14.5 horas a 6 V/cm e o DNA foi corado com brometo de etídio por 1 hora e descorado por 30 minutos em água (Antoniazi et al, 2000).

3.8. *Southern Blotting*

O gel foi mantido em solução de despurinização (HCl 0,25N) por 15 min (2X), seguido de solução desnaturante (NaCl 1,5M; NaOH 500 mM) por 15 min (2X) e a solução neutralizante (NaCl 1,5 M; Tris-Cl 0,5M pH 7.0) por 15 min (2X). As lavagens entre cada solução foram feitas com água Milli-Q. Posteriormente o gel e a membrana de náilon Hybond-N+(GE Healthcare) foram equilibrados em tampão SSPE 10X (NaCl 3M; citrato de sódio 0,3M; pH 7.0) e submetidos a transferência por capilaridade, com o mesmo tampão, por 18h. A ligação covalente cruzada (*Crosslink*) foi realizada por exposição a UV sobre o transiluminador por 3 min. O ensaio de hibridação foi feito com kit comercial (AlkPhos Direct-GE-Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante. As sondas de DNA foram feitas a partir das CDS clonadas no vetor pSPBT1YNEO (PP2A; CyL e PIG-P) usando uma digestão dupla com as enzimas (i) *Bam*HI/*Hind*II para o gene PIG-P (ii) *Bgl*II para obter um fragmento de 720pb para o gene PP2A e (ii) para o gene CyL uma digestão com a enzima *Cla*I foi empregada para obter um fragmento de 1.127pb.

3.9. Digestão de DNA genômico

Os blocos de agarose contendo DNA genômico (*plugs*) foram lavados (em tubos de fundo “U”) sucessivamente a temperatura ambiente, em movimento lentos e constantes (Specimix) com TE (10mM Tris; 1mM EDTA). Duas lavagens por 6 horas, seguido de outra *overnight*. Em seguida ao TE foi adicionado PMSF (1mM) e os plugs foram lavados 2x nessa solução, cada lavagem por 2 horas (sob agitação no Speci-mix). Para remover o PMSF a mesma sequência de lavagens em TE, descrita acima, foi utilizada.

Para a digestão do DNA genômico, os *plugs* foram transferidos a tubos Eppendorf™ com o tampão ideal para a enzima de restrição em uso. Uma primeira lavagem e preparado com todos os componentes do tampão de reação comercial, excetuando os reagentes instáveis (ATP, redutores, proteínas). Para equilibrar os *plugs* de DNA eles foram incubados 37°C em 1 ml do tampão da reação. Por duas vezes, em espaço de 3 horas o tampão foi trocado. Depois dos sucessivos tratamentos dos *plugs*, os ensaios de digestão são realizados a 37°C em um volume final de 100µl, empregando 40U das enzimas *Bgl*III e *Bam*HI e seu respectivo tampão de reação comercial (Biolab). Depois de 12 horas de incubação, mais 1µl de cada endonuclease foi adicionado e deixado por 6 horas antes de proceder com a eletroforese em gel de agarose 1% e fracionado em tampão TBE 1X (Tris 45mM; ácido bórico 45mM; EDTA 1mM pH 8.0) a 22V nas primeiras 12 horas, e nas 6 horas seguintes, a 36V. Ao final da eletroforese o gel foi corado por 1 hora em solução 0.5mg/L de brometo de etídio para sua posterior visualização no equipamento Image Scanner III (GEHealthcare). O gel foi tratado e transferido a uma membrana de náilon Hybond-N+(GE Healthcare) como já descrito para o ensaio de Southern Blotting. No ensaio de hibridação com o kit comercial (AlkPhos Direct-GE-Healthcare) a sonda de DNA (NEO) de 890 pb foi obtida a partir de uma digestão com a enzima *Spe*I em no vetor pX63NEO.

3.10. Imunofluorescência indireta

Promastigotas (1×10^7 células) em fase estacionária foram centrifugados (10 min, 2000 x g, 4°C) e resuspendidos em PBS 1X. 30 µl da suspensão de parasitos foram incubados por 10-20 min em uma lâmina previamente tratada com 0,1% polilisina. Os parasitos não aderidos foram retirados com 25 µl de PBS 1X (3 vezes). A permeabilização das células foi feita com Triton X-100 0,3% com PBS e 4% paraformaldeído por 10 minutos em uma câmara úmida. Os poços que contêm os parasitos aderidos e permeabilizados foram lavados 3 vezes com 25 µl de PBS 1X em gelo. Posteriormente, as células foram bloqueadas com BSA 2% por 30min em na câmara úmida e em gelo. Após o bloqueio, os poços foram lavados 1x com 25 µl de PBS 1X em gelo. Os parasitos foram incubados por 30 min com anticorpo anti-HA (Invitrogen) a 1:200 em BSA 2%. Após 3 lavagens com PBS 1X, o anticorpo secundário anti-coelho conjugados a Alexa Fluor 488 (Invitrogen) em BSA 2% (1:100) e o reagente DAPI a 60µM foram adicionados e incubados por 30 min. Após incubação, os poços foram lavados 3 vezes com 25 µl de PBS 1X. As lamínulas foram montadas usando o reagente

ProLong Gold Antifade (Invitrogen). As imagens foram adquiridas usando o microscópio confocal Zeiss LSM 510.

3.11. Infecções *in Vivo*

As condições de uso de camundongos de BALB/c (fêmeas entre 7 e 8 semanas) foi aprovado pelo Comitê de Ética da FMRPUSP. Todos os animais usados para analisar o fenótipo da infecção dos transfectantes de *L. major* foram mantidos em gaiolas convencionais e condições livre de patógenos.

Promastigotas em fase estacionária tardia de crescimento foram inoculados via subcutânea na pata traseira direita dos camundongos usando um inóculo de 1×10^7 parasitos em 25 μ L de PBS. As cepas selvagens LV39 e LT252 e transfectantes controle (com vetor sem inserto) foram usados como controle experimental. Depois de 9 semanas os amastigotas foram recuperados do linfonodo e mantidos em cultivo axênico em meio M199 com diferentes concentrações de G418 que variam desde 10 μ g/ml (10 X DL₅₀) até 200 μ g/ml (200 X DL₅₀) a 25°C por 5 dias até se diferenciarem na forma promastigota. O curso da lesão na pata infectada foi acompanhado semanalmente, com paquímetro digital junto com medição da pata contralateral. Os parasitos recuperados de *L. major* LV39 foram utilizados em novas infecções *in vivo* (de Toledo et al., 2009).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização funcional *in silico* dos genes diferencialmente expressos no transfectantes de SL RNA de *L. major*

4.1.1 *Cyclin-Like*

O gene LmjF.36.5640 se encontra anotado na base dados de tripanossomatídeos, TritrypDB (<http://tritrypdb.org/>), como codificador de uma proteína conservada hipotética de 54 kDa. Analisando os motivos conservados de domínios catalíticos da proteína hipotética pelo programa BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>); pfam (<http://pfam.xfam.org/search>) e interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), foi detectado um domínio característico de ciclinas. Este domínio é o *cyclin box* que é altamente conservado entre as famílias de ciclinas. Este domínio medeia a união da proteína com as *quinases dependentes de ciclinas (CDK)*, interação essencial para sua atividade. As ciclinas são proteínas instáveis que são sintetizadas e degradadas periodicamente durante o ciclo celular, como mecanismo de controle durante progressão normal do ciclo celular (Malumbres and Barbacid, 2005)

4.1.2. Proteína de direcionamento ao flagelo, putativa kharon1 (KH1)

O gene LmjF.36.5850 foi anotado no TritrypDB (<http://tritrypdb.org/>) como um gene que codifica para uma proteína de 59 kDa, uma putativa kharon 1 (KH1), proteína de direcionamento ao flagelo *flagellum targeting protein kharon1, putative* (KH1). Esta proteína representa o primeiro componente descrito de tráfego de proteínas integrais de membrana no flagelo em protozoários. A proteína *Kharon1* é responsável pelo transporte do transportador de glicose (LmxGT1) do bolso flagelar à membrana flagelar em *L. mexicana*. Mutantes de KH1 nestes parasitas mostraram um comprometimento no estabelecimento inicial da infecção na célula hospedeira (Tran et al., 2013), podendo assim ser relacionada como um potencial fator de virulência nesse parasito.

4.1.3. PIG-P (subunidade P da fosfatidil inositol N-acetilglicosaminiltransferase)

O gene LmjF.36.4750 foi anotado no TritypDB (<http://tritypdb.org/>) como um gene que codifica para uma proteína conservada hipotética de 15 kDa. A busca por ortólogas e parálogas no TriTrypDB sugere que a proteína PIG-P está presente em *L. braziliensis* e *L. panamensis*. A análise de motivos conservados, indicador de função, por BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), sugeriu que o gene pode codificar para a subunidade P da fosfatidil inositol N-acetilglicosaminiltransferase (PIG-P) (Figura 5A), envolvida na biossíntese e ancoragem de glicosilfosfatidilinositol (GPI) à membrana.

Âncoras de glicosil-fosfatidilinositol (GPI) se unem à extremidade C-terminal de proteínas de membranas em eucariotos e são particularmente abundantes em tripanossomatídeos (Ropert and Gazzinelli, 2000). Em tripanossomatídeos as proteínas com âncoras GPI têm importantes funções na transdução de sinal, na regulação do sistema imune do hospedeiro e na patogênese (Paulick and Bertozzi, 2008). Nos passos iniciais da síntese e ancoragem de GPI, diferentes enzimas vão sequencialmente transferindo açúcares e a etanolamina fosfatase (EtNP) para fosfatidilinositol (PI) até completar a âncora que vai ser posteriormente ligada à proteína no retículo endoplasmático antes do transporte à membrana celular. A transferase (GPI-GnT) que inicia o processo de biossíntese é composta por um complexo de 7 proteínas (PIG-A, PIG-C, PIG-H, PIG-Q, PIG-P, DPM2 e PIG-Y) (Hong and Kinoshita, 2009). Este é um dentre os genes selecionados em nosso estudo.

Figura 5. Busca de domínios conservados nas sequências proteicas, por BLASTp. Na porção superior de cada painel estão indicados os diferentes domínios putativos conservados que foram identificados. Foram utilizadas como entrada as sequências das proteínas codificadas pelos genes (A) LmjF.35.4750; (B) LmjF.32.1380 e (C) LmjF.12.0660 contra o banco de dados de proteínas de *Leishmania (L.) major* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.1.4. Proteína hipotética conservada

O gene LmjF.32.1380 foi anotado no TritypDB (<http://tritrypdb.org/>) como um gene que codifica para uma proteína conservada hipotética de 38 kDa. A análise por BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) revelou a presença de um domínio *plant homeodomain* (PHD), comum à superfamília de proteínas inibidoras de crescimento (ING, do inglês, inhibitor of growth) (Figura 5B). Além do domínio conservado PHD, as proteínas ING, possuem a sequência de localização nuclear (NLS) e a nova região conservada (NCR) que são compartilhadas pelas proteínas dessa família (Gunduz et al., 2008; Russell et al., 2006). Em *Leishmania* esses outros domínios não foram encontrados, somente o PHD.

4.1.5. Fosfoproteína fosfatase PP2A

O gene PP2A, LmjF.12.0660, foi anotado no TritypDB (<http://tritrypdb.org/>) como um gene pertencente à família das proteínas serina/treonina fosfatases, tem 109 kDa. Em eucariotos essas proteínas pertencem a três famílias (i) fosfoproteína-fosfatases, (ii) proteína-fosfatases dependentes de metal e (iii) fosfatases com mecanismo catalítico baseado em aspartato. Esta classificação é dependente da especificidade do substrato, sensibilidade a inibidores, requerimentos de cátions divalentes, similaridade de sequência e presença de *motif* catalítico (Shi, 2009; Szöör, 2010). A busca por domínios catalíticos conservados por BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) revelou alta similaridade com os domínios conservados da fosfoproteína fosfatase PP2A (Figura 5C). Para a fosfoproteína fosfatase (PP2A) há várias funções celulares importantes descritas; desenvolvimento celular e morte, mobilidade, dinâmica do citoesqueleto, controle do ciclo celular e a regulação da sinalização de diferentes vias (Janssens and Goris, 2001).

4.1.6. Mitochondrial carrier protein-like protein

O gene LmjF.23.1370 se encontra anotado no TritrypDB (<http://tritrypdb.org/>) como um gene que codifica para uma proteína mitocondrial carregadora similar (*mitochondrial carrier protein-like protein*, MCP) de 43kDa. As MCPs constituem uma grande família de proteínas transportadoras internas de membrana que estão subdivididas de acordo com a especificidade do substrato e a presença específica de um triplete de aminoácidos (Palmieri et al., 2011). A análise da sequência por BLASTp sugere que a MCP, pertence ao grupo que usa como substrato principal S-adenosilmetionina e S-adenosilhomocisteína.

Tabela 3. Lista de genes avaliados e proteínas correspondentes.

Nome do gene	Possível função da proteína	Massa molecular (kDa)	abreviação
LmjF. 12.0660	[‡] Serine/threonine protein phosphatase (PP2A)	109	PP2A
LmjF. 36.5850	*Flagellum targeting protein kharon1	59	FPK1
LmjF. 36.5640	[†] Cyclin-like	54	Cyclin
LmjF. 36.4750	[‡] PIG-P (phosphatidylinositol N-acetylglucosaminyltransferase subunit P)	17	PIG-P
LmjF. 32.1380	*Proteína conservada hipotética	38	PHI
LmjF. 23.1370	* S-adenosylmethionine Mitochondrial carrier protein	43	SAM

A possível função das proteínas foi determinada pelo banco de dados:

* <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>

[†] <http://pfam.xfam.org/>

[‡] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

4.2. Clonagem e superexpressão dos genes em linhagens de *L. major*

A fim de caracterizar os genes potencialmente envolvidos na perda da virulência em *L. L. major* foram gerados transfectantes superexpressos dos seis genes selecionados em duas linhagens de *L. L. major*, uma com perfil de virulência alta (LV39) e outra caracteristicamente não virulenta (CC1). As sequências codificadoras de cada gene (CDS) foram amplificadas por PCR a partir de DNA genômico de *L. major* LV39. Os produtos de cada PCR foram clonados no vetor pTZ57R/T em uma primeira etapa e em seguida subclonados em vetor de expressão de *Leishmania* (pSBT1YNEO) (Figura 6A). (McNicoll et al., 2006; Padmanabhan et al., 2012).

Cinco clones positivos de um total de 40 clones obtidos foram confirmados por perfil de restrição e sequenciamento. O sequenciamento permitiu, após alinhamento de sequências contra o banco de dados do genoma de *L. major* com o programa BLASTN (Altschul and Erickson, 1985), confirmar que todos os genes de interesse (identidade >94%) estavam corretamente clonados no vetor pSBT1YNEO. A partir de um clone positivo, os insertos foram extraídos do TOPO e subclonados no vetor de expressão pSBT1YNEO. Dez clones positivos de aproximadamente 15-20 colônias de bactérias foram confirmadas por perfil de restrição (Figura 6B). Um clone positivo para cada gene foi escolhido e transfectado em promastigotas em fase logarítmica da linhagem virulenta (LV39) e não virulenta (CC1) de *L. major*. Quatro transfectantes foram recuperados para cada gene.

Este vetor de expressão, pSBT1YNEO, foi escolhido para manter constantes as regiões 5'e 3' flangeadoras, de forma que a análise comparativa dos diversos genes não teria qualquer viés de controles diversos sobre os níveis de expressão eventualmente exercidos via elementos *cis* presentes nas regiões não traduzidas dos diferentes transcritos. Ainda que o vetor pSBT1YNEO não tenha sido amplamente testado *in vivo*, como vetor para superexpressão de genes em *Leishmania* (Padmanabhan et al., 2012), um estudo recente em nosso laboratório, demonstrou sua utilidade para este fim; a superexpressão de uma proteína arginina metil transferase, envolvida na modulação de virulência em *L. major* foi alcançada com sucesso (Ferreira et al., 2014).

Figura 6. Geração dos plasmídeos no vetor pSPBT1YNEO α para a superexpressão dos genes em estudo. **(A)** Mapa do vetor de expressão pSPBT1YNEO α . A ORF do gene BT1 (Biopterin transporter BT1) de *L. infantum* foi inserida no sítio de clonagem do vetor comercial pSP72 (Promega). NEO (Neomicina fosfotransferase) - gene de resistência a G418; Y - sítio Poly(A); α IR - região intergênica do gene de alfa-tubulina de *L. enriettii*. EcoRV; BamHI; XbaI e HindIII são os sítios de clonagem (McNicoll et al., 2006; Padmanabhan et al., 2012). **(B)** Perfil de restrição dos recombinantes obtidos no vetor de expressão pSBT1YNEO. Fracionamento do DNA por eletroforese, após digestão do DNA com BamHI e HindIII. Lambda (λ): DNA do fago lambda digerido com HindIII como padrão de massa molecular. pSBT1YNEO (6000 pb).

4.3. Superexpressão dos genes diferencialmente expressos no transfectantes de *SL RNA* de *L. major*

A expressão ectópica das proteínas em *L. major* no vetor pSPBT1YNEO foi confirmada usando um anticorpo policlonal comercial Anti-Ha (Tabela 3). Um experimento anterior no laboratório indica que a fusão de proteínas de interesse ao marcador HA não deve interferir no crescimento, virulência e localização das proteínas em transfectantes de *L. major* (Ferreira et al., 2014). A partir do lisado total de promastigotas das duas linhagens em fase log de *L. major* CC1(A) e LV39 (B) foi possível detectar a expressão de 5 proteínas na linhagem não virulenta e das proteínas PIG-P e FPK1 na linhagem virulenta. Nenhuma reatividade cruzada foi observada no controle negativo; vetor sem inserto (Figura. 7A).

Figura 7. Detecção das proteínas expressas nas linhagens de *L.major* por Western Blotting com anticorpo anti-HA. O extrato proteico de promastigotas das linhagens CC1(A) e LV39(B) superexpressoras dos genes em estudo e transfectantes controle foi fracionado em gel de poliacrilamida 12%. Detecção das proteínas expressas a partir do plasmídeo foi feita por Western blotting usando como anticorpo anti-HA; a normalização foi feita com anti-α-Tubulina. A canaleta indica número de clones avaliados por gene. Padrão de massa molecular 10–250 kDa (BioRad). As linhagens de *L.major* foram mantidas em meio M199, e pressão por droga correspondendo a 10 µg/ml (10x a DL50) de G418.

4.4 PP2A, CyL e PIG-P diminuem a infectividade de *L. major* in vivo

Para investigar a possível correlação entre o nível de expressão dos seis genes selecionados e a virulência dos transfectantes realizamos um experimento piloto de infecção *in vivo* em camundongos BALB/c. A partir dos resultados desses experimentos, realizamos um segundo experimento em que repetimos a infecção apenas com os três genes em que a diferença entre o transfectante controle (vetor vazio) e os transfectantes experimentais foi significativa. Promastigotas mantidos 10 μ g/mL (10xDL50) em fase estacionária (1x10⁷ células/mL) foram injetados no tecido subcutâneo da pata posterior direita dos camundongos. Um clone de cada transfectante superexpresso de *L. major* LV39 e CC1 foram usados na infecção *in vivo*. Como linhagens controle, foram usadas as *L. major* LV39 e CC1 parentais (selvagem, WT) e um transfectante controle (de cada linhagem) portando o plasmídeo pSBT1YNEO sem inserto.

Nossos resultados revelaram que os transfectantes superexpressores dos genes PP2A, CyL, PIG-P, PHI, FPK1 e S-MCP não se distinguem das linhagens controle não virulenta (CC1); as lesões os edemas discretos observados nas patas dos animais infectados com as linhagens controle são similares aos observados no transfectante controle e linhagem parental ($p>0.05$) (Figura. 8A). Por outro lado, na linhagem virulenta (LV39) os transfectantes portando os genes PP2A; CyL e PIG-P desenvolveram lesões menores que os controles LV39 WT e o transfectante com vetor pSPBT1YNEO. Já os transfectantes superexpressos de PHI, FPK1 e S-MCP induziram lesões levemente menores do que aquelas observadas nas infecções com as linhagens controle, com grande desvio padrão; as diferenças não foram significativas. Por essa razão, prosseguimos com o estudo dos 3 genes que levaram a uma significativa diminuição da progressão das lesões e edema (Figura. 8B).

Embora que não tenha sido possível observar a expressão das proteínas nos transfectantes PHI; SAM; PP2A e CyL em *L. major* LV39 por *Western blotting* uma redução significativa da lesão foi observada em todos os transfectantes comparada com o controle pSPBT1YNEO na semana nove ($p<0.0001$) (Figura. 8B). O mesmo resultado foi observado nos transfectantes que apresentaram menor desenvolvimento da lesão em LV39 (PP2A; CyL e PIG-P) e que foram mantidos em cultura com pressão seletiva entre 100x (100 μ g/mL) (Figura. 8A) e 200x 200 μ g/mL (10xDL50) a DL₅₀. ($p<0.0001$)

(Figura. 8B). Essa estratégia, que já foi usada com sucesso anteriormente em nosso laboratório, permitiu confirmar que os diferentes níveis de exposição a G418 não são responsáveis pelo fenótipo observado *in vivo*. (Antoniazi et al., 2000; de Toledo et al., 2009).

A.

B. Med da lesão (mm)

Medida da lesão (mm)

Figura 8. Curso da infecção em camundongos BALB/c infectados com os transfectantes das duas linhagens de *L. major* (CC1) e (LV39). A evolução da infecção causada pelas linhagens/transfectantes de CC1 (Clone1) (A) e LV39 (clone1) mantidos a 10 µg/mL (10x DL50) (B). O edema foi monitorado semanalmente (de 1 a 4 semanas) e na 9a semana pós infecção. Os transfectantes estão identificados pelas identificações das proteínas superexpressas (CyL, PHI, PIG-P, FPK1, S-MCP e PP2A). o teste two-way ANOVA seguido do teste Dunnett's de comparação múltipla entre os grupos usando o software GraphPad Prism (versão 6.05). **** $p < 0.0001$

Figura 9. Infecção *in vivo* em BALB/c com os transfectantes de *L. major* LV39 portando os genes CyL, PIG-P e PP2A a 100X (clone 2) (A) e 200X (clone2) (B) a DL₅₀. Parasitas selvagens (LV39-CC1) e transfectantes com vetor vazio (pSPBT1YNEO) foram usados como controle em todos os experimentos. Na nona semana pós infecção todos os camundongos foram sacrificados. Os dados foram normalizados pela medida da pata contralateral não infectada e apresentados como a média $\pm$ erro-padrão de 5 camundongos por grupo de um único experimento. As análises comparativas entre as médias dos transfectantes e o vetor vazio foram analisados na sexta semana pós infecção empregando o teste two-way ANOVA seguido do teste Dunnett's de comparação múltipla entre os grupos usando o software GraphPad Prism (versão 6.05). **** $p < 0.000$

5.5. A curva de crescimento dos promastigotas dos transfectantes de *L. major* LV39 não foi afetada em cultivo axênico.

O perfil de crescimento de promastigotas axênicos mantidos em meio com diferentes concentrações de G418, foi avaliado comparativamente ao crescimento das linhagens controle. Todos os transfectantes da linhagem virulenta (LV39) de *L. major*, e o transfectante controle (pSPBT1YNEO) foram mantidos na presença de 10µg/ml G418 (10xDL₅₀) ou 40µg/ml G418 (40X DL₅₀). Os transfectantes (PP2A e PIG-P) na linhagem LV39 apresentaram taxas similares de densidade celular, sem diferença significativa ($p>0.05$) em relação ao perfil de crescimento dos controles selvagem e transfectante com 10xDL₅₀ de G418 (Figura. 9A). Observamos, no entanto, que os transfectantes superexpressos de CyL apresentaram uma maior taxa de crescimento na fase logarítmica de crescimento, comparada com os demais transfectantes e linhagens controle até o dia 4 sem diferença significativa ($p>0.05$) (Figura. 10A-B). No entanto, no dia 8, foi observado uma diferença significativa ($p<0.0001$) no crescimento dos transfectantes mantidos 10µg/mL (10x a DL₅₀) de CyL comparado com o vetor vazio (Fig. 10A).

Figura 10. Curva de crescimento dos transfectantes PP2A, CyL e PIG-P de *L. major* LV39 em diferentes concentrações de G418. Promastigotas foram mantidos em meio (M199) com 10µg/mL (10x) (A) e 40µg/mL (40X) (B) a DL₅₀ estimada para G418. Parasitos selvagem (LV39) e transfectantes com vetor vazio (pSPBT1YNEO) foram usados como controle em todos os experimentos. Os dados são apresentados como a média ± erro-padrão de três réplicas em um único experimento. As análises comparativas de densidade celular entre os transfectantes e o controle vazio durante 8 dias foram analisadas pelo teste two-way ANOVA seguido do teste Dunnett's de comparação múltipla entre os grupos usando o software GraphPad Prism (versão 6.05) **** $p < 0.000$

5.6. Padrão de distribuição das proteínas PP2A, CyL e PIG-P em promastigotas de *L. major*

Empregando imunofluorescência indireta detectamos cada uma das proteínas expressas ectopicamente nos promastigotas dos transfectantes, em fase logarítmica de crescimento. Isso foi possível graças à fusão dos genes com HA. A microscopia de fluorescência revelou a presença das proteínas PP2A, CyL e PIG-P em fusão com HA no citoplasma dos parasitos. Em nenhum dos casos foi possível observar sinal no núcleo e a distribuição no citoplasma foi bastante diversa (Figura. 11).

Figura 11. Proteínas PP2A; CyL e PIG- foram detectadas no citoplasma de promastigotas de *L. major*. A localização subcellular individual das proteínas nos transfectantes de LV39 foi determinada usando um anticorpo Anti-HA (fusão no C-terminal), que foi visualizada (verde) com o anticorpo anti-HA de coelho (1:200) conjugado com Alexa Fluor 488 (1:100). DAPI foi usado para corar o núcleo e o cinetoplasto (azul).

5.7. Caracterização molecular parcial dos transfectantes de *L. major*

Poucos estudos já empregaram o vetor pSPBT1YNEO para expressar proteínas em *Leishmania* no contexto ectópico (Ferreira et al., 2014; McNicoll et al., 2006; Padmanabhan et al., 2012). Como observamos uma perda de virulência acentuada do transfectante controle (pSPBT1YNEO) entre o primeiro e o segundo experimentos de infecção, decidimos confirmar a presença dos plasmídeos e sua ‘anatomia’. Ao usar como sonda um fragmento do gene da neomicina fosfotransferase, observamos que todos os transfectantes continham o plasmídeo e que apenas o transfectante controle (pSPBT1YNEO em) tem um sinal muito fraco de hibridação, sugerindo um baixo número de cópias do plasmídeo (Figura 12A). Estes resultados indicam que o vetor, com ou sem gene exógeno, mantiveram-se nos amastigotas, mesmo após 9 semanas de infecção na pata em camundongos tipo BALB/c. Usando como sonda a sequência codificadora de cada um dos genes, só foi possível determinar a identidade dos plasmídeos dos transfectantes PP2A de *L. major* resgatados de camundongo (Figura 12B). Além disso, foi confirmada a ausência de eventos de recombinação espúrias, durante a infecção *in vivo*; em todos os três transfectantes, o DNA plasmidial digerido apresenta as bandas do tamanho esperado de 2527pb (Figura 12C).

Figura 12. Confirmação da presença e anatomia dos plasmídeos nos transfectantes de *L. major*LV39 por *Southern blot*. Híbridação com a sonda NEO (**A**) e PP2A (**B**) nos transfectantes de *L. major*LV39 de culturas originais e aquelas resgatadas da lesão de camundongos. Cada canal indica o nome dos transfectantes e controle pSPBT1YNEO de CC1 ou LV39. Fracionamento dos fragmentos gerados por digestão com as enzimas *Bgl*II e *Bam*HI a partir de DNA contido nos *plugs*, foram hibridados com a sonda Neo, confirmando o tamanho esperado para a construção linearizada (**C**). As condições de PFGE foram as mesmas de (Antoniuzzi et al., 2000), para fracionamento das moléculas circulares. Gel de agarose 1%. Lambda (λ): DNA do fago lambda digerido com *Hind*III como padrão de massa molecular.

6. DISCUSSÃO

Todas as infecções por *Leishmania* começam com sítios de entrada similares, têm os macrófagos e células dendríticas como principais hospedeiras e induzem resposta inflamatória (Murray et al 2005). Por que algumas espécies permanecem no sítio de infecção e outras migram até as mucosas ou órgãos internos é uma das perguntas relevantes e não respondidas sobre a patogênese das leishmanioses. Além do sistema imune e *background* genético do hospedeiro (Lipoldová and Demant, 2006), o tropismo do parasito e a patologia são determinados também pela espécie do parasito (Herwaldt, 1999; Murray et al., 2005). As análises comparativas dos genomas de diferentes espécies patogênicas como *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. mexicana*, revelaram que as diferenças de organização genética e conteúdo gênico entre as espécies são pequenas; existe um pequeno número de genes que são espécie-específicos (Downing et al., 2011; Ivens et al., 2005; Peacock et al., 2007; Rogers et al., 2011). A virulência e o tropismo são matéria complexa. Existe um razoável número de genes que foram associados, por estudos de genética reversa, com a virulência ou tropismo; alguns desses genes são comuns a várias espécies, mas o impacto sobre o padrão de virulência de cada espécie é distinto; como a glicoproteína GP63 ou o LPG1 (Ilg, 2000; Joshi et al., 2002; Sacks et al., 2000; Späth et al., 2000). Por outro lado, há genes que são espécie-específicos, como o gene A2, associado ao padrão de tropismo por vísceras das espécies causadores da forma visceral de leishmaniose, como a *L. donovani* (Zhang and Matlashewski, 1997, 2010).

No sentido de contribuir com a ampliação do rol de genes envolvidos com a virulência em *Leishmania*, fizemos uma busca por genes que poderiam modificar o padrão de virulência em *L. major*. Foi feita uma varredura *in vivo* de seis genes que se encontraram diferencialmente expressos no transcriptoma de transfectantes de *L. major* que apresentavam atenuação de virulência pela superexpressão de SL RNA (Ferreira, 2010). O gene miniexon está presente e é necessário a todos os tripanossomatídeos por ser essencial ao processamento de todos os mRNAs (Benz et al., 2005; Clayton and Shapira, 2007; Clayton, 2002; Liang et al., 2003), e foi também associado à modulações do padrão de virulência em duas espécies distintas, *L. major* e *L. braziliensis* (Antoniazzi et al., 2000; de Toledo et al., 2009). Ferreira e colaboradores demonstraram que um dos genes diferencialmente expressos no mutante SL RNA, uma Proteína Arginina Metil

Transferase (PRMT7), é um regulador de virulência em *L. major* (Ferreira et al., 2014). A análise que conduzimos com outros seis genes diferencialmente expressos na linhagem atenuada nos permite sugerir que três deles LmjF 12.0660, PP2A, LmjF. 36.5640, CyL e LmjF 36.4750 PIG-P estão potencialmente associados à modulação de virulência de *L. major*.

Como estratégia experimental na identificação de genes envolvidos na virulência, a expressão ectópica de proteínas em parasitos de *Leishmania spp.* já permitiu identificar genes que modulam a virulência *in vivo* e *in vitro* (Antoniazzi et al., 2000; de Toledo et al., 2009; Reiling et al., 2010; Rodriguez et al., 2002). Os vetores empregados para fazer análises funcionais de proteínas cruciais para a virulência em espécies patogênicas de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos (Kelly, 1995) devem cumprir um número de critérios para poder ser estabelecido como um vetor de expressão. Esse vetor deve: (i) permitir a expressão funcional das proteínas; (ii) manter-se estável na ausência de droga; (iii) processar os transcritos corretamente; (iv) ser transfectado com alta eficiência e os transformantes resultantes devem poder ser selecionados com vários marcadores de resistência; (v) manter-se como molécula extra-cromossômica com alto número de cópias durante o ciclo de vida do parasito; (vi) expressar qualquer gene de espécies distintas de *Leishmania*; (vii) ser recuperável da célula e (viii) permitir a expressão de altos níveis da proteína ectópica e responder com mais transcrição sob aumento de pressão por droga (Kelly et al., 1992; LeBowitz et al., 1990; Ryan et al., 1993; Tetaud et al., 2002).

Em nosso estudo escolhemos o vetor pSPBT1NEO para superexpressão dos 6 genes, pois sua arquitetura permitia inserir somente a CDS de interesse em regiões flangeadoras ‘neutras’ e iguais para todos os genes. No entanto, pouco se conhece sobre a estabilidade deste vetor, que foi pouco utilizado para superexpressão de proteínas em *Leishmania*. (Ferreira et al., 2014; Padmanabhan et al., 2012). Tínhamos como referência o trabalho recente de Tiago Ferreira, em nosso laboratório, que demonstrou com sucesso, a utilidade do vetor pSBT1YNEO na superexpressão da proteína PRMT7 e seus efeitos sobre a virulência em *L. major* (Ferreira et al., 2014). Por outro lado, no estudo funcional da proteína PIWI em *L. infantum* empregando o mesmo vetor, os níveis de expressão ectópica foram baixos (Padmanabhan et al., 2012). Com nossos resultados e o de outros grupos, podemos reafirmar que o vetor é eficientemente transfectado em *L. major* e *L. infantum* (Ferreira et al., 2014; Padmanabhan et al., 2012), sua presença não afeta o crescimento e é mantido durante o ciclo de vida (Ferreira et al., 2014). Os resultados de

digestão do DNA plasmidial dos transfectantes mostraram que o vetor se manteve como molécula extra-cromossômica.

Os seis genes selecionados para a investigação foram transfectados em duas linhagens distintas; uma virulenta e outra avirulenta. Partimos do princípio que um aumento de virulência seria melhor percebido em uma linhagem avirulenta e que a transfecção de uma linhagem virulenta permitiria perceber melhor a diminuição da virulência. Curiosamente, observamos grande heterogeneidade no nível de proteína de fusão produzida entre a CC1 e LV39; só detectamos a expressão de 2 das 6 proteínas na linhagem virulenta por *Western blotting* ao passo que 5 das 6 foram detectadas na linhagem não virulenta, mas não temos explicação para tal diferença entre as linhagens. Não podemos excluir um problema técnico na execução do *Western blot* ou preparação do material, uma vez que os três genes apresentaram na mesma LV39 um efeito fenotípico claro. Os resultados de infecção *in vivo* sugerem que promastigotas de *Leishmania* superexpressores de PP2A, CyL e PIG-P apresentaram virulência inferior à das linhagens controle.

Genes potencialmente envolvidos no padrão de virulência de L. major

O gene LmjF.12.0660 de *L. major*, segundo a análise *in silico* indicou, pode codificar para uma serina/treonina fosfatase, de 109 kDa, e com domínio característico da família de fosfoproteína fosfatases (PP2A) (Shi, 2009). Observamos ainda que a PP2A está presente predominantemente no citoplasma (Cohen, 1997; Vandomme et al., 2014). Em eucariotos as proteínas serina/treonina fosfatases são responsáveis pela maioria dos eventos de desfosforilação dos resíduos serina, treonina e tirosina (Szöör, 2010). Em cinetoplastídeos patogênicos o processo de fosforilação de proteínas é importante para o controle do desenvolvimento e transição durante o ciclo de vida (Kutuzov and Andreeva, 2008). Em infecções com *L. donovani* está relatado um aumento na regulação da PP2A, que desfosforila uma quinase PKB (Akt), que tem um importante papel na sinalização e proliferação celular e na atividade da explosão respiratória (Chen et al., 2003; Datta et al., 1999). Como resultado dessa desfosforilação, *L. donovani* estabelece a infecção nos macrófagos (Dey et al., 2007). Outro resultado decorrente do aumento na expressão da fosfatase PP2A, em infecções por *L. donovani*, é a inibição da expressão de iNOS na célula hospedeira (Kar et al., 2010). Esse resultado sugere que o aumento da expressão da PP2A em *L. donovani* pode estar envolvido na sobrevivência nos macrófagos do

hospedeiro mamífero. A superexpressão da proteína PP2A *L. major* diminuiu a sobrevivência dos parasitos *in vivo*, em contradição com os resultados de *L. donovani*. Uma possível explicação para o resultado obtido seria de a superexpressão da PP2A em *L. major* ter ocasionado um desequilíbrio da atividade kinase/fosfatase no parasito, que teria conduzido à ativação de inibidores da atividade da PP2A em *L. major*, o que por sua vez teria elevado o estado de fosforilação em uma variedade de moléculas de sinalização no macrófago incluindo a quinase PKB (AKt). Inibidores fisiológicos específicos da PP2A de *Leishmania* nunca foram descritos, mas dada a homologia da proteína fosfatase PP2A com a de outros protozoários patogênicos (Brenchley et al., 2007; Kutuzov and Andreeva, 2008) é possível especular que o inibidor de PP2A previamente identificado em *Plasmodium falciparum* exista em *L. major* e teria sido responsável pelo aumento do estado de fosforilação (Dobson et al., 2003).

O segundo gene que investigamos, LmjF.36.4750, segundo a anotação do genoma e a investigação *in silico* indicou a presença de domínios de uma das proteínas envolvida no processo da biossíntese e ancoragem de glicosilfosfatidilinositol (GPI), a PIG-P (subunidade P da fosfatidil inositol N-acetilglicosaminiltransferase), que tem 15KDa. As glicosil-fosfatidilinositol (GPI) são particularmente abundantes em tripanossomatídeos (Ropert and Gazzinelli, 2000). As glicosil-fosfatidilinositol (GPI) são particularmente abundantes em tripanossomatídeos (Ropert and Gazzinelli, 2000), e são adicionadas pós-transcricionalmente à extremidade C-terminal de proteínas de membranas em organismos eucariotos. Nesses protozoários as proteínas com âncoras GPI têm importantes funções na transdução de sinal, na regulação do sistema imune do hospedeiro e na patogênese (Paulick and Bertozzi, 2008). Nos passos iniciais da síntese e ancoragem de GPI, diferentes enzimas catalisam a transferência sequencial de açúcares e EtNP para fosfatidilinositol (PI) até completar a âncora que vai ser posteriormente ligada à proteína no retículo endoplasmático antes do transporte à membrana celular. A transferase (GPI-GnT) que inicia o processo de biossíntese no retículo endoplasmático é composta por um complexo de 7 proteínas (PIG-A, PIG-C, PIG-H, PIG-Q, PIG-P, DPM2 e PIG-Y) (Hong and Kinoshita, 2009; Paulick and Bertozzi, 2008). A avaliação que fizemos para identificar a localização subcelular da proteína é inconclusivo, e precisa ser repetido, mas sugere presença em organela, de forma bastante estrita.

Uma desestabilização do complexo em mutantes das proteínas (PIG-P) mostraram-se deficientes na expressão de proteínas GPI-ancoradas na superfície das células de mamíferos (Stevens and Raetz, 1991; Watanabe et al., 2000). É possível que alterações na expressão de algumas das proteínas que formam o complexo protéico (GPI-GnT) interfiram com a formação e a atividade de biossíntese de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) que levariam a uma diminuição da expressão das proteínas GPI-ancoradas em células eucarióticas (Victoria et al., 2010; Watanabe et al., 2000).

A sobrevivência do *Trypanosoma brucei* é facilitada pela expressão de uma densa superfície de proteínas GPI-ancoradas no hospedeiro mamífero (Acosta-Serrano et al., 2001) e na sua ausência dessas proteínas, a sobrevivência do parasito fica comprometida no hospedeiro (Lillico et al., 2003). Em *Leishmania spp.*, a maioria das proteínas associadas à virulência e determinantes invasivos/evasivos nos processos de infecção em células do mamífero têm âncoras GPI (Chang et al., 1990). A falta de um componente pode levar a uma redução das infecções *in vivo* e *in vitro* em *L. major* (Joshi et al., 2002; Späth et al., 2003). Em nosso caso, uma redução global das proteínas ancoradas a GPI pode ter corroborado com a diminuição da virulência *in vivo* por uma desestabilização do complexo da enzima (GPI-GnT). O estudo teria que ser estendido para análise dos níveis de expressão de proteínas de superfície ancoradas por GPI, como a GP63 ou a composição dos lipofosfoglicanos (LPGs) de superfície, reconhecidos como fatores de virulência em *Leishmania* (Chang et al., 1990; Chang and McGwire, 2002; Matlashewski, 2001; Olivier et al., 2012) para compreender os possíveis efeitos ocasionados pela superexpressão de PIG-P em *L. major* sobre esses ou outros fatores de virulência GPI-ancorados.

O terceiro gene que levou a alteração do nível de virulência de *L. major* quando superexpresso, foi o LmjF 36.5640. A anotação do genoma o indica como uma proteína hipotética e identificamos na análise *in silico* o domínio chamado *cyclin box* que é altamente conservado entre a família de ciclinas e tem 54kDa. É bem sabido que as ciclinas estão envolvidas na regulação do ciclo celular em eucariotos (Marcos and Mariano, 2005). A superexpressão desta proteína ocasionou uma tendência a uma multiplicação mais acentuada dos promastigotas na fase log de crescimento em cultura e a uma diminuição das infecções *in vivo*. Com os dados atuais podemos sugerir que esta

proteína, sem comprovação funcional de que seja uma ciclina quando superexpressa diminui a virulência de *L. major in vivo* em modelo murino.

6. CONCLUSÕES

Apesar da pouca informação sobre a função das proteínas avaliadas e as incertezas quanto ao nível de expressão de cada uma das proteínas nos transfectantes, este trabalho oferece informação acerca de três genes que podem estar envolvidos na modulação da virulência de *L. major*. Será necessário ampliar a investigação com estes genes para alcançar uma conclusão definitiva sobre seu papel na virulência. A superexpressão deve ser obtida com outro vetor plasmidial, como o pX63NEO, ou pela inserção dos genes em estudo no locus ribossômico (Barr and Gedamu, 2003; Ferreira et al., 2014; Sacks et al., 2000; Späth et al., 2000; Späth et al., 2003).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta-Serrano, A., E. Vassella, M. Liniger, C. Kunz Renggli, R. Brun, I. Roditi, and P. T. Englund, 2001, The surface coat of procyclic *Trypanosoma brucei*: programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98, p. 1513-8.
- Agabian, N., 1990, Trans splicing of nuclear pre-mRNAs: *Cell*, v. 61, p. 1157-60.
- Alexandratos, A., J. Clos, M. Samiotaki, A. Efstathiou, G. Panayotou, K. Soteriadou, and D. Smirlis, 2013, The loss of virulence of histone H1 overexpressing *Leishmania donovani* parasites is directly associated with a reduction of HSP83 rate of translation: *Mol Microbiol*, v. 88, p. 1015-31.
- Altschul, S. F., and B. W. Erickson, 1985, Significance of nucleotide sequence alignments: a method for random sequence permutation that preserves dinucleotide and codon usage: *Mol Biol Evol*, v. 2, p. 526-38.
- Alvar, J., I. D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer, and W. L. C. Team, 2012, Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence: *PLoS One*, v. 7, p. e35671.
- Aly, R., M. Argaman, S. Halman, and M. Shapira, 1994, A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*: *Nucleic Acids Res*, v. 22, p. 2922-9.
- Antoniazzi, S., H. C. Lima, and A. K. Cruz, 2000, Overexpression of minixon gene decreases virulence of *Leishmania major* in BALB/c mice in vivo: *Mol Biochem Parasitol*, v. 107, p. 57-69.
- Bangs, J. D., P. F. Crain, T. Hashizume, J. A. McCloskey, and J. C. Boothroyd, 1992, Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides: *J Biol Chem*, v. 267, p. 9805-15.
- Barr, S. D., and L. Gedamu, 2003, Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress: *J Biol Chem*, v. 278, p. 10816-23.
- Bañuls, A. L., M. Hide, and F. Prugnolle, 2007, *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans: *Adv Parasitol*, v. 64, p. 1-109.
- Beetham, J. K., K. S. Myung, J. J. McCoy, M. E. Wilson, and J. E. Donelson, 1997, Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of *Leishmania chagasi* promastigotes to an infectious form: *J Biol Chem*, v. 272, p. 17360-6.
- Benz, C., D. Nilsson, B. Andersson, C. Clayton, and D. L. Guilbride, 2005, Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 143, p. 125-34.

- Beverley, S. M., 2003a, Chapter 6 - Genetic and genomic approaches to the analysis of *Leishmania* virulence, in J. J. Marr, M.D, W. N. Timothy, Ph.D, and P. D. Richard W. Komuniecki, eds., *Molecular Medical Parasitology*: London, Academic Press, p. 111-122.
- Beverley, S. M., 2003b, Protozomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age: *Nat Rev Genet*, v. 4, p. 11-9.
- Beverley, S. M., and S. J. Turco, 1998, Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*: *Trends in Microbiology*, v. 6, p. 35-40.
- Bogdan, C., and M. Röllinghoff, 1998, The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion: *Int J Parasitol*, v. 28, p. 121-34.
- Bouvier, J., C. Bordier, H. Vogel, R. Reichelt, and R. Etges, 1989, Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase: *Mol Biochem Parasitol*, v. 37, p. 235-45.
- Bouvier, J., P. Schneider, R. Etges, and C. Bordier, 1990, Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*: *Biochemistry*, v. 29, p. 10113-9.
- Bras-Gonçalves, R., E. Petitdidier, J. Pagniez, R. Veyrier, P. Cibrelus, M. Cavaleyra, S. Maquaire, J. Moreaux, and J. L. Lemesre, 2014, Identification and characterization of new *Leishmania* promastigote surface antigens, LaPSA-38S and LiPSA-50S, as major immunodominant excreted/secreted components of *L. amazonensis* and *L. infantum*: *Infect Genet Evol*, v. 24, p. 1-14.
- Breitling, R., S. Klingner, N. Callewaert, R. Pietrucha, A. Geyer, G. Ehrlich, R. Hartung, A. Müller, R. Contreras, S. M. Beverley, and K. Alexandrov, 2002, Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production: *Protein Expr Purif*, v. 25, p. 209-18.
- Brenchley, R., H. Tariq, H. McElhinney, B. Szöör, J. Huxley-Jones, R. Stevens, K. Matthews, and L. Taberner, 2007, The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains: *BMC Genomics*, v. 8, p. 434.
- Brittingham, A., C. J. Morrison, W. R. McMaster, B. S. McGwire, K. P. Chang, and D. M. Mosser, 1995, Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis: *J Immunol*, v. 155, p. 3102-11.
- Brooks, D. R., H. Denise, G. D. Westrop, G. H. Coombs, and J. C. Mottram, 2001, The stage-regulated expression of *Leishmania mexicana* CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element: *J Biol Chem*, v. 276, p. 47061-9.
- Burchmore, R. J., and S. M. Landfear, 1998, Differential regulation of multiple glucose transporter genes in *Leishmania mexicana*: *J Biol Chem*, v. 273, p. 29118-26.
- Burns, J. M., W. G. Shreffler, D. R. Benson, H. W. Ghalib, R. Badaro, and S. G. Reed, 1993, Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania*

- chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, p. 775-9.
- Buxbaum, L. U., H. Denise, G. H. Coombs, J. Alexander, J. C. Mottram, and P. Scott, 2003, Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity: *J Immunol*, v. 171, p. 3711-7.
- Campbell, D. A., U. Kurath, and J. Fleischmann, 1992, Identification of a gp63 surface glycoprotein in *Leishmania tarentolae*: *FEMS Microbiol Lett*, v. 75, p. 89-92.
- Chang, K.-P., S. G. Reed, B. S. McGwire, and L. Soong, 2003, *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity: *Acta Tropica*, v. 85, p. 375-390.
- Chang, K. P., G. Chaudhuri, and D. Fong, 1990, Molecular determinants of *Leishmania* virulence: *Annu Rev Microbiol*, v. 44, p. 499-529.
- Chang, K. P., and B. S. McGwire, 2002, Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence: *Kinetoplastid Biol Dis*, v. 1, p. 1.
- Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar, and M. Boelaert, 2007, Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?: *Nat Rev Microbiol*, v. 5, p. 873-82.
- Charest, H., and G. Matlashewski, 1994, Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene: *Mol Cell Biol*, v. 14, p. 2975-84.
- Charest, H., W. W. Zhang, and G. Matlashewski, 1996, The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3'-untranslated region: *J Biol Chem*, v. 271, p. 17081-90.
- Chen, Q., D. W. Powell, M. J. Rane, S. Singh, W. Butt, J. B. Klein, and K. R. McLeish, 2003, Akt phosphorylates p47phox and mediates respiratory burst activity in human neutrophils: *J Immunol*, v. 170, p. 5302-8.
- Clayton, C., and M. Shapira, 2007, Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias: *Mol Biochem Parasitol*, v. 156, p. 93-101.
- Clayton, C. E., 2002, Life without transcriptional control? From fly to man and back again: *EMBO J*, v. 21, p. 1881-8.
- Coelho, A. C., S. M. Beverley, and P. C. Cotrim, 2003, Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 130, p. 83-90.
- Cohen, P. T., 1997, Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life: *Trends Biochem Sci*, v. 22, p. 245-51.
- Croft, S. L., S. Sundar, and A. H. Fairlamb, 2006, Drug resistance in leishmaniasis: *Clin Microbiol Rev*, v. 19, p. 111-26.

- Cruz, A., C. M. Coburn, and S. M. Beverley, 1991, Double targeted gene replacement for creating null mutants: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 88, p. 7170-4.
- Cruz, A. K., R. Titus, and S. M. Beverley, 1993, Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, p. 1599-603.
- Datta, S. R., A. Brunet, and M. E. Greenberg, 1999, Cellular survival: a play in three Akts: *Genes Dev*, v. 13, p. 2905-27.
- David, C. V., and N. Craft, 2009, Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: *Dermatol Ther*, v. 22, p. 491-502.
- Davies, C. R., P. Kaye, S. L. Croft, and S. Sundar, 2003, Leishmaniasis: new approaches to disease control: *BMJ*, v. 326, p. 377-82.
- De Souza Leao, S., T. Lang, E. Prina, R. Hellio, and J. C. Antoine, 1995, Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells: *J Cell Sci*, v. 108 (Pt 10), p. 3219-31.
- de Toledo, J. S., A. F. Junqueira dos Santos, T. Rodrigues de Moura, S. A. Antoniazi, C. Brodskyn, C. Indiani de Oliveira, A. Barral, and A. K. Cruz, 2009, *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* transfectants overexpressing the minixon gene lose virulence in vivo: *Parasitol Int*, v. 58, p. 45-50.
- Desjeux, P., 2004, Leishmaniasis: current situation and new perspectives: *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 27, p. 305-318.
- Dey, R., N. Majumder, S. Bhattacharjee, S. B. Majumdar, R. Banerjee, S. Ganguly, P. Das, and S. Majumdar, 2007, *Leishmania donovani*-induced ceramide as the key mediator of Akt dephosphorylation in murine macrophages: role of protein kinase Czeta and phosphatase: *Infect Immun*, v. 75, p. 2136-42.
- Dobson, S., R. Kumar, V. Bracchi-Ricard, S. Freeman, S. W. Al-Murrani, C. Johnson, Z. Damuni, D. Chakrabarti, and S. Barik, 2003, Characterization of a unique aspartate-rich protein of the SET/TAF-family in the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, which inhibits protein phosphatase 2A: *Mol Biochem Parasitol*, v. 126, p. 239-50.
- Downing, T., H. Imamura, S. Decuypere, T. G. Clark, G. H. Coombs, J. A. Cotton, J. D. Hilley, S. de Doncker, I. Maes, J. C. Mottram, M. A. Quail, S. Rijal, M. Sanders, G. Schöni, O. Stark, S. Sundar, M. Vanaerschot, C. Hertz-Fowler, J. C. Dujardin, and M. Berriman, 2011, Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance: *Genome Res*, v. 21, p. 2143-56.
- Duncan, R., S. Gannavaram, R. Dey, A. Debrabant, I. Lakhal-Naouar, and H. L. Nakhasi, 2011, Identification and characterization of genes involved in leishmania pathogenesis: the potential for drug target selection: *Mol Biol Int*, v. 2011, p. 428486.

- Ferreira, T. R., 2010, Investigação dos efeitos da expressão ectópica de *spliced leader* sobre a síntese e degradação protéica global em *Leishmania major*., Ribeirão Preto., Universidade de São Paulo.
- Ferreira, T. R., E. V. Alves-Ferreira, T. P. Defina, P. Walrad, B. Papadopoulou, and A. K. Cruz, 2014, Altered expression of an RBP-associated arginine methyltransferase 7 in *Leishmania major* affects parasite infection: *Mol Microbiol*.
- Frommel, T. O., L. L. Button, Y. Fujikura, and W. R. McMaster, 1990, The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 38, p. 25-32.
- Gomez, M. A., I. Contreras, M. Hallé, M. L. Tremblay, R. W. McMaster, and M. Olivier, 2009, *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases: *Sci Signal*, v. 2, p. ra58.
- González-Aseguinolaza, G., F. Almazán, J. F. Rodríguez, A. Marquet, and V. Larraga, 1997, Cloning of the gp63 surface protease of *Leishmania infantum*. Differential post-translational modifications correlated with different infective forms: *Biochim Biophys Acta*, v. 1361, p. 92-102.
- Gossage, S. M., M. E. Rogers, and P. A. Bates, 2003, Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle: *Int J Parasitol*, v. 33, p. 1027-34.
- Guerin, P. J., P. Olliaro, S. Sundar, M. Boelaert, S. L. Croft, P. Desjeux, M. K. Wasunna, and A. D. Bryceson, 2002, Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda: *Lancet Infect Dis*, v. 2, p. 494-501.
- Gunduz, M., E. Gunduz, R. S. Rivera, and H. Nagatsuka, 2008, The inhibitor of growth (ING) gene family: potential role in cancer therapy: *Curr Cancer Drug Targets*, v. 8, p. 275-84.
- Hassan, P., D. Fergusson, K. M. Grant, and J. C. Mottram, 2001, The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 113, p. 189-98.
- Herwaldt, B. L., 1999, Leishmaniasis: *The Lancet*, v. 354, p. 1191-1199.
- Hong, Y., and T. Kinoshita, 2009, Trypanosome glycosylphosphatidylinositol biosynthesis: *Korean J Parasitol*, v. 47, p. 197-204.
- Ilg, T., 2000, Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*: *EMBO J*, v. 19, p. 1953-62.
- Isnard, A., M. T. Shio, and M. Olivier, 2012, Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling: *Front Cell Infect Microbiol*, v. 2, p. 72.
- Ivens, A. C., C. S. Peacock, E. A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P.

- Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. M. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C. V. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R. M. Coulson, A. Cronin, A. K. Cruz, R. M. Davies, J. De Gaudenzi, D. E. Dobson, A. Dueterhoeft, G. Fazelina, N. Fosker, A. C. Frasch, A. Fraser, M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N. Larke, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J. C. Mottram, S. Müller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'neil, M. Pentony, T. M. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M. A. Quail, E. Rabbinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schäfer, J. Schein, D. C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. F. Smith, J. M. Blackwell, K. D. Stuart, B. Barrell, et al., 2005, The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*: Science, v. 309, p. 436-42.
- Janssens, V., and J. Goris, 2001, Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling: Biochem J, v. 353, p. 417-39.
- Joshi, P. B., B. L. Kelly, S. Kamhawi, D. L. Sacks, and W. R. McMaster, 2002, Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor: Molecular and Biochemical Parasitology, v. 120, p. 33-40.
- Kamhawi, S., 2006, Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes?: Trends Parasitol, v. 22, p. 439-45.
- Kapler, G. M., C. M. Coburn, and S. M. Beverley, 1990, Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression: Mol Cell Biol, v. 10, p. 1084-94.
- Kapotas, N., and V. Bellofatto, 1993, Differential response to RNA trans-splicing signals within the phosphoglycerate kinase gene cluster in *Trypanosoma brucei*: Nucleic Acids Res, v. 21, p. 4067-72.
- Kar, S., A. Ukil, G. Sharma, and P. K. Das, 2010, MAPK-directed phosphatases preferentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in experimental visceral leishmaniasis: involvement of distinct protein kinase C isoforms: J Leukoc Biol, v. 88, p. 9-20.
- Kelly, J. M., 1995, Trypanosomatid shuttle vectors: new tools for the functional dissection of parasite genomes: Parasitol Today, v. 11, p. 447-51.
- Kelly, J. M., H. M. Ward, M. A. Miles, and G. Kendall, 1992, A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*: Nucleic Acids Res, v. 20, p. 3963-9.
- Kutuzov, M. A., and A. V. Andreeva, 2008, Protein Ser/Thr phosphatases of parasitic protozoa: Mol Biochem Parasitol, v. 161, p. 81-90.
- Lahav, T., D. Sivam, H. Volpin, M. Ronen, P. Tsigankov, A. Green, N. Holland, M. Kuzyk, C. Borchers, D. Zilberstein, and P. J. Myler, 2011, Multiple levels of gene

- regulation mediate differentiation of the intracellular pathogen *Leishmania*: FASEB J, v. 25, p. 515-25.
- Lamontagne, J., and B. Papadopoulou, 1999, Developmental regulation of spliced leader RNA gene in *Leishmania donovani* amastigotes is mediated by specific polyadenylation: J Biol Chem, v. 274, p. 6602-9.
- Larreta, R., M. Soto, L. Quijada, C. Folgueira, D. R. Abanades, C. Alonso, and J. M. Requena, 2004, The expression of HSP83 genes in *Leishmania infantum* is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation: BMC Mol Biol, v. 5, p. 3.
- LeBowitz, J. H., C. M. Coburn, D. McMahon-Pratt, and S. M. Beverley, 1990, Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 87, p. 9736-40.
- LeBowitz, J. H., H. Q. Smith, L. Rusche, and S. M. Beverley, 1993, Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*: Genes Dev, v. 7, p. 996-1007.
- Liang, X. H., A. Haritan, S. Uliel, and S. Michaeli, 2003, trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation: Eukaryot Cell, v. 2, p. 830-40.
- Lillico, S., M. C. Field, P. Blundell, G. H. Coombs, and J. C. Mottram, 2003, Essential roles for GPI-anchored proteins in African trypanosomes revealed using mutants deficient in GPI8: Mol Biol Cell, v. 14, p. 1182-94.
- Lipoldová, M., and P. Demant, 2006, Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis: Nat Rev Genet, v. 7, p. 294-305.
- Llanes, A., C. M. Restrepo, G. Del Vecchio, F. J. Anguizola, and R. Leonart, 2015, The genome of *Leishmania panamensis*: insights into genomics of the *L. (Viannia)* subgenus: Sci Rep, v. 5, p. 8550.
- Mair, G., H. Shi, H. Li, A. Djikeng, H. O. Aviles, J. R. Bishop, F. H. Falcone, C. Gavrilescu, J. L. Montgomery, M. I. Santori, L. S. Stern, Z. Wang, E. Ullu, and C. Tschudi, 2000, A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA: RNA, v. 6, p. 163-9.
- Malumbres, M., and M. Barbacid, 2005, Mammalian cyclin-dependent kinases: Trends Biochem Sci, v. 30, p. 630-41.
- Marcos, M., and B. Mariano, 2005, Mammalian cyclin-dependent kinases, TRENDS in Biochemical Sciences, Elsevier
- Martínez-Calvillo, S., D. Nguyen, K. Stuart, and P. J. Myler, 2004, Transcription initiation and termination on *Leishmania* major chromosome 3: Eukaryot Cell, v. 3, p. 506-17.

- Martínez-Calvillo, S., S. Yan, D. Nguyen, M. Fox, K. Stuart, and P. J. Myler, 2003, Transcription of *Leishmania* major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region: *Mol Cell*, v. 11, p. 1291-9.
- Matlashewski, G., 2001, *Leishmania* infection and virulence: *Med Microbiol Immunol*, v. 190, p. 37-42.
- McGwire, B. S., K. P. Chang, and D. M. Engman, 2003, Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63: *Infect Immun*, v. 71, p. 1008-10.
- McNicoll, F., J. Drummelsmith, M. Muller, E. Madore, N. Boilard, M. Ouellette, and B. Papadopolou, 2006, A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*: *Proteomics*, v. 6, p. 3567-81.
- McNicoll, F., M. Müller, S. Cloutier, N. Boilard, A. Rochette, M. Dubé, and B. Papadopolou, 2005, Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*: *J Biol Chem*, v. 280, p. 35238-46.
- Medina-Acosta, E., R. E. Karess, H. Schwartz, and D. G. Russell, 1989, The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage: *Mol Biochem Parasitol*, v. 37, p. 263-73.
- Mishra, K. K., T. R. Holzer, L. L. Moore, and J. H. LeBowitz, 2003, A negative regulatory element controls mRNA abundance of the *Leishmania mexicana* Paraflagellar rod gene PFR2: *Eukaryot Cell*, v. 2, p. 1009-17.
- Mottram, J. C., G. H. Coombs, and J. Alexander, 2004, Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*: *Curr Opin Microbiol*, v. 7, p. 375-81.
- Murray, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies, and N. G. Saravia, 2005, Advances in leishmaniasis: *Lancet*, v. 366, p. 1561-77.
- Niimi, T., 2012, Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: a review: *Methods Mol Biol*, v. 824, p. 307-15.
- Olivier, M., V. D. Atayde, A. Isnard, K. Hassani, and M. T. Shio, 2012, *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63: *Microbes Infect*, v. 14, p. 1377-89.
- Olivier, M., D. J. Gregory, and G. Forget, 2005, Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view: *Clin Microbiol Rev*, v. 18, p. 293-305.
- Ouellette, M., A. Haimeur, K. Grondin, D. Légaré, and B. Papadopolou, 1998, Amplification of ABC transporter gene *pgpA* and of other heavy metal resistance genes in *Leishmania tarentolae* and their study by gene transfection and gene disruption: *Methods Enzymol*, v. 292, p. 182-93.

- Padmanabhan, P. K., C. Dumas, M. Samant, A. Rochette, M. J. Simard, and B. Papadopolou, 2012, Novel features of a PIWI-like protein homolog in the parasitic protozoan *Leishmania*: PLoS One, v. 7, p. e52612.
- Palmieri, F., C. L. Pierri, A. De Grassi, A. Nunes-Nesi, and A. R. Fernie, 2011, Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights: Plant J, v. 66, p. 161-81.
- Paulick, M. G., and C. R. Bertozzi, 2008, The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins: Biochemistry, v. 47, p. 6991-7000.
- Peacock, C. S., K. Seeger, D. Harris, L. Murphy, J. C. Ruiz, M. A. Quail, N. Peters, E. Adlem, A. Tivey, M. Aslett, A. Kerhornou, A. Ivens, A. Fraser, M. A. Rajandream, T. Carver, H. Norbertczak, T. Chillingworth, Z. Hance, K. Jagels, S. Moule, D. Ormond, S. Rutter, R. Squares, S. Whitehead, E. Rabinowitsch, C. Arrowsmith, B. White, S. Thurston, F. Bringaud, S. L. Baldauf, A. Faulconbridge, D. Jeffares, D. P. Depledge, S. O. Oyola, J. D. Hilley, L. O. Brito, L. R. Tosi, B. Barrell, A. K. Cruz, J. C. Mottram, D. F. Smith, and M. Berriman, 2007, Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease: Nat Genet, v. 39, p. 839-47.
- Price, H. P., M. R. Menon, C. Panethymitaki, D. Goulding, P. G. McKean, and D. F. Smith, 2003, Myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase, an essential enzyme and potential drug target in kinetoplastid parasites: J Biol Chem, v. 278, p. 7206-14.
- Purdy, J. E., J. E. Donelson, and M. E. Wilson, 2005, Regulation of genes encoding the major surface protease of *Leishmania chagasi* via mRNA stability: Mol Biochem Parasitol, v. 142, p. 88-97.
- Quijada, L., M. Soto, C. Alonso, and J. M. Requena, 2000, Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*: Mol Biochem Parasitol, v. 110, p. 79-91.
- Ramírez, J. R., S. Agudelo, C. Muskus, J. F. Alzate, C. Berberich, D. Barker, and I. D. Velez, 2000, Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis: J Clin Microbiol, v. 38, p. 3768-73.
- Reiling, L., M. Chrobak, C. Schmetz, and J. Clos, 2010, Overexpression of a single *Leishmania* major gene enhances parasite infectivity in vivo and in vitro: Mol Microbiol, v. 76, p. 1175-90.
- Reithinger, R., J. C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander, and S. Brooker, 2007, Cutaneous leishmaniasis: Lancet Infect Dis, v. 7, p. 581-96.
- Requena, J. M., C. Alonso, and M. Soto, 2000, Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections: Parasitol Today, v. 16, p. 246-50.

- Reynolds, D., L. Cliffe, K. U. Förstner, C. C. Hon, T. N. Siegel, and R. Sabatini, 2014, Regulation of transcription termination by glucosylated hydroxymethyluracil, base J, in *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*: *Nucleic Acids Res*, v. 42, p. 9717-29.
- Rittig, M. G., and C. Bogdan, 2000, *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views: *Parasitol Today*, v. 16, p. 292-7.
- Rivas, L., J. Moreno, C. Cañavate, and J. Alvar, 2004, Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient?: *Trends Parasitol*, v. 20, p. 297-301.
- Roberts, S. C., 2011, The genetic toolbox for *Leishmania* parasites: *Bioeng Bugs*, v. 2, p. 320-6.
- Rodriguez, N. E., H. K. Chang, and M. E. Wilson, 2004, Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of *Leishmania chagasi*: *Infect Immun*, v. 72, p. 2111-22.
- Rodriguez, N. M., R. Docampo, H. G. Lu Hg, and D. A. Scott, 2002, Overexpression of the *Leishmania amazonensis* Ca²⁺-ATPase gene *lmaa1* enhances virulence: *Cell Microbiol*, v. 4, p. 117-26.
- Rogers, M. B., J. D. Hilley, N. J. Dickens, J. Wilkes, P. A. Bates, D. P. Depledge, D. Harris, Y. Her, P. Herzyk, H. Imamura, T. D. Otto, M. Sanders, K. Seeger, J. C. Dujardin, M. Berriman, D. F. Smith, C. Hertz-Fowler, and J. C. Mottram, 2011, Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*: *Genome Res*, v. 21, p. 2129-42.
- Rogers, M. E., T. Ilg, A. V. Nikolaev, M. A. Ferguson, and P. A. Bates, 2004, Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG: *Nature*, v. 430, p. 463-7.
- Ropert, C., and R. T. Gazzinelli, 2000, Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa: *Curr Opin Microbiol*, v. 3, p. 395-403.
- Russell, D. G., 1987, The macrophage-attachment glycoprotein gp63 is the predominant C3-acceptor site on *Leishmania mexicana* promastigotes: *Eur J Biochem*, v. 164, p. 213-21.
- Russell, D. G., and H. Wilhelm, 1986, The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages: *J Immunol*, v. 136, p. 2613-20.
- Russell, M., P. Berardi, W. Gong, and K. Riabowol, 2006, Grow-ING, Age-ING and Die-ING: ING proteins link cancer, senescence and apoptosis: *Exp Cell Res*, v. 312, p. 951-61.
- Ryan, K. A., S. Dasgupta, and S. M. Beverley, 1993, Shuttle cosmid vectors for the trypanosomatid parasite *Leishmania*: *Gene*, v. 131, p. 145-50.

- Sacks, D. L., T. N. Brodin, and S. J. Turco, 1990, Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis: *Mol Biochem Parasitol*, v. 42, p. 225-33.
- Sacks, D. L., G. Modi, E. Rowton, G. Späth, L. Epstein, S. J. Turco, and S. M. Beverley, 2000, The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 406-11.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson, 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977: *Biotechnology*, v. 24, p. 104-8.
- Shi, Y., 2009, Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure: *Cell*, v. 139, p. 468-84.
- Siegel, T. N., K. S. Tan, and G. A. Cross, 2005, Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*: *Mol Cell Biol*, v. 25, p. 9586-94.
- Soto, M., S. Iborra, L. Quijada, C. Folgueira, C. Alonso, and J. M. Requena, 2004, Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosynthesis in *Leishmania infantum*: *Biochem J*, v. 379, p. 617-25.
- Späth, G. F., L. Epstein, B. Leader, S. M. Singer, H. A. Avila, S. J. Turco, and S. M. Beverley, 2000, Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, p. 9258-63.
- Späth, G. F., L. A. Garraway, S. J. Turco, and S. M. Beverley, 2003, The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, p. 9536-9541.
- Stevens, V. L., and C. R. Raetz, 1991, Defective glycosyl phosphatidylinositol biosynthesis in extracts of three Thy-1 negative lymphoma cell mutants: *J Biol Chem*, v. 266, p. 10039-42.
- Szöör, B., 2010, Trypanosomatid protein phosphatases: *Mol Biochem Parasitol*, v. 173, p. 53-63.
- Tetaud, E., I. Lecuix, T. Sheldrake, T. Baltz, and A. H. Fairlamb, 2002, A new expression vector for *Crithidia fasciculata* and *Leishmania*: *Mol Biochem Parasitol*, v. 120, p. 195-204.
- Toledo, J. S., T. R. Ferreira, T. P. A. Defina, F. d. M. Dossin, K. A. Beattie, D. J. Lamont, S. Cloutier, B. Papadopoulou, S. Schenkman, and A. K. Cruz, 2010, Cell homeostasis in a *Leishmania major* mutant overexpressing the spliced leader RNA is maintained by an increased proteolytic activity: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 42, p. 1661-1671.
- Torrentera, F. A., N. Glaichenhaus, J. D. Laman, and Y. Carlier, 2001, T-cell responses to immunodominant LACK antigen do not play a critical role in determining

- susceptibility of BALB/c mice to *Leishmania mexicana*: *Infect Immun*, v. 69, p. 617-21.
- Tran, K. D., D. Rodriguez-Contreras, D. P. Vieira, P. A. Yates, L. David, W. Beatty, J. Elferich, and S. M. Landfear, 2013, KHARON1 mediates flagellar targeting of a glucose transporter in *Leishmania mexicana* and is critical for viability of infectious intracellular amastigotes: *J Biol Chem*, v. 288, p. 22721-33.
- Turco, S. J., and A. Descoteaux, 1992, The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites: *Annu Rev Microbiol*, v. 46, p. 65-94.
- Turco, S. J., G. F. Späth, and S. M. Beverley, 2001, Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species: *Trends Parasitol*, v. 17, p. 223-6.
- van Luenen, H. G., C. Farris, S. Jan, P. A. Genest, P. Tripathi, A. Velds, R. M. Kerkhoven, M. Nieuwland, A. Haydock, G. Ramasamy, S. Vainio, T. Heidebrecht, A. Perrakis, L. Pagie, B. van Steensel, P. J. Myler, and P. Borst, 2012, Glucosylated hydroxymethyluracil, DNA base J, prevents transcriptional readthrough in *Leishmania*: *Cell*, v. 150, p. 909-21.
- Vandomme, A., A. Fréville, K. Cailliau, H. Kalamou, J. F. Bodart, J. Khalife, and C. Pierrot, 2014, PhosphoTyrosyl phosphatase activator of *Plasmodium falciparum*: identification of its residues involved in binding to and activation of PP2A: *Int J Mol Sci*, v. 15, p. 2431-53.
- Vasconcelos, E. J., M. C. Terrão, J. C. Ruiz, R. Z. Vêncio, and A. K. Cruz, 2012, In silico identification of conserved intercoding sequences in *Leishmania* genomes: unraveling putative cis-regulatory elements: *Mol Biochem Parasitol*, v. 183, p. 140-50.
- Victoria, G. S., P. Kumar, and S. S. Komath, 2010, The *Candida albicans* homologue of PIG-P, CaGpi19p: gene dosage and role in growth and filamentation: *Microbiology*, v. 156, p. 3041-51.
- Watanabe, R., Y. Murakami, M. D. Marmor, N. Inoue, Y. Maeda, J. Hino, K. Kangawa, M. Julius, and T. Kinoshita, 2000, Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires PIG-P and is regulated by DPM2: *EMBO J*, v. 19, p. 4402-11.
- Weinheber, N., M. Wolfram, D. Harbecke, and T. Aebischer, 1998, Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production: *Eur J Immunol*, v. 28, p. 2467-77.
- Wu, Y., Y. El Fakhry, D. Sereno, S. Tamar, and B. Papadopolou, 2000, A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins: *Mol Biochem Parasitol*, v. 110, p. 345-57.
- Yao, C., J. E. Donelson, and M. E. Wilson, 2003, The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function: *Mol Biochem Parasitol*, v. 132, p. 1-16.

- Yao, C., J. E. Donelson, and M. E. Wilson, 2007, Internal and surface-localized major surface proteases of *Leishmania* spp. and their differential release from promastigotes: *Eukaryot Cell*, v. 6, p. 1905-12.
- Young, J. C., V. R. Agashe, K. Siegers, and F. U. Hartl, 2004, Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol: *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 5, p. 781-91.
- Zhang, W. W., and G. Matlashewski, 1997, Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, p. 8807-11.
- Zhang, W. W., and G. Matlashewski, 2010, Screening *Leishmania donovani*-specific genes required for visceral infection: *Mol Microbiol*, v. 77, p. 505-17.
- Zilka, A., S. Garlapati, E. Dahan, V. Yaolsky, and M. Shapira, 2001, Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region: *J Biol Chem*, v. 276, p. 47922-9.