

KAROLINE MATHIAS LEITE

Análise da participação da Oligopeptidase B e Triparedoxina peroxidase
citoplasmática na virulência de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós - Graduação em Biologia da Relação
Patógeno Hospedeiro do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

KAROLINE MATHIAS LEITE

Análise da participação da Oligopeptidase B e Triparedoxina peroxidase citoplasmática na virulência de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf

Versão original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Leite, Karoline Mathias.

Análise da participação da oligopeptidase B e triparedoxina peroxidase citoplasmática na virulência de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* / Karoline Mathias Leite. – São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Leishmaniose.

Versão do título para o inglês: Analysis of the participation of oligopeptidase B and cytoplasmic tryparedoxin peroxidase in virulence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

1. *Leishmania amazonensis* 2. Oligopeptidase B 3. Triparedoxina peroxidase citoplasmática 4. Fatores de virulência I. Stolf, Profa. Dra. Beatriz Simonsen II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0143/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karoline Mathias Leite.

Título da Dissertação: Análise da participação da oligopeptidase B e triparedoxina peroxidase citoplasmática na virulência de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Orientador(a): Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

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

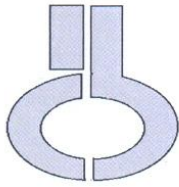
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.056/2013.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 001/09/CEUA, datado de 12.01.09, prorrogado a validade até 12.01.15 e por solicitação da Profa. Dra. **Beatriz Simonsen Stolf**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Karoline Mathias Leite** ao Projeto de Pesquisa "*Expressão protéica em amastigotas de leishmania amazonensis: modulação pela resposta imune de camundongos experimentalmente infectados*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 06 de junho de 2013.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima

Coordenador da CEUA

ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-900 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **023** nas fls.**029** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade da Prof(a) Dr(a) **Beatriz Simonsen Stolf**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudo de fatores de virulência de Leishmania e proteínas do macrófago envolvidas na infecção*" do qual participam o(s) aluno(s) **Mariana K Galuppo, Karoline M. Leite, Eloiza de Rezende, Maurício Scavassini Pena** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **24.03.2015**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 26 de março de 2015.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico à minha família, amigos e camundongos que de alguma forma me ajudaram a concluir este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, principalmente à minha mãe, exemplo de força, coragem e caráter. Obrigada pelo seu amor tolerante, disponível e resistente, que me permite seguir em frente. Graças à sua dedicação e incentivo cheguei onde estou e continuo firme na caminhada. Nos momentos mais difíceis seu apoio me manteve em pé e por essa força incansável lhe serei eternamente grata.

Obrigada às minhas irmãs, Rafaela e Laura, por serem exatamente como são, especiais cada uma à sua maneira. Completamo-nos nas nossas diferenças! Minhas eternas companheiras, que me dão a certeza de que nunca estarei sozinha. Obrigada ao meu cunhado Allan, o irmãzinho que ganhei! Amo vocês incondicionalmente.

Obrigada às minhas tias Marly e Maria Tereza, por serem tão amáveis e queridas. Vocês, juntamente com a minha mãe, são meus exemplos de vida. Mulheres guerreiras, que nunca esmoreceram mesmo frente a todas as dificuldades (e não foram poucas!). Meu maior orgulho é ser filha e sobrinha de vocês!

Obrigada aos meus primos por serem minha melhor lembrança de quando criança e por compartilharem comigo as melhores histórias da nossa família. Agradeço em especial à minha querida prima Célia, por ser minha prima-amiga-irmã-companheira de aventuras. Obrigada por me ajudar a encontrar o melhor caminho quando as coisas estão confusas, por me ajudar a me entender, por todas as conversas, risadas e choros compartilhados. À minha família, afirmo nas palavras de Chico Buarque: vocês são “O que não tem medida, nem nunca terá”.

Obrigada aos meus amigos por deixarem minha trajetória mais leve. Obrigada por compartilharem comigo alegrias, frustrações, vivências, histórias e, conseqüentemente, aprendizados. Agradecimento aos grandes amigos Angélica, Amanda, Beto, Raquel, Ju Ramos e Cleide por estarem sempre por perto (mesmo longe fisicamente em alguns casos). Algumas amigas não vejo faz tempo, pela correria do dia a dia, mas contribuíram muito para minha trajetória: Vi e Jaque, adoro vocês e tenho saudades. Em especial, agradeço à minha grande amiga Ju Daneu por todas às vezes que me apoiou, ouviu minhas lamúrias e me mostrou que todos os problemas têm uma saída, ajudando-me a encontrá-la.

Obrigada à minha grande amiga Tati, exemplo de determinação e garra que o mestrado no ICB II me trouxe de presente e que levarei para a vida toda. Agradeço a força nos momentos em que mais precisei, todos os conselhos e também todas as risadas. Muito obrigada, amiga!

Agradeço a todas as pessoas do departamento de Parasitologia e do Lab 20 pelos anos de convivência e por tornarem possível a conclusão deste trabalho. Agradecimento especial à Mari, por toda ajuda nos experimentos e pela amizade que saiu do laboratório, obrigada pelas histórias divertidas que passamos juntas. Obrigada à Patrícia por ser a IC mais querida e engraçada do departamento, pelas risadas e por ter ajudado na minha formação como pesquisadora.

Obrigada à professora Beatriz Stolf por ter aberto as portas do laboratório, confiado no meu trabalho e pela disponibilidade em todos os momentos.

Agradeço à professora Silvia Uliana e ao seu grupo pela ajuda e incentivo, pelas discussões nas nossas reuniões de resultados e pelos artigos compartilhados. Agradeço especialmente ao Adriano, por dividir comigo seus conhecimentos em biologia molecular de Leishmânias e pela disponibilidade sempre que precisei.

Agradeço aos professores Cláudio Marinho, Carsten Wrenger, Gerhard Wunderlich, Mauro Cortez, Silvia Boscardin e seus respectivos grupos de pesquisa por terem as portas dos seus laboratórios abertas sempre que foi necessário. Obrigada ao pessoal do biotério pela dedicação e ajuda de sempre.

Obrigada ao Leonardo e à Tereza do Instituto Butantan por me receberem em suas instalações e pelos ensinamentos sobre a produção de proteínas heterólogas em sistema *Pichia Pastoris*.

Agradeço imensamente ao Carlos Robello, à Dolores Piñeyro e ao grupo de pesquisa do Instituto Pasteur por terem me recebido de forma tão acolhedora e por terem contribuído para a experiência extremamente enriquecedora e produtiva durante os meses em Montevideo. ¡Muchas Gracias!

Este trabalho contou com o apoio financeiro da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
São Paulo (FAPESP).

“A viagem não acaba nunca. Só os viajantes acabam. E mesmo esses podem prolongar-se em memória, em lembrança, em narrativa. Quando o visitante sentou na areia da praia e disse: “Não há mais o que ver”, saiba que não era assim. O fim de uma viagem é apenas o começo de outra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já (...). É preciso voltar aos passos que foram dados, para repetir e para traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomeçar a viagem. Sempre.”

José Saramago

RESUMO

Leite KM. Análise da participação da Oligopeptidase B e Triparedoxina peroxidase citoplasmática na virulência de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Leishmania ssp. são protozoários parasitas responsáveis por um complexo de doenças conhecidas como leishmanioses. Apresentam duas formas evolutivas principais: a promastigota flagelada, no tudo digestivo do inseto vetor e a amastigota sem flagelo externo, no interior das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), preferencialmente macrófagos, do hospedeiro vertebrado. A capacidade de sobrevivência e multiplicação no interior de células especializadas na destruição de patógenos deve-se à capacidade do parasito de burlar a propriedade microbicida destas células pela produção de moléculas denominadas fatores de virulência. Estudos prévios do nosso laboratório compararam o proteoma de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de lesões de BALB/c e BALB/c nude com o intuito de analisar o impacto da presença de linfócitos T na expressão de proteínas do parasita. Dentre as proteínas diferencialmente expressas encontramos isoformas da Oligopeptidase B (OPB), uma serino peptidase que hidrolisa peptídeos de até 30 aminoácidos em resíduos de lisina e arginina, e da Triparedoxina peroxidase citoplasmática (CPX), proteína antioxidante que participa da detoxificação de hidroperóxidos. As duas tiveram isoformas significativamente mais expressas na ausência de linfócitos T, ou seja, nos parasitos isolados de BALB/c nude, e já foram descritas como fatores de virulência em tripanossomatídeos. De fato, promastigotas de *L.(L.) major* deficientes em OPB apresentaram significante redução na infecção e sobrevivência em macrófagos *in vitro* e lesões de evolução mais lenta no modelo murino de infecção na pata. De forma análoga, promastigotas de *L.(L.) donovani* superexpressoras de CPX apresentaram maior carga parasitária em macrófagos *in vitro*. Considerando a importância da *L.(L.) amazonensis* na epidemiologia da leishmaniose no Brasil, nosso objetivo foi analisar a importância da OPB e CPX na virulência desta espécie utilizando parasitas superexpressores e proteínas solúveis em modelos murinos de infecção *in vitro* e *in vivo*. Mostramos que a superexpressão de CPX aumentou a infectividade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* *in vitro* e que a proteína OPB solúvel também aumentou a infecção de macrófagos por essa espécie de *Leishmania*.

Palavras-chave: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Oligopeptidase B. Triparedoxina peroxidase citoplasmática. Fatores de virulência.

ABSTRACT

Leite KM. Analysis of the participation of Oligopeptidase B and Cytoplasmic Tryparedoxin Peroxidase in virulence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. [Masters thesis (Biology of the Pathogen-Host Relation)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Leishmania ssp. are parasitic protozoa responsible for a disease complex known as leishmaniasis. They present two major developmental forms: the flagellated promastigote in the digestive tract of the vector, and amastigote without external flagella inside cells of the mononuclear phagocytic system, preferably macrophages of the vertebrate host. The ability for survival and multiplication in cells specialized in the destruction of pathogens is due to the ability of the parasite to evade the microbicidal properties of these cells by the production of molecules called virulence factors. Previous studies from our laboratory compared the proteome of *L. (L.) amazonensis* amastigotes obtained from BALB/c and BALB/c nude lesions in order to analyze the impact of the presence of T lymphocytes in the expression of parasite's proteins. Among the differentially expressed proteins we found isoforms of Oligopeptidase B (OPB), a serine peptidase that hydrolyzes peptides up to 30 amino acids in lysine and arginine residues, and cytoplasmic tryparedoxin peroxidase (CPX), an antioxidant protein that participates in the detoxification of hydroperoxides. Both proteins had isoforms significantly more expressed in the absence of T lymphocytes, that is, in parasites isolated from BALB/c nude, and have been described as virulence factors in trypanosomes. In fact, promastigotes of *L. (L.) major* deficient for OPB showed significant reduction in infection and survival in macrophages *in vitro* and lesions of slower evolution in the murine model of footpad infection. Similarly, promastigotes of *L. (L.) donovani* overexpressing CPX had higher parasite loads in macrophages *in vitro*. Considering the importance of *L. (L.) amazonensis* in the epidemiology of leishmaniasis in Brazil, our objective was to analyze the importance of OPB and CPX in the virulence of this species using murine models of infection *in vitro* and *in vivo*. We have shown that overexpression of CPX increased infectivity of *L. (L.) amazonensis* promastigotes *in vitro* and that soluble OPB also increased infectivity of macrophage by this *Leishmania* species.

Keywords: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Oligopeptidase B. Cytoplasmic tryparedoxin peroxidase. Virulence factors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Manifestações clínicas da leishmaniose. Compilado do Manual da Vigilância da Leishmaniose, Brasil, Ministério da Saúde.....22
- Figura 2.** Ciclo de vida de *Leishmania ssp.* Compilado do *Center for Disease Control and Prevention*.....24
- Figura 3.** *Western Blot* de proteínas solúveis de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* extraídas de lesão de camundongos BALB/c (B) e BALB/c nude (N) utilizando anticorpos contra CPX ou OPB em uma dimensão (A, Leonardo Velasquez, dados não publicados) e duas dimensões (Teixeira et al., 2015)..31
- Figura 4.** Imagens de imunofluorescência captadas por microscopia confocal. A = controle negativo para marcação fluorescente anti-CPX. B = marcação fluorescente anti-CPX. C = controle negativo para marcação fluorescente anti-OPB. D = marcação fluorescente anti-OPB.....52
- Figura 5.** Mapa dos vetores de expressão de proteínas utilizados nas clonagens dos genes da OPB e CPX.....53
- Figura 6.** Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. A: fragmento da amplificação do gene CPX com 600 pb. B: nenhuma banda visível na altura 2196 pb, correspondente ao gene da OPB.....54
- Figura 7.** Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. Fragmento da amplificação do gene OPB (2196 pb).....54
- Figura 8.** Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. 1: vetor pSecTag2-A vazio. 2: pSecTag2-A::CPX digerido com Hind III e Xho I. 3: pSecTag2-A::OPB digerido com Kpn I e Xho I.....55
- Figura 9.** Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. A: fragmento da amplificação do gene CPX com 600 pb (C- = controle negativo. C+ = fragmento de PCR.). B: pQE-30::CPX digerido com Hind III.....56
- Figura 10.** Mapa do vetor de transfecção em *Leishmania* pSp utilizado na obtenção de linhagens superexpressoras.....57

Figura 11. Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. 1: vetor pSp vazio digerido. 2: pSp::CPX digerido com XbaI e Hind III. 3: pSp::OPB digerido com Sma I e Sac I.....57

Figura 12. Viabilidade celular (% em relação ao controle) determinada por MTT de promastigotas das cepas LV79, M2269 e PH8 de *L. (L.) amazonensis* frente a diferentes concentrações de G418.....58

Figura 13. Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. 1: gDNA da cepa LV79 (banda referente à amplificação do gene *Neomycin fosfotransferase*). 2: gDNA da cepa M2269. 3: gDNA da cepa PH8. C- = Controle negativo. C+ = Controle positivo.....59

Figura 14. *Western Blot* para avaliar a expressão de CPX e GAPDH (A) e OPB e GAPDH (B) em extratos protéicos solúveis de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa M2269 transfectadas com o vetor pSp vazio (controle), pSp::CPX ou pSp::OPB.....60

Figura 15. Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. 1: Controle negativo para a amplificação de alfatubulina-OPB. 2: fragmento OPB (de pSp::OPB). 3: fragmento alfatubulina (de pSp::OPB). Amplificação de alfatubulina-OPB tendo como templates das PCRs: 4: vetor pSp. 5: vetor da construção pSp::OPB 6: DNA de promastigotas transfectadas com vetor pSp vazio. 7: DNA de promastigotas transfectadas com vetor pSp::OPB.....61

Figura 16. Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* transfectantes cultivadas em meio 199 completo durante sete dias.....62

Figura 17. Análise da produção de OPB em sistema HEK293T. A: SDS-PAGE 12%. B: *Western Blot* para OPB. C+ = controle positivo (extrato solúvel de promastigota de *L. (L.) amazonensis*). C- = controle negativo (eluato de sobrenadante de HEK293T não transfectada). OPB = eluato de sobrenadante de HEK293T transfectado com construção pSecTag2-A::OPB.....63

Figura 18. Atividade peptidase do tipo tripsina do eluato de células HEK293T transfectadas com OPB de *L. (L.) amazonensis* em comparação ao eluato controle.....64

Figura 19. Infecção de macrófagos peritoneais de BALB/c com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* estimulados com eluato de HEK transfectada com OPB (OPB) ou eluato controle (HEK) por 24 ou 72

horas. Porcentagem de macrófagos infectados (acima), amastigotas por macrófago infectado (meio) e índice de infecção (abaixo). Resultado de três experimentos com triplicatas técnicas.....65

Figura 20. SDS-PAGE 12% da CPX produzida em sistema bacteriano. M = marcador. N = controle não induzido. I = controle induzido com IPTG. 1 a 7 = frações purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.....67

Figura 21. Atividade peroxidase da proteína recombinante purificada (CPXr). Cinética da atividade ao longo de 35 minutos (A). Atividade peroxidase em mU/mL HRP ao tempo final de leitura (35 minutos) (B). Resultados de um experimento com duplicatas técnicas.....68

Figura 22. Atividade peroxidase dos extratos do parasita superexpressor (La CPX) e seu controle (La pSP). Cinética da atividade ao longo de 35 minutos (A). Atividade peroxidase em mU/mL HRP ao tempo final de leitura (35 minutos) (B). Experimento com duplicatas técnicas representativo de dois experimentos independentes.....69

Figura 23. Porcentagem de viabilidade celular de parasitas superexpressores (La CPX) e seu respectivo controle (La pSp) estimulados com 400 μ M de H₂O₂ (A, três experimentos) ou 500 μ M de peroxinitrito (B, um experimento) por 30 minutos.....71

Figura 24. Infecção de macrófagos peritoneais de BALB/c com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* superexpressores de CPX ou controle por 24, 48, 72 ou 96 horas. Porcentagem de macrófagos infectados (acima), amastigotas por macrófago infectado (meio) e índice de infecção (abaixo).....72

Figura 25. Imagens obtidas por microscopia de macrófagos peritoneais de BALB/c infectados por promastigotas da linhagem controle (A) ou da linhagem superexpressora de CPX (B) durante 96 horas.....74

Figura 26. Imagens obtidas por microscopia de macrófagos peritoneais de BALB/c infectados com promastigotas selvagens da cepa M2269 de uma cultura com doze passagens (A) e uma cultura recém-iniciada com três passagens (B).....75

Figura 27. Western Blot para avaliar a expressão de MPX e GAPDH em extratos protéicos solúveis de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* superexpressora de CPX ou controle pSp.....75

Figura 28. *Western Blot* comparando expressão de CPX em extratos solúveis de promastigotas (PRO) e amastigotas (AMA) de *L. (L.) amazonensis* isolado 69, Bahia (A) e promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (M2903) e *L. (V.) guyanensis* (IMG3) (B).....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas clonagens nos vetores pQE-30, pSecTag2-A e pSp.....	39
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPX = Triparedoxina peroxidase citoplasmática

dNTP = Desoxirribonucleotídeos fosfatados

Gp63 = glicoproteína 63

GPX = Glutathione peroxidase dependente de selênio

IFN- γ = Interferon gama

IL = Interleucina

iNOS = Óxido nítrico sintase induzível

LB = Meio de cultura *Luria Broth*

LPG = lipofosfoglicano

MHC = Complexo principal de histocompatibilidade

MPX = Triparedoxina peroxidase mitocondrial

NK = *Natural killer*

nsGPXs = Glutathione peroxidase independente de selênio

OPB = Oligopeptidase B

PPR = *Pattern recognition receptor* ou receptores de reconhecimento de padrões

ROS = Espécies reativas de oxigênio

SFB = Soro fetal bovino

SFM = Sistema Fagocítico Mononuclear

SOD = Superóxido Dismutase

Th1 = Linfócitos T *helper* 1

TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa

TR = tripanotona redutase

TXN = triparedoxina

TXNPx = triparedoxina peroxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Leishmaniose	22
1.2 Ciclo biológico da leishmânia	23
1.3 Tratamento da leishmaniose	24
1.4 Internalização e sobrevivência da leishmânia no interior do macrófago	26
1.5 Resistência de <i>Leishmania</i> ao estresse oxidativo.....	27
1.6 Triparedoxina peroxidase citoplasmática	28
1.7 Oligopeptidase B.....	29
1.8 Secreção de fatores de virulência	30
1.9 Resultados preliminares à dissertação: CPX e OPB no proteoma de amastigotas retirados de lesão de camundongos BALB/c x BALB/c nude experimentalmente infectados.....	30
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 Cultivo de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> selvagens e superexpressores	38
4.2 Determinação da curva de crescimento dos parasitas transfectados	38
4.3 Extração de DNA genômico de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	38
4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	39
4.5. Preparação de bactérias competentes e transformação com os plasmídeos pJET, pSecTag2-A e pSp	40
4.6 Preparação de bactérias eletrocompetentes e transformação com o plasmídeo pQE-30	40
4.7 Extração do DNA plasmidial em pequena escala (<i>Mini Prep</i>)	41
4.8 Ligação enzimática dos produtos de PCR ao vetor de clonagem pJET dos genes OPB e CPX (ICB)	41
4.9 Ligação enzimática dos produtos de PCR ao vetor de clonagem pGEM-T <i>Easy</i> do gene CPX (<i>Institut Pasteur</i>)	41
4.10 Digestões com enzimas de restrição, purificação do gel de agarose e ligação enzimática inserto/vetor	42
4.11 Extração do DNA plasmidial em grande escala (<i>Max Prep</i>) e sequenciamento	42
4.12 Obtenção de amastigotas de lesão murina	43
4.13 Extração de proteínas solúveis de amastigotas extraídas de lesão ou promastigotas para <i>Western Blot</i>	43
4.14 SDS-PAGE e <i>Western Blot</i>	44
4.15 Imunofluorescência	45
4.16 Transfecção de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> cepas M2269 por eletroporação	45
4.17 Medida de viabilidade celular pela redução do MTT.....	46

4.18	Transfecção de células HEK293T como sistema de expressão proteica	46
4.19	Purificação da OPB recombinante a partir do sobrenadante de células HEK293T por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.....	46
4.20	Indução da CPX em sistema bacteriano (<i>E. coli</i> cepa M15).....	47
4.21	Purificação da CPX recombinante a partir da fração solúvel de lisado bacteriano por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.....	47
4.22	Extração das proteínas solúveis de <i>L. (L.) amazonensis</i> transfectantes para ensaio de atividade peroxidase	48
4.23	Ensaio de atividade peroxidase dos extratos de parasita e da CPX recombinante	48
4.24	Ensaio de atividade peptidase da OPB recombinante.....	48
4.25	Ensaio de resistência dos parasitas superexpressores de CPX ao H ₂ O ₂ e ao peroxinitrito	49
4.26	Obtenção de macrófagos peritoneais residentes de BALB/c	49
4.27	Infecção de macrófagos peritoneais com <i>L. (L.) amazonensis</i>	49
4.28	Infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 com parasitas transfectantes	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	Imunofluorescência em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> selvagens.....	52
5.2	Clonagens nos vetores de expressão de proteínas: pSecTag2-A e pQE-30.....	53
5.3	Clonagem no vetor de transfecção de <i>Leishmania</i> : pSp.....	56
5.4	Superexpressão de CPX e OPB em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> cepa M2269	58
5.5	Obtenção da proteína recombinante OPB em sistema de expressão HEK293T	63
5.6	Análise da funcionalidade da OPB recombinante: atividade peptidase (<i>tripsina-like</i>) e seu efeito na infecção por <i>L. (L.) amazonensis in vitro</i>	64
5.7	Obtenção da proteína recombinante CPX em sistema de expressão bacteriano	67
5.8	Análise da funcionalidade da CPX recombinante: atividade peroxidase.....	68
5.9	Caracterização funcional dos parasitas superexpressores de CPX: atividade peroxidase, resistência a H ₂ O ₂ e peroxinitrito e efeito na infecção <i>in vitro</i>	69
5.10	CPX como marcador de virulência em <i>Leishmania</i> : relação entre expressão de CPX e virulência em diferentes comparações.....	76
5.11	BALB/c e C57BL/6 experimentalmente infectados com transfectantes CPX e pSp.....	77
6	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

As leishmanioses constituem um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida (World Health Organization, 2009). A doença é endêmica em 98 países (Alvar, 2012) das áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo e estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos ao ano (Alvar et al., 2006; Murray et al., 2005). Existem cerca de 20 espécies de *Leishmania* capazes de causar doença no homem (Cupolillo et al., 2000; Shaw, 1994). Dependendo da espécie do parasito e de determinantes de susceptibilidade dos hospedeiros, as infecções apresentam características clínicas distintas, podendo ser reunidas em quatro grupos: (1) formas com lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém limitadas, designadas por leishmaniose cutânea localizada, (2) formas disseminadas cutâneas, com presença de nódulos múltiplos e ricos em parasitos que surgem tardiamente em pacientes infectados, chamadas de leishmaniose cutânea difusa, (3) formas que se complicam, com o aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas, particularmente do nariz, boca e faringe, denominadas coletivamente por leishmaniose mucocutânea e (4) formas em que os parasitos apresentam acentuado tropismo pelo SFM do baço, do fígado, da medula óssea e dos tecidos linfoides, designadas leishmaniose visceral ou calazar (Figura 1) (Rey, 2008).



Figura 1. Manifestações clínicas da leishmaniose. Compilado do Manual da Vigilância da Leishmaniose, Brasil, Ministério da Saúde.

Infecções pela espécie *L. (L.) amazonensis*, a segunda mais comum no Brasil, estão associadas a quadros de leishmaniose cutânea localizada e cutânea difusa (Brasil, Manual de Vigilância da LTA, 2007), sendo essa última associada a uma anergia do paciente a antígenos do parasita (Balestieri et al., 2002; Convit et al., 1993; Silveira et al., 2004). Nosso grupo tem interesse particular nessa espécie por sua importância no país e pelo fato de diferentes respostas do hospedeiro estarem associadas a diferentes formas da doença.

1.2 Ciclo biológico da leishmânia

As *Leishmania ssp.* são transmitidas ao hospedeiro vertebrado pela picada da fêmea infectada do inseto vetor flebotomíneo. As leishmânias caracterizam-se por apresentarem dois estágios morfológicamente distintos: amastigota, forma oval e desprovida de flagelo externo encontrada no interior das células do hospedeiro vertebrado e promastigota, forma alongada e flagelada encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Bates, Rogers, 2004) (Figura 2). Durante o repasto sanguíneo do inseto são inoculadas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado, que se ligam a receptores existentes nos macrófagos, sendo fagocitadas e encapsuladas no vacúolo parasitóforo (Brodskyn et al., 2003). No interior do fagolisossomo as formas metacíclicas diferenciam-se em amastigotas, que se multiplicam por fissão binária (Alexander, Russel, 1992; Mc Conville, Handman, 2007). Os amastigotas são liberados dos macrófagos por um mecanismo ainda não totalmente caracterizado (Handman, Bullen, 2002; Mc Conville, Handman, 2007; Rittig, Bogdan, 2000) e podem invadir novas células do SFM. Quando o flebotomíneo pica o indivíduo ou o animal infectado, retira com o sangue ou linfa intersticial as leishmânias ou as células infectadas, que passarão a evoluir no interior de seu tubo digestivo (Von Stebut, 2007). No intestino do inseto, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas que se multiplicam por fissão binária. Posteriormente, ocorre a diferenciação em promastigotas metacíclicas, que migram para a região anterior do tubo digestivo do inseto, atingindo a probóscide, podendo ser transmitidas (Bates, Rogers, 2004; Sacks, Perkins, 1985).

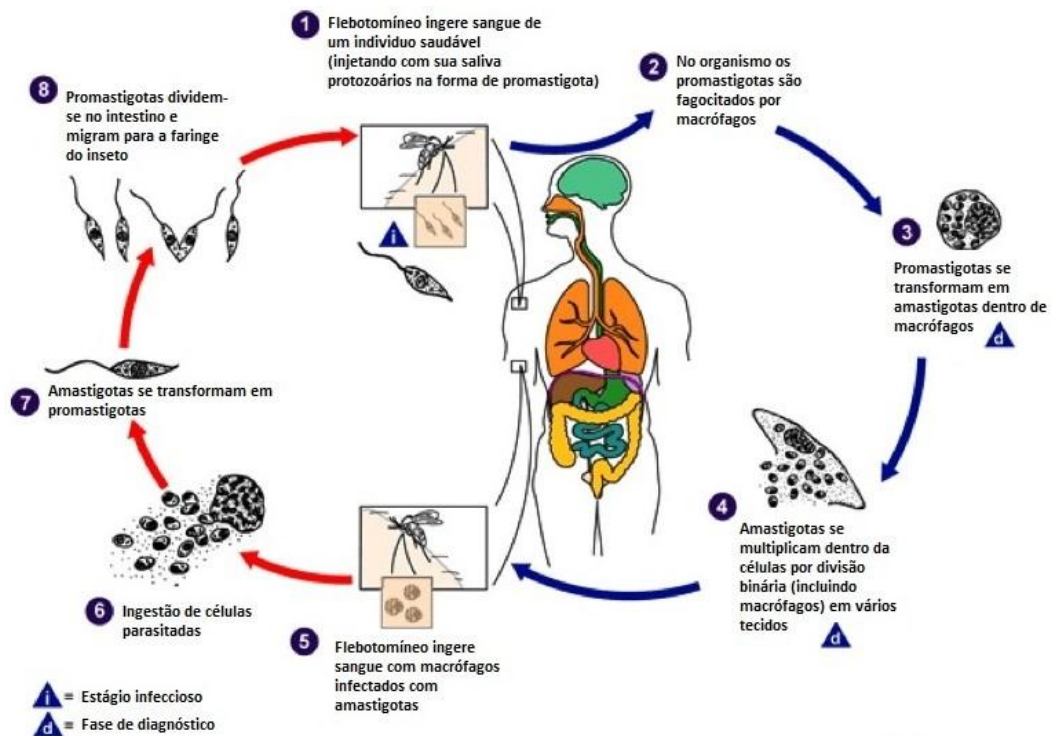


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Compilado do *Center for Disease Control and Prevention*.

1.3 Tratamento da leishmaniose

O tratamento das leishmanioses consiste essencialmente de quimioterapia (Herwaldt, 1999; Murray et al., 2005), que no Brasil baseia-se no uso de metais pesados tóxicos, principalmente compostos antimoniais. Quando o paciente é refratário são utilizados a pentamidina e a anfotericina B, preconizados como segunda escolha pelo Ministério da Saúde. Todos esses medicamentos necessitam de administração intravenosa e/ou intramuscular e supervisão médica ou hospitalização durante o tratamento devido à severidade dos possíveis efeitos adversos.

Considerado fármaco de primeira linha no tratamento da leishmaniose, o antimônio pentavalente tem sido utilizado como principal ferramenta há muitos anos, mostrando-se eficaz no tratamento de todas as manifestações para parte das espécies e isolados de *Leishmania* (ressalta-se que há muitos isolados resistentes) levando à regressão das lesões (Rath et al., 2003). Apresenta duas formulações: o gluconato de antimônio sódico e o

antiomoniato de N-metil glucamina, cujos mecanismos de ação ainda não estão precisamente definidos. Especula-se que ocorra a conversão do composto de Sb(V), considerado pró-fármaco, para Sb (III) pelo macrófago ou mesmo pelo próprio parasita (Callahan et al., 1997).

A forma ativa Sb (III), considerada mais eficaz, interfere com processos de metabolismo energético como a oxidação de ácidos graxos e a glicólise do parasita, levando a baixos níveis de ATP (Rath et al., 2003). Também causa fragmentação de ácidos nucleicos, interfere com a topoisomerase e inibe a Tripanotiona Redutase - componente da cascata TR-TXN-TXNPx (Croft et al., 2006; Friedrich, 2008). Apesar dos diversos mecanismos de ação sobre o parasita, esse fármaco tem propiciado o surgimento de cepas resistentes ao longo dos anos (Croft et al., 2006), limitando seu uso. Alguns dos mecanismos de resistência já descritos incluem a perda da expressão de certas enzimas redutoras de antimônio, baixa expressão de poros celulares para captação do fármaco e o uso de bombas de efluxo (Kaur, Rajput, 2014).

Medicamento de segunda linha no tratamento de leishmanioses, a pentamidina possui amplo espectro contra parasitas e alguns fungos, apresentando ainda atividade antitumoral em melanomas (Pathak et al., 2002). É comercializada na forma de sal isetionato, com aplicação intravenosa ou por aerossol (Cushion et al., 2004).

Graças ao crescente desenvolvimento de resistência aos antimônios, a pentamidina tem sido usada como alternativa no tratamento das leishmanioses cutânea e visceral, apresentando maiores taxas de desenvolvimento de resistência em relação à última (Croft et al., 2006). Seu mecanismo de ação também não está completamente elucidado, apenas com indicativos de inibição da biossíntese de poliaminas (inibição da S-adenosil-L-metionina), alteração do potencial da membrana mitocondrial, com grande acúmulo nesta organela e alta afinidade por regiões do DNA ricas em A-T (Croft et al., 2006; Kaur, Rajput, 2014). Os mecanismos de resistência hoje conhecidos incluem mudança na sequência genômica do kDNA, aumento da expressão de bombas de efluxo e queda na captação do fármaco (Kaur, Rajput, 2014).

Dentre os fármacos utilizados como leishmanicidas, a miltefosina (hexadecilfosfocolina ou HPC) é o único agente de via oral, tendo sido primeiramente empregado no tratamento de neoplasias como o câncer de mama (Croft et al., 2006). Não utilizada de forma clínica no Brasil, a miltefosina é utilizada na Ásia e Europa (Jha et al., 1999). Na Índia, onde é amplamente empregada no tratamento da leishmaniose visceral, apresentou altas taxas de cura (Sundar et al., 2006). Porém, estudos têm demonstrado que a

susceptibilidade do parasito ao fármaco varia entre diferentes espécies e cepas (Velez et al., 2010).

Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido. Estudos sugerem que devido a sua semelhança estrutural com um composto derivado do ácido araquidônico, o Fator de ativação de plaquetas (PAF) (Castro, 2011), ela tenha uma ação ativadora de macrófagos, aumentando a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12, citocinas responsáveis por uma resposta imunológica Th1 e consequente melhor prognóstico na recuperação do paciente, sendo considerado um fármaco imunomodulador (Wadhone et al., 2009). A indução da produção de IFN- γ também leva a maior ativação da iNOS, favorecendo a produção de NO e a eliminação do parasita (Wadhone et al., 2009).

Dentre seus efeitos diretos sobre o parasita, sabe-se que a miltefosina interfere na fluidez da membrana, assim como na composição dos fosfolipídeos, induzindo a apoptose (Filho et al., 2008). Apesar das características positivas da miltefosina, sua lenta eliminação do organismo e as baixas concentrações do medicamento no paciente contribuem para o desenvolvimento de resistência (Dorlo et al., 2008), por exemplo pela redução da expressão de transportadores na membrana, reduzindo a captação do fármaco (Kaur, Rajput, 2014).

Frente ao escasso arsenal terapêutico com restrições de uso quanto à toxicidade e âmbito hospitalar, é clara a premência da identificação e caracterização de biomoléculas parasito-específicas, como os fatores de virulência do parasito, que possam ser exploradas como alvo molecular para potenciais fármacos.

1.4 Internalização e sobrevivência da leishmânia no interior do macrófago

Os macrófagos são as principais células hospedeiras da *Leishmania* (McConville, Handman, 2007). A ativação do macrófago é o processo pelo qual essa célula adquire maior capacidade de fagocitar, matar e digerir microrganismos (Murray, Wynn, 2011). Esse processo depende da ligação de receptores PRRs (*Pattern recognition receptor*) ou estímulo com IFN- γ secretado por células NK ou Th1, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 e IL-6 (Medzhitov, 2007), de espécies reativas de oxigênio (como peróxidos, superóxidos e radicais hidroxilas) e nitrogênio (como óxido nítrico), proteases, hidrolases, proteínas e peptídeos antimicrobianos (Agerberth et al., 2000; Duits et al., 2002). Quando os promastigotas de *Leishmania* são fagocitados, os lisossomos fundem-se com o vacúolo parasitóforo formando o fagolisossomo, liberando seu conteúdo e aumentando

o metabolismo oxidativo do macrófago. A sobrevivência dos parasitos nesse ambiente depende da sua transformação em amastigotas, que possuem diversos mecanismos que reduzem ou impedem a ação destrutiva normal dos fagolisossomos (Olivier et al., 2005).

Os mecanismos que permitem a sobrevivência e contribuem para a patogenicidade da leishmânia, permitindo o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado, estão associados a moléculas denominadas fatores de virulência, que variam em importância dependendo da espécie do parasito (Silva-Almeida, 2012). Um dos fatores de virulência mais estudados em leishmânia é o LPG, importante na modulação da produção de NO, inibição da apoptose, atraso na maturação do fagolisossomo e inibição da transdução de sinal em macrófagos, entre outros (revisado em McMahon-Pratt, Alexander, 2004; Späth, et al., 2003). Apesar de essa molécula ser essencial para a virulência de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani*, ela não é necessária para o sucesso da infecção de *L. (L.) mexicana* (Ilg et al., 2001; Turco et al., 2001).

Outro fator de virulência muito estudado é a gp63, importante nas infecções por *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) donovani* (Chen et al., 2000; Joshi et al., 2002; Wilson et al., 1989). A gp63 inibe a lise do parasita mediada pelo complemento e sua liberação extracelular pode facilitar a migração e difusão da promastigota através do tecido por degradar componentes da matriz extracelular (McGwire et al., 2003). A gp63 extracelular também cliva MHC de classe I e CD4+, o que limita resposta de células T, e diminui a proteína relacionada a MARCKS (myristoylatedalanine-rich C kinase substrate), um fator de ativação de macrófagos (revisado em McMahon-Pratt, Alexander, 2004).

Como LPG e gp63 são expressas predominantemente ou exclusivamente (dependendo da espécie de *Leishmania*) em promastigotas, diversos estudos buscam identificar fatores de virulência expressos em amastigotas, fase do parasito que propaga a infecção no homem. Proteínas como a A2, o homólogo dos receptores para quinase C ativada (LACK) e cisteíno protease B do tipo catepsina (CPB) foram descritas como fatores de virulência de amastigotas de *L. (L.) donovani*, *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente (revisado em McMahon Pratt, Alexander, 2004).

1.5 Resistência de *Leishmania* ao estresse oxidativo

Em resposta a diferentes estímulos, macrófagos produzem um *burst* respiratório composto de diversas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Kaye, Scott, 2011).

Comumente suscetível às ROS, a *Leishmania* evita a liberação destas moléculas ou resiste aos seus efeitos tóxicos, possibilitando sua sobrevivência. A infecção do macrófago por *Leishmania* provoca pouca liberação de ROS devido a diversos fatores, entre eles moléculas de superfície que interagem com os receptores de complemento, como a gp63, prejudicando a maturação do fagossomo e sua atividade oxidativa, (Matheoud et al., 2013) e o LPG, que inibe o burst oxidativo e colabora para a instalação da infecção (Turco et al., 2001). Além disso, o parasita possui moléculas capazes de detoxificar as espécies reativas como a SOD, Glutathione Peroxidase independente de selênio (nsGPXs) (Wilkinson, Kelly 2003) e oxidorreduções, que atuam como moduladoras do estresse oxidativo na ausência das enzimas Catalase e Glutathione Peroxidase dependente de selênio (GPXs), presentes em eucariotos superiores mas não em *Leishmania* (Flohé et al., 1999; Kima, 2014; Schlecker et al., 2005). Um exemplar de oxidorredução é a triparedoxina peroxidase, uma das proteínas estudadas neste trabalho.

1.6 Triparedoxina peroxidase citoplasmática

A triparedoxina peroxidase citoplasmática (CPX) é uma proteína antioxidante restrita aos tripanossomatídeos que participa da detoxificação de hidroperóxidos. Espécies reativas como H_2O_2 resultam usualmente de reações redox, mas também podem ser produzidas por atividade microbicida e na sinalização celular (Martinez, 2008). Os tripanossomatídeos mantêm o balanço redox por um mecanismo singular, por possuírem um sistema dependente de glutathione funcional, porém incompleto, que na maioria dos outros organismos é responsável por manter um ambiente intracelular redutor/protetor. Em substituição, eles possuem um sistema antioxidante baseado em tripanotiona, juntamente com outras três óxido-reduções: tripanotiona redutase, triparedoxina e triparedoxina peroxidase (CPX, citoplasmática e MPX, mitocondrial) (Nogoceke et al., 1997).

A CPX está sabidamente relacionada com a sobrevivência e virulência em tripanossomatídeos. Essa proteína confere proteção a *Trypanosoma cruzi* contra estresse oxidativo dentro do macrófago (Piacenza et al., 2008) e sua superexpressão aumentou a sobrevivência intracelular do parasita (Piñeyro et al., 2008). A CPX também participa da resistência oxidativa em *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* (Iyer et al., 2008; Romao et al., 2009), e promastigotas de *L.(L.) donovani* superexpressores de CPX apresentaram maior carga parasitária em macrófagos *in vitro* (Iyer et al., 2008). De forma semelhante, amastigotas

esplênicos de *L. (L.) donovani* expressam mais CPX do que amastigotas axênicos e apresentaram maior resistência ao estresse oxidativo por H₂O₂ (Pescher et al., 2011). Níveis elevados de CPX foram observados em cepas de *L. (L.) donovani* resistentes ao antimônio (Wyllie et al., 2010) e de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao arsenito (Lin et al. 2005), demonstrando que um melhoramento no metabolismo antioxidante de *Leishmania* pode implicar em resistência a esses compostos. Ainda em *L. (L.) amazonensis*, observou-se que a expressão de CPX se reduz a menos da metade em culturas com muitas passagens quando comparada a uma cultura recém-iniciada, mais virulenta (Magalhães et al. 2014).

Em algumas espécies de *Leishmania* foram identificadas duas ou três variantes de CPX (citoplasmáticas) (Barr et al., 2001; Henard et al., 2014; Kima et al., 2010). Em *L. (L.) amazonensis* foi encontrada uma isoforma de menor tamanho específica do estágio amastigota (Henard et al., 2014), com alta similaridade com a isoforma truncada encontrada em *L. (L.) chagasi* (Barr et al., 2001) e *L. (V.) pifanoi* (Kima et al., 2010) e que confere resistência a estresse oxidativo e nitrosativo (Henard et al., 2014).

1.7 Oligopeptidase B

Oligopeptidase B (OPB) pertence à classe das serino peptidases, caracterizada pela presença de um resíduo de serina no sítio ativo da enzima cuja hidroxila participa da catálise e ligação ao substrato, e à família da prolil oligopeptidase (clã SC, família S9). Essa família de proteínas se restringe à hidrólise nos resíduos de lisina e arginina de peptídeos de no máximo 30 aminoácidos (Polgar, 2002). Embora essa proteína seja descrita como restrita a bactérias, plantas e tripanossomatídeos (Coetzer et al., 2008), peptidases da subfamília S9A estão presentes em inúmeros organismos, inclusive no homem (MEROPS peptidase database) e a OPB de *Leishmania* apresenta identidades de aproximadamente 24% em com as enzimas humanas mais semelhantes. A OPB tem sido considerada um importante fator de virulência (Burleigh, Woolsey, 2002) e alvo terapêutico em tripanossomatídeos (Cazzulo, 2002), sendo importante para sinalização cálcio-dependente durante invasão de células não fagocíticas por *T. cruzi* (Burleigh et al., 2002; Coetzer et al., 2008). Em *Leishmanias*, a expressão de OPB é aumentada em amastigotas em relação à promastigotas em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) donovani* (Gamboa et al., 2007; Rosenzweig, 2008), mas é igualmente expressa nos dois estágios em *L. (L.) major* (Munday et al., 2011) e *L. (L.) mexicana* (Holzer et al., 2006).

Promastigotas de *L.(L.) major* deficientes em OPB apresentaram uma deficiência na diferenciação da forma procíclica para a metacíclica, significante perda na capacidade de infecção e sobrevivência em macrófagos *in vitro*, mas infecção semelhante em camundongos quando comparados à linhagem selvagem (Munday et al., 2011). Outro estudo, porém, demonstrou um atraso significativo na formação da lesão em camundongos por *L. (L.) major* deficientes para OPB (Swenerton et al., 2011). O mecanismo de virulência associado à OPB em *L. (L.) major* parece estar relacionado com o controle da enolase na superfície do parasita (Swenerton et al., 2011). Nenhum estudo até o momento avaliou o efeito da superexpressão da OPB em leishmânias e não há nenhum trabalho sobre a enzima de *L. (L.) amazonensis*.

Além da OPB ou OPB1, uma proteína do tipo Oligopeptidase B denominada OPB2 foi descrita em *L. (L.) amazonensis*. A OPB2 tem uma extensão C-terminal pouco comum e pouca similaridade com a OPB1 e é expressa ao longo de todo o ciclo em *L. (L.) amazonensis* (Guedes et al., 2008).

1.8 Secreção de fatores de virulência

Há crescentes exemplos de proteínas de *Leishmania* que contribuem para a virulência do parasita, aumentando a infecção *in vitro* e *in vivo*. Parte delas são transportadas ao citoplasma do macrófago e interagem diretamente com vias de sinalização da célula hospedeira (Kima, 2007), contribuindo para o fenótipo desativado dos macrófagos infectados (Lambertz et al., 2012). Parte das proteínas secretadas por *Leishmania* seguem a via clássica de secreção baseada na presença de peptídeo sinal N-terminal, porém mais da metade do secretoma de *L. (L.) donovani* e provavelmente de outras espécies é feito por exossomos (Silverman et al., 2008; Silverman et al., 2010). Tanto a CPX quanto a OPB foram identificadas em exossomos de *L. (L.) donovani* (Silverman et al., 2008; Silverman et al., 2010), reforçando sua importância como fatores de virulência que potencialmente interagem com vias da célula hospedeira.

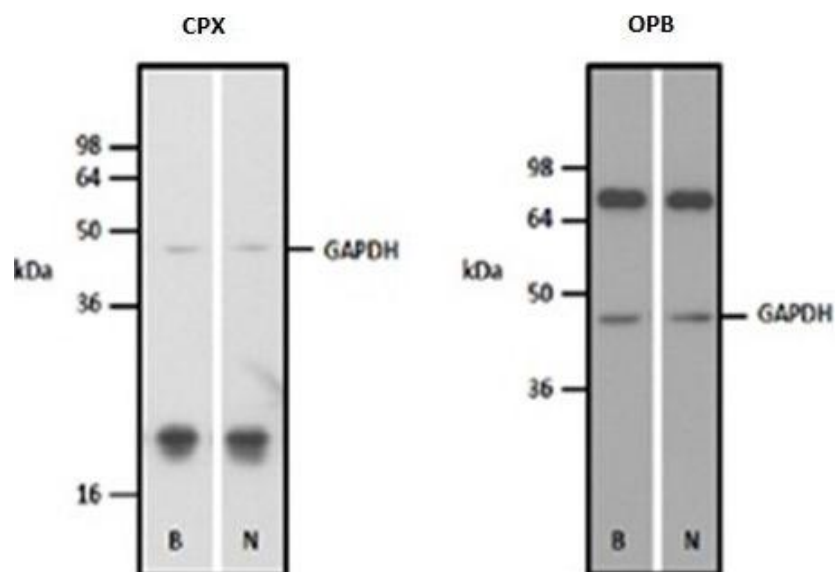
1.9 Resultados preliminares à dissertação: CPX e OPB no proteoma de amastigotas retirados de lesão de camundongos BALB/c x BALB/c nude experimentalmente infectados

Um estudo realizado em nosso laboratório avaliou a expressão proteica em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* modulada pela resposta imune de camundongos de

linhagens BALB/c e BALB/c nude experimentalmente infectados. Os animais BALB/c nude têm uma mutação genética que leva à deficiência de timo e, por consequência, de linfócitos T e suas citocinas. O objetivo do projeto foi identificar as diferenças no padrão de proteínas de amastigotas provenientes de lesões dos dois tipos de animais com base no sistema 2D DIGE. Foram identificadas 15 proteínas diferencialmente expressas, provavelmente moduladas pela presença de linfócitos T e suas citocinas, dentre as quais a OPB e a CPX. Ambas são descritas como ausentes em humanos, embora haja peptidases humanas semelhantes à OPB, sendo a CPX restrita aos tripanossomatídeos, característica que proporciona maior seletividade para um potencial fármaco. Tanto a OPB quanto a CPX tiveram isoformas (de mesmo tamanho, mas cargas distintas) mais abundantes em amastigotas isolados de BALB/c nude, sugerindo que a presença de linfócitos T regula negativamente sua abundância nos amastigotas (Teixeira et al., 2015).

Utilizando anticorpos específicos anti-CPX e anti-OPB, gentilmente cedidos pelo Dr. Carlos Robello e Dra. Dolores Piñeyro (Institut Pasteur, Montevideo) e Dr. Jeremy Mottram (University of Glasgow), respectivamente, foram realizados *Western Blots* (WB) de proteínas solúveis de amastigotas retiradas de lesão na pata de BALB/c e BALB/c nude em uma e duas dimensões. De acordo com os resultados (Figura 3), podemos observar que em abundância geral (gel em uma dimensão), não é possível observar diferenças na expressão das proteínas entre as diferentes linhagens de camundongos. Porém, um estudo das isoformas da proteína CPX (gel em duas dimensões) corrobora os dados encontrados no proteoma, onde as isoformas das diferentes linhagens têm abundâncias distintas.

A.



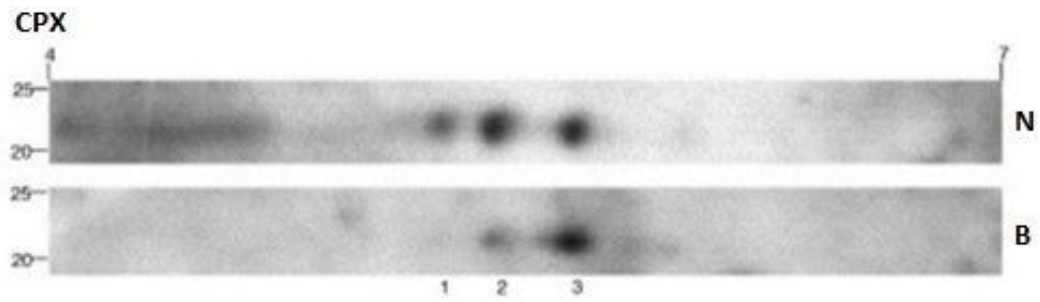
B.

Figura 3. *Western Blot* de proteínas solúveis de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* extraídas de lesão de camundongos BALB/c (B) e BALB/c nude (N) utilizando anticorpos contra CPX ou OPB em uma dimensão (A, Leonardo Velasquez, dados não publicados) e duas dimensões (Teixeira et al., 2015).

A associação de OPB e CPX com virulência em diferentes espécies de *Leishmania* descrita na literatura, a presença de ambas as proteínas em exossomos liberados pelo parasita e os escassos estudos sobre elas em *L.(L.) amazonensis* nos levaram a investigar seu papel na virulência dessa espécie. Além disso, a expressão diferencial de isoformas de OPB e CPX em amastigotas de *L.(L.) amazonensis* derivados de lesões de BALB/c e BALB/c nude foi um achado bastante interessante. As isoformas diferencialmente expressas das duas proteínas foram mais abundantes em amastigotas derivados de BALB/c nude, que se mostraram mais infectivos do que os de BALB/c *in vitro* e *in vivo* (dados não publicados do grupo), o que reforça a possível associação dessas isoformas com virulência em amastigotas e sua regulação por respostas T dependentes. O estudo desses fatores de virulência, que podem ser explorados como potenciais alvos para fármacos, pode contribuir para melhor compreensão dos mecanismos de infecção da *Leishmania*.

Obter e caracterizar duas linhagens transgênicas superexpressoras de CPX e OPB de *L. (L.) amazonensis* e as respectivas proteínas recombinantes e avaliar seu efeito na modulação da infecção *in vivo* e *in vitro*.

Para tanto, as etapas necessárias foram:

- Obtenção das proteínas recombinantes de *L. (L.) amazonensis* OPB em sistema de célula humana HEK293T e de CPX de *L. (L.) amazonensis* em sistema bacteriano *Escherichia coli*.
- Caracterizar as proteínas recombinantes quanto a sua funcionalidade através de ensaios de atividade peroxidase para CPX e atividade peptidase para OPB.
- Investigar se há modulação no nível de infecção por *L. (L.) amazonensis* em macrófagos peritoneais de BALB/c estimulados com OPB solúvel *in vitro*.
- Obter e caracterizar os transgênicos de *L. (L.) amazonensis* superexpressores de CPX.
- Analisar o índice de infecção *in vitro* de macrófagos infectados com cepas de *L. (L.) amazonensis* superexpressoras de CPX.
- Caracterizar os efeitos da superexpressão *in vivo* pelo acompanhamento das lesões em camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com parasitos superexpressores de CPX e parasitos transfectados com o plasmídeo vazio.

4.1 Cultivo de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* selvagens e superexpressores

A cepa selvagem de *L. (L.) amazonensis* M2269 (MHOM/BR/1973/M2269) foi cultivada em estufa a 24 °C em meio 199 (Gibco, NY, USA) completo pH 7,4 (9,90 g/L de meio 199, 0,33 g/L de bicarbonato de sódio, 40 mL/L de HEPES 1 M, 20 mL/L de adenina 5 mM, 2 mL/L de Hemina 0,25%, acrescido de 20 µg/mL de gentamicina (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco). Após a seleção, os promastigotas cepa M2269 superexpressores de CPX ou OPB e o transfectante da mesma cepa contendo o vetor vazio pSp foram cultivados sob as mesmas condições dos parasitas selvagens com a adição de 32 a 300 µg/mL de G418 (Sigma,UK). A cada sete dias os parasitas foram repicados para a densidade de 2×10^6 promastigotas/mL.

4.2 Determinação da curva de crescimento dos parasitas transfectados

Para determinação da curva de crescimento, as culturas dos parasitas superexpressores de CPX e dos parasitas controle contendo o vetor vazio pSp foram repicadas para 1×10^6 promastigotas/mL e a densidade calculada diariamente por 8 dias. Para tanto, uma alíquota de cada cultura foi diluída em formalina 1,5% e contada em câmara de Neubauer. Foram realizados três experimentos independentes, com distintas passagens.

4.3 Extração de DNA genômico de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

1×10^8 promastigotas foram centrifugadas a 2500 x g por 10 minutos, ressuspensas e lisadas em 150 µL de TELT (Tris pH 8,0 50 mM, EDTA pH 9,0 62,5 mM, LiCl 2,5 M e 4% Triton). Após incubação por cinco minutos a temperatura ambiente, adicionou-se 150 µL de fenol tamponado seguido de centrifugação por cinco minutos a 15700 x g. O DNA contido no sobrenadante foi precipitado em 300 µL de etanol absoluto, seguido de nova centrifugação nas mesmas condições. Após descarte do sobrenadante, ressuspendeu-se o DNA em 50 µL de TE (Tris-EDTA) contendo RNase 0,2 mg/mL. O gDNA foi quantificado por *Nanodrop* (Spectrophotometer ND-1000) a 260nm/280nm e utilizado como molde para as reações de PCR.

4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para amplificação dos genes CPX e OPB foram utilizados 100 ng de gDNA de *L. (L.) amazonensis* e oligonucleotídeos (IDT) contendo os sítios de restrição adequados para inserção nos vetores, inicialmente desenhados com base nas extremidades 5' e 3' das sequências dos genes da mesma espécie depositadas no GenBank (AY842247.1 e EF392367.1, CPX e OPB, respectivamente). Após dificuldades na amplificação do gene da OPB novos oligonucleotídeos foram desenhados baseados na sequência proveniente do sequenciamento completo do genoma da espécie publicada no trabalho de Real et. al. 2013 (Tabela 1).

Foram utilizados 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1U da Taq Platinum Pfx polimerase, 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl (Life Technologies) e H₂O nuclease free para um volume final de 20 µL. A ciclagem foi realizada em termociclador da *Applied Biosystems* com uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 94 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação por 60 segundos a 94 °C, *annealing* por 30 segundos na temperatura de *melting* dos primers e extensão a 72 °C de um minuto para o gene da CPX e dois minutos para o gene da OPB. Ao término dos 30 ciclos foi realizada uma etapa adicional de extensão a 72 °C por 15 minutos.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas clonagens nos vetores pQE-30, pSecTag2-A e pSp. Nas sequências as letras em negrito indicam os sítios de restrição das enzimas utilizadas e as letras em vermelho os nucleotídeos que diferem entre a sequência do gene da OPB depositada no NCBI e a sequência depositada no site <http://bioinfo08.ibi.unicamp.br/leishmania/> (Real et. al. 2013). F = *Forward*. R = *Reverse*

Nome	Sequência
F CPX Hind III (pQE-30/pSecTag2)	5' CGCAAGCTTTATGTCCTGCGGTAC 3'
F CPX Xba I (pSp)	5' GCGTCTAGATATGTCCTGCGGTAC 3'
R CPX Xho I (pSecTag2)	5' GCGCTCGAGTCTGCTTGCTGAAGTA 3'
R CPX Hind III (pSp/pQE-30)	5' GCGAAGCTTTCTGCTTGCTGAAGTA 3'
F OPB Kpn I (pSecTag2)	5' GCGGGTACCTATGTCGTCGGACAGCTCCGTCGCG 3'
F OPB Sma I (pSp)	5' GCGCCCGGGTATGTCGTCGGACAGCTCCGTCGCG 3'
R OPB Sac I (pSp)	5' GCGGAGCTCTCCTGCGAACCAGCAGGCGCAT 3'
R OPB XhoI (pSecTag2)	5' GCGCTCGAGTCCTGCGAACCAGCAGGCGCAT 3'

F Neomicina fosfotransferase	5' ATGATTGAACAAGATGGATTG 3'
R Neomicina fosfotransferase	5' TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAA 3'
F Alphatubulina	5' GCGGCAGATCGCCGTGTAACGCCGTGAATGTATGCGCGTG3'
R Alphatubulina	5' GCGGGATCCGGGGAGAGGGATGAGGGGT 3'

4.5 Preparação de bactérias competentes e transformação com os plasmídeos pJET, pSecTag2-A e pSp

Uma colônia de bactérias *Escherichia coli* DH5 α foi inoculada em 20 mL de meio de cultura LB líquido (Life Technologies) e incubada 16 horas a 37 °C, sob agitação constante. Realizou-se uma diluição 1:20 do pré-inóculo em LB, novamente incubado sob as mesmas condições até a DO₆₀₀ atingir 0,3. Neste ponto, as bactérias foram centrifugadas a 832 x g por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e as bactérias ressuspensas em 80 mL de tampão CCMB80 pH 6,4 gelado (KOAc pH 7,0 10 mM, CaCl₂.2H₂O 80 mM, MnCl₂.4H₂O 20 mM, MgCl₂.6H₂O 10 mM e 10% glicerol) e incubadas por 20 minutos no gelo. Centrifugou-se novamente sob as mesmas condições, descartou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se o precipitado em 2 mL de CCMB80 gelado e mediu-se a DO₆₀₀, que deve estar entre 1,0 e 1,5. Alíquotas de 50 μ L foram congeladas em gelo seco e imediatamente armazenadas em freezer – 80 °C.

Para a transformação, 1 ng de DNA plasmidial foi adicionado a tubos contendo 20 μ L de bactérias competentes, juntamente com 75 μ L de CaCl₂ 0,1 M. Após incubação em gelo por 30 minutos, os tubos foram aquecidos a 42 °C por 45 segundos e recolocados em gelo por 5 minutos. Para recuperação das bactérias, acrescentou-se 400 μ L de meio LB, seguido de incubação a 37 °C por 1 hora sob agitação. Centrifugou-se a 400 x g por 2 minutos, descartou-se 380 μ L de sobrenadante e o precipitado ressuspensão no restante do sobrenadante foi plaqueado em placas de LB 2% ágar contendo 100 μ g/mL de ampicilina (USB, USA), mantidas a 37 °C durante a noite.

4.6 Preparação de bactérias eletrocompetentes e transformação com o plasmídeo pQE-30

Uma colônia de bactérias *Escherichia coli* XL1 foi inoculada em 5 mL de meio de cultura LB líquido (Life Technologies) e incubada por 16 horas a 37 °C, sob agitação constante. O pré-inóculo foi diluído em 150 mL de LB e novamente incubado sob as mesmas

condições até a DO_{600} atingir 0,6. Neste ponto, as bactérias foram centrifugadas a $4000 \times g$ por 15 minutos a $4^\circ C$. O precipitado foi ressuspense em 150 mL de H_2O gelada e centrifugado novamente, sob as mesmas condições. O procedimento foi repetido quatro vezes, sempre reduzindo o volume de H_2O gelada à metade. Por fim, o precipitado foi ressuspense em 450 μL de glicerol 10%. Para a eletroporação, 0,1 ng do plasmídeo pQE-30 foi adicionado a 40 μL de bactérias eletrocompetentes em cubetas de metal, seguido de eletroporação de 1 pulso unipolar a 500 V por 008 s (BTX Harvard modelo ECM830). Como controle, eletroporou-se somente 40 μL de bactérias sem o plasmídeo. Adicionou-se 800 μL de LB às cubetas, transferindo em seguida os conteúdos para *eppendorfs* seguido de incubação a $37^\circ C$ por 1 hora, sob agitação. As bactérias foram centrifugadas por 2 minutos, descartou-se 780 μL de sobrenadante e o precipitado ressuspense no restante do sobrenadante foi plaqueado em placas de LB 2% ágar contendo 100 $\mu g/mL$ de ampicilina, mantidas a $37^\circ C$ durante a noite.

4.7 Extração do DNA plasmidial em pequena escala (*Mini Prep*)

Um clone contendo o plasmídeo (pSecTag2-A, pSp ou pQE-30) foi inoculado em 5 mL de meio LB contendo 100 $\mu g/mL$ de ampicilina. Utilizou-se o Kit Plasmid Prep Mini Spin (GE Healthcare) para extração do DNA plasmidial, de acordo com as instruções do fabricante. Os plasmídeos foram quantificados por *Nanodrop*, submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) e visualizados em U.V. após coloração com brometo de etídio 0,75 $\mu g/mL$. Analisou-se tanto o DNA circular como os digeridos com enzima de restrição para confirmação dos tamanhos corretos dos vetores linearizados comparados ao padrão de peso molecular O'GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific, USA) ou 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, NY, USA).

4.8 Ligação enzimática dos produtos de PCR ao vetor de clonagem pJET dos genes OPB e CPX (ICB)

Utilizou-se 1 μL (50 ng) do vetor pJET (Life Technologies) e inserto na proporção molar de 3:1, seguindo o protocolo do fabricante. Após breve agitação em vortex, a mistura foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Transformamos 5 μL da reação de ligação conforme o protocolo do item 4.5.

4.9 Ligação enzimática dos produtos de PCR ao vetor de clonagem pGEM-T Easy do gene CPX (*Institut Pasteur*)

Utilizou-se 1 μL (50 ng) do vetor pGEM-T *Easy* (Promega, Madison, USA) e inserto na proporção molar de 3:1, seguindo o protocolo do fabricante. Após breve agitação em vortex, a mistura foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora. Transformamos 2 μL da reação de ligação conforme o protocolo do item 4.6, em placas com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina acrescidas de IPTG 0,5 mM e X-Gal 80 $\mu\text{g/mL}$.

4.10 Digestões com enzimas de restrição, purificação do gel de agarose e ligação enzimática inserto/vetor

Os vetores de expressão de proteínas (pSecTag2-A e pQE-30), o vetor de transfecção em promastigotas (pSp) e os vetores de clonagem intermediários contendo os genes CPX ou OPB (pJET e pGEM-T *Easy*) foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição e aplicados em gel de agarose 1% em TAE. Os vetores de expressão digeridos e os fragmentos contendo os insertos foram excisados dos géis e purificados com QI Aquick gel extraction Kit (Qiagen, CA, USA) ou GFX Gel Band Purification Kit (GE, New York, USA), de acordo com as especificações dos fabricantes. Uma alíquota do DNA eluído após purificação do gel foi novamente submetida à eletroforese em gel de agarose 1% em TAE para quantificação e cálculo da proporção de massas utilizadas nas reações de ligação inserto/vetor.

Utilizamos a proporção molar 3:1 inserto/vetor e a enzima T4 ligase Invitrogen (pQE-30 e pGEM-T *Easy*) ou New England (pSecTag2-A e pJET). Como controle de ligação, montou-se a reação contendo todos os componentes exceto o inserto (somente o vetor digerido), para observar se haveria recircularização do vetor. Após a mistura dos reagentes por vortex, incubou-se durante 1 hora a temperatura ambiente. 5 μL da reação de ligação foram utilizados na transformação conforme os protocolos dos itens 4.5 e 4.6.

4.11 Extração do DNA plasmidial em grande escala (Max Prep) e sequenciamento

Após confirmação por PCR de cinco colônias de cada placa de ligação, uma colônia positiva foi inoculada em 5 mL de LB ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$, mantida sob agitação a 37°C durante a noite. Os pré-inóculos foram adicionados a 180 mL de meio LB contendo antibiótico até atingir a DO_{600} 0.6. Utilizamos o Kit Max Prep (Qiagen) para extração do DNA plasmidial de acordo com as instruções do fabricante. Os plasmídeos foram quantificados por *Nanodrop* e visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE, após digestão com as enzimas de

restrição. Averiguamos a sequência correta das construções utilizando BigDye 3.1, *primers* específicos dos vetores e o serviço de sequenciamento do Instituto de Química da USP (equipamento ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer/HITACHI) para os insertos inseridos no vetor intermediário pJET e equipamento ABI3130 Applied Biosystems do *Institut Pasteur* para o inserto inserido no vetor intermediário pGEM-T *Easy*.

4.12 Obtenção de amastigotas de lesão murina

Camundongos BALB/c infectados com 2×10^6 formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa M2269 no coxim plantar da pata esquerda foram sacrificados na décima semana em câmara de CO₂. As patas foram removidas, lavadas em etanol 70% e maceradas em *potter* em PBS. Em seguida o material foi transferido para um tubo Falcon de 50 mL e mantido em gelo por 30 minutos, para sedimentar os restos de tecido e debris celulares. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 50 x g durante 10 minutos a 4°C. Recuperado o sobrenadante (amastigotas em suspensão), seguiu-se uma nova centrifugação a 1450 x g durante 25 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado três vezes com 30 mL de PBS, seguido de centrifugações sob as mesmas condições. Após as lavagens o precipitado foi ressuspensão em 30 mL de meio RPMI pH 7,2 suplementado com 4% de SFB e gentamicina (Life Technologies) e incubado a temperatura ambiente sob constante agitação durante três horas, para liberação das amastigotas de membranas endocíticas. Outra centrifugação, nas mesmas condições citadas, foi realizada e o precipitado contendo os parasitas foi ressuspensão em 2 mL de tampão de lise de hemácias (NH₄Cl 15 mM, KHCO₃10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) e mantido em gelo durante um minuto. Em seguida foram adicionados 10 mL de PBS e centrifugou-se novamente. O precipitado foi lavado por duas vezes com 25 mL de PBS, centrifugado e ressuspensão em 1,5 mL de meio RPMI pH 7,2 suplementado com 10% de SFB e gentamicina para contagem dos parasitas em câmara de Neubauer.

4.13 Extração de proteínas solúveis de amastigotas isolados de lesão ou promastigotas para *Western Blot*

Amastigotas de *L. (L.) amazonensis* obtidas de lesão da pata de BALB/c ou promastigotas superexpressoras ou transfectadas com o vetor pSp vazio de *L. (L.) amazonensis* cepa M2269 foram utilizadas para a extração de proteínas solúveis. Os parasitas foram ressuspensos em PBS acrescido de inibidor de proteases (Proteoblock 1:100) na

proporção de 300 µL para cada 1×10^9 células. Foram realizados oito ciclos de choque térmico alternando entre N₂ líquido e banho-maria a 42 °C, seguidos de centrifugação por 5 minutos a 12000 x g. O extrato solúvel foi recuperado e quantificado pelo método de Bradford (BioRad, CA, USA), e armazenado em *freezer* – 80 °C até o momento do uso.

4.14 SDS-PAGE e *Western Blot*

Géis de separação e empilhamento foram preparados segundo Sambrook et al., 1989. O gel de separação foi composto de acrilamida:bisacrilamida 12%, Tris pH 8,8 0,375 M, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,04% v/v (N,N,N',N' – tetrametil-etilenodiamina), polimerizado por 40 minutos a temperatura ambiente. O gel de empilhamento aplicado acima do gel de separação foi composto de acrilamida:bisacrilamida 5%, Tris pH 6,8 0,13 M, SDS 0,1%, persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,1% v/v, polimerizado por 30 minutos a temperatura ambiente. 20 µg de proteína em tampão de amostra (SDS 2%, Tris/HCl pH 6.8 0,085 M, azul de bromofenol 0,1%, 2β-mercaptoetanol 1,2% e glicerol 10%) foram fervidas a 95 °C por 5 minutos e aplicadas nas canaletas do gel. A eletroforese foi realizada a 80 V para o gel de empilhamento e a 120 V para o gel de separação, em tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 250 mM e SDS 0,1%). Como padrão de peso molecular foi utilizado o See Blue Plus2 (Invitrogen).

A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (GE) foi realizada em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0,1%, pH 8,2) por 1 hora e 20 minutos a 3 V utilizando o equipamento de transferência semi-seca TE 77 (GE). A membrana foi corada com Ponceau S (Ácido Acético 5% e Ponceau S 0,2%) e em seguida bloqueada com leite 5% em PBS/Tween 20/0,1% por 1 hora a temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C.

As membranas foram incubadas com os soros anti-CPX (anti-CPX de *Trypanosoma cruzi* produzido em coelho) e anti-OPB (anti-OPB de *Leishmania (L.) major* produzido em ovelha) diluídos em leite 2,5% em PBS/Tween 20 0,1% (anti-CPX na diluição 1:2000 e anti-OPB na diluição 1:5000) por duas horas. As membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos sob agitação com PBS/ Tween 20 0,1% e posteriormente incubadas durante uma hora com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase HRP, diluídos 1:2000 (anti-IgG de coelho comercial KPL para a CPX) e 1:10000 (anti-IgG de ovelha comercial KPL para a OPB) em leite 2,5% em PBS/Tween 20 0,1%. Como controle interno (normalizador),

utilizamos o anti-GAPDH (Sigma) produzido em coelho. Foram realizadas mais duas lavagens de 10 minutos com PBS/Tween 20/0,1% e uma última lavagem apenas com PBS. Em seguida adicionou-se ECL (GE) sobre as membranas por 5 minutos, com posterior exposição em filme de raio-X (GE).

Também foi realizado um experimento para avaliar se a produção da forma mitocondrial da triparedoxina peroxidase sofre alteração com a superexpressão da forma citoplasmática. Para tanto, utilizou-se anticorpo específico anti-MPX de *Trypanosoma cruzi* produzido em coelho, cedido gentilmente pela pesquisadora Dra. Dolores Piñeyro do grupo do Dr. Carlos Robello.

4.15 Imunofluorescência

2×10^5 promastigotas foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 10 minutos, ressuspensas em PBS e aplicadas em lamínulas circulares. Após permeabilização das células (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, BSA 1%, Triton 0,1%, pH 8,0 por 10 minutos) aplicamos os soros para CPX ou OPB mencionados no item 4.14 na diluição 1:100 em tampão Brinkley (MgCl₂ 0,5 M, EGTA 0,5 M, KCl 0,5 M, SFB 5%, pH 6,8) e após lavagem em tampão Brinkley 5% SFB incubamos com anticorpo secundário na diluição 1:500 (anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488 para CPX e anti-IgG de ovelha conjugado com Alexa Fluor 594 para OPB). Como controle negativo, incubamos os parasitas apenas com os anticorpos secundários nas mesmas condições.

4.16 Transfecção de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepas M2269 por eletroporação

Utilizou-se o aparelho *BioRad Gene Pulser II Eletroporation System* para eletroporação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa M2269. Um pulso elétrico de voltagem 0,45 mV e capacitância de 500 μ F foi aplicado a 5×10^7 promastigotas em fase logarítmica juntamente com 5 μ g das construções do vetor pSp com os genes CPX ou OPB, do vetor fechado vazio e sem DNA. Após visualização microscópica das células (confirmando a viabilidade) os parasitas foram transferidos a garrafas contendo 10 mL de meio 199 completo, que foram armazenadas em estufa a 24 °C. No dia seguinte, paramomicina para 1600 μ g/mL foi adicionada às culturas. No terceiro dia de experimento realizamos um repique trocando o antibiótico por G418 12 μ g/mL ou paramomicina na mesma concentração da

seleção e observamos por sete dias. Aumentamos gradualmente o G418 até 32 µg/mL, concentração de manutenção dos parasitas. A população heterogênea foi clonada por plaqueamento em meio sólido (199 contendo 2% de ágar) e uma colônia foi selecionada após análise de cinco colônias de cada construção e do controle.

4.17 Medida de viabilidade celular pela redução do MTT

Promastigotas das três cepas de *L.(L.) amazonensis* mantidas no laboratório (LV79, M2269 e PH8) na densidade de 1×10^7 /mL foram transferidas para placa de 96 poços na presença de diferentes concentrações de G418. Após 48 horas, acrescentou-se 20 µl de uma solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazolil)-2,5-brometo de difenil tetrazolio, Sigma) 5 mg/mL preparada em PBS e incubou-se a 26 °C durante 50 minutos. Transcorrido o tempo de incubação, adicionou-se 100 µL de SDS 10% por poço e as placas foram analisadas em espectrofotômetro para microplacas de cultura BioTek para absorvância em 595 nm.

4.18 Transfecção de células HEK293T como sistema de expressão proteica

Placas de 150 mm (Corning) foram semeadas com $7,0 \times 10^6$ células HEK293T em meio DMEM suplementado com 5% SFB *Low-IgG* (Life Technologies), L-glutamina 2 mM, piruvato de sódio 1 mM e gentamicina. Quando a confluência celular atingiu aproximadamente 60% adicionou-se o DNA às células.

Para cada placa de células HEK293T misturou-se (por vortex) 20 µg de plasmídeo (construção pSecTag2-A::OPB) a 1 mL de uma solução de NaCl 150 mM e em seguida acrescentou-se 100 µL de polietilenimina (PEI, Sigma) 0,45 mg/mL. A mistura foi homogeneizada em vortex por 10 segundos e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. O volume final foi adicionado lentamente a cada uma das 20 placas, incubadas a 37 °C 5% CO₂ por cinco dias. Como controle, 20 placas sofreram o mesmo processo de transfecção sem adição do DNA.

4.19 Purificação da OPB recombinante a partir do sobrenadante de células HEK293T por cromatografia de afinidade em coluna de níquel

Transcorridos os cinco dias da transfecção das células HEK293T, o sobrenadante contendo a proteína OPB solúvel foi recolhido, adicionou-se o inibidor de protease PMSF

para 1 mM final, centrifugou-se a 7500 x g por 20 minutos a 4 °C e este novo sobrenadante foi filtrado (22 µm) para retirada dos debris celulares. O filtrado foi transferido para membrana de diálise (*Snake skin Dialysis Tubing* – Thermo Scientific) e em seguida imerso em cristais de sacarose por aproximadamente 4 horas em geladeira, até redução do volume a menos da metade. Posteriormente, a membrana de diálise foi imersa em 2 litros de tampão de diálise (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM e imidazol 10 mM, pH 7,4) sob lenta agitação em geladeira. Após 4 horas, trocou-se o tampão, mantendo a diálise até o dia seguinte, quando se equilibrou a coluna de níquel (uma vez o volume da coluna) com tampão de equilíbrio (idêntico ao tampão de diálise), passou-se todo o sobrenadante pela coluna, lavou-se (cinco vezes o volume da coluna) com tampão de lavagem (NaCl 1 M, NaH₂PO₄ 50 mM e imidazol 10 mM, pH 7,4), seguido de eluição (4 mL em oito alíquotas de 500 µL) em tampão contendo 400 mM de imidazol pH 7.4. As proteínas nas frações eluídas foram quantificadas por Bradford e a presença da proteína OPB foi analisada por SDS-PAGE e WB conforme descrito no item 4.14. Ao final, uniram-se as frações, que foram concentradas e dialisadas em colunas de diálise (Millipore 3000 MWCO). Como controle, o produto da diálise do sobrenadante de células HEK293T que não receberam o DNA também foi eluído em coluna de níquel, quantificado e analisado.

4.20 Indução da CPX em sistema bacteriano (*E. coli* cepa M15)

Inoculou-se uma colônia de *E. coli* cepa M15 contendo a construção pQE-30::CPX em 5 mL de LB contendo ampicilina e kanamicina, que foi mantida sob constante agitação a 37 °C *overnight*. Diluiu-se a cultura 50 vezes em um volume total de 50 mL, mantendo sob agitação de 220 rpm a 37 °C até a DO₆₀₀ atingir 0,6. Adicionou-se IPTG para uma concentração final de 0,5 mM e incubou-se durante 5 horas a 220 rpm a 30 °C. Após sedimentação das bactérias, o precipitado foi ressuspenso em tampão de lise (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM pH 7,6) e incubado com lisozima 1 mg/mL em gelo por 30 minutos. Em seguida, adicionou-se PMSF 1 mM final e sonicou-se em gelo por 1 minutos (6 pulsos de 10 segundos com intervalos de 10 segundos). A fração solúvel foi separada por centrifugação durante 20 minutos a 15000 x g a 4 °C.

4.21 Purificação da CPX recombinante a partir da fração solúvel de lisado bacteriano por cromatografia de afinidade em coluna de níquel

A coluna de níquel foi previamente equilibrada com 5 volumes de tampão de lise (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM pH 7,6) e posteriormente aplicou-se o lisado, deixando-o recircular (com auxílio de uma bomba de fluxo contínuo) durante 30 minutos. Lavou-se com 5 volumes de tampão de lavagem (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 100 mM pH 7,6) e por fim eluiu-se a proteína em tampão contendo 400 mM de imidazol pH 7,6 (8 alíquotas de 3 mL cada). As frações eluídas foram quantificadas por Bradford e a presença da proteína CPX foi analisada por SDS-PAGE. Ao final, uniram-se as frações, que foram concentradas e dialisadas em colunas de diálise (10000 MWCO).

4.22 Extração das proteínas solúveis de *L. (L.) amazonensis* transfectantes para ensaio de atividade peroxidase

25 mL de cultura dos parasitas superexpressores de CPX e do controle (contendo pSp vazio) em fase log de crescimento foram sedimentados e lavados três vezes com o mesmo volume de PBS. O sedimento foi ressuspensão em 300 μL de HEPES 50 mM contendo DTT 1 mM e inibidores de proteases. As células foram lisadas (por oito ciclos de choque térmico em etanol -20°C e banho-maria 42°C) e a fração solúvel separada por centrifugação a $15000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . As amostras foram dialisadas em colunas VivaSpin (GE) contra HEPES 50 mM, EDTA 1 mM e inibidores de proteases. Posteriormente foram quantificadas por Bradford e armazenadas em -80°C até o momento do uso.

4.23 Ensaio de atividade peroxidase dos extratos de parasita e da CPX recombinante

Os ensaios de atividade peroxidase foram realizados de acordo com o protocolo do Kit *AmplexRed Peroxidase Assay* (Invitrogen). 500 μg e 250 μg de extrato solúvel dos parasitas superexpressores e do controle e as concentrações de 200 μM , 100 μM , 50 μM e 25 μM da proteína recombinante foram utilizados para o ensaio, de acordo com a experiência dos pesquisadores do *Institut Pasteur* em trabalhos com *Trypanosoma cruzi*.

4.24 Ensaio de atividade peptidase da OPB recombinante

Diferentes volumes (25, 10, 5, 1 e 0,5 μL) do eluato da purificação da OPB e do controle (sobrenadante de cultura de células HEK293T) foram utilizados para análise da atividade peptidase, baseada na clivagem do substrato sintético Z-Arg-Arg-AMC

(CalbioChem). As amostras foram diluídas em tampão de atividade (Tris-HCl 50 mM, NaCl 15 mM, CaCl 10 mM e DTT 5 mM) em um volume final de 100 μ L por poço em placa de 96 poços preta. No momento da leitura no fluorímetro (BMG LabTech) com comprimento de onda de 380 nm para excitação e 460 nm para emissão, adicionou-se 1 μ L do substrato para 10 μ M final. Os resultados foram expressos em unidades relativas de fluorescência.

4.25 Ensaio de resistência dos parasitas superexpressores de CPX ao H₂O₂ e ao peroxinitrito

Promastigotas superexpressoras e controle foram sedimentadas por 3000 x g, lavadas três vezes em PBS e incubadas na densidade de 1×10^7 parasitas/mL com ou sem H₂O₂ 400 μ M ou peroxinitrito 500 μ M em PBS-glicose 1% durante 30 minutos. Transcorrido o período foi feita nova centrifugação, os parasitas foram lavados com PBS, ressuspensos em meio 199 completo e distribuídos em placas de 96 poços, em um volume de 200 μ L por poço, quando se realizou uma medida inicial de absorbância a 630 nm para controle da homogeneidade da densidade dos parasitas. Ao final de 48 e 72 horas, as placas foram analisadas microscopicamente e se mediu a absorbância 630 para inferência da viabilidade celular entre os parasitas que receberam o estímulo *versus* os parasitas não estimulados.

4.26 Obtenção de macrófagos peritoneais residentes de BALB/c

Camundongos BALB/c fêmeas foram sacrificados em câmara de CO₂ e limpos com álcool 70% para a descontaminação da pele, que foi aberta expondo a cavidade peritoneal. 5 mL de PBS estéril gelado foram injetados na cavidade peritoneal, aspirados (após massagem) e centrifugados a 1450 x g durante 10 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 não suplementado (Gibco) e a contagem dos macrófagos foi realizada em câmara de Neubauer.

A suspensão de células peritoneais foi ajustada para $1,6 \times 10^6$ células/mL. Transferiu-se 500 μ L da respectiva suspensão para placas de 24 poços com lamínula de vidro circular de 13 mm (Glass Técnica). Após duas horas de incubação em estufa a 37 °C 5% de CO₂ o meio foi trocado por RPMI 1640 pH 7,2 suplementado com 10% de SFB e gentamicina em temperatura ambiente e as células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ *overnight*.

4.27 Infecção de macrófagos peritoneais com *L. (L.) amazonensis*

A infecção dos macrófagos aderidos foi realizada na proporção de 5 parasitos por macrófago com formas promastigotas no quarto dia de crescimento durante 24, 48, 72 e 96 horas (índice de infecção) ou 48 horas (Griess). As células aderidas à lamínula do ensaio para índice de infecção foram fixadas por incubação instantânea das lamínulas em metanol, coradas com Kit de corante Instant-Prov (Newprov, PR, BR). Foram analisados 100 macrófagos por lamínula e determinada a proporção de macrófagos infectados (MI), o número de amastigotas por macrófago infectado (AMA) e o índice de infecção (II=MI x amastigotas totais).

Para análise da possível modulação da infecção pela CPX foram utilizados os parasitas superexpressores, enquanto que para OPB a estratégia foi utilizar parasitas selvagens (cepa M2269) estimulados com a proteína recombinante solúvel (30 µg de proteínas totais da purificação de HEK293T por poço). A proteína OPB solúvel foi acrescentada logo após o plaqueamento dos macrófagos (depois das duas horas de aderência) e mantida até o término do experimento, sendo repostada a cada troca de meio do protocolo descrito no item 4.26.

4.28 Infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 com parasitas transfectantes

Promastigotas de *L.(L.) amazonensis* superexpressoras ou contendo o plasmídeo vazio no quarto dia de cultivo foram ressuspensas em PBS na densidade de 10^5 parasitas/µL. 20 µL foram inoculados por via subcutânea na pata posterior esquerda de camundongos BALB/c e C57BL/6 fêmeas (cinco animais por grupo). As patas infectadas e as contralaterais não infectadas foram medidas semanalmente em largura e espessura durante oito semanas.

5.1 Imunofluorescência em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* selvagens

Como resultado preliminar à dissertação, havíamos utilizado os anticorpos de anti-CPX e anti-OPB frente a extratos proteicos solúveis de *L. (L.) amazonensis*. Ainda com o intuito de testar a especificidade dos anticorpos e observar se haveria alguma localização específica das proteínas em análise, realizamos ensaios de imunofluorescência com as formas promastigotas fixadas e permeabilizadas, utilizando anticorpos secundários fluorescentes (anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (verde) para CPX e anti-IgG de ovelha conjugado com Alexa Fluor 594 (vermelho) para OPB). Observamos que os anticorpos ligaram-se às respectivas proteínas (os controles somente com o secundário não apresentam marcação) de forma dispersa dentro do parasita, sugerindo localização citoplasmática para ambas as proteínas, como esperado (Figura 4).

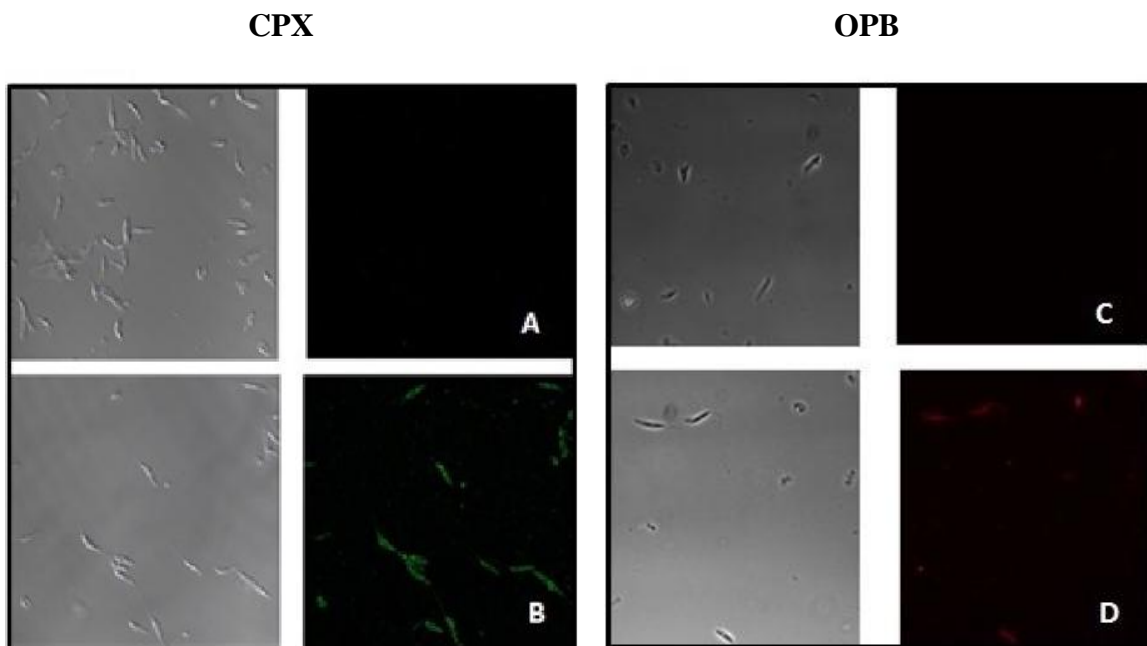


Figura 4. Imagens de imunofluorescência captadas por microscopia confocal. A = controle negativo para marcação fluorescente anti-CPX. B = marcação fluorescente anti-CPX. C = controle negativo para marcação fluorescente anti-OPB. D = marcação fluorescente anti-OPB. À esquerda de cada figura é mostrada a respectiva imagem de contraste de fase. (Aumento de 1000x)

A localização citoplasmática de CPX já foi mostrada em *Leishmania*, inclusive em *L. (L.) amazonensis*, por imunofluorescência. A localização da OPB não foi estudada em

Leishmania, mas a marcação fraca pelo anticorpo nos levou a abandonar a proposta de averiguar sua localização por essa técnica.

5.2 Clonagens nos vetores de expressão de proteínas: pSecTag2-A e pQE-30

Para produção de proteínas recombinantes para OPB e CPX utilizamos o vetor para células de mamífero pSecTag2-A e o vetor bacteriano pQE-30. Inicialmente realizamos uma busca das sequências dos genes de interesse depositadas no site do NCBI para elaboração dos oligonucleotídeos para clonagem (GenBank: AY842247.1 e GenBank: EF392367.1, CPX e OPB, respectivamente). O gene da CPX contém 600 pb enquanto o da OPB contém 2196 pb, em concordância com as massas teóricas das proteínas diferencialmente expressas no trabalho prévio de proteoma do nosso laboratório (23 kDa e 83 kDa, CPX e OPB respectivamente). Optamos por desenhar os oligonucleotídeos contendo os sítios das enzimas a serem utilizadas na digestão e sem o *Stop Codon* (Tabela 1, Materiais e métodos), para que as proteínas fossem traduzidas fusionadas com o *HisTag* no vetor pSecTag2-A (clonagem de CPX e OPB). No vetor pQE-30 (clonagem somente da CPX) o *HisTag* está posicionado antes do *polylinker*, porém há um *Stop Codon* seguido ao último sítio de restrição.

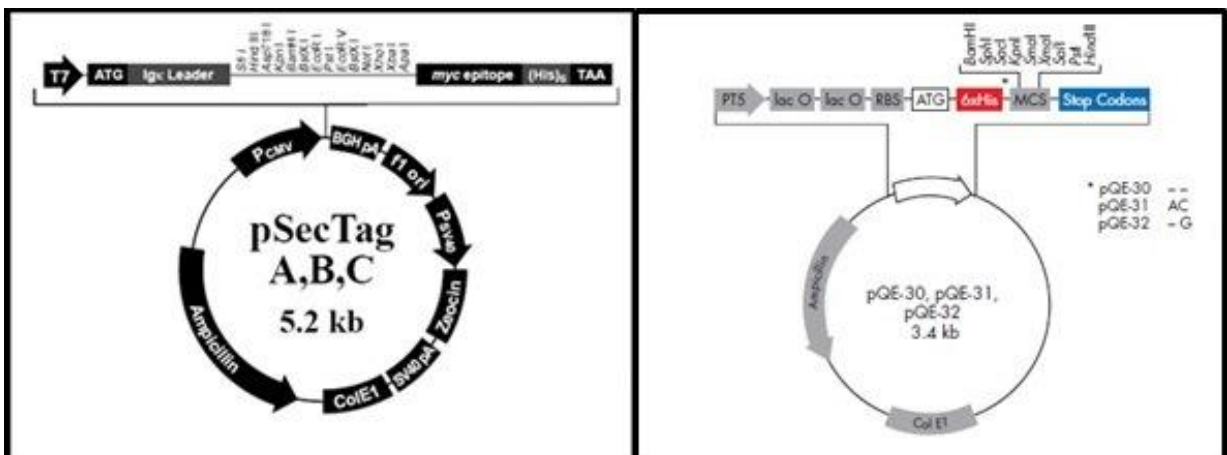


Figura 5. Mapa dos vetores de expressão de proteínas utilizados nas clonagens dos genes da OPB e CPX.

O resultado da amplificação dos genes da CPX e da OPB com os *primers* para clonagem no vetor pSecTag2-A é mostrado na figura 6. Como se pode observar na figura 5B, o gene da OPB não foi amplificado em uma primeira tentativa. Apostamos em estratégias como baixar a temperatura de ligação com os oligonucleotídeos ou aumentar a concentração de magnésio na reação. Outra estratégia utilizada, baseada no trabalho de Guedes et al. 2008, foi

adicionar DMSO (5% e 10%) no meio reacional da PCR. Nenhuma destas alterações melhorou a amplificação do gene da OPB com os mesmos oligonucleotídeos.

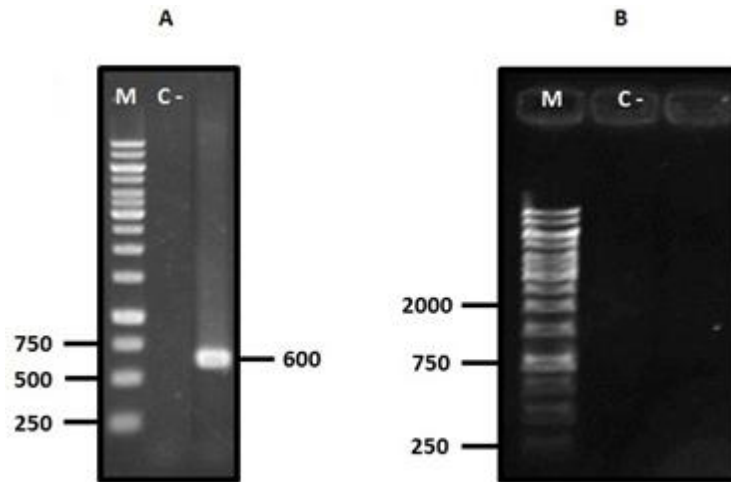


Figura 6. Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. A: fragmento da amplificação do gene CPX com 600 pb. B: nenhuma banda visível na altura 2196 pb, correspondente ao gene da OPB. M= marcador de peso molecular em pares de bases. C- = controle negativo.

Analizamos o *website* do grupo do pesquisador Dr. Fernando Real da UNIFESP, em parceria com pesquisadores da UNICAMP e da LNBio, onde se encontra depositado o genoma completo de *L. (L.) amazonensis* (<http://bioinfo08.ibi.unicamp.br/leishmania/>). Para nossa surpresa, quatro nucleotídeos diferiram em relação à sequência depositada no GenBank, justamente na região utilizada para a construção dos oligonucleotídeos (três nucleotídeos diferentes em um *primer*, um no outro - letras marcadas em vermelho na Tabela 1, Materiais e métodos). Uma nova remessa de oligonucleotídeos foi encomendada baseada nessa sequência e a amplificação foi satisfatória, conforme podemos observar na figura 7.

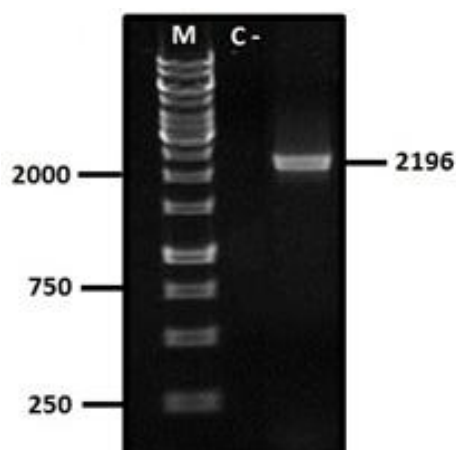


Figura 7. Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. Fragmento da amplificação do gene OPB (2196 pb). M= marcador de peso molecular em pares de bases. C- = controle negativo.

Após amplificação, os fragmentos foram excisados do gel de agarose, purificados e posteriormente inseridos no vetor de clonagem pJET ou pGEM-T Easy. A partir da clonagem dos genes de interesse inseridos nesses vetores, demos seguimento às clonagens nos vetores de expressão utilizando enzimas de restrição para as duplas digestões dos vetores e insertos. Somente prosseguimos com as reações de ligação após a visualização em gel de agarose de digestões completas tanto do vetor (padrão de banda única) como do inserto (duas bandas correspondentes ao tamanho do gene e do vetor pJET ou pGEM-T Easy linearizados). Utilizamos a enzima T4 Ligase da empresa New England Biolabs (MA, USA) após algumas tentativas mal sucedidas com a enzima T4 Ligase da empresa Invitrogen. Utilizamos a proporção molar 1:3 vetor:inserto e para controle da transformação utilizamos um vetor fechado de concentração conhecida (para cálculo de eficiência da bactéria competente) e também uma reação de ligação apenas com o vetor digerido (para observar se haveria religação). Realizamos PCR de cinco colônias de cada placa (uma placa por ligação), isolamos o DNA plasmidial de uma colônia positiva e digerimos com as devidas enzimas de restrição para confirmação dos clones (Figura 8).

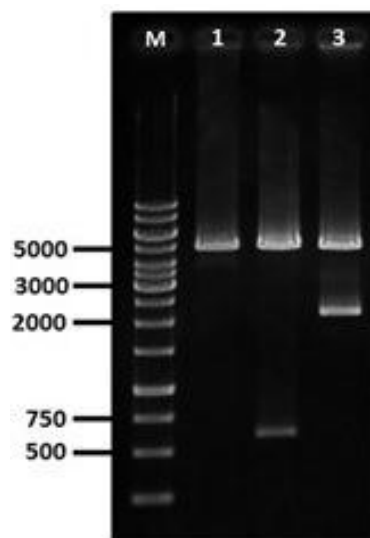


Figura 8. Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. 1: vetor pSecTag2-A vazio. 2: pSecTag2-A::CPX digerido com Hind III e Xho I. 3: pSecTag2-A::OPB digerido com Kpn I e Xho I. M= marcador de peso molecular em pares de bases.

Como discutiremos adiante, o rendimento da produção de proteínas recombinantes em sistema de expressão HEK293T é baixo quando comparado ao tradicional sistema de indução em *E. coli*. Um experimento piloto demonstrou que ambas as proteínas foram expressas em baixa quantidade em células HEK293T. Tínhamos em mãos os resultados da caracterização dos parasitas transfectados com CPX e com OPB, os últimos não apresentavam maior expressão para o gene da OPB. Na ausência de um superexpressor, optamos por produzir a proteína OPB recombinante em sistema livre de LPS para ser utilizada como estímulo solúvel em macrófagos. Para isso, utilizamos a construção pSecTag2-A::OPB, mostrada na figura 8. A produção da proteína CPX foi realizada em sistema bacteriano, utilizando como vetor intermediário pGEM-T *Easy* e vetor de expressão pQE-30, de maneira semelhante à clonagem em vetor de expressão em mamíferos. O fragmento de PCR com os oligonucleotídeos contendo os sítios de restrição para a clonagem em pQE-30 e a digestão da construção podem ser visualizados na Figura 9.

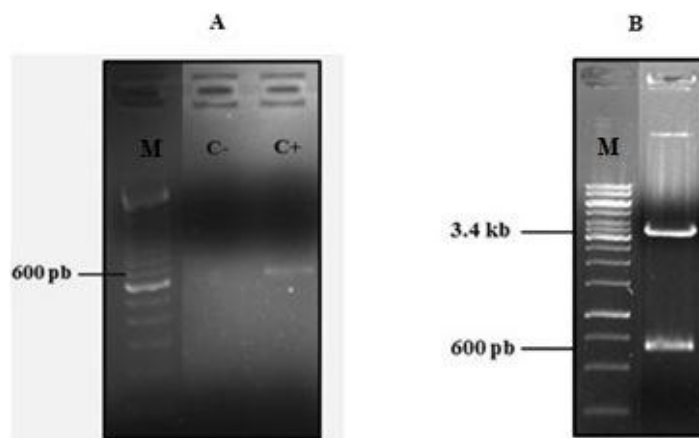


Figura 9. Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. A: fragmento da amplificação do gene CPX com 600 pb (C- = controle negativo. C+ = fragmento de PCR.). B: pQE-30::CPX digerido com Hind III. M = marcador de peso molecular.

5.3 Clonagem no vetor de transfecção de *Leishmania*: pSp

A princípio utilizaríamos o vetor pXG1 para a superexpressão em *Leishmania*, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Silvia Uliana. O *polylinker* deste vetor é restrito e a única

enzima utilizável, levando em consideração a sequência dos genes, é a *SmaI* que gera extremidades não coesivas após clivagem. Além disso, o vetor pXG1 contém 6821 pb, tamanho relativamente grande, outro fator que dificulta a ligação inserto/vetor. Após algumas tentativas de clonagem sem sucesso no pXG1, o vetor pSp (Figura 10) nos foi gentilmente cedido pelo Dr. Adriano Coelho. Este vetor conta com dois *polylinkers* com sítios compatíveis com os genes que seriam clonados e região intergênica da alfa-tubulina de *Leishmania*, que se sabe funcionar bem para expressão da referida proteína.

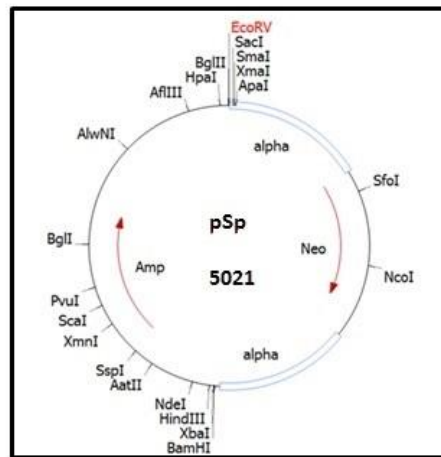


Figura 10. Mapa do vetor de transfecção em *Leishmania* pSp utilizado na obtenção de linhagens superexpressoras.

As construções foram confirmadas por digestão com as respectivas enzimas de restrição (Figura 11).

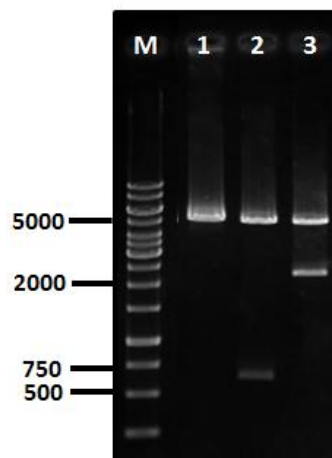


Figura 11. Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. 1: vetor pSp vazio digerido. 2: pSp::CPX digerido com Xba I e Hind III. 3: pSp::OPB digerido com Sma I e Sac I. M= marcador de peso molecular em pares de bases.

5.4 Superexpressão de CPX e OPB em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa M2269

Primeiramente realizamos a transfecção em promastigotas da cepa LV79. De acordo com a literatura, a concentração de G418 para seleção de parasitas transfectados varia entre 12-32 $\mu\text{g/mL}$, dependendo da espécie de *Leishmania*. Ao contrário do que esperávamos o parasita controle que não recebeu o plasmídeo continuava viável na concentração de 24 $\mu\text{g/mL}$ de G418. Ao atingirmos a concentração de 48 $\mu\text{g/mL}$ de G418 e não observarmos morte do parasita controle (sem plasmídeo) suspeitamos de resistência da cepa ao antibiótico. Realizamos um experimento de viabilidade celular utilizando o ensaio de redução do MTT com as três cepas existentes em nosso laboratório: LV79, M2269 e PH8, na presença de diferentes concentrações de G418. Observamos que parasitas da cepa LV79 resistiram a concentrações muito elevadas de antibiótico (100 $\mu\text{g/mL}$), enquanto as demais cepas mostraram-se sensíveis a baixas concentrações (6,25 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 12).

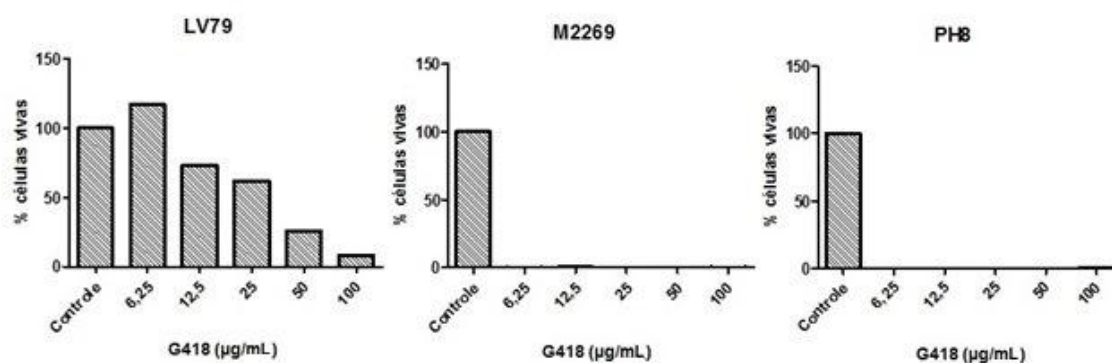


Figura 12. Viabilidade celular (% em relação ao controle) determinada por MTT de promastigotas das cepas LV79, M2269 e PH8 de *L. (L.) amazonensis* frente a diferentes concentrações de G418.

Investigamos se a resistência da cepa LV79 seria devido à presença do gene Neomycin fosfotransferase, provavelmente por contaminação com cepas mutantes que mantemos no laboratório (contendo o plasmídeo pXG1 e derivados). Para isso, utilizamos DNA total das três cepas e *primers* específicos para o gene que confere resistência à neomicina/G418

(*Neomycin fosfotranferase*) (Tabela 1). Como controle positivo, utilizamos um gDNA de *L. (L.) donovani* que possui integrado o gene neomicina fosfotransferase em seu genoma, gerando um produto de amplificação de 818 pb. Como podemos observar na figura 13, a cepa LV79, mas não as cepas M2269 e PH8, possui o gene de resistência ao G418 (provavelmente na forma episossomal, proveniente de contaminação com o plasmídeo pXG1).

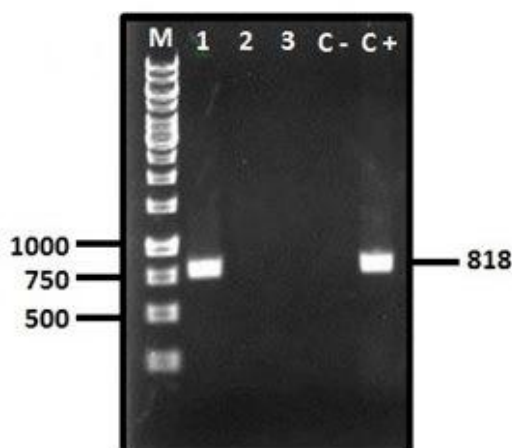


Figura 13. Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. 1: gDNA da cepa LV79 (banda referente à amplificação do gene *Neomycin fosfotranferase*). 2: gDNA da cepa M2269. 3: gDNA da cepa PH8. C- = Controle negativo. C+ = Controle positivo. M= marcador de peso molecular em pares de bases.

Optamos então por fazer uma nova transfecção utilizando a cepa M2269. Um primeiro experimento nesta cepa utilizando uma concentração inicial de 12 $\mu\text{g/mL}$ de G418 para seleção dos parasitos resistentes não foi bem sucedido: apesar das células estarem viáveis após a eletroporação (visualização microscópica), não houve multiplicação celular. Realizamos uma nova transfecção e seleção utilizando paramomicina como droga inicial, nas concentrações de 800 $\mu\text{g/mL}$ e 1600 $\mu\text{g/mL}$ em ambas as culturas até atingirem a fase estacionária de crescimento. Utilizamos a cultura de maior concentração de paramomicina para realizar dois repiques: um mantendo a concentração de paramomicina e outro com 12 $\mu\text{g/mL}$ de G418, que atingiu a fase estacionária de crescimento. Aumentamos a concentração de G418 gradualmente até 32 $\mu\text{g/mL}$ e assim mantivemos os parasitas superexpressores de OPB e de CPX e os portadores do vetor pSp.

Realizamos *Western blot* (WB) para comparar a expressão de CPX ou OPB em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* transfectadas com o vetor pSp vazio ou com as

construções pSp::CPX ou pSp::OPB. Utilizamos 20 μ g de extrato protéico solúvel e anticorpos secundários conjugados com peroxidase (HRP), como descrito. Os resultados são mostrados na Figura 14.

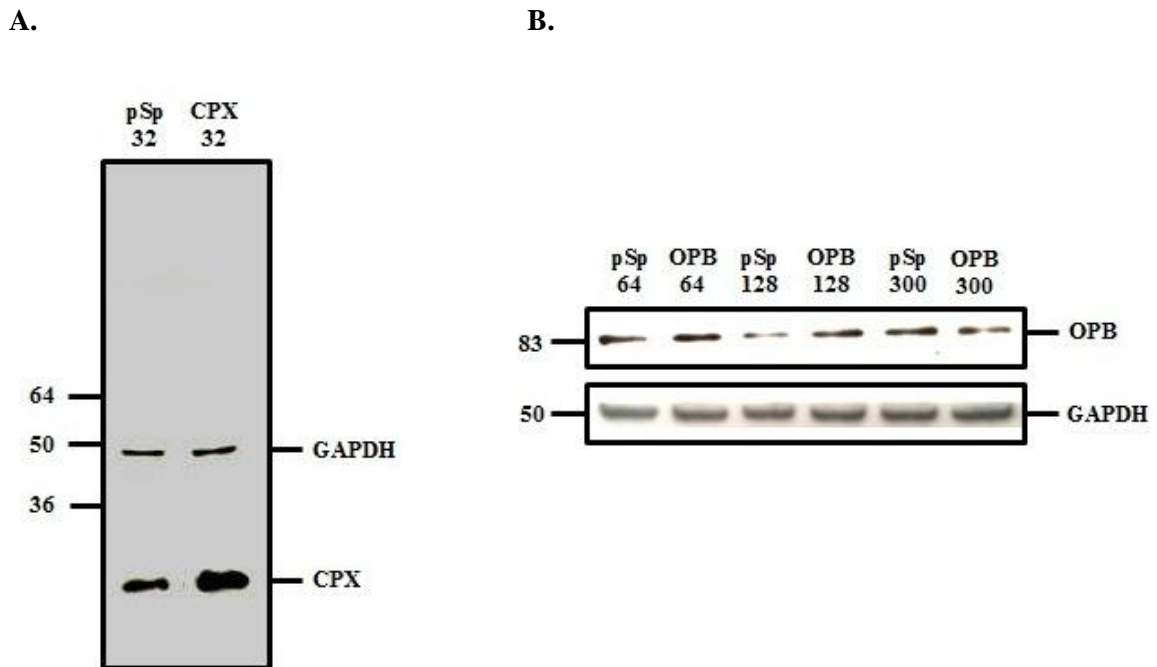


Figura 14. *Western Blot* para avaliar a expressão de CPX e GAPDH (A) e OPB e GAPDH (B) em extratos protéicos solúveis de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa M2269 transfectadas com o vetor pSp vazio (controle), pSp::CPX ou pSp::OPB. A numeração acima de cada canaleta refere-se à concentração de antibiótico G418 (em μ g/mL) adicionado à cultura.

A análise do WB nos permite concluir que somente os transfectantes que receberam o plasmídeo contendo o gene da CPX foram capazes de superexpressar de forma visível e quantificável a proteína (Figura 14-A), de maneira reprodutível em três experimentos independentes. Esses superexpressores apresentam o dobro de expressão de CPX do que os transfectantes portadores de pSp. Os transfectantes que receberam o gene da OPB não mostraram superexpressão mesmo após pressão seletiva com o antibiótico G418 até a concentração de 300 μ g/mL. Essa estratégia foi adotada por se tratar de uma forma episomal de transfecção. Sendo assim, o número de cópias do plasmídeo circular que cada promastigota recebe pode variar. A ideia seria selecionar possíveis células que receberam mais que uma cópia na transfecção e que poderiam apresentar uma superexpressão mascarada por uma grande população que recebeu somente uma cópia.

Após o exame de qualificação, foi sugerido que as linhagens dos transfectantes, até então heterogêneas, fossem clonadas em placas de meio 199-ágar. Cinco clones de cada linhagem foram escolhidos (inclusive do controle contendo o vetor vazio) e testados quanto à capacidade de superexpressão. Não houve diferenças nos níveis de CPX entre os clones e entre eles e a respectiva linhagem original, mas da mesma forma escolhemos um clone dentre os testados para manutenção de uma cultura homogênea em relação ao número de cópias de plasmídeo recebido por células após transfecção.

Após a clonagem dos parasitas portadores de pSp::OPB aplicamos novamente a pressão seletiva com G418. Ainda assim observamos que nenhum clone apresentou superexpressão estável e reprodutível de OPB em mais de um experimento independente. O plasmídeo foi eficiente para promover a superexpressão em *L. (L.) amazonensis*, sugerindo que alguma regulação do protozoário específica para a proteína OPB não permita a superexpressão. Não há artigos publicados mostrando o efeito da superexpressão dessa peptidase em nenhuma espécie de *Leishmania*. Para garantir que o parasita transfectado portava o vetor pSp::OPB e que não houve uma contaminação entre as culturas realizamos PCR utilizando *primer* F da alphasubulina (região contida no vetor pSp) e *primer* R do gene OPB nos DNA totais obtidos das culturas transfectadas com o vetor pSp vazio e com a construção contendo o gene da OPB. Essa amplificação deveria gerar um fragmento de aproximadamente 3 kb somente na construção contendo o gene OPB. Como controles, utilizamos os vetores originais pSp e pSp::OPB como *template* para o mesmo par de *primers*. Além disso, amplificamos a partir da construção pSp::OPB o gene da OPB (*primers* F e R para OPB, gerando um fragmento de 2196 pb) e o gene da alphasubulina (*primers* F e R para alphasubulina, gerando um fragmento de ~800 pb) (Figura 15). Como controle negativo, utilizamos o mix para PCR com H₂O.

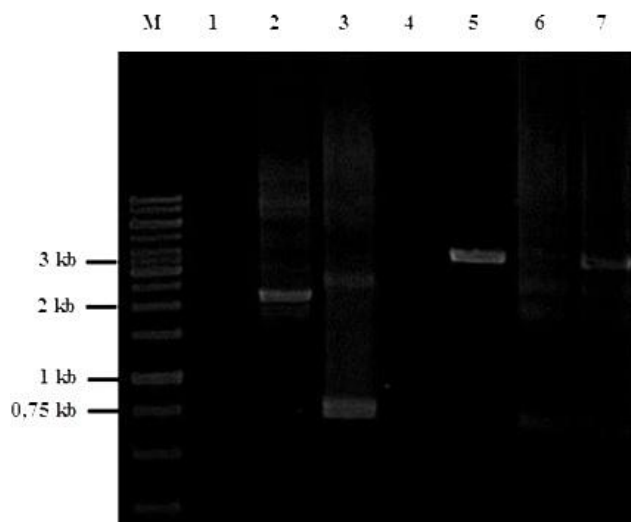


Figura 15. Visualização por luz ultravioleta de eletroforese em gel de agarose 1% com DNA marcado com brometo de etídeo. 1: Controle negativo para a amplificação de alphetubulina-OPB. 2: fragmento OPB (de pSp::OPB). 3: fragmento alphetubulina (de pSp::OPB). Amplificação de alphetubulina-OPB tendo como *templates* das PCRs: 4: vetor pSp. 5: vetor da construção pSp::OPB 6: DNA de promastigotas transfectadas com vetor pSp vazio. 7: DNA de promastigotas transfectadas com vetor pSp::OPB. M = marcador de peso molecular.

Conforme observamos no gel de agarose, somente o DNA da construção pSp:OPB apresenta a amplificação na altura aproximada de 3 kb e não é possível a visualização de nenhuma banda nessa altura quando o DNA dos transfectantes de pSp vazio é utilizado como *template*, demonstrando que mesmo com o gene exógeno, o parasita não foi capaz de apresentar uma superexpressão através de WB.

Selecionados os clones superexpressor de CPX e controle, realizamos a curva de crescimento de todos os promastigotas transfectados, que demonstrou que o padrão de crescimento dos parasitas transfectados é semelhante e que o dia 4 pode ser considerado o início da fase estacionária para as duas linhagens (Figura 16), possibilitando a realização dos experimentos posteriores de resistência aos estresses oxidativos e infectividade *in vitro* e *in vivo*.

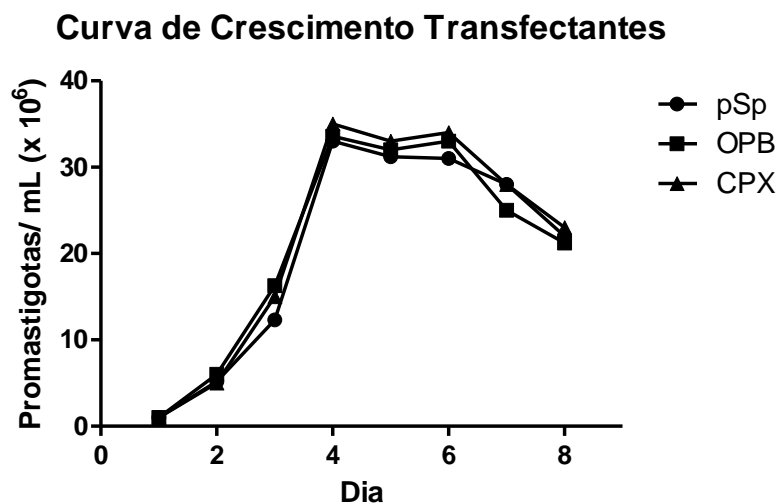


Figura 16. Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* transfectantes cultivadas em meio 199 completo durante oito dias.

Com base nesses resultados, seguimos com os experimentos de infecção *in vitro* e *in vivo* utilizando apenas os transfectantes da CPX, como será mostrado adiante. Para análise da possível influência da OPB na modulação da infecção *in vitro* utilizamos o estímulo com a proteína recombinante solúvel em sistema livre de LPS.

5.5 Obtenção da proteína recombinante OPB em sistema de expressão HEK293T

Um experimento piloto de transfecção (10 placas) de células HEK293T foi realizado e constatamos que CPX e OPB eram expressas por esse sistema. Observamos baixo rendimento na produção das proteínas recombinantes quando comparado, por exemplo, ao sistema de indução em *E. coli*. Assim, utilizamos 20 placas de células que foram transfectadas com o vetor de expressão em células de mamíferos pSecTag2-A contendo o gene da *OPB*. Como no experimento piloto havíamos observado que além de baixo rendimento havia outras proteínas provenientes de HEK293T (que têm afinidade pela coluna de níquel ou pela própria OPB) no SDS-PAGE, utilizamos o sobrenadante de 20 placas de HEK293T que sofreram o mesmo processo de transfecção e purificação como controle negativo para o WB e como controle de estímulo da infecção *in vitro*. Conforme observamos no SDS-PAGE da figura 17, os eluatos de HEK293T controle e transfectada com plasmídeo contendo OPB são muito semelhantes, mas o *Western blot* indica que a proteína OPB apresenta o tamanho correto (mesma altura do controle positivo, um extrato solúvel de promastigotas em fase *Log* de crescimento) e, como esperado, o controle negativo (eluato de HEK293T) não teve marcação. Cada canaleta recebeu 10 μ L de eluato concentrado, que corresponde a 30 μ g totais de proteína. Entre 50 kDa e 64 kDa do SDS-PAGE observa-se uma banda intensa, possivelmente BSA contido no SFB utilizado para suplementar o meio de cultura.

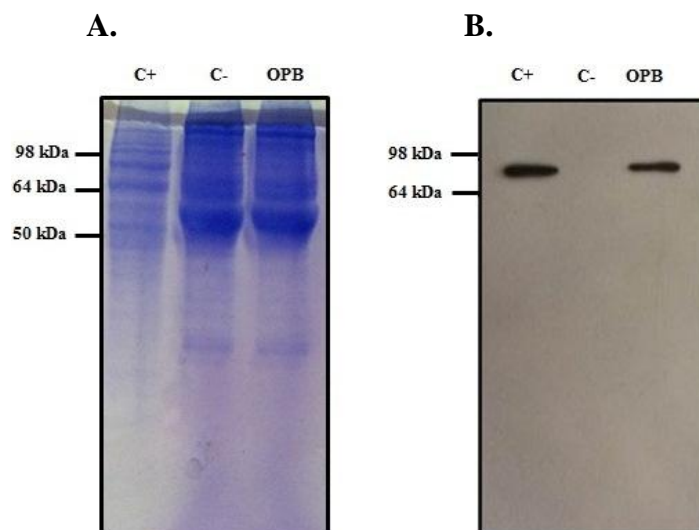


Figura 17. Análise da produção de OPB em sistema HEK293T. A: SDS-PAGE 12%. B: *Western Blot* para OPB. C+ = controle positivo (extrato solúvel de promastigota de *L. (L.) amazonensis*). C- = controle negativo (eluato de sobrenadante de HEK293T não transfectada). OPB = eluato de sobrenadante de HEK293T transfectado com construção pSecTag2-A::OPB.

5.6 Análise da funcionalidade da OPB recombinante: atividade peptidase (*tripsina-like*) e seu efeito na infecção por *L. (L.) amazonensis in vitro*

Para confirmar se a OPB presente no eluato estava funcional realizamos um ensaio enzimático capaz de detectar a atividade peptidase do tipo tripsina (*tripsina-like*), nas frações purificadas dos sobrenadantes de HEK293T transfectadas ou não com a construção pSecTag2-A::OPB. Foi utilizado um substrato comercial que contém duas argininas ligadas a um fluoróforo e a uma molécula estabilizadora (Z-Arg-Arg-AMC), pelo qual se sabe que a OPB tem alta afinidade catalítica (McLuskey et al., 2010). A clivagem entre as argininas libera a fluorescência, captada pelo fluorímetro de placas em um intervalo de tempo e os resultados foram expressos em fluorescência relativa (todas as leituras foram divididas pela respectiva absorbância inicial. Um primeiro experimento utilizando 50, 25 e 10 μL dos eluatos indicou que a atividade peptidase estava saturada, mas demonstrou atividade peptidase somente na eluição das células transfectadas com o gene da OPB (dados não mostrados). Realizamos um segundo experimento com 10, 5, 1 e 0,5 μL de eluato, que mostrou atividade dose resposta nos eluatos contendo OPB (Figura 18). O maior volume (correspondente a 30 μg totais de proteína) foi escolhido para estimular os macrófagos durante a infecção *in vitro* pela cepa selvagem M2269.

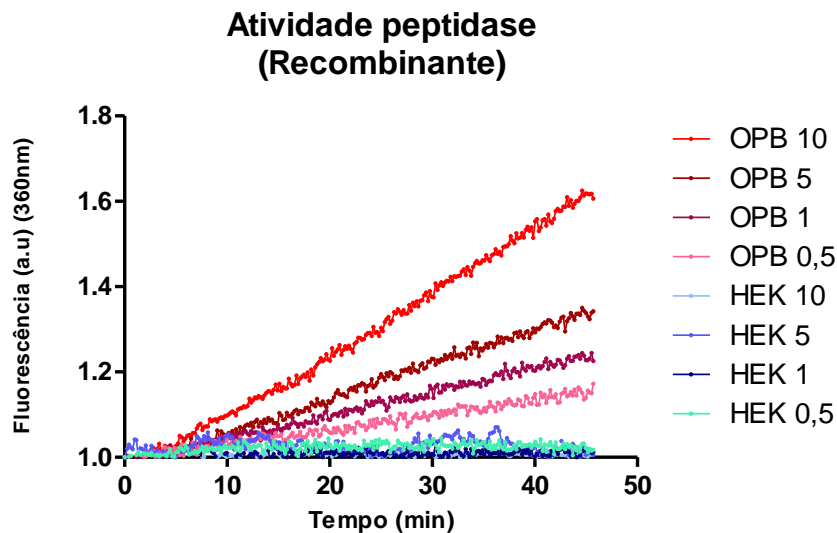
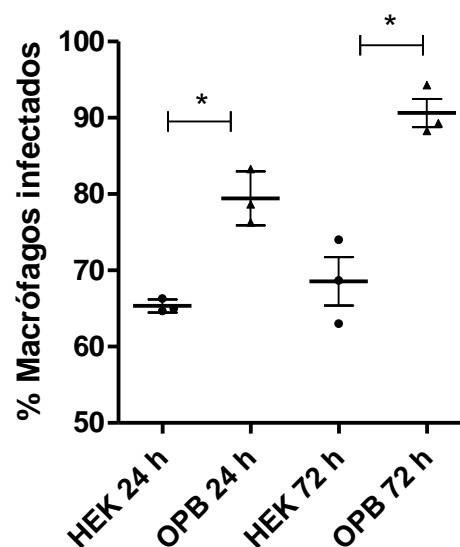


Figura 18. Atividade peptidase do tipo tripsina do eluato de células HEK293T transfectadas com OPB de *L. (L.) amazonensis* em comparação ao eluato controle. A numeração da legenda representa o volume de eluato utilizado, em μL .

Após a constatação da funcionalidade da proteína recombinante presente no eluato partimos para a execução dos experimentos *in vitro* de infecção em macrófagos de BALB/c. O baixo rendimento na produção da proteína OPB em células HEK limitou a massa disponível para análise da infecção em diferentes tempos. Considerando que em várias espécies de *Leishmania* a OPB é mais expressa em amastigotas do que em promastigotas e que em infecções por *L. (L.) donovani* essa enzima pode clivar enolase, reduzindo a ativação de macrófagos e permitindo proliferação do parasita (Swenerton et al., 2011), optamos por analisar um momento mais precoce da infecção e um relativamente tardio: 24 e 72 horas. Após as duas horas de aderência dos macrófagos, o meio foi substituído por meio contendo a proteína recombinante ou controle, possibilitando contato prévio da OPB com o macrófago antes da infecção. Em todas as trocas de meio a OPB foi repostada para que estivesse presente durante toda a infecção. Observamos que a OPB na concentração utilizada não foi tóxica ao macrófago não infectado, que se manteve morfológicamente intacto (dados não mostrados). A figura 19 representa a média de três experimentos independentes, realizados com triplicata técnica para cada condição, de infecção com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* cepa M2269 na presença de OPB eluato de células HEK293T contendo OPB solúvel ou eluato controle nos dois tempos.



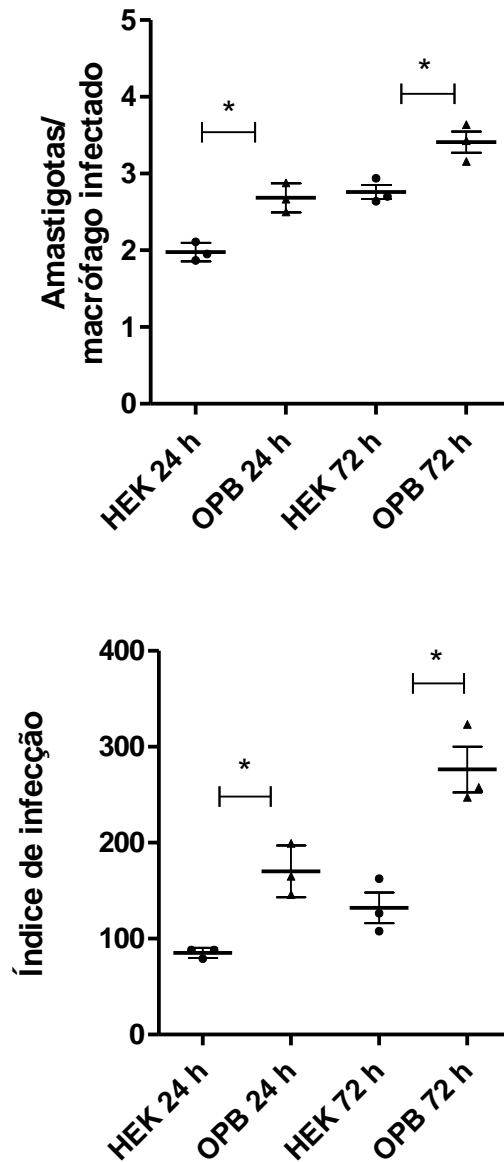


Figura 19. Infecção de macrófagos peritoneais de BALB/c com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* estimulados com eluato de HEK293T transfectada com OPB (OPB) ou eluato controle (HEK) por 24 ou 72 horas. Porcentagem de macrófagos infectados (acima), amastigotas por macrófago infectado (meio) e índice de infecção (abaixo). Resultado de três experimentos com triplicatas técnicas. Análise estatística ANOVA. *: $p \leq 0,05$.

Para os dois tempos e em todos os parâmetros é possível observar um aumento estatisticamente significativo na infecção na presença do eluato contendo a OPBr solúvel quando comparada à infecção na presença de sobrenadante purificado de células HEK283T. Ao avaliarmos a taxa de multiplicação (razão entre número de amastigotas por macrófago nos tempos de 72 e 24 horas de cada condição), observamos que não há diferença significativa no

crescimento intracelular do parasita (dados não mostrados), sugerindo que a OPB atua na entrada da promastigota no macrófago ou possui influência no estabelecimento da infecção nas primeiras 24 horas, em concordância com possíveis mecanismos de ação dessa proteína na infecção descritos na literatura. Nossos resultados corroboram o trabalho que demonstrou que promastigotas de *L. (L.) major* deficientes em OPB apresentam uma menor infectividade *in vitro* (Munday et al., 2011). Não há trabalhos demonstrando a caracterização de linhagens superexpressoras dessa proteína, tampouco da infecção *in vitro* estimulada com a proteína recombinante para nenhuma espécie de *Leishmania*.

5.7 Obtenção da proteína recombinante CPX em sistema de expressão bacteriano

Uma colaboração com o grupo do Dr Carlos Robello (*Institut Pasteur* de Montevideo) nos permitiu avaliar a atividade da CPX de *L. (L.) amazonensis*. Para isso, produzimos a proteína recombinante em sistema bacteriano, de alto rendimento. Depois de sequenciada, a construção pQE-30::CPX (descrita no item 5.2) foi introduzida por eletroporação em uma cepa de *E. coli* denominada M15, que contém um plasmídeo exógeno pREP4, que confere resistência à kanamicina e expressa de maneira constitutiva o repressor *lac*, sendo mais eficiente para indução da expressão da proteína (por não existir indução basal). A indução foi realizada de forma lenta (0,5 mM final de IPTG a 30 °C), de acordo com o protocolo utilizado para a CPX de *T. cruzi*, produzida de forma rotineira pelos pesquisadores no *Institut Pasteur*. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e as frações visualizadas em SDS-PAGE 12% (Figura 20). Observa-se que o protocolo funcionou de maneira bastante eficiente para a proteína de *L. (L.) amazonensis*. Um pequeno volume de cultura (50 mL) foi suficiente para produzir massa de proteína suficiente para posteriores ensaios de atividade.

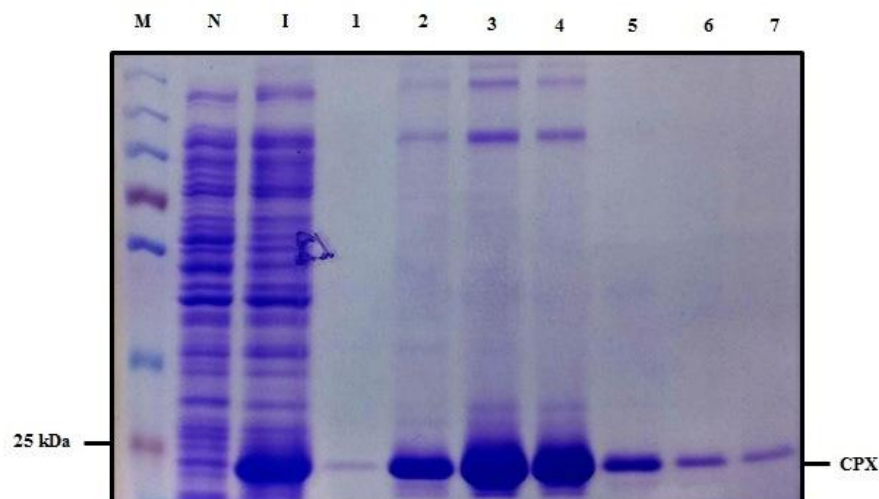
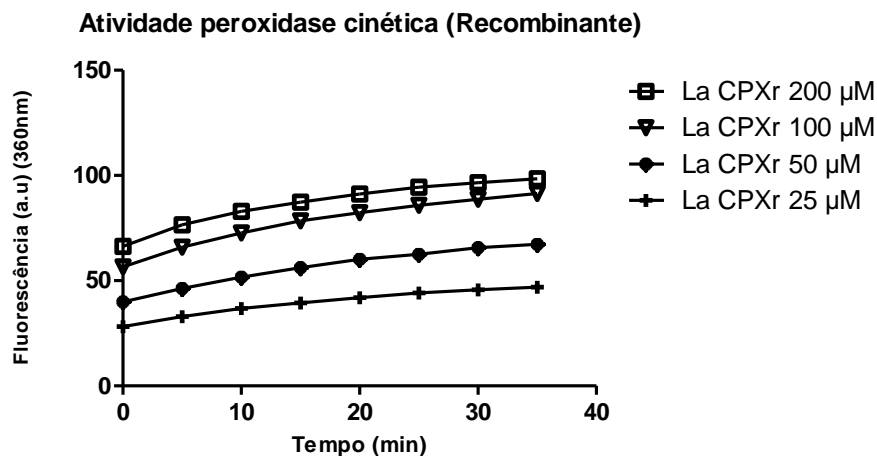


Figura 20. SDS-PAGE 12% da CPX produzida em sistema bacteriano. M = marcador. N = controle não induzido. I = controle induzido com IPTG. 1 a 7 = frações purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

5.8 Análise da funcionalidade da CPX recombinante: atividade peroxidase

Para verificar se a proteína recombinante purificada havia sido produzida de forma funcional, realizamos um ensaio de atividade peroxidase. O reativo *10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine* tem a capacidade de detectar atividade peroxidase pela formação de um produto fluorescente na presença de H_2O_2 . A medida de atividade é dada em unidade de fluorescência ou em mili unidades de HRP (*horseradish peroxidase*) quando os valores são extrapolados na curva de calibração. As molaridades da proteína recombinante (200, 100, 50 e 25 μM , Figura 21) foram baseadas nos ensaios feitos com *T. cruzi*.

A.



B.

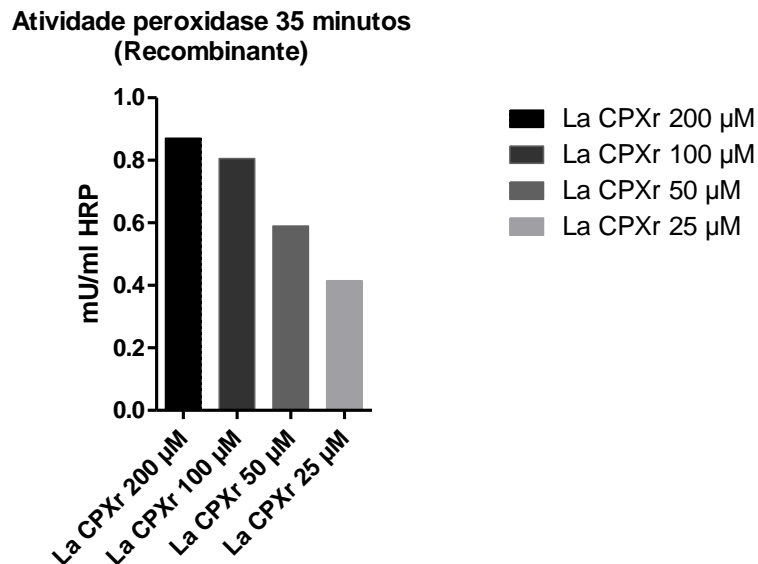


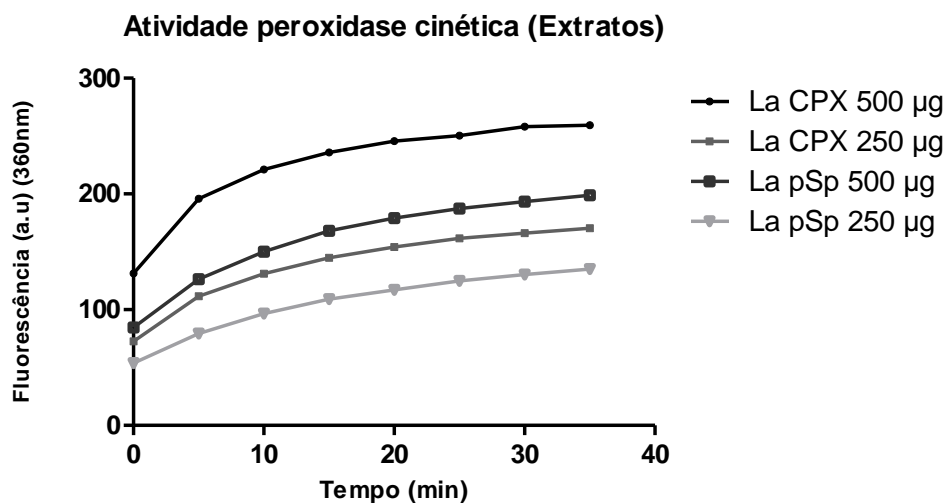
Figura 21. Atividade peroxidase da proteína recombinante purificada (CPXr). Cinética da atividade ao longo de 35 minutos (A). Atividade peroxidase em mU/mL HRP ao tempo final de leitura (35 minutos) (B). Resultados de um experimento com duplicatas técnicas.

A proteína recombinante mostrou atividade peroxidase dose dependente nas diferentes molaridades, provando que foi produzida em sua conformação funcional. Com esses dados mostramos de forma direta que o gene de CPX de *L.amazonensis* codifica para uma enzima com atividade peroxidase.

5.9 Caracterização funcional dos parasitas superexpressores de CPX: atividade peroxidase, resistência a H_2O_2 e peroxinitrito e efeito na infecção *in vitro*

De forma semelhante à análise funcional da proteína CPX recombinante, analisamos a atividade peroxidase nos extratos solúveis de parasitas transfectados com a construção para superexpressão de CPX e com plasmídeo controle. As massas selecionadas para esse ensaio (500 e 250 μ g) também foram baseadas em ensaios prévios com *T.cruzi*. Os resultados são apresentados na figura 22, que corresponde a um experimento representativo de dois experimentos independentes, com extratos solúveis obtidos de diferentes passagens, que mantiveram o mesmo padrão.

A.



B.

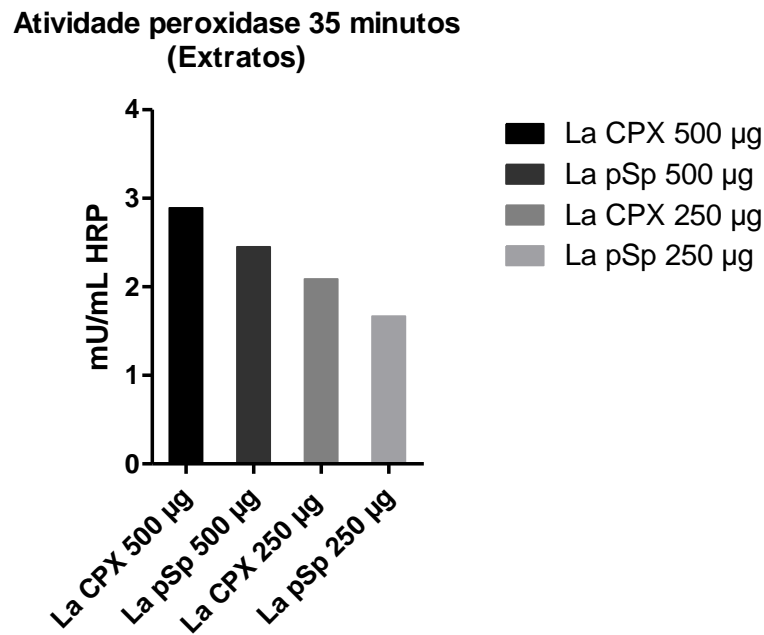


Figura 22. Atividade peroxidase dos extratos do parasita superexpressor (La CPX) e seu controle (La pSP). Cinética da atividade ao longo de 35 minutos (A). Atividade peroxidase em mU/mL HRP ao tempo final de leitura (35 minutos) (B). Experimento com duplicatas técnicas representativo de dois experimentos independentes.

Observa-se que os extratos dos parasitas superexpressores possuem maior atividade peroxidase em ambas as massas analisadas. Ao aplicar a solução contendo o substrato, rapidamente se notava a mudança de coloração, que era captada pelo fluorímetro. Por essa razão, dependendo do tempo para iniciar a captação havia variação no valor de fluorescência inicial, impossibilitando a plotagem de mais de um experimento em um mesmo gráfico. De qualquer forma, o perfil da atividade peroxidase do superexpressor e controle foi bastante semelhante entre os dois experimentos.

Considerando que os parasitas superexpressores apresentam maior atividade peroxidase, realizamos experimentos de resistência ao estresse oxidativo frente a H_2O_2 400 μM ou peroxinitrito 500 μM . Após uma curta exposição (30 minutos) a esses agentes, os parasitas foram centrifugados e lavados para retirada do estímulo e distribuídos em placas de 96 poços, em quadruplicada, por 48 e 72 horas, quando a absorbância 630 nm foi medida para inferência da viabilidade celular. Uma medida inicial de absorbância foi realizada logo após o plaqueamento (tempo zero) para certificação de que as densidades dos parasitas estavam

iguais nos superexpressores e controle. Nesse momento já era possível observar microscopicamente a diferença na viabilidade celular entre os parasitas superexpressores de CPX, mais móveis e morfologicamente normais, e dos parasitas controles, menos móveis e mais arredondados. A Figura 23 representa valores da média de três experimentos independentes para H_2O_2 e de um experimento para o peroxinitrito, pois a amostra cedida deste reagente altamente instável e não comercial não foi suficiente para repetições.

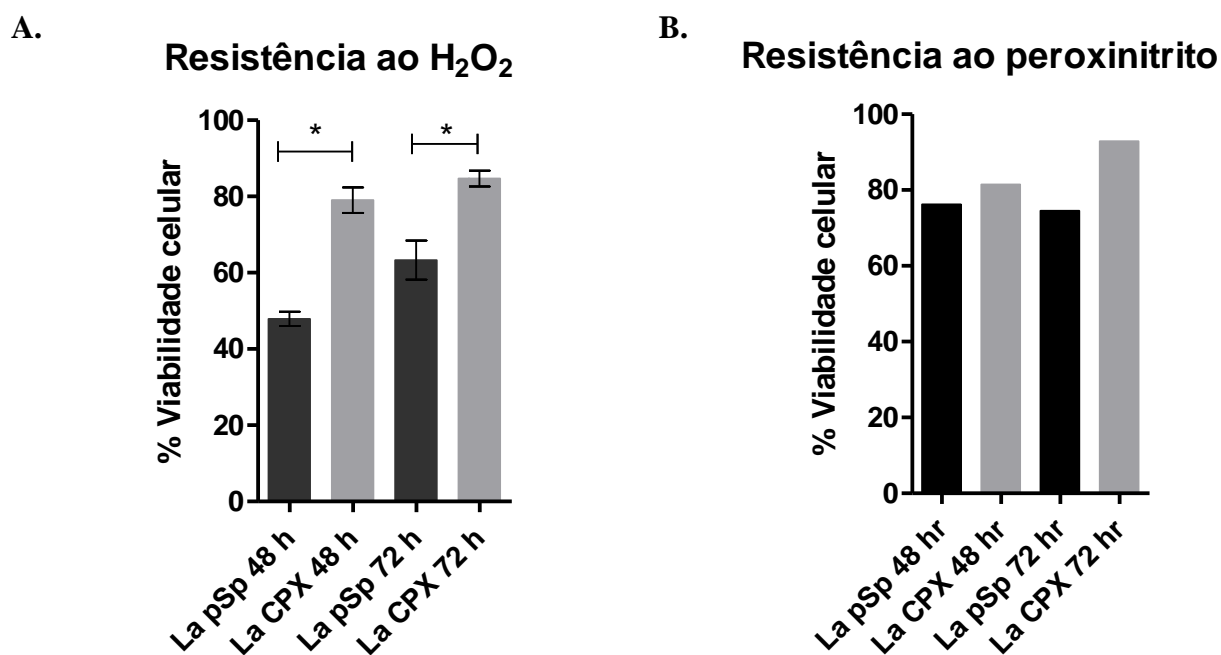


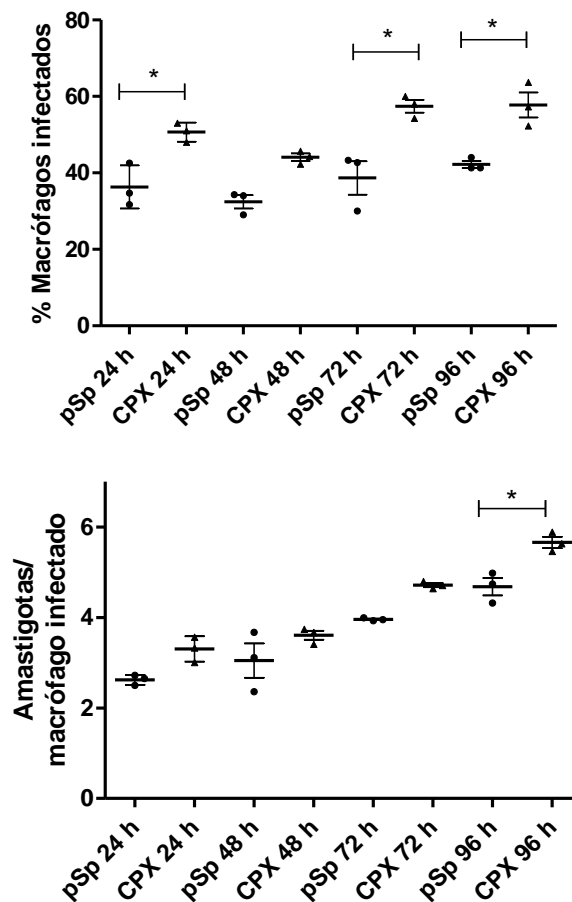
Figura 23. Porcentagem de viabilidade celular de parasitas superexpressores (La CPX) e seu respectivo controle (La pSp) estimulados com 400 μM de H_2O_2 (A, três experimentos) ou 500 μM de peroxinitrito (B, um experimento) por 30 minutos. Análise estatística ANOVA. *: $p \leq 0,05$

Observamos, como esperado, que os parasitas superexpressores são mais resistentes ao estresse oxidativo pelos agentes testados do que os parasitas controles. Para H_2O_2 , as viabilidades dos controles foram em média 47% e 63% e dos superexpressores 79% e 84%, em 48 e 72 horas, respectivamente. Para o peroxinitrito, 76% e 75% para os controles e dos superexpressores 81% e 92%, em 48 e 72 horas, respectivamente. A diferença neste caso foi menor, mas pode eventualmente conferir um aumento de sobrevivência importante no contexto da infecção. É válido ressaltar que o único trabalho com CPX na espécie *L. (L.) amazonensis*, de Lin et al., 2005, que demonstra maior resistência de transfectantes superexpressores de CPX para H_2O_2 e outros dois agentes oxidantes (diferentes de peroxinitrito), utiliza um método diferente, no qual os parasitas recebem uma baixa

concentração de agente oxidante (no caso do H_2O_2 , de 25 a 100 μM) por longo período (quatro dias). Nosso intuito foi avaliar a recuperação dos parasitas frente a uma alta concentração (400 μM para H_2O_2) dos agentes por curto período de estímulo (30 minutos).

Após a caracterização dos superexpressores quanto a sua resistência, partimos para a realização dos experimentos *in vitro*, com o intuito de relacionar a CPX à virulência de *Leishmania*. Infectamos então macrófagos peritoneais com promastigotas superexpressores que continham sabidamente o dobro da CPX do que os transfectados com plasmídeo pSp vazio.

Com base em trabalhos já publicados, sabemos que a CPX está relacionada ao aumento da resistência intracelular de tripanossomatídeos. Sendo assim, escolhemos analisar tempos mais longos (de 24 até 96 horas) para infecção envolvendo CPX. A Figura 24 representa a média de três experimentos independentes, realizados em triplicata técnica para cada condição, de infecção com promastigotas superexpressoras de CPX ou controle (pSp) em quatro tempos (24, 48, 72 e 96 horas de infecção). Foram analisados três parâmetros: porcentagem de macrófagos infectados, número de amastigotas por macrófago infectado e índice de infecção, que corresponde ao produto da proporção de macrófagos infectados pelo número de amastigotas contados.



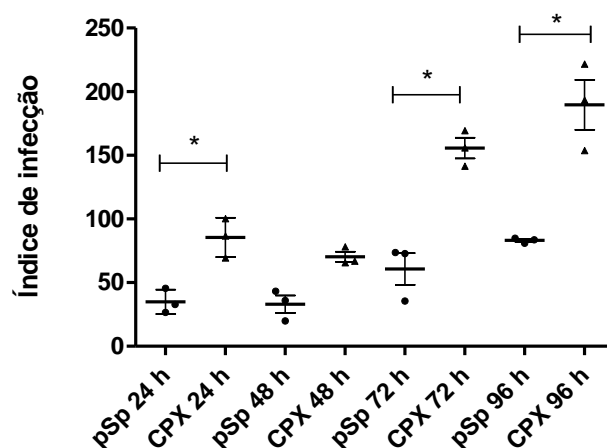
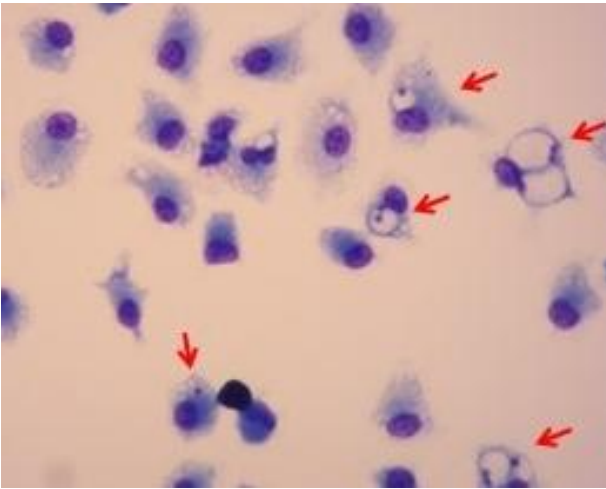


Figura 24. Infecção de macrófagos peritoneais de BALB/c com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* superexpressores de CPX ou controle por 24, 48, 72 ou 96 horas. Porcentagem de macrófagos infectados (acima), amastigotas por macrófago infectado (meio) e índice de infecção (abaixo). Análise estatística ANOVA. *: $p \leq 0,05$.

Para todos os tempos e em todos os parâmetros é possível observar um aumento de infecção da linhagem superexpressora em comparação ao controle. Para a porcentagem de macrófagos infectados e índice de infecção, as diferenças entre CPX e pSp só não foram significativas no tempo de 48 horas de infecção. Em relação ao número de amastigotas por macrófago infectado, percebemos a tendência ao aumento do número para os superexpressores em todos os tempos, porém somente no maior tempo de infecção temos um significado estatístico, corroborando a função já descrita da proteína, que favorece a sobrevivência intracelular do parasita. Acreditamos que o maior índice de infecção (que considera tanto macrófagos infectados quanto amastigotas) já nos tempos iniciais de infecção (24 horas) seja devido justamente a esse papel protetor da CPX, que permite a sobrevivência do parasita frente ao estresse oxidativo/nitrosativo gerado no fagolisossomo e não por um favorecimento da entrada na célula do hospedeiro. Na Figura 25 observamos a visível diferença entre parasita superexpressor e controle em termos da porcentagem de macrófagos infectados e número de amastigotas por macrófago infectado no tempo de 96 horas de infecção (figura representativa de três campos aleatórios).

A.



B.

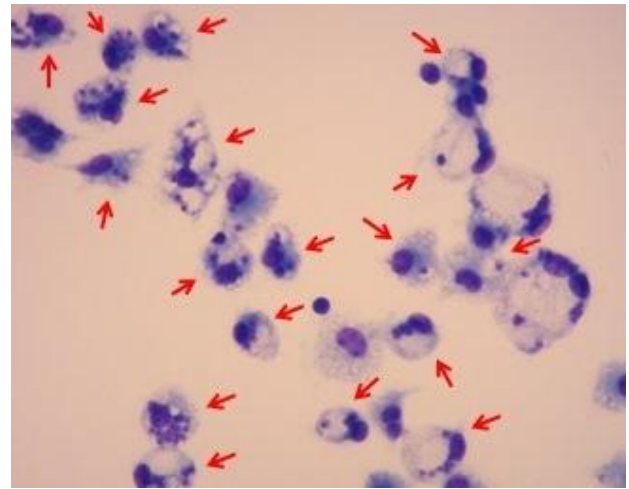


Figura 25. Imagens obtidas por microscopia de macrófagos peritoneais de BALB/c infectados por promastigotas da linhagem controle (A) ou da linhagem superexpressora de CPX (B) durante 96 horas. Coloração por Instant-Prov. As setas vermelhas indicam os macrófagos infectados. (Aumento de 1000x x)

É interessante observar que a porcentagem de macrófagos infectados difere entre linhagens transgênicas (aproximadamente 40% de macrófagos infectados pelos transfectantes em 72 horas de infecção) e linhagem selvagem (no experimento da Figura 19 observamos quase 70% de macrófagos infectados pelo controle em 72 horas de infecção). Podemos justificar a baixa infectividade dos transfectantes pelo fato de serem mantidos sobre pressão de uma droga leishmanicida (o gene da neomicina fosfotransferase confere resistência parcial, por isso observamos diferença no crescimento entre parasitas selvagens e transfectados) e principalmente por possuírem maior número de passagens do que as dos parasitas selvagens (que foram mantidos em cultura por no máximo seis passagens). Sabe-se que parasitas recém-isolados de animais são mais virulentos que parasitas mantidos em cultura por grandes períodos (e portando, sem pressão seletiva do hospedeiro). Interessantemente, um proteoma de *L. (L.) amazonensis* (Magalhães et al., 2014) demonstrou que a CPX endógena se reduz a menos da metade após 150 dias de cultivo. Realizamos um experimento comparando a infectividade da cepa M2269 recém-saída de camundongo BALB/c (P3 = passagem 3) e mais antigas (P12 = passagem 12) e observamos que a porcentagem de macrófagos infectados passou de 80% para 35% (Figura 26).

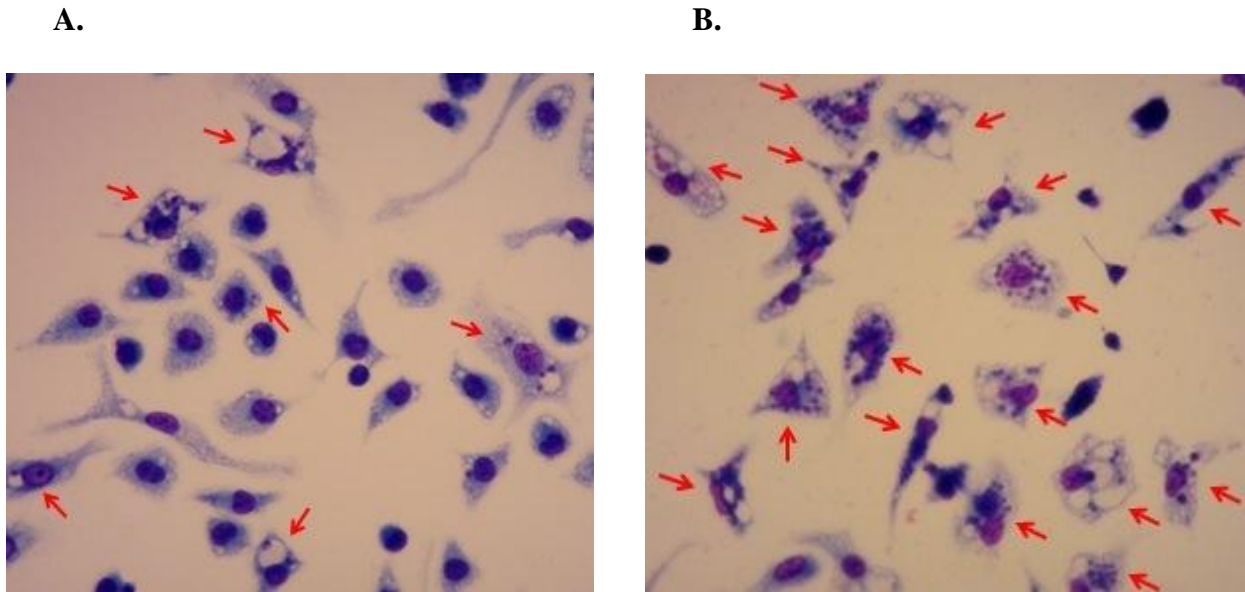


Figura 26. Imagens obtidas por microscopia de macrófagos peritoneais de BALB/c infectados com promastigotas selvagens da cepa M2269 de uma cultura com doze passagens (A) e uma cultura recém-iniciada com três passagens (B). Coloração por Instant-Prov. As setas vermelhas indicam os macrófagos infectados. (Aumento de 1000x)

Através de comunicação pessoal com os pesquisadores do *Institut Pasteur* sabemos que em *Trypanosoma cruzi* a expressão da forma mitocondrial da triparedoxina peroxidase se altera com a superexpressão da forma citoplasmática. Para verificar se isso também ocorria em *Leishmania* utilizamos um anticorpo específico contra a forma mitocondrial em extratos superexpressores de CPX e controle, mas não observamos diferença significativa de expressão (Figura 27). Dessa forma, o fenótipo de maior virulência e resistência oxidativa dos superexpressores deve-se ao aumento da CPX, sem relação com mudanças na MPX.

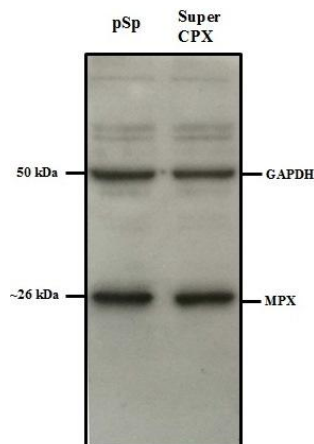


Figura 27. *Western Blot* para avaliar a expressão de MPX e GAPDH em extratos protéicos solúveis de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* superexpressora de CPX ou controle pSp.

5.10 CPX como marcador de virulência em *Leishmania*: relação entre expressão de CPX e virulência em diferentes comparações

Há diversos trabalhos descrevendo a CPX como marcador de virulência para tripanossomatídeos. Visando complementar essas informações para *Leishmania*, realizamos WB comparativos entre extratos solúveis de proteínas de promastigotas e amastigotas de um isolado de lesão cutânea localizada de *L.(L.) amazonensis* de um paciente da Bahia e de duas cepas com diferentes virulências: IMG3, cepa de *L. (V) guyanensis* capaz de estabelecer a infecção em camundongos C57BL/6, e M2903, cepa de de *L. (V.) braziliensis* que não gera lesões nesse animal (Figura 28).

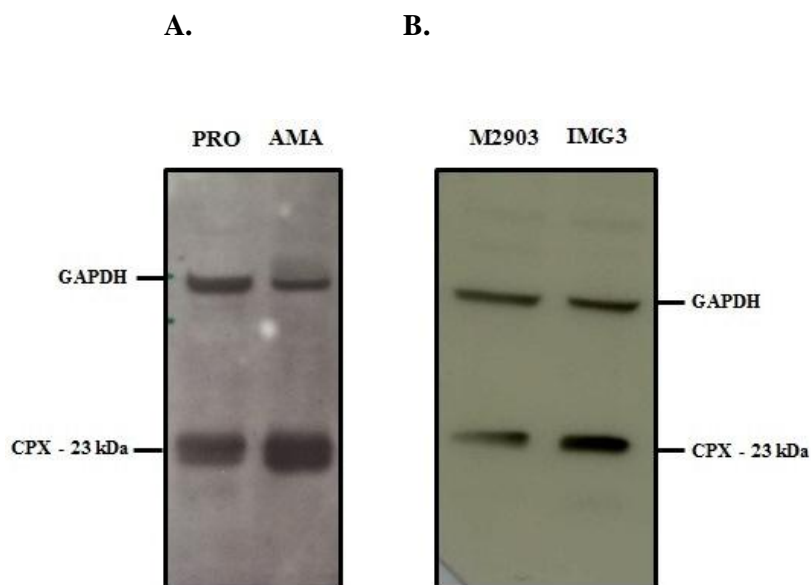


Figura 28. *Western Blot* comparando expressão de CPX em extratos solúveis de promastigotas (PRO) e amastigotas (AMA) de *L. (L.) amazonensis* isolado 69, Bahia (A) e promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (M2903) e *L. (V.) guyanensis* (IMG3) (B).

Conforme pode ser constatado visualmente, a análise da densitometria das bandas e normalização com GAPDH mostrou que a forma amastigota do isolado expressa cerca de três vezes mais CPX que a forma promastigota. A forma amastigota é mais adaptada a sobreviver

em macrófagos ativados do que a promastigota (Henard et al., 2014) e induz lesões maiores e mais precocemente em modelo murino (dados de outros projetos do nosso grupo). Esse estudo é o primeiro a analisar o efeito da CPX não truncada na infectividade por essa espécie de *Leishmania*. Curiosamente, uma isoforma truncada de CPX foi descrita recentemente também como preferencialmente expressa em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e sua superexpressão conferiu maior resistência a peroxinitrito e maior infectividade *in vitro* e *in vivo* (Henard et al., 2014).

Quando comparamos as duas cepas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* observamos que a cepa mais virulenta expressa cerca de o dobro de CPX quando comparada a menos virulenta. Já foi descrito que a superexpressão de CPX aumenta a resistência de *L. (V.) braziliensis* a peróxido de hidrogênio e antimônio (Andrade, Murta, 2014), mas a expressão de CPX nunca havia sido associada à infectividade nessas duas espécies de *Leishmania*.

5.11 BALB/c e C57BL/6 experimentalmente infectados com transfectantes CPX e pSp

Após caracterizar os superexpressores de CPX quanto à sua resistência a agentes oxidantes e à atividade peroxidase de seus extratos, realizamos um ensaio *in vivo* com grupos de cinco fêmeas BALB/c e C57BL/6, inoculando 2×10^6 promastigotas por pata dos superexpressores de CPX ou dos transfectantes com o vetor pSp vazio (controle). Infelizmente, a infecção com esse número de parasitas usualmente empregado em outros experimentos em nosso laboratório não promoveu crescimento de lesões nos camundongos experimentalmente infectados. Uma possibilidade é que as passagens dos transfectantes sejam muito altas e, conseqüentemente, os parasitas estejam menos virulentos. Novos experimentos de infecção *in vivo* deverão ser realizados com novos transfectantes e um número maior de parasitas.

Neste trabalho avaliamos o efeito da superexpressão de CPX e OPB ou da presença da proteína solúvel na infecção, dependendo da proteína. Embora as transfecções com os plasmídeos contendo CPX e OPB tenham sido bem sucedidas, observamos que:

- O superexpressor de CPX expressa ao menos o dobro de proteína, enquanto o transfectante OPB não superexpressa a proteína. Nesse último caso, especulamos que possa haver algum controle pós traducional que impeça a superexpressão de OPB, uma vez que o mesmo vetor foi eficaz para outra proteína na mesma espécie de *Leishmania* ou que o parasita superexpressa OPB em uma quantidade não detectável pelo WB.

Com base nos experimentos com superexpressores de CPX e com as proteínas recombinantes CPX e OPB, chegamos às seguintes conclusões:

- Os promastigotas superexpressores de CPX são mais resistentes ao H₂O₂ e ao peroxinitrito *in vitro* e apresentam maior atividade peroxidase quando comparados ao parasita controle.

- Os parasitas superexpressores de CPX tem maior infectividade em experimentos *in vitro* com macrófagos peritoneais obtidos de BALB/c;

- A proteína CPX produzida em bactéria possui conformação funcional, demonstrada pela atividade peroxidase em ensaios enzimáticos.

- Não observamos diferenças na expressão da triparedoxina mitocondrial quando a forma citoplasmática é superexpressa.

- Amastigotas do isolado 69, Bahia, expressam cerca de três vezes mais CPX do que promastigotas do mesmo isolado e a cepa M2903 de *L. (V.) braziliensis* (que não infecta experimentalmente camundongos) expressa cerca de metade de CPX quando comparada a cepa IMG3 de *L. (V.) guyanensis* (que infecta experimentalmente camundongos), demonstrando que a CPX pode ser considerada fator de virulência em *Leishmania*.

- A proteína OPB produzida em HEK293T possui conformação funcional, demonstrada pela atividade peptidase em ensaios enzimáticos.

- Parasitas selvagens cepa M2269 tem maior infectividade in vitro em macrófagos peritoneais de BALB/c expostos à proteína recombinante OPB solúvel previamente e durante a infecção.

REFERÊNCIAS¹

¹De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

- Agerberth, B, Charo J, Werr J, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*. 2000;96(9):3086-93.
- Alexander J, Russell DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol*. 1992;31:175-254.
- Alvar J, Velez ID, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*. 2006;22(12):552-7.
- Andrade JM, Murta SM. Functional analysis of cytosolic trypanothione peroxidase in antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* lines. *Parasit Vectors*. 2014;29(7):406.
- Balestieri FM., Queiroz AR., Scavone C, et al. *Leishmania (L.) amazonensis* - induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect*. 2002;4:23–9.
- Barr DS, Gedamu L. Cloning and Characterization of Three Differentially Expressed Peroxidase Genes from *Leishmania chagasi*. *The journal of biological chemistry*. 2001; 34279-87.
- Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med*. 2004;4(6):601-9.
- Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2007;2:147.
- Brodskyn C, de Oliveira CL, Barral A, et al. Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert Rev Vaccines*. 2003;2,(5):705-17.
- Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol*. 2002;4:701–11.
- Callahan HL, Portal AC, Devereaux R, et al. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemotherapy*. 1997;818-22.
- Castro WD. Miltefosina exerce sua ação Leishmanicida através do receptor de PAF. *Ouro preto*. 2011.
- Cazzulo JJ. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem*. 2002;2:1261–71.
- Chen DQ, Kolli BK, Yadava N, et al. Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infect Immun*. 2000;68:80–6.
- Coetzer TH, Goldring JP, Huson LE. Oligopeptidase B: a processing peptidase involved in pathogenesis. 2008;90(2):336-44.

- Convit J., Ulrich M., Fernandez CT, et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1993;87:444–448.
- Croft SL, S. Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(1):111-26.
- Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today.* 2000;16(4):142-44.
- Cushion MT, Walzer PD, Collins MS, et al. Highly Active Anti-*Pneumocystis carinii* Compounds in a Library of Novel Piperazine-Linked Bisbenzamidines and Related Compounds. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;4209–16.
- Dorlo PC, van Thiel PP, Huitema AD, et al. Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrob Agents Chemotherapy.* 2008;2855-60.
- Duits LA, Rademaker M, Ravensbergen B, et al. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology.* 2002;106(4):517-25.
- Filho VC, Lucas C, Sampaio NR. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2008;424-27.
- Flohé L., Hecht HJ, Sterinert P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radical Biology and Medicine.* 1999;966–84.
- Friedrich K. Estudos da cinética do antimônio e alterações de citocromos P450 hepáticos em primatas e ratos tratados com antimoniatode meglumina. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública; 2008.
- Gamboa D, van Eys G, Victoir K, et al. Putative markers of infective life stages in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitology.* 2007;134:1689–98.
- Guedes HLM, de Carvalho, RSN, Gomes, DCO, et al. Oligopeptidase B-2 from *Leishmania amazonensis* with an unusual C-terminal extension. *Acta Parasitologica.* 2008;53(2):197–204.
- Handman E.; Bullen DV. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 2002;18(8):332-34.
- Henard AC, Carlsen ED, Hay C, et al. *Leishmania amazonensis* Amastigotes Highly Express a Tryparedoxin Peroxidase Isoform That Increases Parasite Resistance to Macrophage Antimicrobial Defenses and Fosters Parasite Virulence. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2014;1-11.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999;354(9185):1191-9.
- Holzer TR, McMaster WR, Forney JD. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes,

lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;146:198–218.

Ilg T, Demar M, Harbecke D. Phosphoglycan repeat-deficient *Leishmania mexicana* parasites remain infectious to macrophages and mice. *J Biol Chem.* 2001;276:4988–97.

Iyer JP, Kaprakkaden A, Choudhary ML. Crucial role of cytosolic trypanothione peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Mol Microbiol.* 2008;68(2):372–91.

Jha, TK, Sundar S, Thakur CP, et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med.* 1999;341(24):1795-1800.

Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, et al. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;120:33–40.

Kaur G, Rajput B. Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in *Leishmania*. *Journal of Parasitology Research - Hindawi Publishing Corporation.* 2014;1-11.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature.* 2011;9:604-15.

Kima PE. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal for Parasitology.* 2007;37:1087–96.

Kima, PE. *Leishmania* molecules that mediate intracellular pathogenesis. *Institut Pasteur - Microbes and Infection.* 2014;1-6.

Kima PE, et al. Identification of *Leishmania* proteins preferentially released in infected cells using change mediated antigen technology. 2010;4(10)e842.

Lambertz U, Silverman JM, Nandan D, et al. Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis. *Journal of Leukocyte Biology.* 2012;(9):887-99.

Lin YC. et al. Distinct overexpression of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidases results in preferential detoxification of different oxidants in arsenite-resistant *Leishmania amazonensis* with and without DNA amplification. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;142(1):66-75.

Magalhães RD, Duarte MC, Matoos EC, et al. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2014;(8):e2764.

Martinez JCC. NADH desidrogenase mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*: subunidade 7 para diagnóstico diferencial de isolados humanos e análise diferencial. *ICB/SBIB143.* 2008.

Mathoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, et al. *Leishmania* Evades Host Immunity by Inhibiting Antigen Cross-Presentation through Direct Cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host & Microbe.* 2013;15-25.

- McConville MJ, Handman E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *International Journal for Parasitology*. 2007;(37):1047–51.
- McGwire BS, Chang KP, Engman DM. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect Immun*. 2003;71(2):1008–10.
- McLuskey K, Paterson NG, Bland ND, et al. Crystal structure of *Leishmania major* oligopeptidase B gives insight into the enzymatic properties of a trypanosomatid virulence factor. *J Biol Chem*. 2010. 285(50):39249-59
- McMahon-Pratt D, Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? *Immunological Reviews* 2004;201:206-24.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(7164):819-26.
- Munday JC, et al. Oligopeptidase B deficient mutants of *Leishmania major*. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2011;175:49–57.
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews immunology*. 2011;11:723-37.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, et al. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366(9496):1561-77.
- Nogoceke E, Gommel, DU, Kiess, M, et al. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothionemediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biolog Chemist*. 1997;378:827-36.
- Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response: a Signaling Point of View. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;293–305.
- Pathak MK, et al. Pentamidine Is an Inhibitor of PRL Phosphatases with Anticancer Activity. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2002;1255-64.
- Pescher P, Blisnick T, Bastin P, et al. Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. *Cellular Microbiology*. 2011;13(7):978–91.
- Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, et al. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem. J*. 2008;410:359–36.
- Piñeyro MD, Parodi-Talice A, Arcari T, et al. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: Virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 408 (2008) 45–50. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;5;4(10).

- Polgar L. The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(2):349–62.
- Rath S, Trivelin LA, Imbrunite TR, et al. Antimoniais Empregados no Tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. *Química Nova.* 2003;26(4):550-5.
- Rey L. *Parasitologia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Rittig MG, Bogdan C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today.* 2000;16(7):292-7.
- Romao S, Castro H, Sousa, C, et al. The cytosolic trypanothione of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival. *Int J Parasitol.* 2009;39(6):703-11.
- Rosenzweig D, Smith D., Opperdoes F, Stern, et al. Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J.* 2008;22.
- Sacks DL, Perkins PV. Development of infective stage Leishmania promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34(3):456-9.
- Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. P1659.
- Schlecker T, Schmidt A, Dirdjaja N, et al. Substrate Specificity, Localization, and Essential Role of the Glutathione Peroxidase-type Trypanothione Peroxidases in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry.* 2005;14385-94.
- Shaw JJ. Taxonomy of the genus Leishmania: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994;89(3):471-78.
- Silva-Almeida M, Pereira BA, Ribeiro-Guimarães ML, et al. Proteinases as virulence factors in Leishmania spp. infection in mammals. *Parasites & Vectors.* 2012;5:160
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99:239–51.
- Silverman JM, Chan SK, Robinson DP, et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. *Genome Biol.* 2008;9(2):R35.
- Silverman JM, Clos J, de Oliveira CC, et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages. *J Cell Sci.* 2010;123(6):842-52.
- Späth GF, Garraway LA, Turco SJ, et al. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100(16):9536–41.
- Sundar, S, Jha TK, Thakur CP, et al. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;1:S26-33.

Swenerton RK, Zhang S, Sajid M, Medzihradzky KF, et al. The Oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem*. 2011;7;286(1):429-40.

Teixeira PC, Velasquez LG, Lepique AP, et al. Regulation of *Leishmania (L.) amazonensis* protein expression by host T cell dependent responses: differential expression of oligopeptidase B, trypanothione peroxidase and HSP70 isoforms in amastigotes isolated from BALB/c and BALB/c nude mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2):e0003411.

Turco SJ, Späth GF, Beverley SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol*. 2001;17:223–6.

Velez, I, Lopez L, Sanchez X, et al. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(2):351-6.

Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*. 2007;17(2):115-22.

Wadhone P, Maiti M, Agarwal R, et al. Miltefosine Promotes IFN-gamma-Dominated Anti-Leishmanial Immune Response. *The Journal of Immunology*. 2009;7146-54.

Wilkinson SR, Kelly JM. The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biol Chem*. 2003;384(4):517-25.

Wilson ME., Hardin KK, Donelson JE. Expression of the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani* chagasi in virulent and attenuated promastigotes. *J Immunol*. 1989; 143:678–84. (revisado em McMahon-Pratt & Alexander, 2004).

World Health Organization: Research to support the elimination of visceral leishmaniases. WHO, 2009.

Wyllie S, Mandal G, Singh N, et al. Elevated levels of trypanothione peroxidase in antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2010;173(2):162-4.