MAURICIO SCAVASSINI PEÑA

Estudo dos efeitos da proteína LaLRR17 de *Leishmania (L.) amazonensis* na infecção do macrófago e identificação de seus possíveis ligantes

Tese 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 Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf.

Versão original

São Paulo
2017

RESUMO

PENA, M. S. Estudo dos efeitos da proteína LaLRR17 de *Leishmania (L.) amazonensis* na infecção do macrófago e identificação de seus possíveis ligantes. 2017. 88 p., tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Leishmania spp. são protozoários parasitas transmitidos a vertebrados pela picada de insetos flebotomíneos fêmeas. Apresentam duas formas principais em seu ciclo de vida: promastigotas e amastigotas. Os promastigotas vivem no intestino do hospedeiro invertebrado. Os amastigotas vivem preferencialmente no interior de macrófagos, “fagócitos profissionais” capazes de destruir patógenos. Para isso, são capazes de burlar a atividade microbicida desses macrófagos, sobreviver e se multiplicar em seu interior. Essa capacidade se deve a diversas moléculas produzidas pelo parasita, denominadas fatores de virulência, que ajudam em sua internalização e proliferação na célula hospedeira. A proteína LaLRR17 de *Leishmania (L.) amazonensis* recebeu esse nome porque contém em sua região central seis repetições ricas em leucina (LRRs) e por seu gene se localizar no cromossomo 17. Os motivos LRR de diversos organismos estão normalmente envolvidos em interações proteicas. A LaLRR17 é expressa em promastigotas e amastigotas, e foi detectada no citoplasma do macrófago infectado. Parasitas superexpressores dessa proteína apresentaram aumento da infectividade in vitro. Acreditamos que a proteína LaLRR17 participa de interações com moléculas de macrófagos, e que essas interações estão associadas à virulência dessa proteína. No entanto, não eram conhecidas moléculas do macrófago interagem com a LaLRR17. O *Phage Display* é uma técnica baseada na expressão de proteínas sintéticas nos capsídeos de fagos que tem sido utilizada para identificação de ligantes de proteínas. A aplicação do *Phage Display* sobre a LaLRR17 recombinante permitiu identificar potenciais ligantes dessa proteína no macrófago, e aliada a cromatografia de afinidade, apontou diversos candidatos que podem participar do aumento de virulência conferido pela LaLRR17, entre eles o mais promissor, GRP78 do macrófago, que tem papel efetivo na fagocitose da *Leishmania* mediada pela LaLRR17.

Palavra- chave: *Leishmania amazonensis*. LaLRR17. *Phage Display* GRP78

ABSTRACT

PEÑA, M. S. **Effects of LaLRR17 protein from *Leishmania (L.) amazonensis* in macrophage infection and identification of its possible ligands.** 2017. 88 p. Doctors thesis (Parasithology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Leishmania spp. are protozoan parasites transmitted to vertebrates by the bite of female phlebotomine insects. They present two main forms in their life cycle: promastigotes and amastigotes. Promastigotes live in the gut of the invertebrate host. The amastigotes live preferably in macrophages, "professional phagocytes" capable of destroying pathogens. They are able to circumvent the microbicidal activity of macrophages, survive and multiply inside them. This ability is due to several molecules produced by the parasite, called virulence factors, which help their internalization and proliferation inside the host cell. The protein LaLRR17 of *L. (L.) amazonensis* was named because contains in its central region six leucine-rich repeats (LRRs) and its gene locates on chromosome 17. LRR motifs of various organisms are usually involved in protein-protein interactions. LaLRR17 is expressed in promastigotes and amastigotes, and was detected in the cytoplasm of the infected macrophage. Parasites overexpressing this protein showed increased infectivity in vitro. We believe that LaLRR17 participates in interactions with macrophages molecules, and that these interactions are associated with the virulence this protein. However, we do not know which molecules from the macrophage interact with LaLRR17. Phage Display is a technique based on the expression of synthetic proteins in phage capsids that has been used to identify protein binders. The application of Phage Display on recombinant LaLRR17 allowed the identification of potential ligands of this protein in the macrophage, and allied to affinity chromatography, pointed out several candidates that could participate in the increased virulence conferred by LaLRR17, among them the most promising macrophage GRP78, which plays an effective role in LaLRR17-mediated *Leishmania* phagocytosis.

Keywords: *Leishmania amazonensis*. LaLRR17. Phage Display GRP78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

As leishmanioses são antroponoses consideradas um grande problema de saúde pública. São um complexo de doenças com amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram 2 milhões de novos casos (1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500.000 de leishmaniose visceral) ao ano, e que cerca de 12 milhões de pessoas estejam atualmente infectadas (relatório da OMS 2017).

As formas clínicas principais em seres humanos são leishmaniose visceral (LV), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmanioses cutânea localizada (LCL) e cutânea difusa (LCD), as três últimas conjuntamente chamadas de tegumentares (REITHINGER et al., 2007). Existem vinte espécies de *Leishmania* conhecidas como agentes causadores de leishmanioses em humanos (AKHOUNDI et al., 2016). A forma clínica da doença depende tanto da espécie do parasita quanto da resposta imune do hospedeiro (MCMAHON-PRATT, 2004).

Na forma clínica mais grave de leishmaniose, a LV, mais de 95% dos casos é fatal se não for tratada, sendo caracterizada por picos febris irregulares, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Em 2015, mais de 90% dos novos casos notificados à OMS foram originados em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul. Programas de tratamento da LV no Sudeste Asiático estão fazendo progresso no controle da doença e o número de casos está diminuindo nos três principais países endêmicos: Bangladesh, Índia e Nepal (relatório da OMS 2017). No Brasil, a espécie associada à LV é *Leishmania infantum chagasi* ou *L. chagasi* (MENON et al., 2016).

Aproximadamente 95% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem nas Américas, Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central, e mais de dois terços dos novos casos ocorrem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. Dentre as manifestações cutâneas, a LCL é a mais comum e tipicamente apresenta-se com um nódulo que sofre ulceração progressiva até se tornar uma lesão bem característica, podendo variar em gravidade e aspecto clínico. Essa manifestação tem tendência à auto-cura, embora o tempo necessário para isso possa variar de acordo com o hospedeiro (CARVALHO et al., 1995). A forma clínica LMC é caracterizada pela destruição parcial ou completa das membranas mucosas do nariz, boca e garganta (HANDLER et al., 2015).

Mais de 90% dos casos ocorrem no Brasil, Bolívia, Etiópia e Peru, de acordo com o relatório da OMS (2017). Por outro lado, a LCD é caracterizada por múltiplos nódulos não ulcerativos que podem se espalhar para todo o corpo do paciente, normalmente não têm tendência de auto-cura e é de difícil tratamento (REITHINGER et al., 2007).

As espécies de *Leishmania* mais comumente envolvidas em doenças tegumentares no Brasil são *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) guyanensis*. A *Leishmania (L.) amazonensis* é o segundo agente etiológico mais importante da leishmaniose cutânea no Brasil (GONTIJO, 2003), e é responsável por uma grande variedade de formas clínicas (BARRAL et al., 1991). De fato, essa espécie pode causar tanto a doença localizada quanto a difusa, dependendo do sistema imune do indivíduo infectado (ALEXANDER; MCMAHON-PRATT, 2004). A rara LCD caracteriza-se por uma ausência de resposta celular específica (anergia) a antígenos de *Leishmania*, o que permite a acentuada proliferação dos parasitos e a disseminação da infecção (SILVEIRA et al., 2009). Não se sabe se esse quadro anérgico se estabelece devido a características do hospedeiro, do parasita, ou de ambos (SILVEIRA et al., 2009).

Para o tratamento de leishmaniose existem poucos medicamentos, a maioria deles de uso parenteral e com severos efeitos colaterais (ULIANA et al., 2017). Os principais disponíveis atualmente são antimoniais, anfotericina B, paromomicina, pentamidina e miltefosina (ULIANA et al., 2017). A escolha do fármaco para o tratamento depende da orientação regional e do tipo de leishmaniose (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). No entanto, ainda existem limitações relacionadas à eficácia, toxicidade, custo, duração do tratamento, aumento da resistência parasitária e dificuldade de administração (BRUNI et al., 2017).

1.2 O ciclo de vida da *Leishmania*

Durante seu ciclo de vida a *Leishmania* apresenta duas formas principais: amastigota intracelular obrigatório e sem flagelo externo e promastigota flagelada e extracelular. Os amastigotas vivem no interior de fagolisossomas de células fagocíticas de hospedeiros vertebrados, especialmente monócitos e macrófagos, e são ingeridos pelos vetores flebotômíneos fêmeas durante seu repasto de sangue infectado (BATES, 2007).

Os flebotômíneos são moscas dípteras pertencentes a família *Psychodidae*, da qual aproximadamente 700 espécies foram descritas até o momento, sendo 30 espécies com capacidade vetorial confirmada (BATES, 2007). A divisão das *Leishmania spp* que parasitam mamíferos foi feita em subgêneros *Leishmania* e *Viannia* por Lainson e Shaw

baseando-se nas partes do intestino do inseto vetor colonizadas pelos parasitas (LAINSON et al.,1977), uma separação que foi posteriormente sustentada por várias análises filogenéticas.

Diferentes espécies de flebotomíneos transmitem espécies distintas de *Leishmania*, sendo o gênero *Phlebotomus* responsável pela transmissão de *Leishmania* no velho mundo, e o gênero *Lutzomyia* no novo mundo (BATES, 2007). Nas fêmeas hematófagas destes insetos o parasita desenvolve uma complexa série de modificações morfológicas, convertendo-se em promastigotas (figura 1) (BEZERRA DE MENEZES; VERAS, 2016). Os promastigotas se multiplicam aderidos ao intestino do inseto vetor, e se diferenciam em promastigotas metacíclicos no processo conhecido como metaciclogênese, (SACKS, 2001), os metacíclicos, que não se replicam, migram para a região anterior do tubo digestório e são transmitidos ao hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo (BATES; ROGERS, 2004). Diversas moléculas do parasita são importantes nos processos de diferenciação e multiplicação no vetor (KAMHAWI, 2006).

FIGURA 1- Ciclo biológico e mecanismo de transmissão da *Leishmania*

Fonte: BEZERRA DE MENEZES; VERAS, 2016

1.3 Fagocitose da *Leishmania* e sua sobrevivência no macrófago

Os promastigotas transmitidos pelo inseto vetor podem ser fagocitados por vários tipos de células hospedeiras (neutrófilos, células dendríticas e fibroblastos), mas a doença é propagada principalmente nos macrófagos (MCCONVILLE; NADERERE, 2011). Promastigotas (e amastigotas) são internalizados por macrófagos pelo processo de fagocitose, cuja ativação depende da ligação de receptores PRRs (*Pattern recognition receptor*) (MEDZHITOV, 2007). O processo de fagocitose inicia-se pela interação de receptores específicos da superfície da célula fagocítica com ligantes na superfície da partícula ou, neste caso, a célula fagocitada (BOGDAN; RITTIG, 2000). O sucesso da infecção de *Leishmania* em macrófagos depende da capacidade das formas promastigotas ou amastigotas aderirem a essas células por receptores de membrana e, dessa forma, serem fagocitadas (ALEXANDER et al., 1999). As interações e ativações desses receptores podem ser cruciais para o destino intracelular do parasita (UENO; WILSON, 2012).

Os receptores mais conhecidos que participam da internalização de *Leishmania* são o receptor do tipo 3 do complemento (CR3), o receptor do tipo 1 do complemento (CR1), o receptor de manose (MR), receptores Fc gama (FcγRs, nomeado FcγRII-B2), e os receptores de fibronectina (FnRs) (BELOSEVIC; GUY, 1993).

Além da ligação aos receptores, a fagocitose depende de outras interações com a célula hospedeira. O citoesqueleto de actina está envolvido no processo de ligação e internalização da *Leishmania*, processo que foi estudado mais detalhadamente em *L. (L.) donovani* (DESCOTEAUX; PODINOVSKAIA, 2015). O processo de fagocitose de *Leishmania* também envolve componentes do retículo endoplasmático (RE) (GAGNON et al., 2002). De fato, uma análise proteômica indicou que fagossomas continham várias proteínas residentes do RE (GARIN et al., 2001), sugerindo que componentes do RE fundem-se com a membrana plasmática (GAGNON et al., 2002). Este modelo, conhecido como fagocitose mediada por RE, parece ser um mecanismo geral de fagocitose por macrófagos (DESJARDINS, 2003). A fusão direta do RE com a membrana plasmática pode explicar como algumas proteínas, incluindo calnexina e calreticulina, atingem a superfície celular (OKAZAKI et al., 2000). Essas duas proteínas podem estar envolvidas na fagocitose de *Leishmania*, assim como a principal glicoproteína presente na superfície do parasita, GP63 ou leishmanolisina, que inibe a lise por complemento e suprime ativação do macrófago (YAO et al., 2010). A GP63 contém em sua região terminal a

estrutura sacarídica Glc₁ Man₆ GlcNac₂(OLAFSON et al.,1990) que é reconhecida tanto pela calreticulina quanto pela calnexina (SCHRAG et al.,2001; DESJARDINS, 2003).

Outra proteína do RE que está envolvida na fagocitose é a proteína 78 regulada por glicose (GRP78), também conhecida como BiP ou HSPA5, que é a proteína da família GRP melhor descrita (WANG et al.,2009). Uma característica marcante desta proteína é seu caráter multifuncional, além de sua ação mais conhecida como chaperona molecular ligando-se à polipeptídeos nascentes (Haas e Wabl, 1983). Similar a HSP70 citosólica, ela contém um domínio ATPase N-terminal e um domínio de ligação a peptídeos C-terminal (MAATTANEN et al.,2010). Devido à presença de um peptídeo sinal de endereçamento para o RE ela se encontra principalmente no lúmen do retículo, embora, em algumas circunstâncias, seja redistribuída ao citosol, núcleo, mitocôndria, membrana plasmática e meio extra celular (SUZUKI et al.,1991). A presença GRP78 na membrana plasmática tem sido estudada principalmente em linhagens de células tumorais (TSAI et al.,2015; CASAS, 2017), mas outros tipos celulares também podem promover essa translocação para a membrana de forma dependente de estímulo (ZHANG, 2010). Esta translocação se deve a capacidade da GRP78 se ancorar à superfície celular pela ligação a co-chaperonas HTJ-1 / MTJ-1 (BIRUKOVA et al.,2014). Na membrana plasmática ela pode funcionar como um receptor ou co-receptor de transdução de sinal para ligantes solúveis como α 2-macroglobulina (MISRA et al.,2005), fator de diferenciação tumoral (SOKOLOWSKA et al.,2012), entre outros.

Embora já tenha sido descrito que GRP78 pode se encontrar na membrana de macrófagos (SUZUKI et al.,1991) e que a GRP78 exógena estimula a fagocitose por células da micróglia (KAKIMURA et al.,2001), sua relação com infecção do macrófago por patógenos nunca foi descrita.

Os macrófagos, principais células hospedeiras da *Leishmania*, tem mecanismos microbicidas capazes de destruir os patógenos intracelulares por eles fagocitados. Sua ativação clássica pelo IFN- γ leva a respostas inflamatórias inibindo o crescimento da *Leishmania*, por outro lado, sua ativação alternativa por IL-4, inibe a inflamação através da produção de IL-10 beneficiando o crescimento de *Leishmania* (DESCOTEAUX; PODINOVSKAIA, 2015). As *Leishmania spp* desenvolveram mecanismos para burlar a atividade microbicida dos macrófagos, sendo capazes de sobreviver e se multiplicar no seu interior. Essa capacidade se deve a diversas moléculas produzidas pelo parasita, denominadas fatores de virulência, que ajudam na internalização, sobrevivência e proliferação do parasita no macrófago. O lipofosfoglicano (LPG) e a, já citada, GP63 são

os fatores de virulência mais estudados, sendo o LPG a molécula mais abundante na superfície de promastigotas (BIFELD; CLOS, 2015). Suas principais funções estão relacionadas com a inibição da produção de óxido nítrico produzido pelo macrófago, o retardamento da maturação do fagolisossomo e a indução da proteína quinase (PKR), que contribui para o crescimento do parasita (SPATH et al.,2000; PEREIRA et al.,2010). Embora essencial para a virulência de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani*, o LPG não é necessário para a infecção por *L. (L.) mexicana* *in vitro* e *in vivo* (TURCO et al.,2001; SPATH et al.,2003). A GP63 é um antígeno importante em promastigotas, também expressa (em níveis mais baixos) em amastigotas (Isnard et al.,2012). A GP63 facilita a infecção e a sobrevivência de *Leishmania*, uma vez que degrada a matriz extracelular, aumenta a atividade da fosfatase em macrófagos infectados e aumenta a resistência a peptídeos antimicrobianos. Além disso, GP63 cliva C3 a C3b e C3bi, aumentando a resistência do parasita à lise mediada pelo complemento, e cliva diretamente os fatores pró-inflamatórios AP-1 e NF- κ B (ISNARD et al.,2012; BIFELD, CLOS, 2015). Recentemente foi demonstrado que a cisteína peptidase B (CPB), um importante fator de virulência para *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonenses* (MOTTRAM et al.,2004), regula os níveis de LPG e GP63 em *L. (L.) mexicana* (CASGRAIN et al.,2016). Outras cisteíno-peptidases (CP) também favorecem a sobrevivência do parasita por estarem envolvidas na degradação do MHC de classe II e na produção de IL-4, relacionadas com uma resposta Th2, e na produção de TGF- β , que tem efeito negativo sobre a síntese de óxido nítrico (MOTTRAM et al.,1998; MOTTRAM et al.,2004). O fator de alongação 1 alfa (EF-1 α) também é um fator de virulência, capaz de inativar o macrófago por ativar tirosina fosfatase SHP1 (NANDAN et al.,2002).

Enquanto alguns fatores de virulência são restritos à superfície do parasita, outros podem ser secretados. GP63, (EF-1 α), frutose-1,6-bisfosfato aldolase, fosfatase ácida segregada (SAcP), proteínas de choque térmico (HSPs) 10 e 70 e a triparedoxina peroxidase, entre outras, são produzidas e secretadas por amastigotas (SILVERMAN et al.,2010; ISNARD et al.,2012; LAMBERTZ et al.,2012). As CP podem se acumular dentro de amastigotas ou serem secretadas por exossomos, dependendo da espécie *Leishmania*. Esses fatores de virulência têm papéis tanto dentro do parasita quanto no hospedeiro (BIFELD; CLOS, 2015).

Muitos dos fatores de virulência apresentam um padrão de expressão diferencial de acordo com a fase do parasita. Dois genes fase-regulados mais expressos em promastigotas metacíclicos do que em procíclicos e amastigotas foram identificados no

cromossomo 17 pelo grupo da Professora Silvia Uliana, sendo denominados *META 1* e *META 2*. Eles foram inicialmente caracterizados em *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, e estão presentes também em outras espécies de *Leishmania* (COULSON; SMITH, 1990; NOURBAKHS et al., 1996). Em promastigotas metacíclicos o gene *META 1* codifica uma proteína citoplasmática de 12 kDa que se concentra em torno de vacúolos da bolsa flagelar (ULIANA et al., 1999). O *META 1* de *L. (L.) amazonensis* está relacionado com virulência, pois linhagens superexpressoras desse gene produziram em camundongos BALB/c lesões 5 vezes maiores do que as produzidas pela linhagem selvagem (ULIANA et al., 1999). Esse aumento de virulência provavelmente se deve ao fato da proteína se comportar como um forte indutor de uma resposta imune tipo Th2 no hospedeiro mamífero (SEREZANI et al., 2002).

Um estudo comparativo mostrou alto grau de similaridade entre os genes e as sequências proteicas de *META 1* e *META 2* tanto em *L. (L.) major* quanto em *L. (L.) amazonensis*. Ambos mRNAs são mais abundantes em promastigotas metacíclicos de *L. (L.) amazonensis* do que em outras fases do parasita (RAMOS et al., 2004). Enquanto mutantes nulos para o gene *META1* de *L. (L.) amazonensis* não puderam ser gerados (ULIANA et al., 1999), sugerindo uma função essencial para o gene, parasitas nulos para *META2* foram obtidos e se mostraram menos resistentes a condições oxidativas e de temperatura elevada (RAMOS et al., 2011).

1.4 Proteína LRR17 de *Leishmania (L.) amazonensis*

Ao estudar os genes *META 1* e *META 2*, o grupo da Profa Silvia Uliana identificou uma ORF (“*open reading frame*”) próxima ao gene *META1* de *L. (L.) amazonensis* que codifica uma proteína contendo 6 repetições ricas em leucina (*leucine-rich repeats* [LRRs]), a qual foi denominada LRR17 (FRANCO, 2008). O gene que codifica a proteína LRR17 de *L. (L.) amazonensis*, denominado *LaLRR17*, contém em sua região central sequências codificadoras de seis LRRs de 28-30 aminoácidos cada. O transcrito desse gene é 12 e 21 vezes mais abundante em amastigotas do que em promastigotas nas fases logarítmica e estacionária, respectivamente (FRANCO, 2008). Curiosamente, em *L. (L.) major* o mRNA de *LmLRR17* tem a mesma abundância em todas as fases do parasita (PERDOMO, 2010). A proteína codificada pelo gene *LaLRR17* tem 72 kDa e é igualmente expressa em promastigotas nas duas fases e é pouco abundante em amastigotas. Sequências proteicas homólogas de *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* apresentam 92, 92 e 79% de identidade com a *LaLRR17*. Comparações com

bancos de dados mostraram similaridades entre a proteína LaLRR17 e *t-complex-associated testis-expressed protein 1-like*, uma proteína envolvida em secreção, e diversas proteínas da família NLR (*nucleotide binding domain leucine rich*), entre elas a NOD2 (SILVA, 2011).

A LaLRR17 de *L. (L.) amazonensis* parece ser essencial para o parasita, pois não foram obtidos duplos nocautes viáveis. A proteína foi detectada no citoplasma do macrófago infectado fora do vacúolo parasitóforo em diferentes modelos de infecção e por diversos métodos (FRANCO, 2008). A secreção da LaLRR17 não parece ser feita pela via clássica de eucariotos devido à ausência de peptídeo sinal N terminal.

Embora a via clássica de secreção seja funcional em *Leishmania spp*, vias não clássicas são frequentemente usadas. De fato, uma análise proteômica de 151 proteínas secretadas por *L. (L.) donovani* mostrou que 137 delas não apresentavam peptídeo sinal da via de secreção clássica (SILVERMAN et al.,2008). A liberação dessas proteínas é provavelmente feita por um sistema de exossomos capaz de exportar moléculas efetoras para o citoplasma da célula hospedeira (SILVERMAN et al.,2010). Interessantemente, foi mostrado que fatores ambientais que mimetizam a infecção alteram a produção e composição dos exossomos, e que diversas proteínas presentes nessas vesículas tem potencial de modular a ativação e função dos macrófagos (SILVERMAN et al.,2010). Os exossomos em *Leishmania spp* parecem ser o mecanismo mais utilizado para secreção de fatores de virulência como EF-1α e GP63 para o citoplasma do macrófago, onde eles interagem com moléculas como SHP1 e outras, modulando a resposta imune (LAMBERTZ et al.,2012).

Os motivos LRR presentes em diversas proteínas de mamíferos e plantas estão envolvidos em interações proteicas (KAJAVA; KOBE, 2001), inclusive nas interações de parasitas com a célula hospedeira (MCGUINNESS et al.,2003; TAKEDA et al.,2003). Além da LaLRR17, outras proteínas com LRR foram identificadas em *Leishmania*. De fato, buscas em bancos de dados mostraram que mais de 100 proteínas de *L. (L.) major* contem pelo menos duas repetições LRR (GENEST et al.,2008). Duas delas, o proteofosfoglicano (PPG) e o antígeno de superfície do parasita 2 (PSA-2), são importantes moléculas na ligação e fagocitose pelo macrófago (KEDZIERSKI et al.,2004). O PSA-2 foi identificado na região extracelular do glicocálice de formas promastigotas e contém 13 repetições LRR que são capazes de interagir com o receptor do complemento CR3 de macrófagos e induzir a fagocitose (KEDZIERSKI et al.,2004). Uma proteína identificada em *L. (L.) donovani* semelhante à proteína *Internalin-A-like*

(Inl-A) da bactéria *Listeria monocytogenes* contém uma região LRR que interage com a E-caderina presente na membrana celular da célula hospedeira (MUKHERJEE et al.,2016).

Como descrito para PPG, PSA-2 e Inl-A, é provável que a proteína LaLRR17 também participe de interações com moléculas de macrófagos. Além de sua suposta secreção para o citoplasma do macrófago, foi visto que parasitas superexpressores apresentaram aumento da infectividade *in vitro* tanto em termos do número de macrófagos infectados quanto de parasitas por célula. Esse aumento não parece estar relacionado com alterações nos níveis de óxido nítrico nem dos transcritos de TNF- α e TGF- β (SILVA, 2011).

Os dados mostrados até agora apontam para um provável papel da LRR17 de *L. (L.) amazonensis* na comunicação parasita-hospedeiro, possivelmente pelas LRRs. No entanto, não se sabe quais moléculas da célula hospedeira, mais especificamente do macrófago, podem interagir com a LaLRR17, nem detalhes sobre o efeito dessa interação na infecção.

1.5 Proteínas recombinantes de *Leishmania*

Para identificar ligantes da LaLRR17 optamos por utilizar a proteína recombinante. De fato, a maior parte dos estudos focados em diagnóstico, cristalografia e análise funcional de uma proteína dependem de sua produção de forma recombinante (MENEZES-SOUZA et al.,2014; BATISTA et al.,2015; SERAPHIM et al.,2015). O sistema bacteriano é o método mais eficaz para produção de proteína recombinante, pois a bactéria *Escherichia coli* é bem caracterizada em termos genéticos e bioquímicos e pode ser manipulada de forma segura e com baixo custo quando comparada a outros sistemas de expressão (CHAO et al.,2002).

Para análise de interação entre proteínas recombinantes e células do sistema imunológico, a utilização de proteínas recombinantes provenientes de bactérias gram-negativas é problemática pela dificuldade de se remover totalmente o lipopolissacarídeo (LPS) (INOHARA et al.,2002). Como o LPS é uma molécula pró inflamatória, normalmente se recomenda a utilização de sistema de expressão em células eucariotas, nas quais não existe LPS (BASTO et al.,2015). Por outro lado, o rendimento da produção em bactéria é superior ao de sistemas eucarióticos (CECCARELLI; ROSANO, 2014). Por essa razão, quando não há empecilhos para a presença de quantidades vestigiais de LPS, costuma-se utilizar proteínas produzidas em bactérias. Essas proteínas podem ser

usadas para produção de anticorpos e para busca de ligantes, por exemplo por *Phage display* e cromatografia por afinidade.

1.6 A técnica de *Phage Display*

A técnica de *Phage Display* foi usada pela primeira vez em 1985 (SMITH, 1985) e tem sido aprimorada desde então para diversos fins. De forma resumida, sequências de DNA de interesse ou aleatórias são inseridas no genoma de um fago filamentosos de forma que a proteína codificada é expressa em fusão com proteínas do capsídeo do fago, por exemplo a proteína III (GUO et al., 2010). Os bacteriófagos infectam uma variedade de bactérias gram-negativas usando o pilus sexual como receptor. As partículas de bacteriófagos filamentosos das linhagens M13, f1 e Fd, que infectam *Escherichia coli* via pilus F, consistem em uma fita simples de DNA envolta por uma cápsula protéica. Um fago viável expressa aproximadamente 2.700 cópias da proteína codificada pelo gene 8 (g8 ou pVIII, uma proteína de 50 aminoácidos) e de 3 a 5 cópias do gene 3 (p3 ou pIII, proteína de 406 aminoácidos), ambas componentes do capsídeo, além de outras proteínas (MACDOUGALL et al., 1991).

Existem três tipos principais de bibliotecas de *Phage Display*, cujos produtos expressos no fago são proteínas, anticorpos ou peptídeos (Willats, 2002). O isolamento de sequências baseado na afinidade de ligação do bacteriófago a uma molécula (seleção sobre um alvo imobilizado), célula ou tecido alvo é feita por um processo de seleção geralmente feito *in vitro* denominado *Biopanning* (PARMLEY; SMITH, 1988). Por essa triagem, bibliotecas de fagos são expostas a alvos de interesse a fim de seletivamente capturarem fagos aderidos ao alvo. Ao longo de sucessivas adesões, lavagens, eluições e amplificações, a população de bacteriófagos é cada vez mais seletiva em relação ao alvo em questão (WILLATS, 2002).

O *Phage Display* tem sido utilizado para diversos fins: identificação de interações proteína-ligante, incluindo a seleção de agonistas e antagonistas, definição de epitopos de anticorpos monoclonais, seleção de substratos ou inibidores de enzimas, aprimoramento das propriedades de enzimas, seleção de alvos para a inibição de angiogênese tumoral, desenvolvimento de vacinas e identificação de candidatos a drogas ou alvos específicos para entrega de drogas para diversas doenças, incluindo as infecciosas (KURZEPA et al., 2009). Este método tem várias vantagens: o elevado número de proteínas que poderão ser expressas, a alta flexibilidade, a possibilidade de realizar a seleção *in vitro* e *in vivo*,

e até mesmo sobre moléculas inorgânicas. Além disso, a técnica é eficaz, rápida, barata, fácil de controlar, e não requer equipamentos especiais (KURZEPA et al.,2009).

As bibliotecas normalmente usadas para identificação de ligantes de proteínas são as bibliotecas de peptídeos, que frequentemente apresentam atividade biológica relacionada com a natureza da molécula em estudo. Peptídeos selecionados contra um alvo particular auxiliam na identificação do motivo necessário para ligação (STEVENS et al.,1988) e podem contribuir para a identificação do ligante natural desse alvo (PETTER et al.,2008). Peptídeos selecionados que não se assemelham ao ligante natural, geralmente com afinidade semelhante pelo alvo, são denominados mimotopos (GEYSEN et al.,1986; GIORDANO et al.,2001). Peptídeos ligantes de uma enzima frequentemente mimetizam o substrato, ligando-se ao sítio ativo ou alostérico, inibindo-a ou ativando-a (KOIVUNEN et al.,1999; GIORDANO et al.,2001; AHMAD et al.,2005), no caso de receptores de superfície, o peptídeo se assemelha a uma proteína ligante do receptor (KOIVUNEN et al.,1993; GIORDANO et al.,2001), competindo pela ligação a ele. Como a probabilidade de se encontrar um ligante em uma biblioteca de peptídeos é uma função da afinidade pela molécula selecionada (CORTESE et al.,1995), essa abordagem permite identificar moléculas de alta afinidade que podem ser usadas como base para o desenvolvimento de fármacos, vacinas e métodos diagnósticos (SMITH, 1985; SCOTT; SMITH, 1990).

Em *Leishmania* o *Phage Display* ainda é pouco usado, sendo a maioria dos estudos focados em diagnósticos por sorologia (COSTA et al.,2014; COSTA et al.,2015; TOLEDO-MACHADO et al.,2015; LINK et al.,2017). Outros trabalhos utilizaram a técnica para identificar ligantes em promastigotas metacíclicos com o objetivo de impedir a infecção (HOUIMEL; RHADEM, 2016), e ligantes antagonistas do receptor de IL-10 do macrófago, com intuito de evitar uma resposta anti inflamatória (NAIYER et al.,2013). Outros trabalhos também empregaram *Phage Display* para identificar ligantes de uma enzima envolvida na morte do parasita, com o intuito de identificar seus possíveis substratos ou ligantes naturais (NAIYER et al.,2013; PEÑA et al.,2017).

Como já mencionamos, motivos LRR estão normalmente envolvidos na interação entre proteínas. Por essa razão, acreditamos que a proteína LaLRR17 interage com alguma proteína do macrófago, e que essa interação pode ser responsável pelo aumento da infectividade observado para o parasita superexpressor. Empregamos as técnicas de *Phage Display* e cromatografia de afinidade utilizando a LaLRR17 recombinante e os resultados obtidos sugerem que GRP78 é um potencial ligante na célula hospedeira

envolvido no efeito potencializador da LaLRR17 sobre a infecção. Além disso, mostramos que a LaLRR17solúvel aumenta a infecção e a fagocitose do parasita, indicando que ela interfere diretamente nos processos iniciais de entrada do parasita no macrófago.

5. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesta tese sugerem que a LaLRR17 endógena de *L. (L.) amazonensis*, quando liberada pelo parasita, é capaz de aumentar a proporção de células infectadas. Esse efeito foi observado tanto para infecções com o parasita superexpressor quanto para infecções na presença da LaLRR17 recombinante, sugerindo que a *Leishmania* de fato secreta a proteína, como previamente sugerido pelo grupo da Profa Silvia Uliana. Infelizmente a falta de um anticorpo específico para LaLRR17 não nos permitiu avaliar a secreção da proteína. Além disso, o baixo nível de superexpressão (dados informados pelo grupo da Profa Sivia Uliana) dificulta o uso de anticorpo anti-his para esse fim. A LaLRR17 interfere nas etapas iniciais da fagocitose, promovendo maior adesão da *Leishmania* ao macrófago em poucos minutos (5 minutos de contato parasita- macrófago a 34 °C), e maior entrada a partir de 30 minutos de contato.

O aumento na infecção induzido pela LaLRR17 depende de sua interação com a proteína GRP78 na superfície do macrófago, pois o ensaio de cromatografia de afinidade indica sua possível interação com a LaLRR17 e confirmamos que o bloqueio desta anula o efeito da LaLRR17. A ligação entre estas proteínas é confirmada pelo ensaio de *binding*, mostrando que a GRP78 se liga mais a LaLRR17 que ao controle BSA o mesmo utilizado no ensaio de cromatografia.

A GRP78 solúvel também tem um efeito direto na infecção por *Leishmania*, aumentando o número de macrófagos infectado. Esse efeito é semelhante ao observado para micróglia, (KAKIMURA et al., 2001), indicando que a infecção da *Leishmania* é mediada por esta proteína.

O sucesso da infecção por *Leishmania* está atrelado a sua capacidade de ser fagocitada e habitar macrófagos. Fatores de virulência são responsáveis por esta capacidade, e em nosso trabalho demonstramos que a LaLRR17 é um fator de virulência para promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, beneficiando sua fagocitose e consequentemente a infecção. Também demonstramos que a ação da LaLRR17 é dependente da GRP78, indicando que a fagocitose/infecção de *Leishmania* está sendo mediada por um componente do RE presente na membrana. A presença da GRP78 recombinante também beneficia a infecção aumentando o número de macrófagos infectados. Esse trabalho mostra pela primeira vez o papel de LRR17 e GRP78 na

infecção por *Leishmania*, acrescentando esses potenciais novos fatores ao rol de moléculas envolvidas na exacerbação da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, R. et al. An evaluation of the effects of handpiece speed, abrasive characteristics, and polishing load on the flexural strength of polished ceramics. **J Prosthet Dent**; v. 94, n. 5, p. 421-9, Nov 2005. ISSN 0022-3913 (Print) 0022-3913 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16275301> >.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**; v. 10, n. 3, p. e0004349, Mar 2016. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26937644> >.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **J Cell Sci**; v. 112 Pt 18, p. 2993-3002, Sep 1999. ISSN 0021-9533 (Print) 0021-9533 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10462516 >.
- BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that Leishmania amazonensis produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg**; v. 44, n. 5, p. 536-46, May 1991. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2063957 >.
- BASTO, A. P. et al. Immune response profile elicited by the model antigen ovalbumin expressed in fusion with the bacterial OprI lipoprotein. **Mol Immunol**; v. 64, n. 1, p. 36-45, Mar 2015. ISSN 1872-9142 (Electronic) 0161-5890 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25467796> >.
- BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol**; v. 37, n. 10, p. 1097-106, Aug 2007. ISSN 0020-7519 (Print) 0020-7519 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17517415> >.
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. **Curr Mol Med**; v. 4, n. 6, p. 601-9, Sep 2004. ISSN 1566-5240 (Print) 1566-5240 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15357211 >.

BATISTA, F. A. et al. Identification of two p23 co-chaperone isoforms in *Leishmania braziliensis* exhibiting similar structures and Hsp90 interaction properties despite divergent stabilities. **FEBS J**; v. 282, n. 2, p. 388-406, Jan 2015. ISSN 1742-4658 (Electronic) 1742-464X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25369258> >.

BIFELD, E.; CLOS, J. The genetics of *Leishmania* virulence. **Med Microbiol Immunol**; v. 204, n. 6, p. 619-34, Dec 2015. ISSN 1432-1831 (Electronic) 0300-8584 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26047933> >.

BIRUKOVA, A. A. et al. GRP78 is a novel receptor initiating a vascular barrier protective response to oxidized phospholipids. **Mol Biol Cell**; v. 25, n. 13, p. 2006-16, Jul 01 2014. ISSN 1939-4586 (Electronic) 1059-1524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24829380> >.

BRUNI, N. et al. Nanostructured delivery systems with improved leishmanicidal activity: a critical review. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 5289-5311, 2017. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28794624> >.

CARVALHO, E. M. et al. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**; v. 53, n. 3, p. 273-7, Sep 1995. ISSN 0002-9637 (Print) 0002-9637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7573712> >.

CASAS, C. GRP78 at the Centre of the Stage in Cancer and Neuroprotection. **Front Neurosci**; v. 11, p. 177, 2017. ISSN 1662-4548 (Print) 1662-453X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28424579> >.

CASGRAIN, P. A. et al. Cysteine Peptidase B Regulates *Leishmania mexicana* Virulence through the Modulation of GP63 Expression. **PLoS Pathog**; v. 12, n. 5, p. e1005658, May 2016. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27191844> >.

CHAO, Y. P. et al. Construction and characterization of thermo-inducible vectors derived from heat-sensitive lacI genes in combination with the T7 A1 promoter. **Biotechnol Bioeng**; v. 79, n. 1, p. 1-8, Jul 05 2002. ISSN 0006-3592 (Print) 0006-3592 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17590925> >.

CORTESE, R. et al. Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. **Curr Opin Biotechnol**; v. 6, n. 1, p. 73-80, Feb 1995. ISSN 0958-1669 (Print)
0958-1669 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7534506 >.

COSTA, L. E. et al. Phage-fused epitopes from *Leishmania infantum* used as immunogenic vaccines confer partial protection against *Leishmania amazonensis* infection. **Parasitology**, v. 142, n. 10, p. 1335-47, Sep 2015. ISSN 1469-8161 (Electronic) 0031-1820 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26099574> >.

COSTA, L. E. et al. Subtractive phage display selection from canine visceral leishmaniasis identifies novel epitopes that mimic *Leishmania infantum* antigens with potential serodiagnosis applications. **Clin Vaccine Immunol**; v. 21, n. 1, p. 96-106, Jan 2014. ISSN 1556-679X (Electronic)
1556-679X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24256622> >.

COULSON, R. M.; SMITH, D. F. Isolation of genes showing increased or unique expression in the infective promastigotes of *Leishmania major*. **Mol Biochem Parasitol**; v. 40, n. 1, p. 63-75, Apr 1990. ISSN 0166-6851 (Print)
0166-6851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2348831> >.

DESJARDINS, M. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. **Nat Rev Immunol**; v. 3, n. 4, p. 280-91, Apr 2003. ISSN 1474-1733 (Print)
1474-1733 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12669019> >.

GAGNON, E. et al. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. **Cell**, v. 110, n. 1, p. 119-31, Jul 12 2002. ISSN 0092-8674 (Print)
0092-8674 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151002> >.

GARIN, J. et al. The phagosome proteome: insight into phagosome functions. **J Cell Biol**, v. 152, n. 1, p. 165-80, Jan 08 2001. ISSN 0021-9525 (Print)
0021-9525 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11149929> >.

GAUT, J. R.; HENDERSHOT, L. M. Mutations within the nucleotide binding site of immunoglobulin-binding protein inhibit ATPase activity and interfere with release of immunoglobulin heavy chain. **J Biol Chem**; v. 268, n. 10, p. 7248-55, Apr 05 1993. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8463260> >.

GENEST, P. A. et al. A protein of the leucine-rich repeats (LRRs) superfamily is implicated in antimony resistance in *Leishmania infantum* amastigotes. **Mol Biochem Parasitol**; v. 158, n. 1, p. 95-9, Mar 2008. ISSN 0166-6851 (Print) 0166-6851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18164495> >.

GEYSEN, H. M.; RODDA, S. J.; MASON, T. J. The delineation of peptides able to mimic assembled epitopes. **Ciba Found Symp**; v. 119, p. 130-49, 1986. ISSN 0300-5208 (Print) 0300-5208 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2426049 >.

GIORDANO, R. J. et al. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. **Nat Med**; v. 7, n. 11, p. 1249-53, Nov 2001. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689892> >.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO MDE, L. [American cutaneous leishmaniasis]. **Rev Soc Bras Med Trop**; v. 36, n. 1, p. 71-80, Jan-Feb 2003. ISSN 0037-8682 (Print) 0037-8682 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12715066 >.

GUO, Y. et al. Construction of bifunctional phage display for biological analysis and immunoassay. **Anal Biochem**; v. 396, n. 1, p. 155-7, Jan 1 2010. ISSN 1096-0309 (Electronic) 0003-2697 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19699710 >.

GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania* major amastigotes into macrophages. **Infect Immun**; v. 61, n. 4, p. 1553-8, Apr 1993. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8454363> >.

HAAS, I. G.; WABL, M. Immunoglobulin heavy chain binding protein. **Nature**, v. 306, n. 5941, p. 387-9, Nov 24-30 1983. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6417546> >.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **J Am Acad Dermatol**; v. 73, n. 6, p. 897-908; quiz 909-10, Dec 2015. ISSN 1097-6787 (Electronic)

0190-9622 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26568335> >.

INOHARA, N.; OGURA, Y.; NUNEZ, G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. **Curr Opin Microbiol**; v. 5, n. 1, p. 76-80, Feb 2002. ISSN 1369-5274 (Print)
1369-5274 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834373> >.

ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Front Cell Infect Microbiol**; v. 2, p. 72, 2012. ISSN 2235-2988 (Electronic)
2235-2988 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919663> >.

KAKIMURA, J. et al. Bip/GRP78-induced production of cytokines and uptake of amyloid-beta(1-42) peptide in microglia. **Biochem Biophys Res Commun**; v. 281, n. 1, p. 6-10, Feb 16 2001. ISSN 0006-291X (Print)
0006-291X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11178952> >.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends Parasitol**; v. 22, n. 9, p. 439-45, Sep 2006. ISSN 1471-4922 (Print)
1471-4922 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16843727> >.

KATZ, B. A. Binding to protein targets of peptidic leads discovered by phage display: crystal structures of streptavidin-bound linear and cyclic peptide ligands containing the HPQ sequence. **Biochemistry**, v. 34, n. 47, p. 15421-9, Nov 28 1995. ISSN 0006-2960 (Print)
0006-2960 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7492542 >.

KEDZIERSKI, L. et al. A leucine-rich repeat motif of Leishmania parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. **J Immunol**; v. 172, n. 8, p. 4902-6, Apr 15 2004. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15067069> >.

KEDZIERSKI, L. et al. Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**; v. 52, n. 2, p. 104-12, Mar-Apr 2004. ISSN 0004-069X (Print)
0004-069X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15179324> >.

KOBE, B.; KAJAVA, A. V. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. **Curr Opin Struct Biol**; v. 11, n. 6, p. 725-32, Dec 2001. ISSN 0959-440X (Print)

0959-440X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751054> >.

KOIVUNEN, E. et al. Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries. **J Nucl Med**; v. 40, n. 5, p. 883-8, May 1999. ISSN 0161-5505 (Print) 0161-5505 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10319765> >.

KOIVUNEN, E.; GAY, D. A.; RUOSLAHTI, E. Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library. **J Biol Chem**; v. 268, n. 27, p. 20205-10, Sep 25 1993. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7690752> >.

KURZEPA, A. et al. Molecular modification of T4 bacteriophage proteins and its potential application - review. **Folia Microbiol (Praha)**; v. 54, n. 1, p. 5-15, 2009. ISSN 1874-9356 (Electronic) 0015-5632 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19330539 >.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. Leishmania in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the Leishmania mexicana and L. braziliensis complexes. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**; v. 199, n. 1135, p. 309-20, Nov 14 1977. ISSN 0950-1193 (Print) 0950-1193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22860> >.

LAMBERTZ, U. et al. Secreted virulence factors and immune evasion in visceral leishmaniasis. **J Leukoc Biol**; v. 91, n. 6, p. 887-99, Jun 2012. ISSN 1938-3673 (Electronic) 0741-5400 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22442494> >.

LINK, J. S. et al. Synthetic Peptides as Potential Antigens for Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis. **J Immunol Res**; v. 2017, p. 5871043, 2017. ISSN 2314-7156 (Electronic) 2314-7156 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28367456> >.

MAATTANEN, P. et al. Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins. **Semin Cell Dev Biol**; v. 21, n. 5, p. 500-11, Jul 2010. ISSN 1096-3634 (Electronic) 1084-9521 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20347046> >.

MACDOUGALL, J. H.; BEIGHTON, D.; RUSSELL, R. R. Cloning and expression of protease genes from Treponema denticola in Escherichia coli. **Oral Microbiol Immunol**; v. 6, n. 5, p. 270-4, Oct 1991. ISSN 0902-0055 (Print)

0902-0055 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1840314> >.

MCGUINNESS, D. H.; DEHAL, P. K.; PLEASS, R. J. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. **Trends Parasitol**; v. 19, n. 7, p. 312-9, Jul 2003. ISSN 1471-4922 (Print)
1471-4922 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12855382> >.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7-14, Jan 2014. ISSN 1460-2393 (Electronic)
1460-2393 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23744570> >.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunol Rev**; v. 201, p. 206-24, Oct 2004. ISSN 0105-2896 (Print)
0105-2896 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15361243 >.

MEDZHITOV, R. TLR-mediated innate immune recognition. **Semin Immunol**; v. 19, n. 1, p. 1-2, Feb 2007. ISSN 1096-3618 (Electronic)
1044-5323 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22228983> >.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Epitope mapping of the HSP83.1 protein of Leishmania braziliensis discloses novel targets for immunodiagnosis of tegumentary and visceral clinical forms of leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol**; v. 21, n. 7, p. 949-59, Jul 2014. ISSN 1556-679X (Electronic)
1556-679X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24807053> >.

MENG, F.; LOWELL, C. A. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. **J Exp Med**; v. 185, n. 9, p. 1661-70, May 05 1997. ISSN 0022-1007 (Print)
0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9151903> >.

MENON, S. S. et al. Decentralized control of human visceral leishmaniasis in endemic urban areas of Brazil: a literature review. **Trop Med Health**; v. 44, p. 9, 2016. ISSN 1348-8945 (Print)
1348-8945 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27433128> >.

MISRA, U. K.; DEEDWANIA, R.; PIZZO, S. V. Binding of activated alpha2-macroglobulin to its cell surface receptor GRP78 in 1-LN prostate cancer cells regulates PAK-2-

dependent activation of LIMK. **J Biol Chem**; v. 280, n. 28, p. 26278-86, Jul 15 2005. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15908432> >.

MOTTRAM, J. C.; BROOKS, D. R.; COOMBS, G. H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host-parasite interactions. **Curr Opin Microbio**; v. 1, n. 4, p. 455-60, Aug 1998. ISSN 1369-5274 (Print)

1369-5274 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066510> >.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of Leishmania. **Curr Opin Microbiol**; v. 7, n. 4, p. 375-81, Aug 2004. ISSN 1369-5274 (Print)

1369-5274 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358255> >.

MUKHERJEE, I.; CHAKRABORTY, A.; CHAKRABARTI, S. Identification of internalin-A-like virulent proteins in Leishmania donovani. **Parasit Vectors**; v. 9, n. 1, p. 557, Oct 21 2016. ISSN 1756-3305 (Electronic)

1756-3305 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27765050> >.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. Intracellular growth and pathogenesis of Leishmania parasites. **Essays Biochem**; v. 51, p. 81-95, 2011. ISSN 1744-1358 (Electronic)

0071-1365 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22023443> >.

NAIYER, M. M. et al. Identification and characterization of a human IL-10 receptor antagonist. **Hum Immunol**; v. 74, n. 1, p. 28-31, Jan 2013. ISSN 1879-1166 (Electronic)

0198-8859 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000375> >.

NANDAN, D. et al. Leishmania EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. **J Biol Chem**; v. 277, n. 51, p. 50190-7, Dec 20 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384497> >.

NOURBAKHS, F.; ULIANA, S. R.; SMITH, D. F. Characterisation and expression of a stage-regulated gene of Leishmania major. **Mol Biochem Parasitol**; v. 76, n. 1-2, p. 201-13, Feb-Mar 1996. ISSN 0166-6851 (Print)

0166-6851 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8920007> >.

OKAZAKI, Y. et al. Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. **J Biol Chem**, v. 275, n. 46, p. 35751-8, Nov 17 2000. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956670> >.

OLAFSON, R. W. et al. Structures of the N-linked oligosaccharides of Gp63, the major surface glycoprotein, from *Leishmania mexicana amazonensis*. **J Biol Chem**; v. 265, n. 21, p. 12240-7, Jul 25 1990. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2373691> >.

PARMLEY, S. F.; SMITH, G. P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. **Gene**, v. 73, n. 2, p. 305-18, Dec 20 1988. ISSN 0378-1119 (Print)

0378-1119 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3149606 >.

PENA, M. S. et al. Metacaspase-binding peptide inhibits heat shock-induced death in *Leishmania (L.) amazonensis*. **Cell Death Dis**; v. 8, n. 3, p. e2645, Mar 02 2017. ISSN 2041-4889 (Electronic). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28252649> >.

PERDOMO, Sandra Patricia Kalil. Caracterização funcional da proteína LRR17 em *Leishmania (Leishmania) major*. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. doi:10.11606/D.42.2010.tde-17012011-153821. Acesso em: 2017-12-04.

PEREIRA, R. M. et al. Novel role for the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR: modulation of macrophage infection by the protozoan parasite *Leishmania*.

FASEB J, v. 24, n. 2, p. 617-26, Feb 2010. ISSN 1530-6860 (Electronic)

0892-6638 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812373> >.

PETTER, C. et al. Phage display screening for peptidic chitinase inhibitors. **J Mol Recognit**; v. 21, n. 6, p. 401-9, Nov-Dec 2008. ISSN 0952-3499 (Print)

0952-3499 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18680214 >.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiol**; v. 10, n. 1, p. 111-29, 2015. ISSN 1746-0921 (Electronic) 1746-0913 (Linking). Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=25598341 >.

RAMOS, C. R. et al. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J Med Biol Res**; v. 37, n. 8, p. 1103-9, Aug 2004. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273812> >.

RAMOS, C. S. et al. Characterisation of a new Leishmania META gene and genomic analysis of the META cluster. **FEMS Microbiol Lett**; v. 238, n. 1, p. 213-9, Sep 01 2004. ISSN 0378-1097 (Print) 0378-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15336424> >.

RAMOS, C. S. et al. Leishmania amazonensis META2 protein confers protection against heat shock and oxidative stress. **Exp Parasitol**; v. 127, n. 1, p. 228-37, Jan 2011. ISSN 1090-2449 (Electronic) 0014-4894 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20713053> >.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**; v. 7, n. 9, p. 581-96, Sep 2007. ISSN 1473-3099 (Print) 1473-3099 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17714672 >.

RHAIEM, R. B.; HOUIMEL, M. Targeting Leishmania major parasite with peptides derived from a combinatorial phage display library. **Acta Trop**; v. 159, p. 11-9, Jul 2016. ISSN 1873-6254 (Electronic) 0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26995695> >.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol Today**, v. 16, n. 7, p. 292-7, Jul 2000. ISSN 0169-4758 (Print) 0169-4758 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858648> >.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Front Microbiol**; v. 5, p. 172, 2014. ISSN 1664-302X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24860555> >.

SACKS, D. L. Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cell Microbiol**; v. 3, n. 4, p. 189-96, Apr 2001. ISSN 1462-5814 (Print) 1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298643> >.

SCHRAG, J. D. et al. The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. **Mol Cell**; v. 8, n. 3, p. 633-44, Sep 2001. ISSN 1097-2765 (Print)

1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11583625> >.

SCOTT, J. K.; SMITH, G. P. Searching for peptide ligands with an epitope library.

Science, v. 249, n. 4967, p. 386-90, Jul 27 1990. ISSN 0036-8075 (Print)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1696028> >.

SERAPHIM, T. V. et al. The C-terminal region of the human p23 chaperone modulates its structure and function. **Arch Biochem Biophys**; v. 565, p. 57-67, Jan 01 2015. ISSN 1096-0384 (Electronic)

0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25447839> >.

SEREZANI, C. H. et al. Evaluation of the murine immune response to Leishmania meta 1 antigen delivered as recombinant protein or DNA vaccine. **Vaccine**, v. 20, n. 31-32, p. 3755-63, Nov 01 2002. ISSN 0264-410X (Print)

0264-410X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12399206> >.

SHTEYNBERG, D. et al. Combining results of multiple search engines in proteomics. **Mol Cell Proteomics**, v. 12, n. 9, p. 2383-93, Sep 2013. ISSN 1535-9484 (Electronic)

1535-9476 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720762> >.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**; v. 31, n. 8, p. 423-31, Aug 2009. ISSN 1365-3024 (Electronic)

0141-9838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646206> >.

SILVERMAN, J. M. et al. Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani. **Genome Biol**; v. 9, n. 2, p. R35, 2008. ISSN 1474-760X (Electronic)

1474-7596 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282296> >.

SILVERMAN, J. M. et al. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from Leishmania and communication with macrophages. **J Cell Sci**; v. 123, n. Pt 6, p. 842-52, Mar 15 2010. ISSN 1477-9137 (Electronic)

0021-9533 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20159964 >.

SILVERMAN, J. M. et al. Leishmania exosomes modulate innate and adaptive immune responses through effects on monocytes and dendritic cells. **J Immunol**; v. 185, n. 9, p. 5011-22, Nov 01 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20881185> >.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v. 228, n. 4705, p. 1315-7, Jun 14 1985. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4001944 >.

SOKOLOWSKA, I. et al. Identification of potential tumor differentiation factor (TDF) receptor from steroid-responsive and steroid-resistant breast cancer cells. **J Biol Chem**; v. 287, n. 3, p. 1719-33, Jan 13 2012. ISSN 1083-351X (Electronic) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22130669> >.

SPATH, G. F. et al. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite Leishmania major. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 16, p. 9258-63, Aug 01 2000. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10908670> >.

SPATH, G. F. et al. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of Leishmania major infections in mammalian hosts. **Proc Natl Acad Sci U S A**; v. 100, n. 16, p. 9536-41, Aug 05 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12869694> >.

STEVENS, T. L. et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, v. 334, n. 6179, p. 255-8, Jul 21 1988. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2456466 >.

SUZUKI, C. K. et al. Regulating the retention of T-cell receptor alpha chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca(2+)-dependent association with BiP. **J Cell Biol**, v. 114, n. 2, p. 189-205, Jul 1991. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1649196> >.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 335-76, 2003. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524386> >.

TOLEDO-MACHADO, C. M. et al. Use of Phage Display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 133, Feb 28 2015. ISSN 1756-3305 (Electronic)
1756-3305 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25889286> >.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Res**, v. 6, p. 750, 2017. ISSN 2046-1402 (Print)
2046-1402 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28649370> >.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979. ISSN 0027-8424 (Print)
0027-8424 (Linking). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=388439 >.

TSAI, Y. L. et al. Characterization and mechanism of stress-induced translocation of 78-kilodalton glucose-regulated protein (GRP78) to the cell surface. **J Biol Chem**, v. 290, n. 13, p. 8049-64, Mar 27 2015. ISSN 1083-351X (Electronic)
0021-9258 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25673690> >.

TURCO, S. J.; SPATH, G. F.; BEVERLEY, S. M. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between Leishmania species. **Trends Parasitol**, v. 17, n. 5, p. 223-6, May 2001. ISSN 1471-4922 (Print)
1471-4922 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11323305> >.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. **Trends Parasitol**, v. 28, n. 8, p. 335-44, Aug 2012. ISSN 1471-5007 (Electronic)
1471-4922 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22726697> >.

ULIANA, S. R. et al. Leishmania: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta 1 gene. **Exp Parasitol**, v. 92, n. 3, p. 183-91, Jul 1999. ISSN 0014-4894 (Print)
0014-4894 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403759> >.

ULIANA, S. R.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, p. 1-17, Jan 20 2017. ISSN 1469-8161 (Electronic) 0031-1820 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28103966> >.

VERAS, P. S.; BEZERRA DE MENEZES, J. P. Using Proteomics to Understand How Leishmania Parasites Survive inside the Host and Establish Infection. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 8, Aug 19 2016. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27548150> >.

WANG, M. et al. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 9, p. 2307-16, Sep 2009. ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19309259> >.

WILLATS, W. G. Phage display: practicalities and prospects. **Plant Mol Biol**, v. 50, n. 6, p. 837-54, Dec 2002. ISSN 0167-4412 (Print) 0167-4412 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12516857 >.

YAO, C. et al. Proteomic examination of Leishmania chagasi plasma membrane proteins: Contrast between avirulent and virulent (metacyclic) parasite forms. **Proteomics Clin Appl**, v. 4, n. 1, p. 4-16, Jan 2010. ISSN 1862-8354 (Electronic) 1862-8346 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21137013> >.

ZHANG, K. Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. **Int J Clin Exp Med**, v. 3, n. 1, p. 33-40, Jan 08 2010. ISSN 1940-5901 (Electronic) 1940-5901 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20369038> >.