Alessandro Aparecido Rodrigues da Silva

Análise funcional da proteína LRR17, rica em repetições de leucina e secretada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*

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.

São Paulo
2011

Alessandro Aparecido Rodrigues da Silva

Análise funcional da proteína LRR17, rica em repetições de leucina e secretada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*

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: Silvia Reni Bortolin Uliana

Versão Original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Silva, Alessandro Aparecido Rodrigues da.

Análise funcional da proteína LRR17, rica em repetições de leucina e secretada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. / Alessandro Aparecido Rodrigues da Silva. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Silvia Reni Bortolin Uliana.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Biologia Molecular e Parasitologia.

Versão do título para o inglês: Functional analysis of the LRR17 protein, rich in leucine repeats and secreted by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis*.

Descritores: 1. *Leishmania* 2. Análise genômica 3. Expressão gênica 4. Proteínas ricas em repetições de leucina 5. Proteínas secretadas 6. I. Uliana, Silvia Reni Bortolin II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0105/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alessandro Aparecido Rodrigues da Silva.

Título da Tese: Análise funcional da proteína LRR17, rica em repetições de leucina e secretada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*.

Orientador(a): Sílvia Reni Bortolin Uliana.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: icb@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **056** nas fls. **57** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Silvia Reni Bortolin Uliana, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Investigação sobre a função de uma proteína de Leishmania rica em repetições de leucina"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Alessandro Aparecido Rodrigues da Silva, Sandra Patrícia Kalil Perdomo** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa) em **24.09.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 25 de setembro de 2008.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEa - ICB/USP

DEDICATÓRIA

À minha esposa Simone Melo, a melhor de todas as minhas publicações.

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

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Silvia Reni Bortolin Uliana, pela oportunidade de realizar meu doutorado em seu laboratório, por toda a dedicação e atenção dispensada a mim ao longo desses quatro anos.

Ao meu grande amigo Prof. Dr. Fernando Franco, que muito me ensinou sobre biologia molecular no início do meu doutorado. Muito obrigado por toda a dedicação profissional e pela amizade fiel.

As duas amigas de laboratório Cristiana Trinconi e Vivian Bonano, pela amizade, carinho, boas risadas e por estarem sempre dispostas a ajudarem nos experimentos. A presença de vocês foram fundamental.

Aos demais colegas de laboratório, Danilo, Jenicer, Rogéria e Sandra pelo companheirismo durante todo este período.

As amigas Fabi Lima , Carol, Rafaela Frassini e Lucila Ávilla, que estiveram conosco por alguns meses, mas deixaram boas lembranças.

Ao Prof. Dr. Ariel Silber pela amizade, aprendizado e discussões científicas. Agradeço também ao seu grupo de trabalho, muito obrigado à todos, por sempre se mostrarem disposto a ajudar.

À Prof^a. Dr^a. Alcira Tânia B. Katzin e mais novo mestrando Alexandre S. Moura, pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

À Prof^a. Dr^a Silvia Celina Alfieri, pelas opiniões no projeto.

À Marta Campaner, pela ajuda para descongelar meus parasitas e descontaminar minhas culturas e pela amizade sincera.

Ao meu amigo Ms.Rodrigo Antonio Ceschini Sussmann, pela amizade e por todo o apoio científico

Aos meus irmãos da Republica Zimbabwe, que representam o que há de mais puro, leal e honesto em uma amizade, ter amigos como vocês é o que torna a nossa existência mais bela e feliz.

À minha família em especial minha mãe, Eunice de Macêdo Taunay "*in memoriam*" pelo exemplo fantástico de mulher, mãe, esposa e pela forma incondicional de me amar.

"Eu poderia viver recluso numa casca de noz e me considerar rei do espaço infinito..."

William Shakespeare – Hamlet Ato 2, Cena 2

Resumo

Taunay-Rodrigues A. Análise funcional da proteína LRR17, rica em repetições de leucina e secretada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* [Tese Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011

As repetições ricas em leucina (LRR) são domínios presentes em diversas famílias de proteínas com diferentes funções, sendo responsáveis pela formação de uma estrutura capaz de estabelecer interações protéicas. Em decorrência do projeto de caracterização de um segmento do cromossomo 17 de *L. (L.) amazonensis*, identificamos um gene que codifica uma proteína de 72 kDa contendo, em sua região central, seis motivos LRR. A região central da proteína LRR17 apresentou similaridade com a porção carboxi-terminal da proteína NOD 3 humana. As proteínas NOD são parte de uma família recentemente identificada de receptores intracelulares, os “nucleotide-binding domain leucine-rich repeat” (NLR), de reconhecimento de padrões associados à patógenos (PAMPs). Genes ortólogos ao identificado em *L. (L.) amazonensis* estão presentes nos genomas de *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis*. Para obtenção de anticorpos específicos contra a proteína LRR17 de *Leishmania*, imunizamos coelhos com peptídeos sintéticos derivados da região N-terminal das proteínas LRR17 de *L. (V.) braziliensis*, *(L.) major*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*. Esse soro foi utilizado em “Western blots”, contendo extrato total de promastigotas de fase logarítmica, estacionária e amastigotas axênicos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, onde encontramos um padrão de reconhecimento com bandas de massa molecular aparente entre 72 kDa e 17 kDa. Observamos também que O gene *LRR17* é regulado de forma distinta ao longo dos ciclos biológicos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. A proteína LRR17 de *L. (V.) braziliensis* é secretada tanto nos estágios promastigota como amastigota. Identificamos também a secreção da proteína LRR17 em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Para estudo da função da proteína LRR17 em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, obtivemos mutantes hiperexpressores da proteína LRR17. As linhagens mutantes foram mais

infectivas em infecções de macrófagos *in vitro* quando comparadas com a linhagem selvagem. A proteína LRR17 parece estar envolvida no processo de invasão do parasita em infecções *in vitro* e no estabelecimento da infecção da forma amastigota de *Leishmania*.

Palavras chave: *Leishmania*. Análise genômica. Expressão gênica. Proteínas ricas em repetições de leucina. Proteínas secretadas.

Abstract

Taunay-Rodrigues A. Functional analysis of the LRR17 protein, rich in leucine repeats and secreted by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis*. [Ph. D. thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011

Leucine-rich repeats (LRRs) are versatile binding motifs found in a variety of proteins involved in protein-protein interactions. During the process of characterizing the *L. (L.) amazonensis* *META1* genomic region, a 2.03 Kb ORF (*LaLRR17*) was identified encoding a protein with 6 LRRs in its central region and presenting similarity with the human NOD3 protein. The *LaLRR17* protein is found in increased abundance in amastigotes and is also secreted to the cytoplasm of *L. (L.) amazonensis*-infected macrophages. An orthologue to *LaLRR17* was identified in *L. (V.) braziliensis* chromosome 17. To study the function of the LRR17 protein in *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* we developed specific polyclonal antibodies against a peptide derived from the amino-terminal regions conserved between *L. (V.) braziliensis*, *(L.) major*, *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) infantum* LRR17 proteins. We found that *LRR17* gene expression is differentially regulated during the life cycle of *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis*. The *LbLRR17* protein is secreted in *L. (V.) braziliensis* promastigotes and amastigotes and the 72 kDa *LaLRR17* protein is also secreted in promastigotes of *L. (L.) amazonensis*. To characterize the function of the LRR17 protein we obtained transgenic parasite lines of *L. (L.) amazonensis* overexpressing the *LaLRR17* gene and of *L. (V.) braziliensis* overexpressing the *LbLRR17* gene. The mutants were more infective to macrophages *in vitro* when compared with the wild type strains, indicating that the LRR17 protein may interact with macrophage molecules, modulating the cellular response to increase parasite survival.

Keywords: *Leishmania*. Genome analysis. Gene expression. Leucine-rich repeat protein. Secreted proteins.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	DNA complementar
C-terminal	carboxi-terminal
DNAg	DNA genômico
dATP	Desoxiadenosina-trifosfato
dCTP	Desoxicitosina-trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina-trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNAse	Desoxiribonuclease
dNTP	Desoxinucleotídeo-trifosfato
D.O.	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimidina-trifosfato
EDTA	Ácido etileno diamino tetraacético
h	Hora
Hyg	Higromicina fosfotransferase
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
KDNA	DNA do Cinetoplasto
LPG	Lipofosfoglicano
LRR	“Leucine-Rich Repeat”
M	Molar
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mg	Miligrama
mL	Mililitro

mM	Milimolar
NK	Células Natural Killer
Neo	Neomicina fosfotransferase
N-terminal	amino-terminal
NLR	“Nucleotide-binding Domain Leucine-Rich Repeat”
NOD	“Nucleotide binding oligomerization domain”
NF-kB	“Nuclear Factor kappa B”
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
ORF	“Open Reading Frame”
pb	Pares de bases
PAMP	“Pathogen-Associated Molecular Patterns”
PRR	“Pattern Recognition Receptors”
PPG	Proteofosfoglicanos.
PBS	Salina em tampão fosfato
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PEG	Polietileno glicol
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoreto
RNA	Ácido ribonucléico
RNAg	Rna guia
RNAse	Ribonuclease
RNAm	RNA mensageiro
RNAr	RNA ribossômico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Tampão citrato de sódio/cloreto de sódio
SLRNA	“spliced-leader RNA”
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
TLR	“Toll-Like receptor”

TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa.
UV	Ultravioleta
V	Volts
$\times g$	Aceleração da gravidade no sistema MKS (9,81 m/s ²)
μCi	Microcurie
μg	Micrograma
$\mu\text{J}/\text{cm}^2$	Microjaules por centímetro quadrado
μL	Microlitro

Sumário

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Considerações Gerais	19
1.2 Arquitetura e processamento do genoma de <i>Leishmania ssp.</i>.....	24
1.3 Interação Parasita-Hospedeiro e Imunologia da Infecção.....	27
1.4 Proteínas com Repetições Ricas em Leucinas	33
2 OBJETIVOS	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Materiais	41
3.1.1 Organismos	41
3.1.1.1 <i>Leishmania sp.</i>.....	41
3.1.1.2 Bactérias	41
3.1.1.3 Camundongos	41
3.1.2 Vetores	41
3.1.3 Oligonucleotídeos	43
3.1.4 Reagentes	44
3.1.5 Enzimas de restrição	44
3.2 Métodos	45
3.2.1 Extração de DNA genômico de tripanosomatídeos	45
3.2.2 Purificação de DNA genômico de <i>Leishmania</i> em pequena escala	45
3.2.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	46
3.2.4 Eletroforese de DNA	46
3.2.5 Southern Blot	46

3.2.6 Sequenciamento de DNA	47
3.2.7 Análise das sequências de nucleotídeos	47
3.2.8 Clonagem Molecular	47
3.2.9 Preparação da bactéria competente	48
3.2.10 Transformação e plaqueamento	48
3.2.11 Triagem de clones por hibridização molecular	48
3.2.12 Reações de hibridização	49
3.2.13 Transfecções	49
3.2.13.1 Construção <i>La</i> [pXG1 NEO LaLRR17 myc]	49
3.2.13.2 Construção do cassete <i>Lb</i> [pSSU-Int Pac I/PmeI]	50
3.2.13.3 Eletroporação	50
3.2.13.4 Obtenção dos clones	51
3.2.14 Obtenção de extrato protéico total de <i>Leishmania</i>	51
3.2.15 Sobrenadante de parasitas	52
3.2.16 Obtenção de amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	52
3.2.17 Eletroforese em SDS-PAGE	53
3.2.18 Western Blot e “imunoblotting”	53
3.2.19 Infecção de macrófagos in vitro	54
3.2.20 Dosagem de Nitrito em sobrenadantes de cultura de infecção	55
3.2.21 Infecção de camundongos BALB/c	55
4. RESULTADOS	57
4.1 Caracterização do gene LRR17 de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	57

4.2 Obtenção de soro anti-LRR17 e detecção da proteína nativa	61
4.3 Obtenção e caracterização de linhagens transgênicas de <i>L. (V.) braziliensis</i> para estudo funcional da proteína LRR17	69
4.4 Obtenção e caracterização de linhagens transgênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i> para estudo funcional da proteína LRR17	77
4.5 Análise da produção de NO em macrófagos infectados com as linhagens transgênicas	83
4.6 Efeito de proteínas secretadas por promastigotas na infecção “in vitro”	85
5 DISCUSSÃO.....	89
6 CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Leishmania é um protozoário tripanosomatídeo, pertencente à ordem Kinetoplastida, causador de um conjunto de doenças de caráter zoonótico denominadas leishmanioses. Estudos moleculares recentes indicam que o gênero tem cerca de 120 milhões de anos e que surgiu ainda na Pangéia, quando os continentes estavam unidos (Thomaz-Soccol, 1993; Noyes, 1998; Kern, 2000). A ordem Kinetoplastida é caracterizada por possuir uma estrutura contendo DNA (kDNA) (Simpson, 1987), chamada cinetoplasto, que se localiza na base do flagelo, posterior ao corpúsculo basal (Simpson, 1973).

Mais de 20 diferentes espécies do gênero *Leishmania* estão relacionadas com patologias em humanos. A leishmaniose é uma doença difundida mundialmente, presente em 88 países, encontrada em áreas tropicais e subtropicais da Ásia, África e América do Sul, com uma estimativa de mais de dois milhões de novos casos a cada ano, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2007). Na América Latina, ela já foi detectada em 12 países e, destes, cerca de 90% dos casos acontecem no Brasil, onde foram notificados, no período de 1990 a 2007, 561.673 casos de leishmanioses, sendo 508.193 (90,5%) casos de leishmaniose tegumentar e 53.480 (9,5%) casos de leishmaniose visceral, segundo dados do Ministério da Saúde.

Nos últimos anos observou-se tanto o surgimento de novas áreas endêmicas como também a expansão da doença naquelas já existentes. No Brasil, novos casos foram descritos não apenas em zonas rurais, mas também em regiões peri-urbanas e urbanas (Camargo-Neves et al., 2002; Jerônimo et al., 2004).

A expansão geográfica das áreas de transmissão se deve tanto ao fluxo constante de indivíduos entre regiões endêmicas e centros urbanos (Schwartz et al., 2006), como também ao desmatamento e urbanização não planejada. O aumento do número de casos de leishmaniose em pacientes imunodeprimidos, principalmente usuários de drogas injetáveis e portadores do vírus “Human immunodeficiency vírus” (HIV) tem favorecido a expansão da doença em áreas urbanas (Dedet e Pratlong, 2000; Cruz et al., 2006; Alvar et al., 2008).

No Brasil, a partir da década de 80 verificou-se aumento no número de casos de leishmaniose registrados, variando de 3.000 (1980) a 37.710 (2001), segundo dados

do Ministério da Saúde. Observaram-se também picos de transmissão a cada cinco anos, apresentando tendência de aumento do número de casos, a partir do ano de 1985 quando se solidificou a implantação das ações de vigilância e controle da doença no país. No período de 1985 a 2005, verificou-se uma média anual de 28.568 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 18,5 casos/100.000 habitantes, sendo que os coeficientes mais elevados foram registrados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes. Na década de 80, as leishmanioses cutânea e muco-cutânea foram assinaladas em 19 estados da federação. Em 2003 foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros, observando-se uma ampla dispersão e, em algumas áreas uma intensa concentração de casos, enquanto em outras os casos apresentam-se isolados.

A leishmaniose é causada por várias espécies de protozoários parasitas como *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) venezuelensis*, entre outras, sendo que as características clínicas da doença dependem tanto da espécie infectante como também da resposta imune do hospedeiro. Podemos definir quatro formas distintas de leishmaniose:

- Cutânea localizada, caracterizada por lesões ulceradas na pele, geralmente na face, nos braços e nas pernas, sendo causada principalmente por *L. (L.) major*, na Europa e Oriente Médio e *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* nas Américas.
- Cutânea difusa, com lesões nodulares distribuídas pelo corpo todo tendo como principal agente etiológico *L. (L.) amazonensis*;
- Muco-cutânea, que causa desfiguração da face e destrói as mucosas oral e nasal, geralmente provocada por *L. (V.) braziliensis*.
- Visceral, também conhecida como calazar, provoca febre, perda de peso, anemia e aumento do fígado e baço, causada por *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*. Esta forma pode ser fatal quando não tratada (Hepburn et al., 2000).

A maioria dos casos de leishmaniose cutânea no Brasil tem como agente etiológico a *L. (V.) braziliensis*. A infecção por esta espécie pode se manifestar inicialmente sob a forma cutânea localizada, com evolução crônica e, em parte dos casos, com cicatrização espontânea da ulceração. As lesões mucosas podem aparecer muitos anos após a cicatrização, espontânea ou por tratamento medicamentoso, da lesão primária. Alguns pacientes desenvolvem a forma mucosa sem qualquer sinal prévio de infecção e essa forma pode ser suficientemente destrutiva para causar a morte por infecção secundária (Veloza et al., 2006). A transmissão de *L. (V.) braziliensis* está presente em todo o território nacional e as leishmanioses cutânea e muco-cutânea representam uma das afecções dermatológicas que merecem mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que podem produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional.

A segunda espécie de maior prevalência entre os agentes causais de leishmaniose cutânea no Brasil é a *L. (L.) amazonensis*, responsável por casos de leishmaniose cutânea e difusa, principalmente distribuídos na região amazônica. A leishmaniose difusa é de ocorrência rara, mas é extremamente grave, já que a resposta à terapêutica é quase sempre inadequada, levando o paciente a quadros progressivos, debilitantes e mutilantes.

O ciclo biológico de todas as espécies de *Leishmania* de mamíferos é heteroxeno, com uma fase promastigota extracelular, multiplicando-se no interior do intestino médio do mosquito vetor (*Phlebotomus* e *Lutzomyia spp*) e uma fase intracelular amastigota, onde o parasita reside e se multiplica dentro do vacúolo fagolisossômico do macrófago de hospedeiros mamíferos (Lainson e Shaw, 1987). Quando o inseto vetor pica um vertebrado infectado, durante o repasto sanguíneo, ingere macrófagos com amastigotas no seu interior. Quando os macrófagos se rompem, os amastigotas, no intestino médio do inseto, assumem a forma promastigota, nesta fase denominada procíclico e se multiplicam avidamente por divisão binária. Cerca de cinco dias após o repasto, estes promastigotas sofrem a metaciclogênese, passando então para a fase de promastigotas metacíclicos, que são as formas

infectantes (Sacks e Perkins, 1985). Estes migram para a probóscide do inseto e então, quando o inseto pica outros hospedeiros sadios, acaba introduzindo estes promastigotas metacíclicos durante o repasto e estes são rapidamente fagocitados por macrófagos, onde se multiplicam por divisão binária e, após o rompimento dos macrófagos, são capazes de infectar outros macrófagos.

Acredita-se que a leishmaniose tegumentar americana (LTA), cujos principais agentes etiológicos são *L. (V) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* seja uma doença autóctone do continente americano (Neiva et al., 1917; Pessoa et al., 1948; Marzochi et al., 1999). Os ceramistas pré-colombianos do Peru, Equador e Colômbia já reproduziam em suas peças de cerâmica (huacos) figuras humanas que apresentavam possivelmente, características patológicas da leishmaniose. Segundo o médico e historiador peruano Lastres (1951), desde a época colonial, vários estudiosos registram dados sobre uma estranha enfermidade da região andina que eles conheciam como “uta”. O cronista espanhol Pedro Pizarro (1571) relatou que, em 1533, os povos situados nos vales quentes do Peru eram dizimados por um mal do nariz associado ao comércio da coca na vertente amazônica, que nos leva a acreditar que era leishmaniose. Provavelmente, essa doença acomete os povos das Américas, desde o período pré-colombiano até os dias atuais.

Os primeiros registros de doenças semelhantes à leishmaniose, fora do continente Americano, também são muito antigos. Desde o século XVIII conhecia-se o botão d’Aleppo (botão de Aleppo, na Síria) e o botão de Biskra, descrito durante a ocupação militar francesa à Biskra, no Irã, no ano de 1844. O registro do calazar também é antigo, principalmente na Índia. Em 1835, médicos gregos descreveram a existência, na ilha de Hidra, próximo a Creta, de uma esplenomegalia infantil que, segundo os registros, assemelhava-se ao calazar.

Somente no final do século XIX é que foram descobertos os agentes etiológicos das leishmanioses, quando Cunningham (1885), na Índia, descreveu formas amastigotas em casos de calazar (Pessoa, 1958). Posteriormente, em 1898, o pesquisador russo Peter Fokitsch Borovsky demonstrou ser um protozoário o agente etiológico do botão d’Aleppo, botão de Deli ou botão do Oriente, publicando assim, a

primeira descrição clara do parasita em uma revista militar russa, mas sem lhe dar nome (Allison, 1993).

Em 1901 o médico escocês William Leishman identificou um protozoário com as formas arredondadas, no baço de um soldado britânico que havia falecido na Índia, em decorrência de uma febre local conhecida como febre "Dum Dum" ou calazar. Seus dados não foram publicados até 1903, quando outro médico britânico, o inglês Charles Donovan, descreveu também um parasita relacionado à mesma febre na Índia. Contudo, haviam dúvidas se o agente etiológico seria um esporozoário ou um protozoário. Com os dados de Leishman, a questão começou a ser resolvida, pois demonstrou-se que um protozoário de formas tripanossomatídeas causava as doenças indianas e orientais.

No mesmo ano, Laveran e Mesnil (1903), ao examinar alguns preparados de Donovan, propuseram o nome *Leishmania donovani* ao agente das infecções viscerais da Índia. Outro destacado médico inglês, Ronald Ross, em 1903, foi o primeiro a conseguir cultivar o parasita e observou que nas culturas ele era visto sob a forma flagelada. Patton (1907), observou as formas amastigotas de leishmanias em monócitos e as formas promastigotas no intestino de insetos que eram alimentados sobre pacientes com calazar (Faust et al., 1974).

As primeiras descrições sobre o parasita da leishmaniose nas Américas foram feitos por Carini e Paranhos, no Sul do Brasil, em 1909. Nesse mesmo ano, a leishmaniose muco-cutânea foi descrita como uma doença presente também no Brasil. Em 1911, Gaspar de Oliveira Vianna, trabalhando no Instituto Oswaldo Cruz, demonstrou a correlação dessas lesões com um protozoário do gênero *Leishmania* dando o nome de *Leishmania brasiliensis* ao parasita. Atualmente a forma adotada é a inglesa, *Leishmania (V.) braziliensis*. A forma visceral foi descrita pela primeira vez no Paraguai, em 1913 e a confirmação de que *Phlebotomus* eram transmissores veio em 1921 (Sergent et al., 1921; Aragão, 1922).

1.2 Arquitetura e processamento do genoma de *Leishmania ssp*

Sucintamente, o estudo da organização do genoma deste parasita revela que a maioria dos genes estruturais estão arranjados em “tandem” (Tschudi et al., 1985; Souza et al., 1992; Medina-Acosta et al., 1993; Landfear et al., 1993; Johner et al., 2006) sendo transcritos sob a forma de RNAs precursores policistrônicos (Johnson et al., 1987; Tschudi e Ullu, 1988). A transcrição nos cromossomos se inicia nas chamadas regiões de “switch”, ou seja, locais do cromossomo onde há mudança da fita de DNA a ser transcrita (Martinez-Calvillo et al., 2003; Martinez-Calvillo et al., 2004) e ocorre por longos segmentos na mesma fita de DNA, podendo ser em direções divergentes ou convergentes. Estas moléculas precursoras são processadas em RNA mensageiros (RNAm) maduros pela adição de uma cauda de poli-Adeninas (poli-A) na região 3' e pela adição de um pequeno RNA líder (SL RNA ou mini-exon) de 39 nucleotídeos na região 5', no fenômeno conhecido como “*trans-splicing*” (Boothroyd e Cross, 1982; Campbell et al., 1984.; Agabian, 1990). Como seqüências necessárias para o “*trans-splicing*” foram definidos a presença do sítio acceptor do SL (um dinucleotídeo AG) e um trato de polipirimidinas (Huang e Van der Ploeg, 1991). A adição da cauda de poli-A ocorre à cerca de 100 a 500 nucleotídeos antecedendo o próximo AG acceptor de SL (LeBowitz et al., 1993; Hartmann et al., 1998).

Este processo de transcrição e processamento faz com que os principais mecanismos de regulação de expressão ocorram em nível pós-transcricional (Aly et al., 1994). As regiões não traduzidas dos RNAm, especialmente a região 3' parecem ser responsáveis pela especificidade de expressão nos diferentes estágios do ciclo (Wu et al., 2000; Brittingham et al., 2001). Vários mecanismos parecem estar envolvidos nessa regulação pós-transcricional, tais como controle da degradação do RNAm, da tradução do RNAm ou por modificação e degradação da proteína (Clayton e Shapira, 2007). Outro mecanismo importante deve-se a modificações pós-transcricionais das seqüências nucleotídicas de regiões codificantes dos transcritos feita por “*RNAs guia*” (Benne et al., 1986)

O DNA do cinetoplasto (kDNA) é formado por dois tipos de moléculas: os minicírculos (com tamanho aproximadamente entre 0,5 a 2,5 Kb) e os maxicírculos (com tamanho variando entre 20 a 38 Kb). Cerca de 10.000 minicírculos e 50

maxicírculos se encontram concatenados, formando uma extensa rede de kDNA. Os maxicírculos codificam RNAs ribossomais e proteínas mitocondriais, enquanto os minicírculos estão relacionados à formação de pequenos “RNAs guia” que controlam a especificidade da “edição” do RNA (Simpson et al., 2000). Todas as outras proteínas mitocondriais e RNA transportadores são codificados no núcleo e importados ao citoplasma (Lukes et al., 2005). A expressão dos genes da mitocôndria é rigorosamente controlada de acordo com a fase de desenvolvimento do parasito e uma das formas de controle desta expressão genética é realizada pela edição do RNA.

O processo de edição do RNA, em tripanossomatídeos, consiste na adição (ou, menos freqüentemente, na remoção) de uridinas (U), alterando a sequência do pré-RNAm e, assim, o sentido da sua mensagem. A informação que especifica como o pré-RNAm deve ser alterado está contida em pequenas moléculas de RNA (com cerca de 40 a 80 nucleotídeos) transcritas separadamente, constituindo o RNAg. Estas moléculas contêm, na extremidade 5', uma sequência complementar a uma das extremidades da cadeia de RNAm a ser editado, seguida de uma sequência que especifica quais os nucleotídeos a serem inseridos no transcrito e, por fim, na extremidade 3', contém uma sequência contínua de nucleotídeos de uridinas (Benne et al; 1986; Benne, 1994; Seiwert e Stuart, 1994; Simpson e Thiemann, 1995; Lukes et al., 2005).

Acredita-se que a função da edição do RNA seja a produção de diferentes cadeias de RNAm em diferentes situações, podendo ser visto como um mecanismo “primitivo” de alteração da expressão gênica. Esta hipótese é suportada pelo fato de os tripanosomatídeos serem organismos eucariotas unicelulares muito antigos, que desde muito cedo divergiram da linha evolutiva que conduziu às plantas e aos animais, e por se considerar que as próprias mitocôndrias contêm um sistema genético primitivo (Sollner-Webb, 1991).

A importância clínica e epidemiológica das leishmanioses foi o fator decisivo para que, em 1994, fosse tomada pela OMS a decisão de estimular o projeto de seqüenciamento do genoma de uma espécie de *Leishmania*. A escolha do comitê responsável recaiu sobre a espécie mais estudada até aquele momento, *L. (L.) major*. Durante os anos seguintes foram também seqüenciados os genomas dos

tripanossomatídeos, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. O seqüenciamento do genoma desses três organismos foi concluído simultaneamente, em 2005 (Ivens et al., 2005; Berriman et al., 2005; El-Sayed et al., 2005). Os dados resultantes do seqüenciamento do genoma de *L. (L.) major* permitiram confirmar informações anteriores sobre a estrutura e fisiologia genômica nesses organismos, assim como trouxeram ferramentas para que novos dados fossem obtidos. O genoma haplóide de *L. (L.) major*, com 32.8 Mb, está distribuído em 36 cromossomos. O seqüenciamento identificou a presença de 911 genes que transcrevem RNA, 39 pseudogenes e 8.272 genes que codificam proteínas, dos quais apenas 36% podem ser atribuídos função putativa (Ivens et al., 2005).

A comparação entre os genomas de *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*, espécies que causam doenças com manifestações clínicas diferentes, identificou um alto grau de conservação entre as seqüências codificantes e sintonia entre os genes (Peacock et al., 2007). Poucos dentre os genes identificados são espécie-específicos e podem estar envolvidos na diferença de virulência entre os parasitas (Peacock et al., 2007). Em *L. (L.) donovani*, por exemplo, o gene *A2* é fundamental para sobrevivência nos órgãos viscerais e está relacionado à patologia característica desta espécie: a forma visceral. O interessante é que em *L. (L.) major*, o gene *A2* foi encontrado na forma de pseudogene (Peacock et al., 2007) e em *L. (L.) tarentolae* o gene *A2* está ausente (Mizbani et al., 2011).

Em *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum* não foi identificada a presença da maquinaria responsável por gerar diversidade no DNA, encontrada em outros eucariotos. A falta, por exemplo, de elementos de transposição favorece a estabilidade dos cromossomos (Peacock et al., 2007). Em *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei* várias classes de transposons estão presentes no genoma, como os elementos LTR ("long terminal repeat"), *ingi/L1 Tc*, *SLACS/CZAR* e os retrotransposons LTR VIPER (Peacock et al., 2007). Em adição, os telômeros de *L. (V.) braziliensis* contêm uma família de elementos de transposons ainda não conhecida (Peacock et al., 2007).

Estudos de microarranjos de DNA permitiram estudar a expressão global de genes em estágios específicos de *L. (L.) major*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) mexicana* (Brown e Botstein, 1999). Com isso, foi identificada a presença de poucos genes com

expressão estágio-regulada, sendo a maioria dos genes expressos de forma constitutiva em todos os estágios de vida do parasita (Cohen-Freue et al., 2007; Rochette et al., 2008, 2009).

O estudo da expressão global de proteínas em estágios específicos de algumas espécies de *Leishmania*, como *L. (L.) infantum* (Acestor et al., 2002; El Fakhry et al., 2002), *L. (L.) donovani* (Bente et al., 2003), *L. (L.) mexicana* (Leifso et al., 2004) e *L. (V.) panamensis* (Walker et al., 2006) demonstraram que a expressão dos RNAm determinada por análise de microarranjos de DNA não tem correlação precisa com a expressão de proteínas (Zhang et al., 2004; Domom e Aebersold, 2006; Mcnicoll et al., 2006; Leifso et al., 2007).

1.3 Interação Parasita-Hospedeiro e Imunologia da Infecção

O largo espectro fenotípico das leishmanioses está relacionado à espécie infectante, bem como à resposta imunológica do hospedeiro, que envolvem componentes tanto do sistema imune humoral quanto celular.

Como o parasita é obrigatoriamente intracelular no hospedeiro mamífero, seu primeiro alvo são os macrófagos e células dendríticas, podendo também infectar fibroblastos e neutrófilos (Körner et al., 2006). Para invadir essas células, as *Leishmanias* desenvolveram uma série de estratégias que permitem contrariar a atividade dos macrófagos e resistir ao sistema de defesa do hospedeiro. Sucintamente, podemos dizer que o sucesso da invasão do parasita processa-se em três etapas principais: reconhecimento e entrada no macrófago, resistindo aos componentes citotóxicos do soro; sobrevivência e multiplicação dentro dos macrófagos e modulação da resposta imune mediada pelos linfócitos T (Bogdan et al., 1990b). As formas promastigotas metacíclicas inoculadas no hospedeiro são eficientes no escape à resposta imune inata, utilizando mecanismos como resistência à ativação do sistema complemento, modulação da produção de citocinas e quimiocinas, interferência nos processos de migração e apoptose celulares e modificação do micro-ambiente intracelular para diminuir os efeitos microbicidas dos macrófagos (Awasthi et al., 2004).

Os mais importantes receptores dos macrófagos envolvidos na adesão e fagocitose da forma promastigota invasora são os receptores para moléculas do

complemento CR₁ e CR₃, os receptores de manose-fucose, os receptores Fc γ RI e Fc γ RII que são importantes no reconhecimento do parasita opsonizado com anticorpos específicos, e o receptor de fibronectina.

A ativação do complemento leva à formação do componente C5a, o qual atrai os macrófagos para a área da infecção, através de um gradiente quimiotático. Outro efeito da ativação do complemento é a opsonização do parasita por fixação das proteínas C3b ou C3bi, facilitando a associação do parasita com os receptores do complemento CR1 e CR3, respectivamente, favorecendo assim a entrada do parasita nas células fagocíticas. O C3b pode também favorecer a formação dos complexos C5b-C9, que medeiam a lise da membrana dos parasitas.

A capacidade de resistência das formas promastigotas metacíclicas à lise pelo complemento não é devida à ausência de ligação e ativação do mesmo, parecendo antes estar relacionada com a expressão de moléculas na superfície do parasita. As moléculas presentes na superfície do parasita, nesta fase do ciclo, são modificadas para protegê-lo da lise pelo sistema complemento, promover a opsonização e facilitar a entrada na célula hospedeira (McConville et al., 1991; McConville et al., 1992).

A interação entre a forma promastigota metacíclica de *Leishmania* com a célula fagocítica ocorre através de moléculas ancoradas à membrana por meio da ligação com uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Naderer et al., 2004). Duas das moléculas mais abundantes na membrana do parasita desempenham um papel crucial nesse contexto: a glicoproteína de 63 kD (gp63) e o lipofosfoglicano (LPG). A gp63 é a segunda molécula mais abundante na membrana e está envolvida na entrada da forma promastigota no macrófago. Linhagens mutantes hiper-expressoras da proteína gp63 são mais eficientes na ligação ao macrófago comparados aos parasitas da linhagem selvagem (Liu e Chang, 1992). Muitos autores a tem indicado como responsável pela resistência à lise pelo complemento através da clivagem do C3b à sua forma inativa (iC3b), a qual se mantém opsonizadora, mas perde a capacidade de induzir a formação do complexo C5b-C9 (Yao et al., 2003).

A molécula mais abundante na forma promastigota é o LPG que na forma invasiva metacíclica apresenta o número de repetições de oligossacarídeos fosforilados duplicado e alguns constituintes alterados (McConville et al., 1992). Essa molécula é

importante para sobrevivência do parasita durante a transmissão pelo vetor, protegendo-o contra o complemento e agindo como ligante para adesão ao macrófago (Naderer et al., 2004). Trabalhos mostram que a infecção com *L. (L.) major* deficiente em LPG resulta na baixa sobrevivência do parasita em camundongos e atenua a virulência em macrófagos (Ilg et al., 1999; Turco et al., 2001). Entretanto, promastigotas de *L. (L.) mexicana* deficientes em LPG não apresentaram fenótipo alterado durante a infecção (Ilg, 2000).

Após a internalização do parasita ocorre a fusão do vacúolo parasitóforo com lisossomos (Prina et al., 2004; Körner et al., 2006; Real et al., 2010). O tipo de vacúolo formado pela *Leishmania* varia de acordo com a espécie: *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) pifanoi*, por exemplo, são encontradas dentro de um largo vacúolo enquanto *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* vivem dentro de um pequeno vacúolo.

A passagem da forma promastigota para a forma amastigota é acompanhada por uma diminuição da expressão do LPG. Nesse novo cenário, as formas amastigotas para resistirem a um meio ácido e rico em proteases do vacúolo parasitóforo, utilizam-se de mecanismos como a indução de alterações na homeostase do macrófago. Os parasitas promovem assim o aumento da concentração de Ca^{2+} dentro do macrófago, alterando as suas vias de sinalização dependentes do Ca^{2+} . Como consequência, os macrófagos ficam com os mecanismos de resposta a estímulos internos alterados, afetando funções de combate ao parasita, como o choque oxidativo e a expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II (Olivier, 1996).

A resposta imune decorrente das interações *Leishmania*-macrófago, exercem um forte impacto tanto no desenvolvimento quanto na supressão da doença. Células ativadas como macrófagos, células “natural killer” (NK) e linfócitos T desempenham um papel crucial na defesa do hospedeiro contra a infecção por *Leishmania*. Na forma visceral da doença, observa-se uma intensa resposta humoral, com produção de elevados níveis de gamaglobulinas, principalmente IgG e IgM. Algumas delas representam anticorpos específicos, enquanto outras são resultantes da ativação policlonal das células B (Raziuddin et al., 1992). No entanto, os elevados níveis de

anticorpos não impedem a progressão da doença e estão associados a uma profunda diminuição da imunidade celular (Rezai et al., 1978; Dunan et al., 1990).

Os hospedeiros vertebrados possuem um conjunto de moléculas do MHC que se ligam a peptídeos antigênicos, de forma que estes sejam reconhecidos pelo sistema imune. No macrófago, as moléculas da classe II, associadas a peptídeos parasitários provenientes de compartimentos celulares acídicos, posicionam-se na membrana externa, de forma a serem reconhecidos pelas células T, sinalizando, deste modo, a existência da infecção intracelular (Paul, 1993).

Ao reconhecerem o antígeno, que lhes é apresentado pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), as células T $CD4^+$ ficam ativadas e produzem citocinas. A ativação da produção de citocinas pela célula hospedeira tem um papel crucial no estabelecimento da infecção. Após estimulação, as células T $CD4^+$ podem diferenciar-se funcionalmente em duas sub-populações, T “helper” 1 (Th1) e T “helper” 2 (Th2). As células Th1 e Th2 diferenciam-se a partir de precursores Th “naive” (sem experiência prévia de contato com antígeno), em resposta a citocinas. A interleucina 12 (IL-12), produzida pelos macrófagos e células dendríticas, é essencial para desencadear uma resposta do tipo Th1, enquanto a IL-4 direciona o desenvolvimento da sub-população Th2. Estas sub-populações diferem no padrão de citocinas produzidas e, conseqüentemente, na sua função. As células Th1 produzem IL-2, IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e conduzem a imunidade celular, resultando na ativação dos macrófagos e de células T $CD8^+$ citotóxicas e subsequente morte dos parasitas. As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, as quais inibem a ativação dos macrófagos e induzem uma resposta humoral não protetora na leishmaniose.

No modelo de infecção por *L. (L.) major* uma resposta celular Th1 está relacionada com a resistência ao parasita enquanto uma resposta celular Th2 geralmente significa susceptibilidade à doença (Alexander e Bryson, 2005). Estas diferenças na resposta celular estão diretamente relacionadas à ativação de fatores de transcrição envolvidos no controle da expressão de diferentes citocinas como IL-12 e TNF- α (Ji et al., 2002).

Já no modelo de infecção por *L. (V.) braziliensis* encontramos uma resposta por células T específicas, tanto Th1 como Th2, direcionada para uma forte resposta do tipo Th1. A resposta exacerbada do tipo Th1 está associada a uma crônica e severa destruição tecidual, em razão de uma forte resposta inflamatória, e à escassez de parasitos nas lesões (Bacellar et al., 2002; Matos et al., 2005).

Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ são produzidas, além de IL-4. Essa resposta é fracamente regulada por IL-10 e TGF- β , encontradas em níveis baixos, mostrando que uma resposta inadequada do tipo Th1, considerada protetora na maioria das formas dessa doença, pode levar a uma imunopatogênese exacerbada (Bacellar et al., 2002; Amato et al., 2003). A forma muco-cutânea está também relacionada a elevados níveis de anticorpos circulantes, como IgG1 e, principalmente, IgG3 (Junqueira Pedras et al., 2003).

A ativação de células T é também influenciada pela co-estimulação dessas células pelas células que apresentam antígenos. A co-estimulação através da molécula CD28 nas células T resulta na eficiente ativação e proliferação de células T induzidas pelo antígeno e prolonga a sobrevivência celular e a produção de citocinas. Estudos sugerem que a expressão de CD40, CD80 e CD86 tem um impacto importante na resposta imune anti-*Leishmania*. O bloqueio dessas moléculas promove a inibição na produção de IFN- γ , IL-5 e IL-12 (Brodskyn et al., 2001). Recentes estudos demonstram que a resposta Th1, formada após infecção por *L. (V.) braziliensis*, é acompanhada pela resposta de células T produtoras de IL-10. Citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-12 podem ser tóxicas quando produzidas em quantidades elevadas e a IL-10 bloqueia a ativação de células Th1 e, conseqüentemente, previne a superprodução dessas citocinas, evitando dano tecidual (Antonelli et al., 2004). A IL-10 também inibe a ativação macrofágica, como a expressão de moléculas co-estimulatórias como B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) e moléculas de adesão intercelular, diminuindo a habilidade dessas células em destruir a *Leishmania* (Bourreau et al., 2001).

O NF- κ B é um fator de transcrição de células eucarióticas que regula a expressão de numerosos genes que participam na resposta imune e inflamatória (Schreck, 1992). Em mamíferos, proteínas desta família (c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65) e RelB) encontram-se no citoplasma na sua forma

inativa. Quando há a fosforilação de uma proteína repressora (I κ B) dessas moléculas, elas tornam-se ativas, formando um dímero específico e são translocadas para o núcleo, ligando-se a seqüências promotoras no DNA e induzindo a expressão gênica (Baldwin, 1996). Os dímeros formados pelos complexos p50 e RelA são os mais conhecidos. Certos dímeros aparentemente não existem, por exemplo, RelB dimeriza somente com p50 ou p52. A habilidade de diferentes dímeros reconhecerem diferentes seqüências de DNA aumenta a capacidade das subunidades do NF- κ B de regular a expressão de diferentes genes (Baldwin, 1996). Alguns autores sugerem que *Leishmania* não somente inibe a translocação do NF- κ B, mas também module a formação dos complexos que são translocados para o núcleo (Guizani-Tabbane et al., 2004).

Outra estratégia, utilizada pela *Leishmania* como escape ao parasitismo é a morte celular programada ou apoptose, que se caracteriza pela ativação de proteases endógenas, como por exemplo, as caspases. Como resultado, temos rompimento do citoesqueleto, encolhimento celular e fragmentação do DNA (Raff, 1998). A inibição do desencadeamento de apoptose em macrófagos ou neutrófilos parasitados por *Leishmania* (Filardy et al., 2011) bem como a inibição da translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo (Guizani-Tabbane et al., 2004), são considerados importantes mecanismos de evasão às defesas do hospedeiro e estabelecimento da infecção.

A resposta imunológica em humanos também é influenciada pelas moléculas contidas na saliva dos flebótomos, como proteínas, enzimas e prostaglandinas. Além de serem anticoagulantes e vasodilatadores, atuam na supressão da resposta inflamatória e na modulação de citocinas (Gillespie et al., 2000). Moléculas imunogênicas presentes na saliva de flebótomos podem atuar como adjuvantes no desenvolvimento de vacinas, visto que, em modelo experimental, a pré-exposição à saliva protege contra uma infecção exacerbada causada por *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*.

Uma característica comum em infecções por *Leishmania*, após cura clínica da doença, é a persistência parasitária. Vários mecanismos imunológicos, como modulação das atividades microbidas do hospedeiro, síntese de citocinas inibitórias,

falha na ativação de células T ou isolamento do parasito dentro de células que não produzem uma resposta imune, promovem a persistência do parasito. Esse fato talvez possa ser explicado como uma garantia da transmissão e, conseqüentemente, da manutenção do ciclo do parasito (Mendonça et al., 2004). A demonstração dessa persistência em indivíduos curados clinicamente levanta várias questões a respeito da evolução clínica, da epidemiologia e das estratégias para o controle da leishmaniose (Mendonça et al., 2004).

1.4 Proteínas com Repetições Ricas em Leucinas

A primeira proteína descrita com domínios de repetições ricas em leucinas, [LRR-leucine-rich repeat], foi identificada na glicoproteína do soro humano “leucine-rich α_2 -glyco-protein” (Takahashi et al., 1985). Atualmente, há pelo menos 200 proteínas com essas repetições, em uma lista que vem crescendo constantemente.

Os domínios LRR geralmente contêm 11 resíduos de aminoácidos conservados (LxxLxLxx^N/CXL – onde x pode ser um aminoácido qualquer, L representa o aminoácido Leucina, podendo também ser ocupado por valina, isoleucina e fenilalanina). Existem seis subfamílias de proteínas com domínios LRR, baseando-se no comprimento dos motivos e nas sequências consenso (Típica, Inibidor de “ribonuclease-like”, Bacteriana, Planta, Contendo-cisteína e “SD22-like”) (Kajava et al., 1998). Os motivos LRR possuem uma estrutura molecular em forma de α -hélices e folhas β . As folhas β são altamente conservadas entre as diferentes proteínas, enquanto as demais regiões apresentam grandes variações (Kobe e Deisenhofer, 1995; Buchanan e Gay, 1996). As unidades dos motivos em α -hélices e folhas β são conectadas em alças e paralelamente arranjadas em um eixo comum, originando uma estrutura em forma de ferradura (Kobe e Deisenhofer, 1995; Buchanan e Gay, 1996; Kajava, 1998). As folhas β cobrem a face côncava da estrutura em ferradura, enquanto as hélices flanqueiam o perímetro da circunferência. Toda essa estrutura molecular é estabilizada por ligações dissulfeto.

Os motivos LRR formam distintos arranjos moleculares, que estão presentes em uma variedade de proteínas, encontradas em todos os reinos filogenéticos. Em plantas as interações com patógenos ocorrem pela associação das proteínas do

parasita, com proteínas que apresentam motivos LRR, codificadas por genes de resistência em plantas (genes R) (Dangl e Jones, 2001). As proteínas contendo domínios LRR não se limitam apenas às interações proteínas-proteínas, participando de relevantes processos biológicos como reparo de DNA, adesão celular, transdução de sinal, desenvolvimento, transcrição e processamento de RNA. Ainda não se conhece um perfil padrão compartilhado entre os ligantes e os domínios LRR, o que indica que os motivos LRR sejam estruturas versáteis, capazes de acomodar ligantes com a mínima identidade de sequências através de uma ligação estável.

Os motivos LRR presentes em proteínas de mamíferos e plantas estão envolvidos em interações protéicas (Kobe e Kajava, 2001), inclusive nas interações de parasitas com a célula hospedeira (Kedzierski et al., 2004; McGuinness et al., 2003; Takeda et al., 2003; Campos et al., 2001). Os indivíduos sadios são protegidos contra patógenos por meio de diferentes mecanismos. Um desses mecanismos protetores é a imunidade inata, que em contraste com a imunidade adquirida é imediatamente ativada, não necessitando de um prévio encontro com o microorganismo para poder desencadear uma resposta imunológica. Portanto, para responder rapidamente à invasão de um patógeno as células que atuam na linha de ação da imunidade inata, como macrófagos, reconhecem moléculas altamente conservadas, PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), como lipopolisacarídeos, peptideoglicanos, lipoproteínas bacterianas, flagelina (subunidade monomérica do flagelo que propicia mobilidade às bactérias) e estruturas do material genético de bactérias e vírus. Esse reconhecimento é feito através de receptores conhecido como PRRs ("Pattern Recognition Receptors") capazes de reconhecer essas moléculas conservadas nos diferentes patógenos (Akira et al., 2006). Entretanto, esses mecanismos de reconhecimento e defesa imunológica não estão totalmente compreendidos, pois se especula que haja a participação de várias proteínas e sinais liberados pela célula que possam influenciar no processo (Karin et al., 2006).

Muitas famílias de proteínas contendo domínios LRRs estão bem caracterizadas em bactérias, que utilizam a expressão dessas proteínas para invadirem a célula hospedeira e suprimirem as defesas do hospedeiro (Kedzierski et al., 2004). *Listeria monocytogenes*, por exemplo, contém nove proteínas dessa família já

caracterizadas, com 22 motivos LRRs cada, e estão envolvidas na invasão celular do hospedeiro mamífero (Marino et al., 1999). A proteína Internalina A (InlA) da bactéria *Listeria monocytogenes*, por exemplo, está relacionada à entrada em células epiteliais do intestino enquanto a proteína Internalina B (InlB) promove a invasão de hepatócitos, fibroblastos e células endoteliais através da interação com receptores celulares (Lingnau, 1995). Isso foi confirmado quando anticorpos que se ligam ao domínio LRR da proteína InlB bloquearam a invasão pela bactéria (Mengaud et al., 1996). Proteínas contendo domínios LRR, expressas pelas bactérias *Salmonella* e *Shigella* estão envolvidas na inibição do Fator Nuclear (NF)- κ B, contribuindo assim para a persistência da bactéria e colonização dos tecidos do hospedeiro (Haraga e Miller, 2003).

Há poucas proteínas contendo domínios LRR caracterizadas em *Leishmania*. É provável que os motivos LRR de protozoários parasitas, tenham um papel na virulência desses organismos similares ao de bactérias (Kedzierski et al., 2004). Recentemente, uma nova proteína (TvBspA-like-625), contendo 12 domínios LRR foi identificada em *Trichomonas vaginalis*. Acredita-se que esta proteína esteja envolvida nas interações entre *T. vaginalis* e células do epitélio vaginal, bem como proteínas da matriz extracelular do hospedeiro (Hirt et al., 2002). As proteínas CWP₁ e CWP₂ de *Giardia lamblia* possuem domínios LRR e participam da formação do complexo protéico durante o processo de encistamento. A CWP₁ e a CWP₂ possuem, cada uma, 24 repetições ricas em leucina (Luján, 1995).

Em *Leishmania*, o antígeno de superfície (PSA-2), por exemplo, foi identificado na região extracelular do glicocálix de formas promastigotas do parasita e está envolvido na invasão do macrófago. A proteína PSA-2 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; Jimenez-Ruiz et al., 1998). Outro exemplo é a proteína LRR de *L. (L.) infantum* (acesso Gen-Bank: *LinJ34.0550*), recém caracterizada. Essa proteína contém repetições LRRs na sua região amino-terminal e acredita-se que esteja envolvida na resistência a antimoniais na fase amastigota (Genest et al., 2007).

Proteínas contendo domínios LRR como Proteofosfoglicanos (PPG) (Ilg et al., 1999), foram identificados também no glicocálix extracelular de *Leishmania*.

Glicoconjugados de membrana como as proteínas gp63, LPG e PPG, estão implicados na associação e invasão do macrófago do hospedeiro (Greene et al., 2001; Handman, 1999). O LPG e PPG são expressos extracelularmente, interagindo com receptores presentes no macrófago do hospedeiro. O PPG secretado pode ligar-se ao macrófago e modular a sua biologia, através de glicanos compartilhados entre PPG e LPG (Piani et al., 1999). Quando o gene que codifica o PPG associado à membrana foi clonado (Ilg et al., 1999), a análise da sequência revelou a presença de motivos LRR com alta similaridade em relação aos domínios LRR anteriormente descritos na glicoproteína PSA-2 (Montgomery et al., 2000; Jiménez-Ruiz., 1998). Uma alta similaridade também foi encontrada entre as sequências de aminoácidos das proteínas PPG e PSA-2 e a família de proteínas Internalina de *Li. monocytogenes*. É provável que como as proteínas Internalina, as proteínas PPG e PSA-2 estejam envolvidas no mecanismo de invasão a célula hospedeira (Kedzierski et al., 2004).

Algumas das moléculas de *Leishmania* com expressão regulada parecem estar envolvidas na virulência do parasita interferindo direta ou indiretamente no controle da doença. As moléculas descritas anteriormente como a glicoproteína de superfície gp63 que apresenta regulação diferencial durante a metaciclogênese (Chen et al., 2000) e a proteína A2 que é expressa na superfície da forma amastigota de *L. (L.) donovani* (Zhang e Matlashewski, 2001) são exemplos disso. Dentre os genes expressos predominantemente em estágios infectivos já identificados estão os genes *META 1* e *META 2*, inicialmente caracterizado em *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente, estes genes possuem um padrão de transcrição regulada, sendo mais expressos na forma de promastigota metacíclico e estão presente em outras espécies de *Leishmania* (Coulson e Smith, 1990; Nourbakhsh et al., 1996).

Um estudo comparativo entre as sequências de um pequeno fragmento do cromossomo 17 de *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis* foi realizado, mostrando alto grau de sintonia e similaridade de sequência (Ramos et al., 2004). Essa região do cromossomo 17 foi escolhida por ser a região onde se localizam os genes *META 1* e *META 2*. O papel do gene *META 1* na virulência de *L. (L.) amazonensis* havia sido previamente demonstrado (Uliana et al., 1999). A comparação entre o genoma de *L.*

(L.) major e *L. (L.) amazonensis* nessa região revelou similaridade de 90.4% para as regiões codificadoras e 77.0% para as regiões intergênicas.

O estudo do padrão de expressão de oito ORFs identificadas na região estudada revelou a presença de vários genes com padrão de expressão semelhante ao dos gene *META* (Ramos et al., 2004). Entretanto um dos genes, localizado a 3' do gene *META 1* apresenta expressão regulada na forma amastigota de *L. (L.) amazonensis*, ou seja, na fase intracelular do hospedeiro mamífero e codifica uma proteína contendo repetições ricas em leucina.

A identificação de um gene *LRR17* em *L. (L.) amazonensis* – *LaLRR17*, que codifica uma proteína putativa que tem similaridade com a proteína NOD3 humana, despertou grande interesse, já que mecanismos de defesa inata estão certamente implicados na resposta à infecção por esses protozoários. O transcrito *LaLRR17* é mais abundante em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e dados obtidos em nosso laboratório mostram que a proteína *LaLRR17* é secretada para o citoplasma da célula hospedeira, sugerindo que a mesma possa agir como mediadora da interação entre o amastigota e o macrófago (Franco e Uliana, 2008). Genes ortólogos ao identificado em *L. (L.) amazonensis* estão presentes nos genomas de *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis*. Um estudo mais detalhado da região do genoma de *L. (V.) braziliensis* contendo o ortólogo do gene *LaLRR17* (LbrM17_V2_0920, GeneDB) permitiu a identificação de uma cópia truncada do gene *LbLRR17*, chamada por nós de *LbLRR17.2* (LbrM17_v2_990, GeneDB), que codifica os primeiros 84 aminoácidos da proteína *LbLRR17*.

2 OBJETIVOS

Objetivos específicos:

- Caracterizar estruturalmente os genes *LbLRR17* e *LbLRR17.2* de *L. (V.) braziliensis*.
- Caracterizar o padrão de expressão da proteína LRR17 em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.
- Obtenção de mutantes de *L. (V.) braziliensis* hiperexpressores da proteína LbLRR17.
- Obtenção de mutantes de *L. (L.) amazonensis* hiperexpressores de proteína LaLRR17.
- Caracterizar funcionalmente a proteína LRR17 com o estudo do fenótipo de linhagens transgênicas do gene *LRR17* em infecções *in vitro* e *in vivo*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Organismos

3.1.1.1 *Leishmania* sp

Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/73/M2269 e *L. (L.) major* (MHOM/IL/80/Friedlin) foram cultivados em meio M199 (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 40 mM HEPES pH 7,4, 0,1 mM adenina, 0,005% hemina e 100 µg/mL penicilina/estreptomicina, e incubados a 25 °C, com repiques a cada sete dias.

3.1.1.2 Bactérias

- *Escherichia coli* / linhagem BL21 StarTM(DE3) pLysS [F- *ompT hsdS_B* (*r_B⁻m_B⁻*) *gal dcm* (DE3) pLysS (CamR)] (Invitrogen) cultivada em meio LB (1% bacto-triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,18 M NaCl) com 34 µg/mL cloranfenicol.
- *Escherichia coli* /linhagem DH5α (F⁻ϕ 80d*lacZ* Δ M15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 hsdR17* (*r_k⁻m_k⁺*) *deoR thi-1 pHoA supE44 λ⁻gyrA96 relA1*) (Gibco-BRL) cultivada em meio LB (1% bacto-triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,18 M NaCl).

3.1.1.3 Camundongos

Camundongos BALB/c fêmeas com aproximadamente quatro semanas de idade, provenientes do biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

3.1.2 Vetores

- **pBS-myc:** Criado a partir do vetor pBlueScript II SK (+/-) (Stratagene), possui inserido uma sequência codificadora do epitopo viral *myc* mais a sequência codificadora de 6 histidinas na região de sítios de clonagem. Esse plasmídeo foi gentilmente cedido pela Dr^a. Maria Del Carmem Becerra (Centre de Recerca en Salut, Barcelona, Espanha).

- **pAE:** (Ramos et al., 2004): Originado dos vetores pET3-His (Novagen) e pRSET (Invitrogen), caracteriza-se por ser um vetor com alto número de cópias e com 2,8 kb para expressão de proteínas recombinantes em fusão com uma cauda de seis histidinas na região N-terminal. Foi cedido pelo Prof. Dr. Paulo Lee Ho do Instituto Butantã - USP.
- **pCR4-Topo:** (Cloning Invitrogen): Vetor linearizado com uma única desoxitimidina (T) na extremidade 3' conferindo um sítio eficiente de clonagem "AT" para produtos de PCR. Possui a Topoisomerase I do vírus *Vaccinia* que liga o DNA dupla fita do produto de PCR no vetor. Confere resistência a ampicilina.
- **pXG:** É um vetor específico para expressão em *Leishmania* de 6,821 Kb. Contém as regiões 5' e 3' do gene dihidrofolato redutase timidilato sintase (*DHFRTS*) DE *L. (L.) major* e confere resistência à geneticina. Foi construído no laboratório do Dr. Stephen Beverley [St Louis, USA] e cedido gentilmente pelo professor Dr. Luiz Tosi (FMRP-USP).
- **pSSU-int:** (Misslitz et al., 2000): É um vetor originado a partir de uma modificação parcial no vetor pNEB193 (New England Biolabs), na região dos sítios múltiplos de clonagem (MCS) para que o pSSU-Int pudesse integrar no locus do DNA ribossômico (rDNA) especificamente nas repetições da subunidade menor 18S rDNA. O cassete que é integrado no genoma de *Leishmania* contém nas extremidades partes das sequências 5' e 3' da subunidade menor de rDNA de *L.(L.) tarentolae* (5'SSU e 3'SSU, respectivamente) a fim de promover a recombinação homóloga. A 3' da região 5'SSU há um sítio aceitor de "splicing" (SAS), um sítio múltiplo de clonagem (MSC), a sequência codificadora da higromicina fosfotransferase (HYG) seguida da região intergênica do locus do gene da Cisteína Proteinase B (CPB) e finalmente a sequência 3'SSU. Este vetor foi gentilmente cedido pelo Dr. Toni Aebischer [Edimburgo, RU].

3.1.3 Oligonucleotídeos

Quadro 1 – Sequências dos oligonucleotídeos utilizados.

Nome	Sequências	TM (°C)
LbLRR 5 UTR	5'GGTGTAGGCGCTGATATTGCT 3'	59
LbLRR 3 UTR	5'AGCATAGGTACGCAGCACGCTGC 3'	69
LbLRR17 <i>Bam</i> HI-1-23	5'CGGGATCCATGTTGAATACTACCTTGCGTAC 3'	59
LbLRR17 <i>Hind</i> III-2030-2009	5'CCCAAGCTTTTAGAGACTTCGGCCTGTCATG 3'	61
LbLRR17.2-60-42	5'CAGCACCTGCAGCTGCGG 3'	57
LbLRR17.2-432-412	5'ATGAGGCGTGGCAGTTGCCG 3'	61
LbLRR17-527-544	5'GCCGTCCGGTGCCATGC 3'	53
LbLRR17-1562-1544	5'CTTCGCACTGGTTCTCCAC 3'	53
LEM1-54	5'CGGGATCCTGCACCGGCGGGTGTG 3'	59
LbLRR17 <i>Bam</i> HI-2030-2009	5'CGGGATCCTTAGAGACTTCGGCCTGTCAATG 3'	61
H5	5'CGGGATCCATGAAAAGCCTGAACTCAC3'	51
H3	5'GCTCTAGACTCTATTCCTTTGCCCTCG3'	47
S1	5'GATCTGGTTGATTCTGCCAG3'	55
S4	5'GATCCAGCTGCAGGTTACC3'	59
LbLRR17+3'UTR <i>Bam</i> HI	5'CTGTGTATAGCACTCGTCCGAC3'	59
LmLRR17- F	5'GCATGCTGAATGCCGCCCTGCG3'	59
LmLRR17- R	5'TTTGACACTTCGTGTCATGCG3'	59
LbLRR17 <i>Hind</i> III-2030-2009	5'CCCAAGCTTTTAGAGACTTCGGCCTGTCATG3'	61

3.1.4 Enzimas de restrição

Todas as enzimas de restrição utilizadas foram adquiridas de New England, Biolabs ou Fermentas e as digestões foram realizadas seguindo o protocolo descrito pelo fabricante.

3.1.5 Reagentes

Reagentes grau P.A foram obtidos das empresas Sigma ou Merck.

3.2 Métodos

3.2.1 Extração de DNA genômico de tripanosomatídeos

Culturas de promastigotas de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis*, com aproximadamente 1×10^9 células, foram centrifugadas a $3.000 \times g$ por 10 minutos. Posteriormente, o precipitado foi lavado duas vezes com PBS estéril e ressuspensão em 150 mM NaCl (1 mL/g de célula). A suspensão foi adicionada, gota a gota, em TES (150 mM Tris pH 7,5; 50 mM EDTA pH 8,0; 1% SDS) a 65 °C (20 mL/g de célula), sob leve agitação, e a seguir tratada com pronase (200 µg/mL) a 45 °C por 2 horas. Após adicionar o mesmo volume de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1), centrifugou-se por 10 minutos a $12.000 \times g$, e ao sobrenadante adicionou-se 0,1 volume de acetato de sódio 3,0 M pH 7,0 e 2 volumes de etanol 100% gelado; o precipitado foi enrolado em pipeta Pasteur, seco, ressuspensão em água e tratado com RNase A (20 µg/mL) a 37 °C durante 1 hora. Adicionou-se a seguir NaCl e SDS para concentração final de, respectivamente, 0,2 M e 0,5%, para tratamento com proteinase K (50 µg/mL) a 37 °C por 1 hora. A solução foi novamente submetida à extração com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1), e o DNA precipitado com acetato de sódio e etanol 70%.

3.2.2 Purificação de DNA genômico de *Leishmania* em pequena escala

A purificação de DNA genômico em pequena escala foi realizada conforme descrito por (Medina-Acosta et al., 1993). Culturas de promastigotas contendo aproximadamente 1×10^8 células foram centrifugadas a $3.000 \times g$ por 10 minutos, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento de células em 1,0 mL de PBS estéril. As células foram passadas para um tubo eppendorf e novamente centrifugadas a $3.000 \times g$ por 5 minutos. O sedimento foi então ressuspensão em 150 µL de TELT (Tris-HCl pH 8,0 50 mM; EDTA pH 9,0 62,5 mM; LiCl 2,5 M; Triton X-100 4%) e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Acrescentou-se 1 volume de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25 : 24 : 1), misturou-se por 5 minutos e em seguida centrifugou-se a $20.000 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 2 volumes de etanol 100% gelado. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e em seguida centrifugada a $20.000 \times g$ por 10

minutos. O precipitado foi seco por 30 minutos a 42 °C e ressuspenso em 50 µL de água destilada e tratado com RNase A (20 µg/mL) a 37 °C durante 1 hora.

3.2.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas segundo (Saiki et al., 1985) e (Mullis et al., 1986). O DNA contendo a sequência alvo foi submetido a reações em volume final de 50 µL em tampão de Taq Platinum polimerase 1x (Tris-SO₄ pH 8,9 20 mM; sulfato de amônia 50 mM) (Invitrogen) contendo MgSO₄ 50 mM; 200 µM de dNTPs; 2,5 UI de Taq Platinum polimerase (Invitrogen) e 100 ng de cada um dos oligonucleotídeos. Inicialmente a reação foi incubada a 94 °C por 1 minuto sendo em seguida submetida a 35 ciclos de amplificação, com as seguintes etapas: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto na temperatura de associação e 1 minuto para cada 1 Kb a 72 °C. Para a extensão final utilizamos a temperatura de 72 °C por 5 minutos. A amplificação do produto esperado foi verificada submetendo-se uma alíquota de 10 µL da reação à eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.2.4 Eletroforese de DNA

Para separação dos fragmentos de DNA utilizamos géis de agarose com concentrações entre 0,8 a 1,5% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA pH 8,0 1 mM) e brometo de etídio (0,75 µg/mL). Os géis foram observados em transiluminador ultravioleta (UV) e fotografados em ImageQuant (Molecular Dynamics, CA) (Amersham Pharmacia Biotech, NJ). Como padrão de peso molecular foi utilizado DNA do fago λ (Gibco BRL) digerido com a enzima de restrição *Hin* dIII.

3.2.5 Southern Blot

A transferência dos fragmentos de DNA foi feita segundo (Southern, 1975), usando membranas de Nylon (Hybond-N, Amersham Pharmacia).

3.2.6 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento automático foi realizado segundo o método descrito por (Sanger e Coulson, 1975) modificado para a utilização de terminadores fluorescentes. Utilizou-se o kit “Big dyetm Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems). Incubou-se inicialmente a reação por 1 minuto a 96 °C e em seguida, 35 ciclos de 15 segundos a 96 °C, 15 segundos na temperatura de anelamento TM adequada e 4 minutos a 60 °C. O produto da reação de PCR foi precipitado pela adição de 90 µl de isopropanol 66%, seguido de agitação e incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Após incubação, o DNA foi centrifugado a 21.910 x g por 20 minutos e então lavado com etanol 70% gelado. Em seguida o DNA foi centrifugado como descrito acima, seco e ressuspensão em 20 µl de TSR (“Template Supression Reagent”), para o sequenciamento no aparelho ABI Prism 310 Genetic.

3.2.7 Análise das seqüências de nucleotídeos

A análise das seqüências foi feita no programa Lasergene (DNASTar Inc., Madison, WI, U.S.A.), a busca de similaridade foi processada utilizando-se o programa BLAST (Altschul et al., 1990) e os alinhamentos foram feitos com o auxílio dos programas Clustal W (Chenna et al., 2003) e T-Coffee (Notredame et al., 2000). A análise de motivos funcionais nas seqüências de aminoácidos foram realizadas pelo programa PROSITE (Bairoch et al., 1997).

3.2.8 Clonagem Molecular

Todos os plasmídeos foram clivados com enzimas de restrição apropriadas para cada inserto. Os insertos foram submetidos a uma separação em gel de agarose “low melting”, na qual a banda a ser clonada foi cortada diretamente do gel. O fragmento de DNA foi purificado da agarose, utilizando o “kit” “Quick Gel Extraction Kit – Invitrogen[®]” para remoção da agarose e uma alíquota da amostra foi aplicada em gel de agarose para quantificação. Para a ligação utilizamos uma proporção inserto: vetor de 3:1 em reação contendo DTT 10mM, tampão 1x T4 DNA ligase (Tris-HCl pH 7, 650 mM; MgCl₂ 10 mM; DTT 1 mM; PEG 8000 5 %) e 1 UI de T4 DNA ligase (Gibco-BRL). A mistura foi incubada a 16 °C por 16 horas.

3.2.9 Preparação da bactéria competente

O método utilizado foi uma variação do descrito por (Cohen et al., 1972), baseado no tratamento com cloreto de cálcio. Uma colônia de *Escherichia coli* DH5 α ou BL-21 foi inoculada em 3 mL de meio LB e incubada a 37 °C por 16 horas. Um 48nocolo de 500 μ L desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB, e a cultura foi incubada a 37 °C, sob agitação constante, até uma DO₆₀₀ entre 0,3 e 0,6. Em seguida a cultura foi resfriada a 4 °C, centrifugada a 3000 x g por 10 minutos a 4 °C, lavada com 40 mL de CaCl₂ 50mM gelado e novamente centrifugada nas mesmas condições. O precipitado foi então ressuspensionado em volume de CaCl₂ 50mM contendo 15% de glicerol correspondente (em mL) a 10X o valor obtido para a DO₆₀₀. As bactérias competentes foram mantidas a -70 °C.

3.2.10 Transformação e plaqueamento

Após a ligação, o DNA foi misturado a 200 μ L de bactéria *Escherichia coli* DH5 α competente e incubado a 4 °C por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi então submetida a choque térmico a 42 °C por 90 segundos, e a seguir novamente transferida para o gelo. Foram adicionados 800 μ L de meio LB e a mistura foi incubada a 37 °C por 45 minutos. A cultura foi plaqueada em LB e adicionados antibióticos apropriados para seleção e incubada a 37 °C por 16 horas.

3.2.11 Triagem de clones por hibridização molecular

As colônias obtidas na transformação foram transferidas para membranas de nylon (Hybond-N, Amersham-Pharmacia), colocando-se a membrana em contato direto com as colônias por 1 minuto. Em seguida, as membranas foram embebidas em 10% SDS por 3 minutos, solução desnaturante (NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 N) por 5 minutos, solução neutralizante (1,0 M Tris pH 8,0; 1,5 M NaCl) por 10 minutos e 10X SSC por 10 minutos. As membranas foram secas a temperatura ambiente e posteriormente expostas à radiação UV para fixação do DNA. As membranas foram hibridizadas com a sonda correspondente ao fragmento utilizado na clonagem.

3.2.12 Reações de hibridização

- Marcação das sondas utilizadas: A marcação dos fragmentos de DNA citados no texto foi feita através da técnica de “random priming” (Feinberg e Vogelstein, 1983) utilizando-se o kit “Megaprime DNA Labelling System” (AmershamPharmacia), na presença de α -[P³²] dATP e/ou α -[P³²] dCTP (atividade específica de 3.000 Ci/mmol), (AmershamPharmacia).
- Reações de hibridização: As hibridizações foram feitas em tampão de hibridização (formamida 50%, SSC 5X, Denhardt 5X e SDS 1%) a 42 °C por 16 horas. As duas primeiras lavagens de todas as hibridizações foram feitas à temperatura ambiente com solução contendo SSC 2x e SDS 0,1%. As lavagens de estringência foram feitas a 0,1 x SSC e 0,1 x SDS a temperatura de 65 °C para as sondas utilizadas.

3.2.13 Transfecções

3.2.13.1 Construção *La [pXG1 NEO LaLRR17 myc]*

A construção contendo o gene *LaLRR17* foi planejada de forma a permitir a distinção entre a proteína nativa e a mutante. Assim, a ORF do gene *LRR17* de *L. (L.) amazonensis* foi amplificada, utilizando os primers LmLRR17- F e LmLRR17- R e clonada em um plasmídeo construído com base no vetor *pBS*, contendo seqüências codificadoras do epitopo viral myc mais 6 histidinas de forma que a sequência codificadora da proteína *LaLRR17* estivesse em fase aberta de leitura com as seqüências dos epitopos myc + His na região C-terminal da proteína. Posteriormente a construção [*pBS LaLRR17 myc*] foi digerida com *Bam* HI, separando o fragmento *LaLRR17 myc/his* do vetor *pBS* e em seguida clonado no vetor *pXG* (digerido também com *Bam* HI). A clonagem foi confirmada por fragmentos de restrição e sequenciamento parcial.

3.2.13.2 Construção do cassete *Lb [pSSU-Int Pac I/PmeI]*

A ORF *LbLRR17* juntamente com a sua região 3' UTR foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos *LbLRR17Bam* 1-23 e *LbLRR17+ 3'UTRBam*. O produto obtido (2,4 Kb) foi clonado no vetor TOPO e seqüenciado, sendo em seguida digerido com a enzima de restrição *Bam* HI e posteriormente clonado no vetor pSSU-Int aberto com *Bam* HI, originando assim a construção pSSU/ *LbLRR17+ 3'UTR*. A clonagem do produto amplificado foi confirmada por fragmentos de restrição e sequenciamento. O cassete para transfecção foi obtido pela digestão com *Pac* I e *Pme* I.

3.2.13.3 Eletroporação

A eletroporação em *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram realizadas como descrito por (Kapler et al.,1990). Promastigotas no 3º dia de cultura foram centrifugados a 1.500 x g por 10 minutos, lavados com EPB estéril (Hepes 21 mM pH 7, 5; NaCl 137 mM; KCl 5 mM; Na₂HPO₄ 0,7 mM; glicose 6mM) e ressuspensos nesse mesmo tampão para densidades finais de 1×10^8 parasitas/mL. Em um tubo eppendorf, 4×10^7 parasitas foram misturados com 50 µg de DNA circular (para super-expressão da proteína LaLRR17) ou 5 µg de DNA linear (para super-expressão da proteína LbLRR17) e incubou-se a mistura por 15 minutos no gelo. Aplicou-se a mistura dos parasitas com o DNA nas cubetas de eletroporação de 0,2 cm, previamente resfriadas e para a eletroporação utilizou-se pulsos de 400 V e 960 µF para *L. (L.) amazonensis* e 450 V e 500 µF para *L. (V.) braziliensis*. Os parasitas foram então ressuspensos em 10 mL de meio 199 e levados à estufa à 25°C e somente após 24 horas foram acrescentadas as drogas de seleção 60 µg/mL G418 para *L. (L.) amazonensis* ou 32 µg/mL de Higromicina B para *L. (V.) braziliensis*.

Como controle, submetemos as linhagens selvagens ao mesmo experimento de transfecção, a fim de verificar a sobrevivência dos parasitas após o processo e também ao cultivo com a droga, para nos certificarmos de que somente as linhagens mutantes eram resistentes.

3.2.13.4 Obtenção dos clones.

Para a obtenção de clones isolados, as culturas foram plaqueadas em meio 199 - 1% ágar contendo 60 µg/mL G418 ou 32 µg/mL de Higromicina B (Uliana et al., 1999). Após uma semana, as colônias isoladas foram transferidas para placas de 96 poços contendo 100 µL de meio e 24 horas depois acrescidas com mais 100 µL de meio contendo a droga para seleção 2x concentrada. Assim que o crescimento em cada poço se tornava evidente as culturas (200 µL) foram transferidas para placas de 24 poços contendo 800 µL de meio 199 com droga. Após uma semana transferiu-se 1,0 mL de cada cultura para uma garrafa contendo 9 mL de meio 199/droga. Semanalmente eram feitos repiques para manutenção da cultura.

3.2.14 Obtenção de extrato protéico total de *Leishmania*

Para a obtenção de extrato protéico total, os parasitas foram inicialmente lavados 3 vezes com PBS 1x (NaH_2PO_4 2,6 mM; Na_2HPO_4 7,4 mM; NaCl pH 7,2 140 mM) e contados em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram lisadas com tampão de lise (Tris-HCl pH 7,6 10 mM; NaCl 150 mM; SDS 2%) acrescido de inibidores de protease (200 mM PMSF; 2,0 M benzamidina; 10 mM leupeptina; 5,0 mM fenantrolina; 50 mg/mL inibidor de tripsina), no volume em µL determinado pela equação $[(\text{número de células}/2 \times 10^7) \times 5]$. O precipitado foi ressuspenso, fervido por 10 minutos, mantido no gelo por 10 minutos e posteriormente centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g. Sendo em seguida diluído em 1 volume de tampão de amostra 2x (Tris pH 6,8 62,5 mM; SDS 2,5%; glicerol 10%; β -mercaptoetanol 2,5%; EDTA 1%; azul de bromofenol 0,015%). Foram aplicados 10 µL de cada amostra (equivalente a 1×10^7 células) por canaleta nos géis de poliacrilamida-SDS.

3.2.15 Sobrenadante de parasitas

Promastigotas de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* foram cultivados em meio M199 sem soro por um período de 24 horas. Aproximadamente 2×10^7 células/mL foram centrifugadas a $3.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Após centrifugação, o sobrenadante foi recolhido e separado do “pellet”, contendo as células. O sobrenadante foi novamente centrifugado a $3.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C e posteriormente centrifugado em uma coluna de concentração (Millipore) a $10.000 \times g$ por 40 minutos a 4°C , até atingir um volume aproximado de 200 μL . O volume de sobrenadante concentrado equivalente a 1×10^7 parasitas foi aplicado por canaleta nos géis de poliacrilamida-SDS.

3.2.16 Obtenção de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*

Linhagens de células VERO derivadas de rim de macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*, foram cultivadas em meio DMEM acrescido de 10 % de SFB, por um período de sete dias. Para desprender as células aderidas à parede do recipiente, lavamos essas células com PBS estéril e adicionamos 500 μL de tripsina. Após dois minutos na presença de tripsina, adicionamos 4,5 mL de meio DMEM com 10 % SFB e contamos as células.

Para realizarmos a infecção utilizamos uma proporção parasita: Célula Vero de cinco para um. Durante as primeiras 24 horas de infecção, as células foram incubadas em estufa a $33^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Posteriormente, descartamos o meio antigo, lavamos as células com PBS estéril, adicionamos meio DMEM novo e incubando a $33^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ por 72 horas. Após esses três dias de incubação o sobrenadante foi recolhido e utilizado para extração de proteínas totais de amastigota de *L. (V.) braziliensis*. As amostras foram fracionadas em gel de poliacrilamida-SDS e transferidas para membrana de nitrocelulose para reações de “immunoblotting”.

3.2.17 Eletroforese em SDS-PAGE

As amostras foram separadas em géis de poliacrilamida-SDS contendo 13% de acrilamida (29% acrilamida; 1% metilenobisacrilamida) (Laemmli, 1970) em cuba Mini-VE Vertical Electrophoresis System (Amersham Biosciences). As corridas foram realizadas a 80 V em tampão Tris-glicina pH 8,3 (25 mM Tris pH 8,3; 250 mM glicina; 0,1% SDS). Utilizamos como marcador de peso molecular Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas).

3.2.18 Western Blot e “imunoblotting”

O extrato protéico fracionado em gel de poliacrilamida-SDS foi transferido para membranas de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amersham-Pharmacia) usando o sistema “Trans-blot SD-Semidry Transfer Cell” (BioRad) e posteriormente corado com Ponceau. A membrana foi bloqueada com TBST-5% (Tris 10 mM pH 8,0; NaCl 150 mM; 0,1% Tween 20; 5% de leite em pó desnatado) por 2 h a temperatura ambiente sob agitação leve. A membrana foi incubada com o soro pré-imune ou imune diluídos em TBST com 5% de leite em pó por 1h a temperatura ambiente sob agitação leve. Posteriormente a mesma foi lavada 3X com TBST por 10 minutos e incubada com soro anti-imunoglobulinas totais de coelho conjugado a “horseradish peroxidase” diluído em TBST por 1h a temperatura ambiente sob agitação leve. A membrana foi lavada 4X com TBST por 10 minutos e 1 X com TBS por 5 minutos. A revelação com substrato luminescente foi feita com o “Kit” “SuperSignal West Pico Trial” (PIERCE) e as membranas foram expostas a filmes de raio X (GE Healthcare) por tempos que variaram de 5 segundos a 15 minutos.

3.2.19 Infecção de macrófagos *in vitro*

Células L929 foram extraídas da medula óssea de camundongos BALB/c e diferenciados para macrófagos (Weischenfeldt e Porse, 2008). Os camundongos foram eutanizados e o fêmur desses animais foi exposto retirando-se os músculos. O osso foi lavado em álcool 70% e depois com PBS estéril. As epífises foram cortadas e através de uma seringa conectada a agulha 21G, lavou-se o fêmur por dentro com meio 2030 (30% LCCM (meio condicionado de células L929), 20% de soro fetal bovino e 50% de meio RPMI-1640 completo (Gibco BRL) para extrair a medula que contém os monócitos. As amostras foram colocadas em placa de petri de plástico e incubadas a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ por 6 dias. No quarto dia foi acrescentado mais 10 mL de meio 2030 nessas placas. No sexto dia foi aspirado o meio dessas placas já contendo macrófagos diferenciados e adicionado PBS estéril gelado por 15 minutos, mantendo-se as placas no gelo. Em seguida centrifugou-se a 1200 x g por 10 minutos a 4 °C. Os macrófagos foram ressuspensos em meio R105 (5% LCCM, 10% de soro fetal bovino e 85% de meio RPMI-1640 completo (Gibco BRL) e contados. Os experimentos de infecção foram realizados em meio R105.

Para os experimentos de infecção *in vitro*, a suspensão de células foi lavada três vezes com RPMI sem soro, a 3000 x g por 10 minutos, a 4 °C. As células obtidas foram contadas e plaqueadas. Os macrófagos foram cultivados em lâminulas redondas colocadas em placas de 24 poços. Foram adicionados 3×10^5 macrófagos por poço em 400 µL de meio R105 suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas de incubação para adesão a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ adicionamos promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* em proporção de três parasitas para uma célula. As culturas foram incubadas a 33 °C / 5% CO₂ por 3 horas. Posteriormente as lâminas foram lavadas com R105 aquecido para retirada dos parasitas livres e 500 µL de meio R105 fresco foi adicionado a cada poço. Após 16 e 48 horas as lâminas foram lavadas com PBS aquecido, fixadas com metanol por 1 minuto e coradas. Foram contados 100 macrófagos espalhados por todo campo de cada lâmina. Desses 100 macrófagos foi calculado o percentual de células infectadas com um ou mais amastigotas e contado o número de amastigotas por célula infectada. As

infecções com cada linhagem foram realizadas em triplicata e os experimentos repetidos pelo menos três vezes.

3.2.20 Dosagem de Nitrito em sobrenadantes de cultura de infecção

A produção de Nitrito, durante as infecções de macrófagos por *Leishmania*, foi analisada através do método de Griess. O Óxido Nítrico é uma importante molécula envolvida na resposta imune além de outros sistemas. A partir da ativação dos macrófagos e através de uma endotoxina como o lipopolissacarídeo (LPS), mediadores do Óxido Nítrico são ativados resultando na ativação do sistema inflamatório. Através da Reação de Griess, padronizado por John Peter Griess em 1879, o nitrito presente na amostra reage em meio ácido com uma amina aromática, produzindo um sal de diazônio. Este sal reagirá com a 3-hidroxi-1,2,3,4-tetraidrobenzilquinolina, uma molécula orgânica, e produzirá a coloração rósea. A coloração resultante tem intensidade de cor em proporção direta com a concentração de nitrito na amostra.

Um volume igual a 50 µL de sobrenadante de cultura de 48 horas de infecções de macrófagos por *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis* foi coletado e transferido para placas de 96 poços para avaliação da quantidade de nitrito. Aos 50 µL sobrenadante/poço foram adicionados igual volume do reagente de griess (Solução de sulfanilamida 1% e hidrocloreto naftiletileno diamida – NEED - 0,1% H₃PO₄ – 0,3 M). A leitura das placas foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm.

3.2.21 Infecção de camundongos BALB/c

Grupos de seis camundongos foram infectados no coxim plantar da pata posterior esquerda com 1×10^6 promastigotas (5º dia) em 50 µL de PBS. A medida das lesões foi feita através de medidor de espessura (Mitutoyo) avaliando-se a espessura da pata infectada e da pata contralateral sadia. Os dados apresentados relativos a tamanho da lesão correspondem à diferença (mm) entre a pata posterior esquerda (com lesão) e a pata posterior direita (sadia).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização do gene *LRR17* de *Leishmania (V.) braziliensis*

A ORF do gene *LbLRR17* de *L. (V.) braziliensis* foi amplificada por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores complementares às regiões 5' e 3' da ORF, com base na sequência disponível no banco de dados GeneDB (www.genedb.org - LbrM17_V2_0920) (Figura 1).

Figura 1- Amplificação da ORF *LbLRR17*. Eletroforese em gel de agarose de produtos obtidos em reação de polimerização em cadeia (PCR) com DNA genômico (DNAG) de *L. (V.) braziliensis* para amplificação da ORF *LbLRR17*. (1) Reação de PCR usando “primers” complementares às regiões 5' e 3' da ORF e (2) Controle sem DNAG. Marcador: DNA de fago λ digerido com a enzima de restrição *Hin* dIII.

Os oligonucleotídeos foram desenhados de tal forma que o produto quando amplificado apresentasse sítios de restrição para a enzima *Bam* HI na região 5' (*LbLRR17Bam*HI1-23 - 5' CGGGATCCATGTTGAATACTACCTTGCGTAC 3') e sítios de restrição para a enzima *Hin* dIII na região 3' (*LbLRR17Hind*III-2030-2009 - 5' CCCAAGCTTTTAGAGACTTCGGCCTGTCATG 3'). Posteriormente o fragmento amplificado de aproximadamente 2 Kb foi clonado no vetor TOPO e sequenciado. A sequência de nucleotídeos da ORF *LbLRR17* foi confirmada, identificando-se 100% de identidade com a sequência disponível no banco de dados GeneDB. A sequência de nucleotídeos da ORF *LbLRR17* mostrou 82% de identidade tanto com a sequência homóloga de *L. (L.) major* como também de *L. (L.) amazonensis*.

A análise da sequência primária da proteína codificada pela ORF *LbLRR17* mostrou a presença de uma região central hidrofóbica que possui seis repetições ricas em leucina com similaridade de aminoácidos com proteínas da família NLR (“nucleotide-binding domain leucine-rich repeat”) (Figura 2). A comparação entre a sequência traduzida da proteína *LbLRR17* e a região carboxi-terminal das proteínas NOD3 humana mostrou 48% de similaridade e 31% de identidade.

Figura 2 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos das proteínas LRR17 de *L. (L.) braziliensis* (LbrM17_V2_0920, GeneDB) e NOD3 humana (NC_000016.9 Genbank). Aminoácidos idênticos estão marcados com blocos pretos. Alinhamento obtido pelo programa Clustalw (www.ebi.ac.uk/clustalw). As caixas pretas representam o núcleo de cada repetição ricas em leucina identificadas na proteína LbLRR17.

O estudo mais detalhado dessa região do cromossomo 17 de *L. (V.) braziliensis* mostrou, surpreendentemente, uma quebra de sintenia em relação à mesma região do cromossomo 17 de *L. (L.) major* (Figura 3) e permitiu também a identificação de um segundo gene putativo (LbrM17_v2_990, GeneDB) contendo a sequência que codifica os primeiros 84 aminoácidos da proteína LbLRR17. Essa sequência foi denominada LbLRR17.2 e pensamos inicialmente que a mesma poderia corresponder a uma cópia truncada do gene.

Figura 3 - Alinhamento de segmento do cromossomo 17 de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major*, obtido pelo programa ACT (Artemis Comparison Tool) (www.sanger.ac.uk/act). As ORFs são representadas por flechas abertas apontando a direção de transcrição. Os blocos de sequências conservadas são unidos entre os dois esquemas por blocos coloridos, sendo que a cor vermelha indica regiões de maior similaridade. Estão indicados os genes META 1 (M1), META 2 (M2) e LRR17.

Para caracterizarmos esse gene, nossa primeira estratégia foi amplificar a ORF *LbLRR17.2* usando oligonucleotídeos iniciadores complementares às regiões 5' e 3' da ORF, com base nas sequências disponíveis no banco de dados GeneDB. Como a região 5' da ORF *LbLRR17.2* é igual aos primeiros 252 nucleotídeos da ORF *LbLRR17*, usamos o mesmo oligonucleotídeo complementar à região 5' da ORF *LbLRR17* (LbLRR17BamHI1-23- 5' CGGGATCCATGTTGAATACTACCTTGCGTAC 3') e para a

região 3' desenhamos um oligo complementar à região 3' (LbLRR17.2-432-412- 5' ATGAGGCGTGGCAGTTGCCG 3').

O produto da amplificação por PCR da ORF *LbLRR17.2* mostrou-se inespecífico (dados não mostrados). Variações nas condições de reação como temperatura de anelamento e concentração de magnésio não influenciaram significativamente o perfil de amplificação obtido. Apesar da inespecificidade, analisamos as bandas que estavam próximas ao tamanho esperado para a ORF *LbLRR17.2* (400pb). Os produtos amplificados foram então clonados e seqüenciados. Entretanto, não encontramos nenhuma similaridade entre as seqüências obtidas e a seqüência disponível para a região correspondente ao gene putativo *LbLRR17.2*.

Outros oligonucleotídeos foram também utilizados na tentativa de amplificar a região do cromossomo 17 que poderia conter o gene *LbLRR17.2*. Utilizamos um oligonucleotídeo complementar à região 5' do gene META 1 localizado a 3.500 bp "upstream" do gene *LbLRR17.2* (LEM1-54- 5'CGGGATCCTGCACCGGCGGGTGTG3') e um oligonucleotídeo complementar reverso ao início da ORF *LbLRR17.2* (LbLRR17.2-60-42 - 5' CAGCACCTGCAGCTGCGG 3'). Nós esperávamos encontrar um produto de amplificação com aproximadamente 4 Kb, o que não aconteceu (dados não mostrados).

Como já mencionado acima, os dois genes (*LbLRR17* e *LbLRR17.2*) compartilham os primeiros 250 nucleotídeos de suas ORFs. Um "Southern blot", usando uma sonda comum ao início das ORFs apresentou um perfil de gene de cópia única, pois não encontramos tamanhos de fragmentos de restrição correspondentes ao gene *LbLRR17.2* e apenas para o gene *LbLRR17* (Figura 4). Utilizando anticorpos anti-*LRR17*, que descreveremos a seguir em maiores detalhes, em "immunoblots", não encontramos nenhuma banda positiva com o tamanho esperado da proteína *LbLRR17.2*. Esses dois fatos somados nos levam a acreditar que o gene *LbLRR17.2* presente na seqüência do cromossomo 17 do genoma de *L. (V.) braziliensis* seja fruto de um erro de montagem e não uma segunda cópia, truncada, do gene *LbLRR17*.

Figura 4 - Análise do padrão de restrição do gene *LbLRR17*. (A) Esquema da região genômica do cromossomo 17 de *L. (V.) braziliensis* contendo o gene *LRR17*, mostrando o padrão de restrição tanto do gene *LRR17* como *LRR17.2*, segundo a sequência depositada no geneDB. (B) Southern blot contendo DNA genômico de *L. (V.) braziliensis* digerido com enzimas de restrição e hibridizado com a sonda LbLRR17-500pb, correspondente ao fragmento *Pst* I – *Xho* I

4.2 Obtenção de soro anti-*LRR17* e detecção da proteína nativa

A estratégia utilizada para obtenção de soro específico para as proteínas LRR17 foi a de imunização com peptídeo sintético. A sequência do peptídeo foi escolhida com base no alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas LRR17 de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* e selecionando-se sequências conservadas para síntese comercial desse peptídeo (Figura 5).

Figura 5 - Peptídeo sintético desenhado para obtenção de soro imune. Alinhamento da sequência de aminoácidos das proteínas LRR17 de *L. (V.) braziliensis* (acesso GeneDB: LbrM17_V2_0920), *L. (L.) major* (acesso GeneDB: LmjF 17.0900), *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* (acesso “Gen-Bank”: LinJ17_V31000). Alinhamento realizado utilizando o programa Clustal W (www.ebi.ac.uk/clustalw). Aminoácidos conservados em todas as sequências estão marcados em blocos pretos. Resíduos conservados em três das quatro sequências aparecem em blocos cinza escuros e resíduos conservados em 50% das sequências, são marcados por blocos em cinza claros. A sequência escolhida para síntese do peptídeo está delimitada por caixas em cinza (N-terminal). A seta em preto mostra o sítio predito para a enzima Caspase 1. Setas vazias mostram os sítios preditos para digestão com a enzima Prolina endopeptidase.

O peptídeo conjugado com “Keyhole Limpet Hemocyanin” (KLH) foi utilizado para imunização de coelhos, obtendo-se então soros policlonais contra o peptídeo correspondente à região N-terminal (que passaremos a denominar soro N-terminal). O soro policlonal foi inicialmente testado em ELISA contra o peptídeo conjugado à albumina e reagiu com títulos superiores a 1:2000.

O Soro policlonal reagiu com uma banda de massa molecular aparente de 72 kDa em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (Figura 6A), como esperado. Além da banda de 72 kDa encontrada em promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, encontramos também uma segunda banda de massa molecular aparente de 17 kDa (Figura 6A).

Nosso próximo passo foi a utilização desse anticorpo para estudarmos o padrão de expressão da proteína LRR17 de *L. (V.) braziliensis*. Assim, procuramos obter amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis*. Sabíamos de antemão da dificuldade, já que a infecção em modelos murinos por *L. (V.) braziliensis* leva a lesão com muito poucos parasitas. A estratégia inicialmente proposta para obtenção de amastigotas nesse projeto baseava-se em realizar infecção de macrófagos “*In vitro*” com posterior recuperação de parasitas. Nos experimentos iniciais utilizando macrófagos peritoniais de camundongos, observamos que o rendimento era baixo. Tentamos então estabelecer um método alternativo, infectando células de linhagens macrofágicas, como J774, A1 e THP1, também sem grande sucesso em termos de número de amastigotas recuperados. Por outro lado, tentamos infectar células VERO com base em resultados descritos anteriormente na literatura (Rabinovitch et al., 1995) e obtivemos altas taxas de infecção e recuperação de amastigotas. Esse foi então o protocolo eleito inicialmente para obtenção de extrato protéico de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*.

Figura 6 - Padrão de expressão da proteína LbLRR17 evidenciada pelo soro anti-N-terminal-LRR17. (A) Reatividade do soro anti-N-terminal-LRR17 em diluições 1:4000, contra extratos de proteínas totais de promastigotas (2.10^7 parasitas) de *L. (V.) braziliensis* de fases logarítmica (L) e estacionária (S), separados em SDS-PAGE 13%. (B) Reatividade do soro pré-imune anti-N-terminal-LRR17 em diluições 1:4000. (C) Reatividade do soro anti-N-terminal-LRR17 em diluições 1:4000, contra extratos de proteínas totais de amastigotas axênicos (2.10^7 parasitas) de *L. (V.) braziliensis* (A_v), obtidos em infecção célula VERO. (D) Reatividade do soro anti-N-terminal-LRR17 em diluições 1:4000, contra extratos de proteínas totais de amastigotas axênicos (2.10^7 parasitas) de *L. (V.) braziliensis* (A_m), obtidos em infecção de macrófagos de medula de camundongos BALB/c. Como controle para a reação contra extrato total de amastigotas, utilizamos extratos totais de macrófago - não infectado (M) e células Vero (V). Como controle da quantidade de proteína presente em cada canaleta utilizamos um anticorpo anti-GAPDH de *T. cruzi* em diluições 1:3000. Esse anticorpo não reconhece a proteína em células de mamíferos.

Ao ensaiarmos extratos totais de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* com o soro anti-N-terminal da proteína LRR17, encontramos duas bandas mais reativas, de massa molecular de aproximadamente 72 kDa e 17 kDa, tanto em promastigotas de fase logarítmica como estacionária (Figura 6A). Ao ensaiarmos extratos totais de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*, obtidos por infecção de células VERO com o soro anti-N-terminal da proteína LRR17, encontramos um perfil diferente do que observamos nas fases logarítmica e estacionária, pois encontramos além das duas bandas de 72 kDa e 17 kDa, uma terceira banda de aproximadamente 43 kDa (Figura 6C). Como controle para a reação contra extrato total de amastigotas, utilizamos extrato total de célula VERO, e não detectamos bandas positivas no “immunoblotting” (Figura 6C). O soro pré-imune anti-N-terminal também foi testado contra os mesmos extratos de promastigotas analisados com o soro imune e não reagiu contra nenhum deles (Figura 6B).

A identificação inesperada da banda de 43 kDa em extratos de amastigotas nos fez insistir no protocolo de infecção de macrófagos e conseguimos obter amastigotas de *L. (V.) braziliensis* oriundos de infecção de macrófagos diferenciados a partir de células L929 extraídas da medula óssea de camundongos BALB/c. Pudemos então analisar comparativamente o padrão de expressão da proteína LRR em amastigotas axênicos de *L. (V.) braziliensis* obtidos de infecções de célula Vero e macrófagos. Vimos que nos extratos de amastigotas que vieram de infecção por célula VERO, o anticorpo anti-LRR17, reconhece três bandas reativas de aproximadamente 72 kDa, 43 kDa e 17 kDa (Figura 6C). Já nos extratos de amastigotas de infecção de macrófagos, encontramos apenas uma banda de 72 kDa (Figura 6D).

Um anticorpo obtido contra a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *Trypanosoma cruzi* (gentilmente cedido pelo Dr. Ariel Silber, do Departamento de Parasitologia, ICB-USP), foi utilizado como controle da quantidade de proteína aplicada a cada canaleta. Podemos observar o “loading” equivalente nas canaletas contendo extratos dos diversos estágios do parasita. Esse anticorpo não reconhece a proteína GAPDH de células de mamíferos (Dr. Ariel Silber, comunicação pessoal).

O perfil de reatividade nos experimentos de “immunoblotting” acima citados pode indicar que a proteína LRR17 de *L. (V.) braziliensis* seja modificada pós-traducionalmente. De fato, a sequência traduzida apresenta potenciais sítios para fosforilação e glicosilação, além de sítios potenciais para clivagem proteolítica (Figura 5). Outro fato interessante foi a expressão diferencial da proteína LRR17 entre amastigotas obtidos por infecção de célula Vero e macrófagos, o que provavelmente mostra que o padrão de expressão da proteína LRR17 está associado à célula infectada.

Observamos um perfil de expressão da proteína LbLRR17 igual entre promastigotas de fase logarítmica e estacionária. Porém, ao comparamos com a forma amastigota, encontramos um padrão de expressão da proteína LbLRR17, menos abundante, indicando que o gene *LbLRR17* possa ser regulado de forma distinta durante o ciclo biológico de *L. (V.) braziliensis*.

O mesmo soro policlonal foi também utilizado para análise da expressão da proteína em extratos totais de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Observamos a presença de duas bandas reativas, de massas moleculares de aproximadamente 72 KDa e 17 KDa, tanto em promastigotas de fase logarítmica como em estacionária (Figura 7A). O soro anti-N-terminal também foi utilizado contra extrato total de *L. (L.) amazonensis* na forma amastigota extraída de lesões de camundongos e encontramos uma banda reativa de aproximadamente 50 KDa (Figura 7A). O soro pré-imune foi testado contra os mesmos extratos analisados com o soro imune e não reagiu contra nenhum deles (Figura 7B). Diferentemente do que observamos em *L. (V.) braziliensis*, a proteína LRR17 em *L. (L.) amazonensis* tem um padrão de expressão protéica diferente entre promastigotas de fase logarítmica e estacionária, com uma maior abundância da proteína na fase logarítmica. Ao compararmos as formas promastigotas e amastigota, encontramos uma maior expressão da proteína na forma promastigota do ciclo.

Figura 7 - Detecção da proteína LRR17 em extrato protéico de *L. (L.) amazonensis*. (A) Reatividade do soro anti-N-terminal-*LRR17* em diluições 1:5000 contra extratos de proteínas totais de promastigotas (2.10^7 parasitas) de *L. (L.) amazonensis* de fases logarítmica (L); estacionária (S) e amastigotas de lesão (A), separados em SDS-PAGE 13%. (B) Reatividade do soro pré-imune anti-N-terminal-*LRR17* em diluições 1:3000. Como controle da quantidade de proteína presente em cada canaleta utilizamos um anticorpo anti-GAPDH de *T. cruzi* em diluições 1:3000.

Após identificarmos a proteína LbLRR17 em extrato total de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, fomos verificar se a proteína poderia ser secretada por promastigotas. Para verificarmos esta hipótese, analisamos as proteínas presentes no sobrenadante de culturas de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* cultivados em meio sem soro fetal bovino por 24 horas. Ao final desse período, os parasitas foram examinados ao microscópio óptico, mostrando-se íntegros e indicando que a presença de proteínas no sobrenadante não era proveniente de lise celular. O soro anti-N-terminal-LRR17 reagiu com uma banda de massa molecular aparente de 72 kDa, tanto no extrato protéico dos parasitas como também no material obtido do sobrenadante das culturas de *L. (V.) braziliensis* (Figura 8A) e *L. (L.) amazonensis* (Figura 9A). Porém em *L. (L.) amazonensis* além da banda de 72 kDa,

encontramos tanto no extrato protéico dos parasitas, como no sobrenadante de promastigotas do parasita, uma segunda banda de massa molecular de aproximadamente 17 kDa (Figura 9A). Como controle da integridade dos parasitas, utilizamos anticorpos α -tubulina e α -GAPDH. Ambos identificam proteínas que não são secretadas e portanto não poderiam estar presentes no sobrenadante de cultura de parasitas íntegros.

Figura 8 - Detecção da proteína nativa em sobrenadante de cultura de *L. (V.) braziliensis*. Proteínas recuperadas do sobrenadante (S) de cultura de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* correspondente a 2.10^7 parasitas) e extrato protéico dos parasitas recuperados no “pellet” (P), foram separados em SDS-PAGE 13% e incubado com o soro anti-N-terminal da proteína LRR17 em diluições 1:3000 (A). Como controle do experimento, utilizamos o anticorpo anti-GAPDH de *T. cruzi* em diluições 1:3000 (B), anticorpo anti-tubulina em diluições 1:600 (C) e Gel de poliacrilamida 13% corado com Coomassie Brilliant Blue (D).

Figura 9 - Detecção da proteína nativa em sobrenadante de cultura de *L. (L.) amazonensis*. Proteínas recuperadas do sobrenadante (S) de cultura de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* correspondente a $2 \cdot 10^7$ parasitas) e extrato protéico dos parasitas recuperados no “pellet” (P), foram separados em SDS-PAGE 13% e incubado com o soro anti-N-terminal da proteína LRR17 em diluições 1:3000 **(A)**. Como controle do experimento, utilizamos o anticorpo anti-GAPDH de *T. cruzi* em diluições 1:3000 **(B)**, anticorpo anti-tubulina em diluições 1:600 **(C)**.

Em *L. (V.) braziliensis*, conseguimos verificar a secreção da proteína LRR17 por amastigotas, utilizando parasitas provenientes de infecção de células VERO, mantidos em cultura axênica por 24 horas (Figura 10A). O soro anti-N-terminal-LRR17 reagiu com uma banda de massa molecular aparente de 72 kDa, no extrato protéico dos parasitas e no material obtido do sobrenadante das culturas. As bandas de 43 kDa e 17 kDa, reconhecidas pelo soro anti-N-terminal-LRR17 em amastigotas de célula VERO, não foram encontradas nos extratos protéicos dos amastigotas de *L. (V.) braziliensis* mantidos em cultura axênica por 24 horas.

Figura 10 - Detecção da proteína nativa em sobrenadante de cultura de amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Proteínas recuperadas do sobrenadante (S) de cultura de amastigotas de *L. (V.) braziliensis* correspondente a 2.10^7 parasitas) e extrato protéico dos parasitas recuperados no “pellet” (P), foram separados em SDS-PAGE 13% e incubado com o soro anti-N-terminal da proteína LRR17 em diluições 1:3000 (A). Como controle do experimento, utilizamos o anticorpo anti-GAPDH de *T. cruzi* em diluições 1:3000 (B).

4.3 Obtenção e caracterização de linhagens transgênicas de *L. (V.) braziliensis* para estudo funcional da proteína LRR17

Para estudo da função da proteína LRR17 em *L. (V.) braziliensis*, tentamos inicialmente obter linhagens mutantes hiperexpressoras da proteína, utilizando construções no plasmídeo pXG. Esse vetor de expressão em *Leishmania* destina-se à manutenção episomal em linhagens transfectadas. Várias tentativas de transfecção e seleção de clones mutantes utilizando essa construção foram infrutíferas, possivelmente pela dificuldade de manutenção de episomos em *L. (V.) braziliensis*, o que pode ser explicado pela presença da maquinaria de interferência por RNA (RNAi) em *L. (V.) braziliensis* (Lye et al., 2010), que degradaria o RNA transcrito a partir do episomo inserido, uma vez que ambas as fitas de moléculas circulares são transcritas em *Leishmania* (LeBowitz et al., 1990).

Assim, estabelecemos uma nova estratégia de transfecção, utilizando uma construção para integração no genoma de *L. (V.) braziliensis* por recombinação homóloga. Essa construção foi obtida utilizando o vetor pSSU-Int, (Misslitz et al., 2000) que contém sequências da subunidade 18S do rDNA flanqueando o cassete e o gene que confere resistência a higromicina (Figura 11A). O fragmento clonado à montante do gene que codifica a higromicina fosfotransferase corresponde à ORF completa do gene *LbLRR17* e 240 pb de sua região 3'UTR (Figura 11A), conforme descrito em Material e Métodos.

Transfecções com o cassete linear obtido com essa construção foram realizadas e selecionamos clones resistentes ao marcador de seleção higromicina. Após a obtenção de clones isolados, a integração do cassete no locus ribossômico foi verificada por reações de amplificação utilizando oligonucleotídeos complementares à região 18S rDNA que flanqueiam a região de inserção do cassete (S1 e S4) (Uliana et al., 1994) e oligonucleotídeos complementares a regiões internas do cassete. Nas reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos S1 e *LbLRR17*HindIII 2030-2009, identificamos uma banda 2.8 Kb, presente nos clones transfectantes, mas não na amostra correspondente ao DNAg de *L. (V.) braziliensis* de linhagem selvagem (Figura 11B). Já nas reações de amplificação, com os oligonucleotídeos S1 e H3', observamos uma banda de 4 Kb, presente apenas nos clones transfectantes e uma banda menor de 2.1 Kb presente em todas as amostras, provavelmente fruto de uma amplificação inespecífica (Figura 11C).

Figura 11 - (A) Esquema da integração do cassete *Lb* [pSSU-Int HYG *LbLRR17*-3' UTR] no genoma de *L. (V.) braziliensis* e representações das reações de PCR realizadas para confirmar a integração no locus da subunidade 18S do rDNA. As setas indicam as posições dos oligonucleotídeos utilizados. **(B)**, e **(C)** gel de agarose 0,8%. DNA genômico de *L. (V.) braziliensis* selvagem e linhagens transgênicas submetidos a reações de PCR com os pares de oligonucleotídeos S1 / *LbLRR17*_Hind 2030-2009 (B), e *LbLRR17* – 527- 544 / H3' (C). Controle negativo à direita das respectivas reações.

A presença do cassete no locus ribossômico foi verificada também por “Southern blots” contendo DNAg das linhagens selvagem e transgênica de *L. (V.) braziliensis* digerido com a enzima de restrição *Pst* I. Quando foi usada a sonda LbLRR17 - 500pb correspondente ao início da ORF, identificamos bandas de aproximadamente 3.2 Kb e 1 Kb em todas as amostras que corresponde à cópia genômica *LRR17*. Ainda nas linhagens *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]* foi observada uma banda referente a um fragmento do cassete integrado de aproximadamente 2.9 Kb (Figura 12B). Ao digerirmos DNAg da linhagem selvagem de *L. (V.) braziliensis* e da linhagem de *L. (V.) braziliensis* transgênica com a enzima de restrição *Xho* I e hibridarmos com a sonda *LbLRR17- 500pb*, encontramos uma banda de aproximadamente 7.0 Kb em todas as amostras, correspondendo à cópia genômica *LRR17* e uma banda referente a um fragmento do cassete integrado de aproximadamente 0.5 Kb (Figura 13C). No clone transfectante T-32, encontramos duas bandas de aproximadamente 2 kb e 0.4 kb (Figura 12C), que possivelmente corresponde a inserções aleatórias do cassete pSSU-int no genoma de *L. (V.) braziliensis*. Nos “Southern blots” aqui apresentados, nós utilizamos DNAg de clones de linhagem de *L. (V.) braziliensis*, *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]* mantidos em meio de cultura que estavam sobre pressão de seleção para droga Higromicina B, na concentração tanto de 32 µg/mL como também de 64 µg/mL.

Figura 12 - Caracterização das linhagens *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17-3'UTR]*. (A) Esquema *locus* LRR17 e da integração do cassete *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17-3' UTR]* no genoma de *L. (V.) braziliensis* (B) Southern blots contendo DNAg de *L. (V.) braziliensis* das linhagens selvagem (WT), *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17-3' UTR]* – 32 µg/mL de Higromicina B (T-32 e T-32') e *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17-3' UTR]* - 64 µg/mL de Higromicina B (T-64), digeridos com *Pst* I e hibridados com a sonda LbLRR17- 500pb. (C) Southern blots contendo DNAg de *L. (V.) braziliensis* das linhagens selvagem (WT), *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17-3' UTR]* – 32 µg/mL de Higromicina B (T-32 e T-32') e *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17-3' UTR]* - 64 µg/mL de Higromicina B (T-64), digeridos com *Xho* I e hibridados com a sonda LbLRR17- 500pb. À direita dos respectivos blots, gel contendo as mesmas amostras coradas com brometo de etídio antes da transferência, mostrando que as quantidades de DNA aplicada em todas as canaletas eram equivalentes.

O nível de expressão da proteína LbLRR17 na linhagem mutante foi verificado utilizando-se o soro anti-N-terminal-LRR17. Identificamos um aumento da expressão da proteína LbLRR17 nas linhagens *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]* mantidas em meio de cultura a concentração de 32 µg/mL de Higromicina B de 12 vezes em relação a linhagem selvagem (quantificação através do programa ImageJ). O mesmo também foi observado com a linhagem *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]* mantida em meio de cultura a concentração de 64 µg/mL de Higromicina B, onde houve um aumento de 28 vezes em relação à linhagem selvagem (Figura 13), o que nos leva a acreditar que o aumento na concentração da droga de seleção nas linhagens *L. (V.) braziliensis*, *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]*, levou a um aumento na expressão da proteína LbLRR17.

Figura 13 - Caracterização da linhagem *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17-3' UTR]*. Soro anti-N-terminal LRR17 foi usado em experimento de “immunoblotting” contra extrato total de promastigotas de fase estacionária (2.10^7 parasitas) de *L. (V.) braziliensis* das linhagens selvagem (WT), *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]* mantida a 32 µg/mL de Higromicina B (T-32) e *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]* mantida a 64 µg/mL de Higromicina B (T1-64) separados em SDS-PAGE 13%. O soro foi utilizado em diluições 1:3000. A seta indica a proteína LRR17 detectada. Como controle da quantidade de proteína presente em cada canaleta utilizamos um anticorpo anti-GAPDH de *T.cruz.* em diluições 1:3000.

As linhagens de *L. (V.) braziliensis* transgênicas [*pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR*], mantidas tanto a 32 µg/mL como também a 64 µg/mL de Higromicina, foram utilizadas para infectar macrófagos diferenciados a partir de medula de camundongos BALB/c (Figura 14). Estas infecções foram comparadas com macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis* de linhagem selvagem (WT). Após 16 horas de infecção, observamos um aumento de 29,53% e 32,94% na porcentagem de células infectadas com as linhagens transgênicas mantidas a 32 µg/mL e 64 µg/mL de Higromicina respectivamente, quando comparadas com células infectadas com a linhagem selvagem (Figura 14A). Em relação à infecção por 48 horas, observamos um aumento de 46,4% e 48% em relação ao controle, na porcentagem de células infectadas com as linhagens transgênicas (Figura 14B). Avaliando o número de parasitas por célula infectada, vimos também que nas primeiras 16 horas de infecção (Figura 14C), a linhagem transgênica LbLRR17 foi mais invasiva que a linhagem selvagem e que em 48 horas (Figura 14D), o número de parasitas em macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis* transgênica LbLRR17 era consideravelmente maior que para a linhagem selvagem. Portanto, a linhagem *L. (V.) braziliensis* transgênica LbLRR17 foi mais infectiva em infecções de macrófagos “*in vitro*”.

A infectividade da linhagem [*pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR*] foi também ensaiada “*in vivo*” através de infecção de camundongos BALB/c. Após vários meses de infecção, não encontramos lesões na orelhas do camundongos infectados.

Figura 14: Análise da linhagem *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17-3' UTR]* em infecções *in vitro*. Macrófagos extraídos de medula de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* por 16h (A) e 48h (B). Linhagem Selvagem (WT), Linhagem *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]* mantida a 32 μ g/mL de Higromicina B (T1-32) e *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]* mantida a 64 μ g/mL de Higromicina B (T1-64). Após infecção os macrófagos foram fixados e corados. A porcentagem de macrófagos infectados com um ou mais parasitas foi analisada por contagem (A e B), assim como a média do número de amastigotas por macrófago nas infecções de 16 (C) e 48 horas (D). O resultado mostra a média e o desvio padrão de triplicatas de um experimento representativo de seis experimentos independentes (*): $P < 0,001$ Teste estatístico ANOVA.

4.4 Obtenção e caracterização de linhagens transgênicas de *L. (L.) amazonensis* para estudo funcional da proteína LRR17

A caracterização do gene LRR17 de *L. (L.) amazonensis* foi importante porque nos permitiu analisar comparativamente funções do gene LRR17 em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Assim, nosso primeiro passo para a caracterização do gene foi obter as construções para transfecção. A construção contendo a ORF do gene *LbLRR17* foi obtida por amplificação da mesma, usando oligonucleotídeos flanqueados por sítios de restrição para a enzima *Bam* HI na região 5' (*LbLRR17*- *Bam*HI1-23-5' CGGGATCCATGTTGAATACTACCTTGCGTAC3') e na região 3' (*LbLRR17*-*Bam*HI 2030-2009 – 5'CGGGATCCTTAGAGACTTCGGCCTGTCAATG 3').

A construção contendo o gene *LaLRR17* foi planejada de forma a permitir a distinção entre a proteína nativa e mutante. Assim, a ORF do gene *LRR17* de *L. (L.) amazonensis* foi amplificada e clonada em um plasmídeo construído com base no vetor *pBS* e contendo seqüências codificadoras do epítipo viral *myc* mais 6 histidinas (gentilmente cedido pela Dra. Maria Del Carmen Becerra). Posteriormente a construção [*pBS LaLRR17 myc*] foi digerida com *Bam* HI, separando o fragmento *LaLRR17 myc/his* do vetor *pBS* e em seguida clonado no vetor *pXG* (Figura 15A). As construções *LaLRR17 [pXG NEO LaLRR17 myc]* e *La [pXG NEO]* foram transfectados em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em vários experimentos independentes. Obtivemos vários clones resistentes à marca de seleção (G418).

Os clones mutantes de *L. (L.) amazonensis* transfectados com a construção [*pXG NEO LaLRR17 myc*] foram confirmados quanto à presença do epissomo por “Southern blots” contendo DNA genômico da linhagem selvagem, da linhagem contendo o plasmídeo nativo e da linhagem de *L. (L.) amazonensis* transgênica *LaLRR17 [pXG NEO LaLRR17 myc]* digeridos com *Bam* HI e hibridados com a sonda *LaLRR17* (Figura 15B) ou com um fragmento da ORF da neomicina fosfotransferase (Figura 15C).

Figura 16 - Caracterização da linhagem *La* [pXG1 NEO *LaLRR17 myc*]. (A) Construções de DNA para obtenção da linhagem *La* [pXG1 NEO *LaLRR17 myc*]. A ORF do gene *LRR17* de *L. (L.) amazonensis* foi amplificada e clonada em um plasmídeo construído com base no vetor *pBS*. Posteriormente a construção [pBS *LaLRR17 myc*] foi digerida com *Bam* HI, separando o fragmento *LaLRR17 myc/his* do vetor *pBS* e em seguida clonado no vetor *pXG* (digerido também com *Bam* HI). (B) e (C) Southern blots contendo DNAg de *L. (L.) amazonensis* das linhagens selvagem (WT), [pXG NEO] (pX) e *La* [pXG1 NEO *LaLRR17 myc*] T1 e T2, digeridos com *Bam* HI e hibridados com a sonda *LaLRR17* e NEO, respectivamente. As culturas de parasitas foram mantidas na presença de 120 µg/mL de geneticina. (D) Reatividade do soro anti-MYC contra extratos de proteínas totais de promastigotas ($2 \cdot 10^7$ parasitas) *L. (L.) amazonensis* das linhagens selvagem (WT), [pXG NEO] (pX), *La* [pXG1 NEO *LaLRR17 myc*] T1 e T2, separados em SDS-PAGE 12%. A seta indica a proteína LRR17 detectada. O soro foi utilizado em diluições 1:2000. Como controle da quantidade de proteína presente no sobrenadante de cultura, utilizamos o anticorpo anti-GAPDH de *T. cruzi* em diluições 1:2000.

O vetor vazio *pXG* possui somente um sítio para *Bam* HI, onde a ORF *LaLRR17* foi inserida. A digestão com esta enzima, portanto, libera a ORF do plasmídeo originando no gel uma banda de 2.1 Kb. Quando foi usada a sonda *LaLRR17* identificamos uma banda de aproximadamente 9.0 Kb em todas as amostras que corresponde à cópia genômica *LRR17*. Ainda na linhagem *La [pXG NEO LaLRR17 myc]* foi observada uma banda com o tamanho para o fragmento resultante da digestão do epissomo e correspondente à ORF *LaLRR17* de 2.1 KB (Figura 15B).

A hibridação com a sonda *NEO* confirmou a presença do epissomo que contem o gene da neomicina fosforansferase (*NEO*) na linhagem *La [pXG NEO LaLRR17 myc]* e na linhagem *La [pXG NEO]*. A digestão com a enzima de restrição *Bam* HI separa o plasmídeo *pXG* da ORF *LaLRR17*. Portanto a sonda *NEO* reconhece uma banda de 6.8 Kb correspondente ao plasmídeo vazio (Figura 15C). As bandas adicionais observadas na hibridização com a sonda *NEO* provavelmente correspondem a moléculas do epissomo não digeridas. A proteína *LaLRR17* expressa pelo epissomo foi detectada utilizando-se anticorpos contra o epitopo *myc* em extratos protéicos de promastigotas da linhagem *La [pXG NEO LaLRR17 myc]* (Figura 15D).

O soro anti-N-terminal- *LRR17* foi ensaiado em “Western blots” contendo extrato total de promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* de linhagem selvagem (WT), linhagem transgênica *LaLRR17 [pXG1 NEO LaLRR17 myc]* e linhagem contendo o plasmídeo vazio *La [pXG1 NEO]* (Figura 17). Nos “Western blots”, o soro anti-N-terminal reconhece nos extratos protéicos de linhagem selvagem de *L. (L.) amazonensis* (WT), duas bandas de massas moleculares aparentes de 72 kDa e 17 kDa. Nos extratos protéicos de linhagens de *L. (L.) amazonensis* transgênicas (T), além das bandas de 72 kDa e 17 kDa, uma outra banda é reconhecida com peso molecular aparente de aproximadamente 77 kDa, tamanho predito para a proteína *LaLRR17* codificada pelo epissomo, em fusão com o epitopo viral *myc* e uma cauda de histidinas (Figura 16A).

O nível de expressão da proteína *LaLRR17* nas linhagens mutantes foi verificado utilizando-se o soro anti-N-terminal contra a proteína *LRR17*. Diferentemente do que encontramos em *L. (V.) braziliensis* - *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]*, nas linhagens de *L. (L.) amazonensis* transgênicas, *La [pXG NEO LaLRR17 myc]* mantidas

a 64 $\mu\text{g/mL}$ ou 128 $\mu\text{g/mL}$ de geneticina, não identificamos aumento da expressão da proteína LaLRR17 em relação à proteína LaLRR17 da linhagem selvagem (Figura 16B).

Figura 16 - Caracterização da linhagem *La [pXG1 NEO LaLRR17 myc]*. (A) e (B) Reatividade do soro anti-N-terminal-LRR17 contra extratos de proteínas totais de promastigotas ($2 \cdot 10^7$ parasitas) de *L. (L.) amazonensis* das linhagens selvagem (WT), [*pX NEO*] (pX) e *La [pXG1 NEO LaLRR17 myc]*, separados em SDS-PAGE 13%. O soro foi utilizado em diluições 1:3000. As culturas de *L. (L.) amazonensis* foram mantidas em concentrações de 64 $\mu\text{g/mL}$ (T-64) e 128 $\mu\text{g/mL}$ (T-128) de Geneticina. Como controle da quantidade de proteína presente em cada canaleta utilizamos um anticorpo anti-GAPDH de *Trypanosoma cruzi* em diluições 1:3000.

O fenótipo das linhagens de *L. (L.) amazonensis* transgênicas foi estudado através de experimentos de infecção de macrófagos de medula de camundongos BALB/c. Esses macrófagos foram infectados com a linhagem selvagem, a linhagem contendo plasmídeo nativo, *La [pXG1 NEO]* e a linhagem transgênica, *La [pXG NEO LaLRR17 myc]*. Após 16 horas de infecção, observamos um aumento de 29% na porcentagem de células infectadas com as linhagens transgênicas quando comparadas com células infectadas com a linhagem selvagem e com a linhagem contendo o vetor vazio (Figura 17A). Em relação à infecção por 48 horas, observamos um aumento de 41,66% em relação ao controle, na porcentagem de células infectadas com as linhagens transgênicas (Figura 17B). Avaliando o número de parasitas por célula

infectada, vimos que em 48 horas o número de amastigotas por macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* transgênica LaLRR17 é maior que para as demais linhagens. (Figura 17C). Portanto, a linhagem de *L. (L.) amazonensis* transgênica LaLRR17 foi mais infectiva em infecções de macrófagos “*in vitro*”.

Figura 17 - Análise da linhagem *La [pXG NEO LaLRR17 myc]* em infecções *in vitro*. Macrófagos extraídos de medula de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis* e incubados por 16h **(A)** e 48h **(B)**. Linhagens selvagem (WT), *[pXG NEO]* (pX) e *La [pXG NEO LaLRR17 myc]*. Após infecção os macrófagos foram fixados e corados. A porcentagem de macrófagos infectados com um ou mais parasitas foi analisada por contagem **(A e B)**, assim como a média do número de amastigotas por macrófago **(C)**. O resultado mostra a média e o desvio padrão de triplicatas de um experimento representativo de seis experimentos independentes (*): $P < 0,001$ Teste estatístico ANOVA

A infectividade da linhagem *La [pXG NEO LaLRR17 myc]* foi também ensaiada *in vivo* através de infecção de camundongos BALB/c. Ao compararmos grupos de camundongos infectados com a linhagem selvagem e com as linhagens *La [pXG NEO]* e *La [pXG NEO LaLRR17 myc]*, observamos que as lesões dos grupos de camundongos infectados com as linhagens transgênicas apresentaram uma diminuição no tamanho das lesões quando comparados com o grupo infectado com a linhagem selvagem (Figura 18). Portanto, aparentemente a presença do epissomo diminui a virulência dos parasitas *in vivo*. Entretanto, se compararmos o desenvolvimento das lesões do grupo *La [pXG NEO]* com as lesões do grupo *La [pXG NEO LaLRR17 myc]* não se observa diferença significativa. Dois clones das linhagens de *L. (L.) amazonensis [pXG NEO LaLRR17 myc]*, foram utilizados nas infecções e o padrão de lesão foi muito semelhante (dados não mostrados). Estes clones foram isolados de duas transfecções independentes.

Figura 18 - Análise da linhagem *La [pXG1 NEO LaLRR17 myc]* em infecções *in vivo*. Grupos de seis camundongos BALB/c infectados na pata posterior esquerda com 1×10^6 promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) amazonensis*. Linhagem Selvagem (WT); Linhagem *La [pX NEO]* (pX) e Linhagem *La [pXG1 NEO LaLRR17 myc]* (T). O tamanho da lesão corresponde à diferença entre a pata posterior esquerda infectada e a pata contralateral não infectada. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

4.5 Análise da produção de NO em macrófagos infectados com as linhagens transgênicas

As linhagens transgênicas de *L. (V.) braziliensis*, [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR], e *L. (L.) amazonensis*, La [pXG NEO LaLRR17 myc] mostraram-se mais infectivas nas infecções de macrófagos e apresentaram um maior número de parasitas por macrófago quando comparadas as linhagens selvagens. O óxido nítrico é uma molécula-chave para a resistência de células do sistema imune contra infecções por *Leishmania*. Portanto, decidimos avaliar o papel do óxido nítrico nas infecções de macrófagos infectados pelas linhagens transgênicas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

O sobrenadante de cultura de infecção de macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis* incubados por 48 horas, foi analisado pelo método de Griess para podermos verificar a resposta celular através do acúmulo de nitrito, um metabólito gerado a partir do óxido nítrico (Figura 19).

Figura 19 - Dosagem de nitrito nos sobrenadantes de infecção de macrófagos por *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis* “in vitro”. Macrófagos extraídos de medula de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* das linhagens selvagem (WT), Linhagem *Lb* [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR] mantida a 32 µg/mL de Higromicina B (T1-32) e *Lb* [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR] mantida a 64 µg/mL de Higromicina B (T1-64 **(A)** ou *L. (L.) amazonensis* das linhagens selvagem (WT), Linhagem *La* [pX NEO] (pX) e Linhagem *La* [pXG1 NEO LaLRR17 myc] (T) **(B)**, incubados por 48h. Após infecção o nível de Nitrito presente no sobrenadante foi analisado através do método de Griess. O resultado mostra a média e o desvio padrão de triplicatas de um experimento representativo de três experimentos independentes. Como controle utilizamos sobrenadante de macrófagos que não foram infectados (Mo).

Os sobrenadantes coletados das infecções de macrófagos pelas linhagens transgênicas de *L. (V.) braziliensis* ou de *L. (L.) amazonensis*, apresentaram uma maior quantidade de nitrito nos sobrenadantes de cultura que os sobrenadantes das linhagens selvagens. Contraditoriamente essa elevada produção de NO, não foi suficiente para provocar a morte dos parasitas, visto que, em experimentos de infecções, os mesmos parasitas transgênicos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* apresentaram uma alta porcentagem de infecção. Esses dados nos levam a especular que a hiperexpressão da proteína LRR17 em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, é capaz de modular a ação do óxido nítrico.

4.6 Efeito de proteínas secretadas por promastigotas na infecção “in vitro”

Outro experimento que realizamos foi o estudo do papel que as proteínas secretadas por promastigotas de *Leishmania* têm no processo de infecção de macrófagos por *Leishmania*. Nesse experimento, macrófagos de medula, já diferenciados, foram expostos antes de serem infectados, por uma hora ao sobrenadante de cultura de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* ou de *L. (L.) amazonensis*. Após esse período, os macrófagos foram infectados com linhagens selvagens de *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis* (Figura 20).

Observamos que macrófagos pré-incubados com proteínas secretadas pelo parasita tornaram-se mais susceptíveis à invasão e a proliferação tanto em infecções por *L. (V.) braziliensis* como por *L. (L.) amazonensis* (Figura 20). A produção de NO por essas culturas também foi avaliada notando-se, surpreendentemente uma maior produção de NO em macrófagos que foram expostos inicialmente ao sobrenadante de cultura (Figura 21). Portanto, esses resultados indicam que proteínas presentes no sobrenadante de cultura, secretadas pelo parasita, tenham um papel importante no processo de infecção de macrófagos por *Leishmania*.

Os experimentos acima expostos mostram que a capacidade de infecção de macrófagos por *Leishmania*, está relacionada às proteínas que são secretadas para o meio durante o processo de infecção. Proteínas essas que poderiam se associar a receptores específicos na superfície do macrófago, facilitando assim, a internalização do parasita.

Figura 20 - Análise da infecção “in vitro” de macrófagos pré-expostos a sobrenadante de cultura de *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos extraídos de medula de camundongos BALB/c foram expostos a sobrenadante de cultura (SbN) e posteriormente infectado com promastigotas de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* (A) ou *L. (L.) amazonensis* (B) (WT+ SbN). Após infecção os macrófagos foram fixados e corados. A porcentagem de macrófagos infectados com um ou mais parasitas foi analisada por contagem (A e B), assim como a média do número de amastigotas por macrófago em 16 horas (A1 e B1) e 48 horas (A2 e B2). O resultado mostra a média e o desvio padrão de triplicatas de um experimento representativo de três experimentos independentes. (*): $P < 0,001$ Teste estatístico ANOVA.

Figura 21 - Dosagem de Nitrito de sobrenadantes de infecção *in vitro* de macrófagos pré-expostos ao sobrenadante de cultura e posteriormente infectados por *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*. Sobrenadante de infecção de macrófagos extraídos de medula de camundongos BALB/c, pré-expostos a sobrenadante de cultura de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* e posteriormente infectados por 48h com promastigotas de fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* (SbN+Lb) **(A)** ou *L. (L.) amazonensis* (SbN+La) **(B)**, tiveram seus sobrenadantes de cultura analisados através do método de Griess. O resultado é representativo de três experimentos independentes feitos em triplicata. Como controle utilizamos sobrenadante de macrófagos que não foram infectados (Mo), sobrenadante de macrófagos que foram infectados por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* mas não foram pré-expostos a sobrenadante de cultura (Lb) e (La) e sobrenadante de macrófagos que foram apenas expostos ao sobrenadante de cultura, sem serem infectado (SbN).

5 DISCUSSÃO

A comparação feita entre o genoma de *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis*, espécies que resultam em manifestações clínicas diferentes, mostrou um alto grau de conservação entre as sequências codificantes e sintonia entre os genes. Poucos genes espécie-específicos foram identificados e poderiam estar envolvidos na diferença de virulência entre os parasitas (Peacock et al., 2007). Especula-se que as diferentes manifestações clínicas possam ser explicadas pela expressão diferencial desses genes entre as espécies de *Leishmania* (Peacock et al., 2007).

A maioria das proteínas preditas pelo projeto genoma de *Leishmania* possuem função ainda não caracterizada. Somente 3 a 4% dessas proteínas compreendem domínios que podem estar relacionados com a virulência do parasita, como por exemplo, sequências com repetições ricas em leucina (LRR-leucine-rich repeats) (Peacock et al., 2007). Há poucas proteínas contendo domínios LRR caracterizadas em *Leishmania*. O antígeno de superfície (PSA-2), por exemplo, foi identificado na região extracelular do glicocálix de formas promastigotas do parasita e está envolvido na invasão do macrófago (Kedzierski et al., 2004; Jimenez-Ruiz et al., 1998). A proteína LRR de *L. (L.) major* apresenta repetições LRR na sua região amino-terminal e acredita-se que esteja envolvida na resistência a antimoniais na fase amastigota (Genest et al., 2007).

A ORF identificada a 3' do gene *META 1* de *L. (L.) amazonensis* codifica uma proteína com seis domínios hidrofóbicos na sua região central, caracterizados na literatura como repetições LRR. Nós denominamos esse gene de *LRR17* ("Leucine-rich repeats" do cromossomo 17) (Franco, 2008). A partir da amplificação da ORF do gene homólogo *LmLRR17* foi expressa uma proteína recombinante que foi purificada e injetada em camundongos para obtenção de um anticorpo policlonal. O anticorpo obtido reconhece uma proteína nativa em extratos de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* de aproximadamente 72 kDa, confirmando a massa esperada para a proteína codificada. A análise do padrão de expressão do gene *LRR17* mostrou que o RNAm é mais abundante na forma amastigota de *L. (L.) amazonensis*. Outro fato interessante descoberto é que em *L. (L.) amazonensis* a proteína LaLRR17 é secretada para o citoplasma do macrófago, sugerindo que esta proteína possa interagir com proteínas do macrófago e modular a resposta inflamatória da célula hospedeira

(Franco, 2008). A localização no citoplasma do macrófago e não no vacúolo parasitóforo, observada por microscopia eletrônica e nas reações de imunohistoquímica, podem indicar que a proteína *LaLRR17* consegue acessar o citosol da célula hospedeira sem passar pelo vacúolo. Isto é bem provável, pois é comum encontrarmos amastigotas de *L. (L.) amazonensis* aderidos à membrana do vacúolo, sugerindo que haja um mecanismo de transporte de moléculas nessa região de adesão (Franco, 2008).

Genes ortólogos ao identificado em *L. (L.) amazonensis* estão presentes nos genomas de *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis*. O gene que codifica a proteína homóloga à *LaLRR17*, identificado em *L. (L.) major*, apresenta um padrão de expressão nessa espécie diferente do observado em *L. (L.) amazonensis*, observando-se maior abundância do RNA em promastigotas, ou seja, no estágio do ciclo biológico onde o parasita reside no intestino do invertebrado. O anticorpo policlonal produzido contra a proteína de *L. (L.) major* reconhece uma proteína nativa de 72 kDa em *L. (L.) major* (Franco, 2008). A expressão diferencial do gene *LRR17* entre *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* pode indicar a presença de um fator de virulência possivelmente envolvido nas diferentes apresentações clínicas entre estas duas espécies.

O estudo mais detalhado da região do genoma de *L. (V.) braziliensis* contendo o ortólogo do gene *LaLRR17* (LbrM17_V2_0920, GeneDB) permitiu a identificação de uma cópia truncada do gene *LbLRR17*, chamada por nós de *LbLRR17.2* (LbrM17_v2_990, GeneDB), que codifica os primeiros 84 aminoácidos da proteína *LbLRR17*. A similaridade da proteína *LRR17* de *Leishmania* com a região carboxi-terminal da proteína NOD 3 humana e outras proteínas NOD, sugere um resquício dessas proteínas nesses parasitas que permaneceu ao longo da evolução. Realmente as proteínas da família NOD são bastante conservadas com ortólogos encontrados em todo reino animal (Alder et al, 2005). As proteínas NOD fazem parte de uma família de proteínas recentemente identificadas que desempenham papel importante em fenômenos relacionados à imunidade inata.

Os indivíduos sadios são protegidos contra patógenos por meio de diferentes mecanismos protetores como a imunidade inata, que em contraste com a imunidade

adquirida é imediatamente ativada, não necessitando de um prévio encontro com o microorganismo para poder desencadear uma resposta imunológica. Portanto, para responder rapidamente à invasão de um patógeno, as células que atuam na linha de ação da imunidade inata, como macrófagos, reconhecem moléculas altamente conservadas ou padrões moleculares associados a patógenos, PAMPs (“Pathogen-Associated Molecular Patterns”), como lipopolisacarídeos, peptidoglicanos, lipoproteínas bacterianas e estruturas do material genético de bactérias e vírus. Esse reconhecimento é feito através de receptores conhecidos como PRRs (“Pattern Recognition Receptors”) capazes de reconhecer essas moléculas conservadas nos diferentes patógenos (Akira et al., 2006).

A primeira família de PRRs estudada em detalhe foi a dos TLR, que são clássicas proteínas transmembrana com domínios de ligação ricos em leucinas. Esses receptores são encontrados em macrófagos, células “*Natural Killer*”, células dendríticas e linfócitos T e B e estão presentes também na membrana dos lisossomos (Bell et al., 2003). Os receptores TLR possuem um domínio extracelular contendo LRR e um domínio intracelular chamado de receptor Toll/IL-1 ou domínio TIR. Quando há a associação de um ligante com a região extracelular dos TLRs, o domínio TIR recruta uma molécula adaptadora MyD88 (Bell et al., 2003), o que desencadeia a ativação de uma série de quinases e a consequente fosforilação e a posterior translocação do fator de transcrição κ B para o núcleo (Bell et al., 2003). Em *L. (L.) major* demonstrou-se a relação do LPG e de glicoinositol fosfolipídeos (GIPLs) com a molécula MyD88 e a ativação do NF- κ B via TLR2, embora outras moléculas também possam estar envolvidas na ativação desse receptor (de Veer et al., 2003). Estudos com RNA de interferência demonstraram que o TLR3 está envolvido no reconhecimento de *L. (L.) donovani* por macrófagos (Flandin et al., 2006).

Recentemente uma nova família de PRRs foi descrita, as NLRs (“nucleotide-binding domain leucine-rich repeat”). As proteínas NOD representam uma família de proteínas citosólicas que apresentam estrutura similar a “proteínas R” de plantas que são responsáveis por respostas de defesa contra patógenos (Dangl et al., 2001). Identificadas também em mamíferos, as proteínas NOD estão relacionadas à inflamação e reações imunes (Inohara et al., 2002). Proteínas pertencentes a esta

família foram caracterizadas em animais, plantas, fungos e bactérias, incluindo mais de 20 proteínas similares identificadas em células humanas (Inohara e Nuñez, 2003). As NLR também são conhecidas como CATERPILLER (CARD [“caspase recruitment domain, transcription enhancer purine binding, lots of leucine repeats”]) (Harton et al, 2002; Ting et al., 2006), NOD (“nucleotide-binding and oligomerization domain leucine-rich repeat”) (Inohara e Nunez, 2003; Inohara et al, 2005), NACHT-LRR (NAIP, CIITA, HER-E, TP-1, “leucine-rich repeat”) (Kufer et al., 2005) ou “NOD-like receptors” (nucleotide-binding and oligomerization domain) (Meylan., 2006).

Os genes NLR codificam proteínas regulatórias com uma estrutura constituída de três domínios conservados: uma região central responsável pela oligomerização destas moléculas e contendo um sítio de ligação de nucleotídeos (“nucleotide binding oligomerization domain” -NOD), uma região amino-terminal contendo um domínio efetor e um domínio carboxi-terminal, rico em seqüências repetitivas de leucina (“leucine-rich repeats”-LRRs) (Inohara et al., 2005). Na região central das proteínas NLR são encontrados os domínios Walker A e B relacionados à ligação e clivagem de ATP/GTP. Esta clivagem resulta na mudança conformacional da proteína pela energia liberada. Quando dois domínios centrais NOD ficam próximos ocorre uma dimerização, induzida pela quebra de ATP ou pela ligação da região LRR ao seu ligante específico. Com isso, os domínios efetores também se aproximam e tornam-se funcionais, podendo ativar ou sinalizar a próxima proteína da cascata (Inohara et al., 2002; 2003). A dimerização de proteínas NOD1 e NOD2, que pertencem à família NLR, resulta na interação com Rip 2, uma proteína da família das quinases contendo o domínio CARD na sua região amino-terminal. Com isso ocorre a fosforilação do complexo IKK e a translocação do fator de transcrição nuclear- κ B para o núcleo (Ogura et al., 2000). A proteína NOD3 humana (Genbank, NP849172), apresenta em sua região amino-terminal uma seqüência ainda não caracterizada e sem similaridade com domínios efetores de outras proteínas NLR, seguida pelos domínios NOD e LRRs (Inohara e Nuñez, 2003). Várias proteínas NOD, incluindo NOD1, NOD2, APAF1 (“Apoptotic protease activating factor 1”) e CED-4 (“*Caenorhabditis elegans*” cell death gene-4) são fatores reguladores da atividade de caspases, estando relacionadas à regulação da apoptose em células de mamíferos (Alder et al., 2005).

As proteínas NOD1 e NOD2 são até o momento as mais estudadas e estão diretamente envolvidas na defesa contra patógenos intracelulares (Inohara et al., 2002). A importância das proteínas da família NLR, na imunidade inata e reconhecimento de bactérias intracelulares tem sido claramente descrita pela literatura, porém até o momento nenhum trabalho mostrou se *Leishmania* consegue interagir com essas proteínas e modular a resposta de defesa celular por essas vias ou mesmo se pacientes que desenvolveram a patologia possuem algum tipo de mutação nessas proteínas.

A maior diferença estrutural entre as proteínas NOD1 e NOD2 é a presença de duas repetições do domínio CARD na região amino-terminal da NOD2. A NOD1 está presente em vários tecidos humanos enquanto NOD2 é expressa predominantemente em monócitos e células epiteliais (Ogura et al., 2001; Inohara e Nuñez, 2003).

As proteínas NOD1 e NOD2 são capazes de reconhecer peptídeos derivados da degradação de peptidoglicanos (PGNs) da parede celular de bactérias. NOD1 se associa ao peptídeo γ -D-meso-glutamil-ácido diaminopimérico (iE-DAP) (Chamaillard et al., 2003; Girardin et al., 2003), enquanto NOD2 reconhece dipeptídeo muramil (MDP) (Inohara et al., 2003; Girardin et al., 2003). Uma vez que tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas contêm MDP, NOD2 é capaz de reconhecer um amplo espectro de bactérias. Em contraste, PGNs de bactérias Gram-positivas não contêm iE-DAP, sendo assim, NOD1 funciona como um sensor somente de bactérias Gram-negativas (Tanabe et al., 2004). Algumas patologias como a doença de Crohn ou síndrome de Blau, estão relacionadas a mutações na proteína NOD2. Na doença de Crohn, há uma mutação na região do gene que codifica o domínio LRR da proteína NOD2, apresentando assim deficiência no reconhecimento de patógenos (Ogura et al., 2001). Já na síndrome de Blau, ocorrem mutações na porção NOD da proteína NOD2.

A descoberta de que domínios LRR estão relacionados a interações proteína-proteína, nos leva a especular que eles estejam envolvidos em interações patógeno-hospedeiro com uma possibilidade de evolução convergente de mecanismos de defesa de protozoários parasitas com a célula hospedeira. Muitos patógenos como bactérias e protozoários parasitas utilizam proteínas LRR para invadir a célula hospedeira e favorecer sua sobrevivência. A similaridade da região LRR da proteína LRR17 com a

região carboxi-terminal de proteínas da família NOD é bastante intrigante. A ativação e translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo, assim como a ativação da cascata apoptótica estão diretamente relacionadas à estimulação de receptores NOD da família de proteínas NLR (“nucleotide-binding domain leucine-rich repeat”). A região central da proteína LRR17 apresentou similaridade de aminoácidos com a região carboxi-terminal das proteínas NOD 3, NOD 1, NOD 2 e NOD 27. Esta região está envolvida no reconhecimento e interação com o ligante específico destas proteínas em células de mamíferos. Como a proteína LRR17 de *L. (L.) amazonensis* é secretada pelo parasita para o citoplasma da célula hospedeira e possivelmente também é secretada em promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, temos como hipótese, que a proteína LRR17 estaria competindo com as proteínas NOD do macrófago pelo seu ligante específico, formando assim, um dímero não funcional que inibiria ou modularia mecanismos de defesa da célula hospedeira como, por exemplo, a translocação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo ou a ativação de caspases. Nós observamos em experimentos de infecção de macrófagos com *L. (V.) braziliensis* de linhagens transgênica e selvagem, que as linhagens transgênicas para a proteína LRR17, eram muito mais infectivas e apresentavam um maior número de parasitas por macrófago infectado que as infecções com as linhagens selvagens. Portanto, acreditamos que a hiperexpressão da proteína LRR17 estaria tornando as *L. (V.) braziliensis* mutantes mais virulentas. Uma hipótese que poderia explicar essa virulência acentuada nas linhagens de *L. (V.) braziliensis* transgênicas é a possível interação entre as proteínas LRR17 e as proteínas NOD, através do seu ligante específico. Como a *L. (V.) braziliensis* transgênica hiperexpressa a proteína LRR17, essa *Leishmania* teria uma maior quantidade de proteínas LRR disponíveis para se associarem com as proteínas NOD do macrófago, tornando-o inativo e impedindo assim, a continuidade da via de translocação do fator de transcrição NF- κ B e de produção de citocinas pró-inflamatórias, favorecendo em ultima instância o parasita.

Para dar início à caracterização estrutural do gene *LRR17* de *L. (V.) braziliensis*, inicialmente mostramos a amplificação, sequenciamento, clonagem e expressão da ORF do gene *LbLRR17* de *L. (V.) braziliensis*, cuja proteína apresenta similaridade, em sua região central, com a porção carboxi-terminal da proteína NOD 3

humana. As tentativas de caracterização do gene *LbLRR17.2*, por amplificação de DNA e Southern blots resultaram em ausência de produto específico detectável, indicando que há um erro de montagem dessa região do genoma de *L. (V.) braziliensis* e que provavelmente esse gene não existe.

A proteína recombinante *LbLRR17* expressa foi purificada e utilizada na produção de anticorpos em camundongos. O soro contendo anticorpos contra a proteína recombinante *LbLRR17* foi utilizado em “Western blots”, contendo extrato total de promastigotas de fase logarítmica e estacionária de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*. Identificamos três bandas positivas com massa molecular aparente entre 70 kDa e 79 kDa (dados não mostrados). Dados anteriores do nosso laboratório mostraram que anticorpos policlonais produzidos contra a proteína recombinante LRR17 de *L. (L.) major* reconheciam uma proteína nativa de 72 kDa em *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*. O soro policlonal obtido contra a proteína recombinante *LbLRR17* reconheceu, em promastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, bandas de massa molecular diferentes das que havíamos encontrado com o soro policlonal contra a proteína recombinante LRR17 de *L. (L.) major*.

Para testarmos a especificidade desses anticorpos contra a proteína LRR17 de *Leishmania*, realizamos a purificação desse soro por imunoabsorção em “Western Blot”, contra proteínas do extrato total da bactéria *E. coli* BL21, utilizada como hospedeira para expressão da proteína recombinante LRR17 e verificamos que o soro após a imunoabsorção reconhecia apenas proteínas da bactéria *E. coli* BL21 e não reagiu com proteínas de *Leishmania*.

Uma alternativa para obtenção de anticorpos específicos foi então utilizada, imunizando-se coelhos com um peptídeo sintético derivado da região N-terminal conservada entre as proteínas LRR17 de *L. (V.) braziliensis*, *(L.) major*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*. Esse soro foi utilizado em “Western blot”, contendo extrato total de promastigotas de fase logarítmica, estacionária e amastigotas axênicos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* de fase logarítmica e estacionária, encontramos um padrão de reconhecimento de duas bandas de massa molecular aparente de 72 kDa e 17 kDa. Ao ensaiarmos o mesmo soro contra extrato de amastigotas oriundos de célula VERO, observamos além das

bandas de 72 kDa e 17 kDa, presentes em promastigotas, uma terceira banda de peso molecular aparente de 43 kDa. Diferentemente do que vimos em amastigotas de célula VERO, extrato total de amastigotas axênicos oriundos de infecção de macrófagos em ensaios de “Western blot” contra o soro anti-N-terminal LRR17, apresentam apenas uma banda de 72 kDa. Vimos também que em *L. (V.) braziliensis*, não há diferença de expressão da proteína LRR17 entre as fases logarítmica e estacionária, mas ao compararmos a forma promastigota e amastigota observamos uma maior abundância da proteína LRR17 na forma promastigota.

Semelhantemente ao observado em *L. (V.) braziliensis*, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* de fase logarítmica e estacionária também apresentam um padrão de reconhecimento de duas bandas de massa molecular aparente de 72 kDa e 17 kDa. O soro anti-N-terminal utilizado contra extrato total de *L. (L.) amazonensis* na forma amastigota extraída de lesões de camundongos reconhece uma banda reativa de aproximadamente 50 kDa. Diferentemente do que vimos em *L. (V.) braziliensis*, a proteína LRR17 em *L. (L.) amazonensis* tem um padrão de expressão protéica diferente entre promastigotas de fase logarítmica e estacionária, com uma maior abundância da proteína na fase logarítmica. Porém ao compararmos as formas promastigotas e amastigota, encontramos uma maior expressão da proteína na forma promastigota do ciclo, assim como ocorre em *L. (V.) braziliensis*.

Essa diferença no padrão de expressão da proteína LRR17 em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, pode indicar que a proteína LRR17 seja possivelmente processada por proteólise e ocorra modificações pós-traducionais. A análise “in silico” da sequência peptídica da proteína LbLRR17 prediz ausência de regiões transmembrana (programa TMHMM) e ausência de peptídeo sinal (Bendtsen et al., 2004). Vários sítios potenciais para fosforilação estão presentes (Blom et al., 1999). A análise da sequência buscando sítios de reconhecimento por proteases (Peptide Cutter) identifica desde enzimas com múltiplos sítios de clivagem como Arg-C proteinase (53 sítios de clivagem) ou pepsina (153 sítios de clivagem) até enzimas que reconhecem poucos sítios na sequência da proteína, como a prolina oligopeptidase (3 sítios de clivagem) e trombina (1 sítio de clivagem). A prolina oligopeptidase é uma serino protease citosólica, presente na maior parte dos organismos superiores, que foi

inicialmente caracterizada como uma enzima capaz de hidrolisar polipeptídeos de até 30 aminoácidos (Polgáret al., 2002). Entretanto, enzimas com atividade de prolina endopeptidase especificamente ativas contra colágeno e fibronectina foram descritas em *T. cruzi* e *Trypanosoma brucei* (Santana et al., 1997; Grellier et al., 2001). Inibidores da prolina endopeptidase de *T. cruzi* são capazes de inibir a invasão de células de mamíferos por tripomastigotas. Assim, seria razoável supor que uma atividade de prolina endopeptidase esteja presente em *Leishmania*. De fato, uma sequência que codifica uma proteína com 53% de identidade e 70% de similaridade (em 687 aminoácidos) pode ser identificada no genoma de *L. (V.) braziliensis* (gene LbrM28_V2.2130)

Segundo a análise “in silico”, a clivagem da proteína LbLRR17 (697 aminoácidos) pela enzima prolina oligopeptidase poderia ocorrer nas posições 253, 360 e 419 da proteína. Dois fragmentos, sendo um de 257 aminoácidos e outro de 419 aminoácidos são gerados pela clivagem na posição 419 da proteína, sendo que para o fragmento de 419 aminoácidos, a massa molecular predita seria de aproximadamente 47 kDa, que coincide com a massa molecular aparente da proteína LRR17 encontrada em amastigotas de *L. (V.) braziliensis* de célula VERO e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* extraídos de lesão de camundongos. Essa é apenas uma das inúmeras combinações possíveis de clivagem para a proteína LRR17.

Para estudarmos o perfil de clivagem das proteínas LRR17 de 72, 43 e 17 kDa de *L. (V.) braziliensis*, estamos analisando essas proteínas através de espectrometria de massa, o que nos permitirá averiguar se realmente as proteínas de 43 e 17 KDa são um subproduto de clivagem. Essa expressão diferencial do gene *LRR17* em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* pode indicar a presença de um fator de virulência possivelmente envolvido nas características clínicas da doença.

A virulência de *Leishmania* está relacionada tanto a moléculas secretadas ou de superfície, como também moléculas intracelulares. As duas primeiras classes parecem ser mais importantes para o estabelecimento da infecção, protegendo o parasita da ação do sistema imunológico e as moléculas intracelulares parecem estar envolvidas no fenótipo da doença (Chang et al., 2003). A localização da proteína LRR17 no citoplasma de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* (Franco,

2008), indica que esta proteína possa estar interagindo com moléculas da célula hospedeira, possivelmente através das regiões LRRs. Essa interação pode modular a resposta de defesa celular e favorecer a sobrevivência do parasita, visto que, as proteínas secretadas estão envolvidas na manutenção da infecção interferindo nas funções microbidas do macrófago, produção de citocinas, apresentação de antígeno e a ativação de células efectoras. Esse processo possivelmente é feito pela inibição da expressão gênica, degradação ou repressão de proteínas (Gregory e Olivier, 2005).

A manipulação genética de organismos unicelulares, como o de *Leishmania*, é uma ferramenta utilizada por pesquisadores para o estudo da função de genes que possam estar relacionados à virulência do parasita. Para estudo da função da proteína LRR17 em *L.(L.) amazonensis* foram realizados experimentos de nocaute. A exclusão do primeiro alelo foi obtida por recombinação homóloga com sucesso. Entretanto, as linhagens com duplo nocaute não foram viáveis (Franco e Uliana, 2008). A plasticidade do genoma de *Leishmania* é uma característica bem conhecida. Vários estudos descrevem que em situações de estresse o parasita consegue amplificar genes de interesse ou mesmo cromossomos inteiros (Cruz et al., 1993). Esta capacidade de amplificação de um gene de interesse também foi observada por Uliana e colaboradores (1999) durante as tentativas de obtenção de mutantes defectivos do gene *META 1*. Portanto, o gene *LRR17* parece ser essencial para *L.(L.) amazonensis* e por isso utilizamos outra estratégia para caracterizar seu papel na virulência do parasita.

A metodologia para transfecção transiente em *Leishmania* foi padronizada no final da década de 80 (Laban e Wirth.,1989), e um ano depois, foi desenvolvida a transfecção estável (Laban et al., 1990). Diversos vetores apresentando apenas um trato de polipirimidinas, um sítio aceptor de “splicing” e uma região 3’ UTR foram desenvolvidos (LeBowitz et al., 1990; Cruz et al., 1991; Kelly et al., 1992; Kelly et al., 1994; Garraway et al., 1997; Misslitz et al., 2000; Tetaud et al., 2002) para expressão em *Leishmania*. Com isso diversos fatores de virulência foram identificados e caracterizados (Matlashewski., 2001).

Para estudo da função da proteína LRR17 em *L. (V.) braziliensis*, buscamos obter mutantes hiperexpressores da proteína LRR17, utilizando inicialmente uma

construção para transfecção contendo o gene *LbLRR17*, clonado no plasmídeo pXG. Apesar de termos realizado várias tentativas, não foi possível obter linhagens de *L. (V.) braziliensis* portando os episômos [pXG Neo *LbLRR17*] ou [pXG Neo *LaLRR17* myc/his]. A hipótese levantada para explicar esse achado foi a de que uma maquinaria de interferência por RNA (RNAi), possivelmente presente em *L. (V.) braziliensis*, poderia ser responsável pela degradação de transcritos provenientes do episômo. Novas construções foram preparadas com base no vetor pSSU-int, objetivando a integração de cassetes transfectados, por recombinação homóloga. Linhagens de *L. (V.) braziliensis* contendo o cassete foram obtidas.

Outra área de trabalho foi a obtenção de mutantes de *L. (L.) amazonensis*, que objetivam completar a caracterização funcional do gene *LRR17* de *L. (L.) amazonensis*. Essa caracterização foi importante porque nos permitiu analisar comparativamente funções do gene *LRR17* em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*.

Obtivemos uma linhagem de *L. (V.) braziliensis* transgênica *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]*, expressando cerca de 28 vezes mais a proteína *LRR17* em relação à linhagem selvagem. Diferentemente do que encontramos nas linhagens de *L. (V.) braziliensis* mutantes, as linhagem de *L. (L.) amazonensis* transgênicas não apresentaram aumento da expressão da proteína *LaLRR17* em relação à proteína *LaLRR17* da linhagem selvagem. Essa diferença de expressão entre as linhagens mutantes de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, pode estar relacionado a uma diferença de regulação de expressão entre o gene *LRR17* dessas espécies, bem como diferenças no processamento do RNAm e da proteína, o que pode traduzir-se em alterações no fenótipo entre estas espécies.

A infectividade da linhagem *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]* foi ensaiada “*in vitro*” através de infecção de macrófagos de medula de camundongos BALB/c, onde observamos um aumento no número de macrófagos parasitados nas infecções com a linhagem de *L. (V.) braziliensis* transgênica para o gene *LRR17* quando comparados com as infecções com a linhagem selvagem. A linhagem selvagem e a linhagem *Lb [pSSU-Int HYG LbLRR17- 3' UTR]* foram utilizadas para infecção de camundongos BALB/c, onde não observamos lesões nos grupos de camundongos infectados, após vários meses.

As linhagem clonais transfectadas de *L. (L.) amazonensis* com o plasmídeo [pXG Neo LaLRR17 myc/his] também foi ensaiada “*in vitro*” através de infecção de macrófagos de medula de camundongos BALB/c, onde observamos um aumento no número de macrófagos parasitados nas infecções com a linhagem de *L. (L.) amazonensis* transgênica para o gene *LaLRR17* quando comparados com as infecções com a linhagem selvagem e infecções com a linhagem contendo o vetor vazio. Esse fenótipo foi também observado quando utilizamos macrófagos peritoniais residentes de camundongos BALB/c, para os quais a linhagem de *L. (L.) amazonensis* transgênica também apresentou uma maior capacidade de infecção quando comparado com as linhagens selvagem e contendo o vetor vazio (dados não mostrados).

A infectividade da linhagem *La [pXG1 NEO LaLRR17 myc]* foi também ensaiada “*in vivo*” através de infecção de camundongos BALB/c, onde observamos que as lesões dos grupos de camundongos infectados com as linhagens transgênicas apresentaram uma diminuição no tamanho das lesões quando comparados com o grupo infectado com a linhagem selvagem. Entretanto, não foram observadas diferenças entre as linhagens *La [pXG NEO LaLRR17 myc]* e *La [pXG NEO]*. Aparentemente, apenas a presença do vetor nativo foi responsável por diminuir a virulência do parasita. As lesões com esta linhagem foram bem menores quando comparadas com a linhagem selvagem. Alterações de virulência de cepas transfectantes controle também foram observadas durante a super-expressão do gene *META 2* em *L. (L.) amazonensis*. Linhagens contendo o vetor pTEX nativo aumentaram a virulência “*in vivo*” quando comparadas com a linhagem selvagem (Ramos, 2006). Resultados idênticos também foram observados durante a super-expressão do gene *LmjLRR17* de *L. (L.) major* em *L. (L.) amazonensis* - *La [pXG NEO LmjLRR17 myc]*. As lesões com esta linhagem foram bem menores quando comparadas com a linhagem selvagem. Porém se compararmos a linhagem *La [pXG NEO LmjLRR17 myc]* com a linhagem contendo o vetor nativo não houve diferença significativa (Franco, 2008).

A infecção de macrófagos de medula de camundongos BALB/c com *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*, levou a um aumento na produção de nitrito nos sobrenadantes de cultura dessas infecções. Recentes estudos apontam que o Óxido Nítrico (NO) possui um relevante papel na resposta imunológica de macrófagos

humanos a infecções intracelulares, mas a natureza desse papel ainda não está bem definida (Gantt et al., 2001; Nicholson et al., 1996). A ação leishmanicida da produção de NO, em células eucarióticas, incluem inibição da cadeia respiratória em mitocôndrias, inativação de peróxidasas, inibição da glicólise, mutação de DNA, inibição do reparo e síntese do DNA e peroxidação de lipídeos de membrana (Bogdan, 2001).

Resistência ao NO foi descrita em *E.coli* e *Mycobacterium tuberculosis* e isolados resistentes foram associados com efeitos mais severos da doença, quando comparado com linhagens não resistentes (Fang, 1997). Em *Leishmania*, recentes trabalhos demonstraram que a resistência ao NO de isolados de *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis* conferem benefícios para a sobrevivência do parasita dentro do macrófago e provavelmente exacerba as características clínicas da doença (Giudice et al., 2007). Em nossos experimentos, as linhagens transgênicas para o gene LRR17, tanto de *L. (V.) braziliensis* como de *L. (L.) amazonensis* apresentaram aumento na produção de NO nos sobrenadantes de infecção, quando comparados às linhagens selvagens. Uma das hipóteses que explica esse resultado pode ser o fato de que as linhagens transgênicas, por serem mais infectivas que as linhagens selvagens, expõem o macrófago a uma condição de estresse maior durante a infecção, o que pode resultar em uma maior produção de NO pelo macrófago. Esse aumento na quantidade de NO no entanto, não é eficiente para eliminação da *Leishmania* transgênica, que além de ser mais infectiva que a linhagem selvagem, possui um maior número de amastigotas por macrófago.

Em *L. (V.) braziliensis*, nós tentamos determinar através de imunofluorescência de células Vero infectadas a localização estrutural da proteína LbLRR17, bem como a localização subcelular em promastigotas de fase logarítmica e estacionária de *L. (V.) braziliensis*. Infelizmente, não conseguimos por imunofluorescência determinar a localização da proteína LRR17 em *L. (V.) braziliensis*, pois o anticorpo anti-N-terminal da proteína LRR17 não reagiu em ensaios de imunofluorescência. Acreditamos que a razão possa ser que a proteína na forma nativa, devido a sua conformação, esteja impedindo que o anticorpo reconheça sítios específicos na proteína LRR17.

A ativação da produção de citocinas na célula hospedeira tem um papel crucial no estabelecimento da infecção. No modelo de infecção por *L. (L.) major* uma resposta celular Th1 está relacionada com a resistência ao parasita enquanto uma resposta celular Th2 geralmente traduz suscetibilidade à doença (Alexander e Bryson, 2005). Estas diferenças de resposta imune estão diretamente relacionadas à ativação de fatores de transcrição envolvidos no controle da expressão de diferentes citocinas como IL-12 e TNF- α (Ji et al., 2002). O fenótipo observado nas infecções in vitro com os mutantes LRR17 precisa ser melhor estudado, determinando-se o perfil da resposta celular. Esses dados poderão ser obtidos através da dosagem da produção de citocinas IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-4 e TNF- α nos sobrenadantes de cultura celular de macrófagos infectados com *L. (V.) braziliensis* linhagens selvagem e transgênica e macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* linhagens selvagem e transgênica. Pretendemos também analisar em camundongos infectados com *L. (V.) braziliensis* linhagens selvagem e transgênica e *L. (L.) amazonensis* linhagens selvagem e transgênica a regulação da resposta imune por citocinas tanto por ELISA como também através da análise pela técnica qPCR, da expressão de RNA mensageiro que codifica para as citocinas IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-4 e TNF- α .

Sabemos que em *L. (V.) braziliensis* a proteína LRR17 é secretada por promastigotas e amastigotas. De forma semelhante, em *L. (L.) amazonensis* mostramos que ocorre secreção da proteína LRR17 na forma promastigota do parasita. Dados anteriores de nosso laboratório mostram também em *L. (L.) amazonensis* a localização da proteína LRR17 no citoplasma do macrófago e não no vacúolo parasitóforo, observada por microscopia eletrônica e nas reações de imunohistoquímica (Franco, 2008). Esses dados nos levam a especular que a proteína LaLRR17 e que provavelmente a LbLRR17, consigam acessar o citosol da célula hospedeira. A localização da proteína LRR17 no citoplasma de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* indica que esta proteína possa estar interagindo com moléculas da célula hospedeira, possivelmente através das regiões LRRs. Essa interação pode modular a resposta de defesa celular e favorecer a sobrevivência do parasita.

6 CONCLUSÃO

- A expressão do gene LRR17 é regulada de forma diferente ao longo do ciclo biológico de *L.(V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*;
- A proteína LRR17 de 72 kDa de *L.(V.) braziliensis* é secretada tanto nos estágios de promastigota como amastigota. Em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* há a secreção das proteínas LRR17 de 72 kDa e 17 kDa;
- A linhagem de *L.(V.) braziliensis* transgênica para a proteína *LbLRR17* foi mais virulenta em infecções de macrófagos *in vitro*;
- A linhagem de *L. (L.) amazonensis* transgênica para a proteína *LaLRR17* foi mais virulenta em infecções de macrófagos *in vitro*;
- Infecções de macrófagos com linhagens de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* transgênicas para a proteína LRR17 apresentaram um aumento na síntese de NO, quando comparadas a linhagens selvagens.
- Proteínas secretadas pela *Leishmania* são capazes de estimular e modular os macrófagos para se tornarem mais susceptíveis a invasão pelo parasita.

REFERÊNCIAS

Referências*

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

Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol*. 2002;169(2):898-905.

Agabian N. Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*. 1990;61(7):1157-60.

Akarid K, Arnoult D, Micic-Polianski, J, Sif J, Estaquier J, Ameisen JC. *Leishmania major*-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *J Leukoc Biol*. 2004;76:95-103.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124:783-801.

Alder MN, Rogozin IB, Iyer LM, Glazko GV, Cooper MD, Pancer Z. Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. *Science*. 2005;3310(5756):1970-3.

Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett*. 2005;99(1):17-23.

Allison M. Leishmaniasis. In: organization Kenneth F Kiple. The Cambridge world history of human disease. Cambridge. Cambridge University Press; 1993 chapter 8, p. 832-4.

Aly R, Argaman M, Halman S, Shapira M. A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in *Leishmania*. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22(15):2922-9.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. 2008; 21(2):334-59.

Amato VS, Andrade Jr HF, Duarte MIS. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop*. 2003;85:39-49.

***De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical Journal: sample references. Available from <http://www.icmje.org> [2007 May 22].**

Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin Exp Immunol*. 2004;136:341-8.

Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*. 2004;119(6):238-58.

Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*. 2002;70:6734-40.

Bairoch A. The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(13):3097-103.

Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-83.

Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, Segal DM. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*. 2003; 24(10):528-33.

Bendtsen JD, Nielsen H, Von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol*. 2004;340:783-95.

Benne R, Van den Burg J, Brakenhoff JP, Sloof P, Van Boom JH, Tromp MC. Major transcript of the frameshifted coxII gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*. 1986;46:819-26.

Benne R. RNA editing in trypanosomes. *Eur J Biochem* 1994;221:9-23.

Bente M, Harder S, Wiesgigl M, Heukeshoven J, Gelhaus C, Krause E, et al. Developmentally induced changes of the proteome in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proteomics*. 2003;3(9):1811-29.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. 2005;309:416-22.

Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*. 1999;294(5):1351-1362.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*. 2001;2(10):907-16.

Bogdan C, Rollinghoff M, Solbach W. Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitology Today*. 1990b;6:183-7.

Boothroyd JC, Cross GA. Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. *Gene* 1982;20(2):281-9

Bourreau E, Prévot G, Gardon J, Pradinaud R, Launois P. High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. *J Infect Dis* 2001;184:1628-30.

Brodskyn CI, Dekrey GK, Titus RG. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. *Infect Immun* 2001;69:665-72.

Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet.* 1999;21(1 Suppl):33-7.

Brittingham A, Miller MA, Donelson JE, Wilson ME. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;112(1):51-9.

Bray RS. *Leishmania mexicana mexicana*: attachment and uptake of promastigotes to and by macrophages in vitro. *J Protozool.* 1983;30(2):314-22.

Buchanan SG, Gay NJ. Structural and functional diversity in the leucine-rich family of proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 1996;65:1-44.

Camargo-Neves VL, Gomes Ade C, Antunes JL. Correlation of the presence of phlebotominae species (Diptera: Psychodidae) with records of American tegumentary leishmaniasis cases in the State of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35:299-306.

Campbell DA, Thornton DA, Boothroyd JC. Apparent discontinuous transcription of *Trypanosoma brucei* variant surface antigen genes. *Nature.* 1984;311(5984):350-5.

Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol.* 2001;167(1):416-23.

Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol.* 2003;4(7):702-7.

Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3497-500.

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

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

Cohen SN, Chang ACY, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci*. 1972;69:2110-4

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

Cruz AK, Titus R, Beverley SM. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(4):1599-603

Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavante C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*. 2006;123:357-88.

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

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

Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006;312(5771):212-7.

Dunan S, Meller C, Kaplanski S, Mary C, Faugere B, Franck J, Toga I, Farnarier C, Quilici M.. Étude de l'immunité cellulaire chez des malades atteints de leishmaniose viscérale méditerranéenne. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropical*. 1990;70:83-97.

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

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

Fang FC. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. J Clin Invest. 1997;99(12):2818-25.

Faust EC, Russel PF, Jung RC. Parasitologia Clínica. Barcelona, Salvat. Ed. Salvat S.A; 1974.

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 1983;132:3-13.

Filardy AA, Pires DR, Dosreis GA. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to *Leishmania* infection. Cell Mol Life Sci. 2011;68(11):1863-70.

Flandin JF, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. Eur J Immunol. 2006;36(2):411-20.

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

Gantt KR, Goldman TL, McCormick ML, Miller MA, Jeronimo SM, Nascimento ET, Britigan BE, Wilson ME. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. J Immunol. 2001;167(2):893-901.

Garraway LA, Tosi LR, Wang Y, Moore JB, Dobson DE, Beverley SM. Insertional mutagenesis by a modified in vitro Ty1 transposition system. Gene. 1997;198(1-2):27-35.

Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. Parasite Immunol. 2000;22:319-31.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. J Biol Chem. 2003;278(11):8869-72.

Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME, Ho JL, de Jesus AR, Carvalho EM, Almeida RP. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. BMC Infect Dis. 2007;7:7.

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

Gorman MA, Uboldi AD, Walsh PJ, Tan KS, Hansen G, Huyton T, Ji H, Curtis J, Kedzierski L, Papenfuss AT, Dogovski C, Perugini MA, Simpson RJ, Handman E, Parker MW. Crystal structure of the *Leishmania major* MIX protein: A scaffold protein that mediates protein-protein interactions. *Protein Sci.* 2011;20(6):1060-8.

Greene LH, Chrysina ED, Irons LI, Papageorgiou AC, Acharya KR, Brew K. Role of conserved residues in structure and stability: tryptophans of human serum retinol-binding protein, a model for the lipocalin superfamily. *Protein Sci.* 2001;10(11):2301-16.

Grellier P, Vendeville S, Joyeau R, Bastos IM, Drobecq H, Frappier F, Teixeira AR, Schrvel J, Davioud-Charvet E, Sergheraert C, Santana JM. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J Biol Chem.* 2001;14;276:47078-86

Gregory DJ, Olivier M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. *Parasitology.* 2005;130 (Supl):S27-35.

Guizani-Tabbane L, Ben-Aissa K, Belghith M, Sassi A, Dellagi K. *Leishmania major* amastigotes induce p50/c-Rel NF-kappa B transcription factor in human macrophages: involvement in cytokine synthesis. *Infect Immun.* 2004;72(5):2582-9.

Haraga A, Miller SI. A *Salmonella enterica* serovar typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. *Infect Immun.* 2003;71(7):4052-8.

Hartmann C, Hotz HR, McAndrew M, Clayton C. Effect of multiple downstream splice sites on polyadenylation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1998;93(1):149-52

Handman E. Cell biology of *Leishmania* *Adv Parasitol.* 1999;44:1-49.

Harton JA, Linhoff MW, Zhang J, Ting JP. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol.* 2002;169(8):4088-93.

Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp.Dermatol.* 2000;25:363-70.

Hirt RP, Harriman N, Kajava AV, Embley TM. A novel potential surface protein in *Trichomonas vaginalis* contains a leucine-rich repeat shared by micro-organisms from all three domains of life. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;125(1-2):195-9.

Huang J, Van der Ploeg LH. Requirement of a polypyrimidine tract for trans-splicing in trypanosomes: discriminating the PARP promoter from the immediately adjacent 3' splice acceptor site. *EMBO J.* 1991;10(12):3877-85.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. Science. 2005;9:436-42.

Ilg T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. EMBO J. 2000;19(9):1953-62.

Ilg T, Montgomery J, Stierhof YD, Handman E. Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania major* gene, ppg1, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. J Biol Chem. 1999;274(44):31410-20.

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

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. J Biol Chem. 2003;278(8):5509-12.

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

Jeronimo SM, Duggal P, Braz RF, Cheng C, Monteiro GR, Nascimento ET, Martins DR, Karplus TM, Ximenes MF, Oliveira CC, Pinheiro VG, Pereira W, Peralta JM, Sousa J, Medeiros IM, Pearsoni RD, Burns TL, Pugh EW, Wilson ME. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. Scand J Infect Dis. 2004;36(6-7):443-9.

Ji J, Sun J, Qi H, Soong L. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(4):338-45.

Jiménez-Ruiz A, Boceta C, Bonay P, Requena JM, Alonso C. Cloning, sequencing, and expression of the PSA genes from *Leishmania infantum*. Eur J Biochem. 1998;251(1-2):389-97.

Johner A, Kunz S, Linder M, Sahakur Y, Seebeck T. Cyclic nucleotide specific phosphodiesterases of *Leishmania major*. BMC Microbiol. 2006;6:25.

Johnson PJ, Kooter JM, Borst P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. Cell. 1987;51(2):273-81.

Junqueira Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VMA, Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis 2003;47:477-85.

Kapler GM, Coburn CM, Beverley SM. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol. Cell. Biol.* 1990;10:1084–1094.

Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell.* 2006;124:823-35.

Kajava AV. Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J Mol Biol.* 1998;277:519-27.

Kedzierski Ł, Montgomery J, Curtis J, Handman E. Leucine-rich repeats in host-pathogen interactions. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2004;52(2):104-12.

Kelly JM, Das P, Tomas AM. An approach to functional complementation by introduction of large DNA fragments into *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* using a cosmid shuttle vector. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;65(1):51-62.

Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(15):3963-9.

Kern S. Palearctic origin of leishmania. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2000;95:75-80.

Kobe B, Deisenhofer J. Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine rich repeats. *Nature.* 1993;366:751-6.

Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.* 2001;11(6):725-32.

Korner U, Fuss V, Steigerwald J, Moll H. Biogenesis of *Leishmania major*-harboring vacuoles in murine dendritic cells. *Infect Immun.* 2006;74(2):1305-12.

Kufer TA, Fritz JH, Philpott DJ. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol.* 2005;13(8):381-8

Laban A, Tobin JF, Curotto de Lafaille MA, Wirth DF. Stable expression of the bacterial *neor* gene in *Leishmania enriettii*. *Nature.* 1990;343(6258):572-4.

Laban A, Wirth DF. Transfection of *Leishmania enriettii* and expression of chloramphenicol acetyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(23):9119-23.

Laemmli UK, Mölbert E, Showe M, Kellenberger E. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J Mol Biol.* 1970;49(1):99-113.

Laison R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: editors Peters W, Killick-Kendrik R. *The Leishmaniasis in the biology and medicine*. London: Academic Press; 1987 p:1-20.

Landfear SM, McMahon-Pratt D, Wirth DF. Tandem arrangement of tubulin genes in the protozoan parasite *Leishmania enriettii*. *Mol Cell Biol.* 1983;3(6):1070-6.

Lastres JB. *La medicina en la epoca Inca. Historia de la medicina peruana*. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1951.

LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.* 1993;7(6):996-1007.

LeBowitz JH, Coburn CM, McMahon-Pratt D, Beverley SM. Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(24):9736-40.

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

Lingnau A, Domann E, Hudel M, Bock M, Nichterlein T, Wehland J, et al. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun.* 1995;63(10):3896-903.

Lisi S, Sisto M, Acquafredda A, Spinelli R, Schiavone M, Mitolo V, Brandonisio O, Panaro M. Infection with *Leishmania infantum* Inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *J Eukaryot Microbiol.* 2005;52:211-17.

Liu X, Chang KP. Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (gp63)-deficient *Leishmania* increases their binding to macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(11):4991-5.

Lukes J, Hashimi H, Zikova A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet* 2005;48:277-99.

Lye LF, Owens K, Shi H, Murta SM, Vieira AC, Turco SJ, Tschudi C, Ullu E, Beverley SM. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathog.* 2010; 28;6(10):1001-161.

Matos DS, Azeredo-Coutinho RBG, Schubach A, Conceição-Silva F, Baptista C, Moreira JS, Mendonça SCF. Differential interferon- γ production characterizes the cytokine responses to *Leishmania* and *Mycobacterium leprae* antigens in concomitant mucocutaneous leishmaniasis and lepromatous leprosy. *Clin Infect Dis* 2005;40:5-12.

Marino M, Braun L, Cossart P, Ghosh P. A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria internalins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 1;97(16):8784-8.

Martinez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K, Myler PJ. Transcription initiation and termination on *Leishmania major* chromosome 3. *Eukaryot Cell*. 2004;3(2):506-17.

Martinez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*. 2003;11(5):1291-9.

Marzochi, MC A .Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging anthroponosis and possibilities for their control. Rio de Janeiro. Cadernos de Saúde Pública.1994;10(2):359-75.

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

McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MA, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO J*. 1992;11(10):3593-600.

McNicoll F, Drummelsmith J, Müller M, Madore E, Boilard N, Ouellette M, Papadopoulou B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. *Proteomics*. 2006; 6(12):3567-81.

McConville MJ, Blackwell JM. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *J Biol Chem*. 1991;266(23):15170-9.

McGuinness DH, Dehal PK, Pleass RJ. Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol*. 2003;19(7):312-9.

Medina-Acosta E, Beverley SM, Russel DG.. Evolution and expression of the *leishmania* surface proteinase (gp63) gene locus. *Infect Agents Dis*. 1993;2:25-34.

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

Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 2004;189:1018-23.

Mengaud J, Lecuit M, Lebrun M, Nato F, Mazie JC, Cossart P. Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin. *Infect Immun*. 1996;64(12):5430-3.

Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 2006;442(7098):39-44.

Mizbani A, Taslimi Y, Zahedifard F, Taheri T, Rafati S. Effect of A2 gene on infectivity of the nonpathogenic parasite *Leishmania tarentolae*. *Parasitol Res*. 2011 Mar 26; [Epub ahead of print].

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=infectivity%20of%20the%20nonpathogenic%20parasite%20Leishmania%20tarentolae>.

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

Montgomery J, Ilg T, Thompson JK, Kobe B, Handman E. Identification and predicted structure of a leucine-rich repeat motif shared by *Leishmania major* proteophosphoglycan and Parasite Surface Antigen 2. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;107(2):289-95.

Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol*. 1994;152(6):2930-7.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology*. 1986;24:17-27.

Naderer T, Vince JE, McConville MJ. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr Mol Med*. 2004;4(6):649-65.

Neiva A. Leishmaniasis tegumentaria americana. In: Primera Conferencia de la Sociedad Sudamericana de Higiene, Microbiología y Patología. 1917; Buenos Aires p.311-73.

Nicholson S, Bonecini-Almeida Mda G, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho JL. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med*. 1996;183(5):2293-302.

Nourbakhsh F, Uliana SR, Smith DF. Characterisation and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;76(1-2):201-13.

Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-Coffee. A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*. 2000;302(1):487-93.

Noyes H. Implications of a neotropical origin of the genus *Leishmania*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1993;5:675-61.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature. 2001;411(6837):603-6.

Olivier, M. Modulation of host cell intracellular Ca²⁺. Parasitology Today. 1996;12:145-150.

Paul W E. Infectious diseases and the immune system. Scientific American. 1993;269:90-7.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat Genet. 2007;39(7):839-47.

Pessoa SB. Parasitologia médica. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan; 1958.

Pessoa SB. Leishmaniose tegumentar americana. Rio de Janeiro; Ministério da Educação e Saúde, Serviço de Documentação; 1948.

Piani A, Ilg T, Elefanty AG, Curtis J, Handman E. *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. Microbes Infect. 1999;1(8):589-99.

Polgár L. The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(2):349-62.

Pratlong F, Dereure J, Deniau M, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dedet JP. Enzymatic polymorphism during *Leishmania*/HIV co-infection: a study of 381 *Leishmania* strains received between 1986 and 2000 at the international cryobank in Montpellier, France. Ann Trop Med Parasitol. 2003;97(1):47-56.

Prina E, Abdi SZ, Lebastard M, Perret E, Winter N, Antoine JC. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. J Cell Sci. 2004;15(117):315-25.

Raff M. Cell suicide for beginners. Nature. 1998;396(6707):119-22.

Ramos CR, Abreu PA, Nascimento AL, Ho PL. 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. 2004;37(8):1103-9

Raziuddin S, Telmasani A W, el-Hag el-Awad M, al-Amari O, al-Janadi M. Gamma delta T cells and the immune response in visceral leishmaniasis. *European Journal of Immunology*. 1992;22:1143-48.

Real F, Mortara RA, Rabinovitch M. Fusion between *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* parasitophorous vacuoles: live imaging of coinfecting macrophages. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(12):e905.

Rezai H R, Ardehali S M, Amirhakimi G, Kharazmi A. Immunological features of kala-azar. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1978;27:1079-83.

Rochette A, Raymond F, Corbeil J, Ouellette M, Papadopolou B. Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2009;165(1):32-47.

Rochette A, Raymond F, Ubeda JM, Smith M, Messier N, Boisvert S, Rigault P, Corbeil J, Ouellette M, Papadopolou B. Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. *BMC Genomics*. 2008;29(9):255.

Ruhland A, Leal N, Kima PE. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cell Microbiol*. 2007;9:84-96.

Sacks DL, Perkins P. Development of infective stage of *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sandflies. *Am.J. Trp Med Hyg*. 1985;34:456-9.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-4.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*. 1975;94(3):441-8.

Santana JM, Grellier P, Schrével J, Teixeira AR. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J*. 1997;1:325:129-37.

Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun*. 1992;17(4):221-37.

Schwartz E, Hatz C, Blum J. New world cutaneous leishmania in travellers. *Lancet Infect Dis*. 2006;6:342-349

Simpson L, Thiemann OH, Savill NJ, Alfonzo JD, Maslov DA. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. *Proc Natl Acad Sci*. 2000;97(13):6986-93

Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 1987;41:363-82.

Simpson L. Structure and function of kinetoplast DNA. *J Protozool.* 1973;20(1):2-8.

Simpson L, Thiemann OH. Sense from nonsense: RNA editing in mitochondria of kinetoplastid protozoa and slime molds. *Cell* .1995;81: 837-840.

Seiwert SD, Stuart K. RNA editing: transfer of genetic information from gRNA to precursor mRNA in vitro. *Science.* 1994;266: 114-117.

Sollner-Webb B. RNA editing. *Current Opinion in Cellular Biology.* 1991;3: 1056-1061.

Southern EM. Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Anal Biochem.* 1979;100(2):319-23.

Souza AE, Waugh S, Coombs GH, Mottram JC. Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. *FEBS Lett.* 1992;311:124-7

Tanabe T, Chamaillard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, et al. Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J.* 2004;23(7):1587-97.

Takahashi N, Takahashi Y, Putnam FW. Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich α_2 -glycoprotein of human serum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82:1906-10.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.

Tetaud E, Lecuix I, Sheldrake T, Baltz T, Fairlamb AH. A new expression vector for *Crithidia fasciculata* and *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;120(2):195-204.

Thomas-Soccol V. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross *American Parasitology Human Comp.* 1903;68:107-8

Ting JP, Kastner DL, Hoffman HM. CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(3):183-95.

Tschudi C, Young AS, Ruben L, Patton CL, Richards FF. Calmodulin genes in trypanosomes are tandemly repeated and produce multiple mRNAs with a common 5' leader sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(12):3998-4002

Tschudi C, Ullu E. Polygene transcripts are precursors to calmodulin mRNAs in trypanosomes. *EMBO J.* 1988;7(2):455-63.

Turco SJ, Spath GF, Beverley SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol.* 2001;17(5):223-6.

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

Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J Eukaryot Microbiol*. 1994;41(4):324-30.

Velozo D, Cabral A, Ribeiro MCM, Motta JOC, Costa I M C, Sampaio RNR. Leishmaniose mucosa fatal em criança. *An Bras Dermatol*. 2006;81:3.

Veras PS, Moulia C, Dauguet C, Tunis CT, Thibon M, Rabinovitch M. Entry and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes within phagolysosome-like vacuoles that shelter *Coxiella burnetii* in Chinese hamster ovary cells. *Infect Immun*. 1995;63(9):3502-6.

Walker J, Vasquez JJ, Gomez MA, Drummelsmith J, Burchmore R, Girard I, et al. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;147(1):64-73.

Weischenfeldt J, Porse B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. 2008 Dec 1; 2008:pdb.prot5080. doi: 10.1101/pdb.prot5080.

Wu Y, El Fakhry Y, Sereno D, Tamar S, Papadopoulou B. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania amastigotes* encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;110(2):345-57.

Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;132(1):1-16.

Zhang H, Yan W, Aebersold R. Chemical probes and tandem mass spectrometry: a strategy for the quantitative analysis of proteomes and subproteomes. *Curr Opin Chem Biol*. 2004;8(1):66-75.

Zhang WW, Matlashewski G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol Microbiol*. 2001;39(4):935-48.