



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Estudos Estruturais e Funcionais do Fator Inibitório da Migração dos Macrófagos de
Leishmania major (LmMIF2) e de Mutantes da Região Carboxi-terminal**

Elise Marques Freire Cunha

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2019



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Estudos Estruturais e Funcionais do Fator Inibitório da Migração dos Macrófagos de
Leishmania major (LmMIF2) e de Mutantes da Região Carboxi-terminal**

Elise Marques Freire Cunha

Tese de Doutorado

Orientador: Prof^o Dr. Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira

RIBEIRÃO PRETO - SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Cunha, Elise Marques Freire

Estudos estruturais e funcionais do Fator Inibitório da Migração dos Macrófagos de *Leishmania major* (LmMIF2) e de mutantes da região Carboxi terminal, Ribeirão Preto, 2019.

131 p. : il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química

Orientador: Arthur Henrique Cavalcante de Oliveira

1. *Leishmania major*. 2. Fator Inibitório de Migração de Macrófagos. 3. Análise estrutural em solução. 4. Manipulação genética. 5. Virulência

Resumo

CUNHA, E. M. F. Estudos estruturais e funcionais do Fator Inibitório da Migração dos Macrófagos de *Leishmania major* (LmMIF2) e de mutantes da região Carboxi-terminal. 2019. 131p. Tese de Doutorado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão, Universidade de São Paulo, 2019.

MIF é uma importante proteína pró-inflamatória e imunoreguladora que contribui para a patogenicidade de várias doenças, havendo uma correlação entre os níveis de MIF e a severidade dessas patologias. Ortólogos do MIF foram descritos em diversas espécies patogênicas ao homem, sugerindo que a produção desses ortólogos, por parasitas, tenha a função de modular a resposta imune, promovendo a sobrevivência dos parasitas no hospedeiro. Dessa forma, a caracterização estrutural e funcional de MIF2 de *L. major* pode contribuir para elucidar os aspectos envolvidos no mecanismo adotado pela *Leishmania* para evadir do sistema imune do hospedeiro, uma vez que já foi sugerido uma modulação de sistemas imunológicos de hospedeiros por outros parasitos que expressam MIF durante seu ciclo de vida. Neste trabalho, foi realizada caracterização estrutural em solução da MIF2 de *L. major* e de mutantes com deleções de 05 e 10 aminoácidos na cauda C-terminal. MIF2 de *L. major* e as mutantes W107F Δ 5, W65L Δ 5 e Wt Δ 10 foram expressas em *E. coli* e purificadas do extrato solúvel por cromatografia de afinidade e detectada por SEC-MALS como trímero em solução (pH 7 e 4). As análises de CD UV-distante mostram que as deleções na cauda C-terminal não ocasionaram alterações na estrutura secundária em relação à MIF2 e que as proteínas mantêm sua estrutura secundária estável até extremos de pH, sugerindo comportamento de glóbulo fundido. Com relação à estrutura terciária, CD de UV-próximo em pH 7 mostra que a deleção na cauda C-terminal da MIF2 ocasionou alterações no microambiente do triptofano. Esses dados foram confirmados pelas análises de fluorescência que mostraram que W107F Δ 5, W65L Δ 5 e Wt Δ 10 apresentaram deslocamento de λ máximo para a região do vermelho, indicando ambiente mais polar para este aminoácido. É possível observar para os mutantes W107F Δ 5 e Wt Δ 10 uma intensidade de fluorescência semelhante a da MIF2. O mutante W65L Δ 5 apresentou uma intensidade de fluorescência cerca de 50% menor do que a MIF2 recombinante evidenciando maior contribuição do W107 para a fluorescência da proteína. Espectros de fluorescência do ANS reforçam os resultados a respeito da existência de um estado de glóbulo fundido, uma vez que tanto MIF, quanto mutantes apresentaram mudanças na estrutura terciária em pHs mais ácidos (< 4,0). Os experimentos de Dicroísmo Circular utilizando concentrações de GdnHCl (0 – 6M) demonstram que a mutação de 10 aminoácidos na cauda C-terminal diminui a estabilidade da proteína. Os mutantes com 5 aminoácidos deletados na cauda C-terminal possuem estabilidade similar à MIF2 recombinante enquanto o mutante com 10 aminoácidos deletados na cauda C-terminal apresenta-se mais instável. Ensaio de migração de macrófagos *in vitro* mostraram que as deleções na cauda C-terminal não influenciaram na atividade das proteínas, mostrando que esta região não é essencial para esta atividade de MIF2. O nocaute gênico de MIF2 e MIFs foi obtido por CRISPR/Cas9. As cepas superexpressoras de MIF2 e mutantes MIF2 Δ 5 e MIF2 Δ 10 apresentaram crescimento similar à linhagem *L. major* Friedlin Cas9/T7 e da linhagem parental com o vetor pX63NEO vazio, mostrando que a reinserção de MIF2 e MIF mutada, mesmo que epissomal, restabeleceu a capacidade de replicar-se em cultura. O superexpressor de MIF2 epissomal teve virulência diminuída quando comparada a linhagem parental pX63NEO vazio e a expressão dos mutantes MIF2 Δ 5 e MIF2 Δ 10 epissomal revertem esse efeito. O nocaute de MIF2 e MIFs afetou o crescimento do parasito em cultura, diminuiu cerca de 70% da virulência durante a infecção *in vitro* e *in vivo* e mostrou que a região C-terminal está envolvida na modulação desta virulência.

Abstract

CUNHA, E. M. F. Structural and functional studies of Macrophage Migration Inhibitory Factor of *Leishmania major* (LmMIF2) and mutants of the Carboxy-terminal residues. 2019. 131p. Tese de Doutorado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão, Universidade de São Paulo, 2019.

MIF is an important pro-inflammatory and immunoregulatory protein that contributes to the pathogenicity of several diseases, with a correlation between MIF levels and the severity of these pathologies. MIF orthologues were described in several pathogenic species to human, suggesting that its production by parasites is related with immune response modulation, promoting parasite survival. Thus, the structural and functional characterization of *L. major* MIF2 may contribute to elucidate the aspects involved in the mechanism adopted by *Leishmania* to evade the host immune system, since it has been suggested modulation of host immune systems by other parasites which express MIF during its life cycle. In this work, structural characterization of MIF2 mutants with single tryptophan and $\Delta 5$ and $\Delta 10$ C-terminal deletions was performed. *L. major* MIF2 and W107F $\Delta 5$, W65L $\Delta 5$, Wt $\Delta 10$ mutants were expressed in *E. coli* and purified from the soluble extract by affinity chromatography and detected by SEC-MALS as a trimer in solution (pH 7 and 4). Far UV CD analyzes show that C-terminal deletion did not cause changes in secondary structure related to MIF2 and that the proteins maintain their secondary structure stable until pH 3, suggesting molten globule state. Regarding the tertiary structure, Near UV CD at pH 7 shows that MIF2 C-terminal deletions caused changes in tryptophan microenvironment. These data were confirmed by fluorescence analyzes that showed λ_{maximum} red shift for W107F $\Delta 5$, W65L $\Delta 5$ and Wt $\Delta 10$, indicating a more polar environment for this amino acid. W108F $\Delta 5$ and Wt $\Delta 10$ showed fluorescence intensity similar to MIF2. W65L $\Delta 5$ showed fluorescence intensity about 50% lower than the recombinant MIF2, evidentiating a greater contribution of W107 to the fluorescence of the protein. ANS fluorescence spectra reinforce the results regarding the existence of a molten globule state, since both MIF and mutants present changes in the tertiary structure in more acidic pHs (<4.0). Circular Dichroism experiments using concentrations of GdnHCl (0-6M) demonstrate that the $\Delta 10$ C-terminal decreases the protein stability. C-terminal $\Delta 5$ mutants have similar stability to recombinant MIF2 while the C-terminal $\Delta 10$ is more unstable. *In vitro*, macrophage migration assays showed that C-terminal deletions did not influence protein activity, showing that this region is not essential for MIF2 activity. Genetic knockout of MIF2 and MIFs were obtained using CRISPR/Cas9. MIF2, MIF2 $\Delta 5$ and MIF2 $\Delta 10$ overexpressor strains showed similar growth curve to *L. major* Friedlin Cas9/T7 and parental lineage with pX63NEO vector, showing that episomal reinsertion of mutated MIF2 and mutant MIF2, reestablished the ability to replicate in culture. Episomal MIF2 overexpressor had decreased virulence increased when compared to pX63NEO vector overexpressor and MIF $\Delta 5$ and MIF2 $\Delta 10$ mutants reserved thie effect. KOMIF2 and KOMIFs affected growth of the parasite in culture, decreased about 70% of virulence during *in vitro* and *in vivo* infection and showed that the C-terminal region is envolved in the modulation this virulence.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O parasito *Leishmania* e as Leishmanioses

Os agentes causadores das leishmanioses são os parasitos protozoários classificados taxonomicamente no gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae e classe Kinetoplastea. (Vickerman, 2000). Cerca de 20 espécies do gênero *Leishmania* são os que infectam mamíferos, causando a leishmaniose. Dois gêneros de insetos transmitem esses protozoários ao homem: *Phlebotomus*, no velho mundo, e *Lutzomyia*, na América.

Os protozoários são organismos unicelulares e considerados digenéticos, pois alternam entre dois hospedeiros, vertebrado e invertebrado, diferenciando-se em dois ciclos principais (Figura 1). No primeiro, o parasito é flagelado, móvel (promastigota procíclico) e adere-se às células epiteliais no trato digestivo do inseto hospedeiro. Os parasitos encontrados na região apical do aparelho digestório do inseto secretam uma substância gelatinosa composta principalmente por proteoglicanas, única de *Leishmania* que leva ao acúmulo de promastigotas metacíclicas nessa região e à obstrução mecânica da porção apical do aparelho digestório do inseto, dificultando a ingestão do sangue (Rogers *et al.*, 2004). Nesse estágio, além da multiplicação do protozoário, há a metaciclogênese: termo utilizado para descrever a diferenciação da forma promastigota procíclica (não infectiva) para a forma promastigota metacíclica (infectiva).

O segundo estágio do ciclo de vida do protozoário inicia-se com a injeção intradérmica das formas metacíclicas pela picada do inseto no hospedeiro vertebrado. O flebotomíneo (Figura 2 A) possui um aparelho bucal muito curto, sendo assim o inseto não consegue aprofundar a picada a mais de 2 a 3 mm na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto. Enquanto as fêmeas infectadas por *Leishmania* se alimentam de sangue para a maturação dos ovócitos, as promastigotas (Figura 2B) metacíclicas são regurgitadas no local da picada (Abdeladhim *et al.*, 2014).

Após a picada do inseto ocorre um estímulo para a migração de células fagocíticas para a região, principalmente neutrófilos, células dendríticas e macrófagos, que reconhecem elementos de superfície e fagocitam os parasitos que foram regurgitados (Sharma e Singh, 2008).

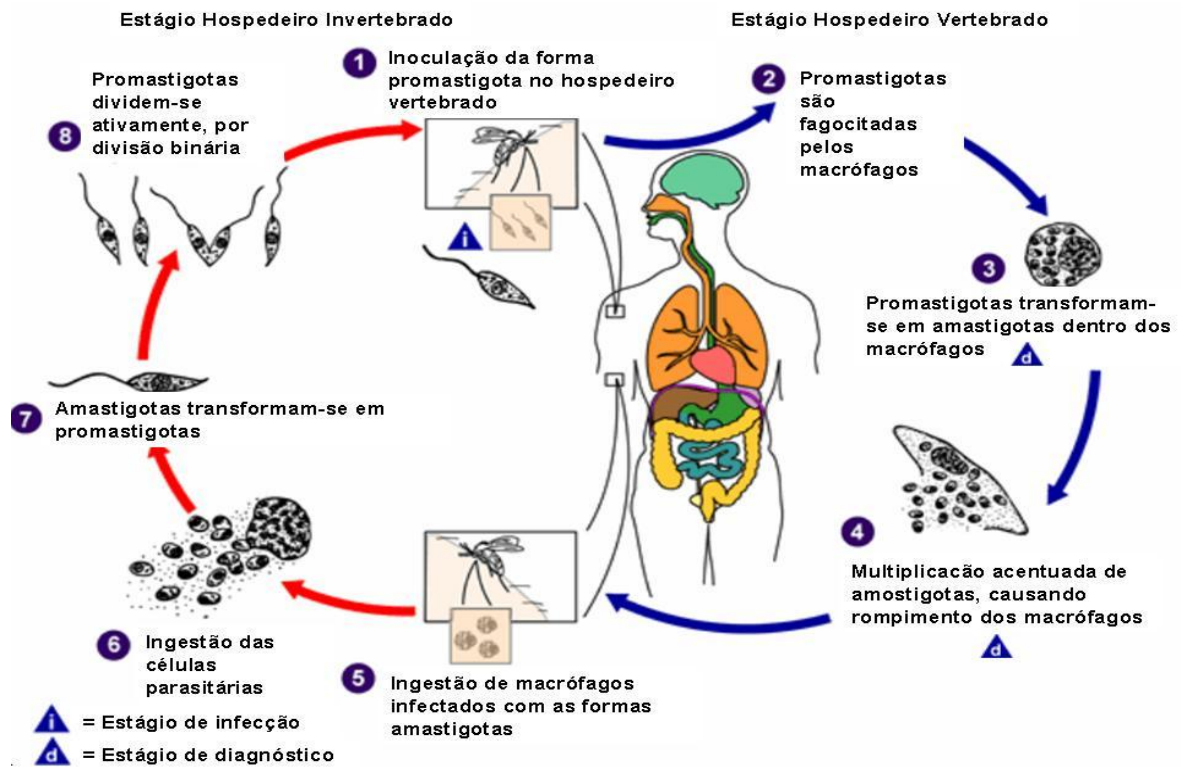


Figura 1. Ciclo de Vida da *Leishmania*

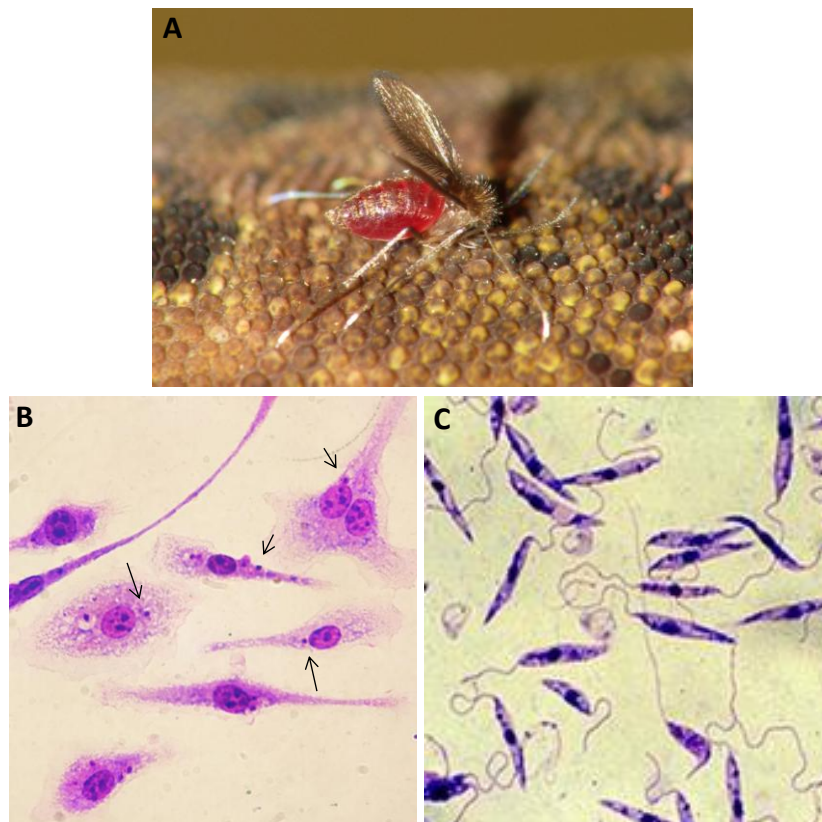


Figura 2. Inseto vetor da leishmaniose e as principais formas do parasito *Leishmania*. A) Flebotomíneo; B) Macrófagos, distinguidos dos pelos núcleos, contendo formas amastigotas (indicado pelas setas) em seu citoplasma; C) Formas promastigotas de *Leishmania sp* encontradas no intestino do vetor. FONTE: a) WHO, (2019) B) FONTE: Bruno Tavares Biagi C) FONTE: <http://www.faperj.br/?id=816.2.2>

As seguintes etapas são necessárias para dar continuidade ao ciclo de vida do protozoário: i) a adesão do parasito na superfície do macrófago atraído para o local, (ii) a fagocitose, (iii) a sobrevivência dentro do fagossomo no macrófago, (iv) a diferenciação da forma promastigota para a amastigota com flagelo recolhido na bolsa flagelar e (v) a multiplicação da forma amastigota.

A adesão na superfície do macrófago é mediada pelo LPG e pela metalo-protease gp63 da promastigota, interagindo com receptores CR3 do macrófago (Chang *et al.*, 1990; Blackwell *et al.*, 1985; Bogdan & Röllinghoff, 1998; Russell e Wilhelm, 1986; Wanderley *et al.*, 2005). A endocitose é mediada por receptores do complemento, preferencialmente do tipo CR1, formando o fagossomo. Com a fusão do fagossomo e do lisossomo, há a diferenciação e proliferação da forma amastigota nas condições hostis da organela, seguidas da lise e liberação das formas diferenciadas (Peters, *et al.*, 1995). O inseto, ao picar o vertebrado infectado, ingere monócitos e macrófagos contendo formas amastigotas do parasito (Figura 2C), que no trato digestivo do inseto se diferenciam em promastigotas procíclicas, completando o ciclo de vida do parasito.

Populações humanas de 80 países são afetadas pela leishmaniose, que é endêmica em regiões subtropicais e tropicais do globo, sendo a grande maioria dos países atingidos pela doença classificada como subdesenvolvida ou em desenvolvimento (Desjeux, 2004; WHO, 2019). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2019) em 2017 dos 20.792 mil novos casos registrados, 20.145 mil ocorreram em 07 países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão.

Doenças causadas por parasitos protozoários são responsáveis por inúmeros casos de morbidade e mortalidade em vários países, o que retrata um sério problema de saúde pública mundial (Tiuman *et al.*, 2005).

A leishmaniose pode ser classificada em cutânea, mucocutânea, visceral (ou calazar) e cutânea difusa (Figura 3), dependendo do quadro clínico e epidemiológico apresentado. Na forma cutânea de leishmaniose, que pode evoluir para cura espontânea, as lesões cutâneas aparecem em número grande e variável. A mucocutânea causa erupções na mucosa nasobucofaríngea. A forma visceral é a mais grave, atingindo órgãos como o baço e o fígado, podendo ser letal. Indivíduos anérgicos especificamente à *Leishmania* desenvolvem lesões que não ulceram, caracterizando a forma cutânea difusa (WHO, 2019).



Figura 3. Imagens de pacientes diagnosticados com leishmaniose. A) Lesão ulcerosa típica de leishmaniose tegumentar (Leishmaniose cutânea). B) Doente com emagrecimento acentuado e hepatoesplenomegalia (Leishmaniose Visceral). C) Ulceração na porção cartilaginosa do septo nasal (Leishmaniose Mucocutânea). D) Múltiplas lesões ulcerosas (Leishmaniose Cutânea Difusa).

Após a transmissão dos parasitos de *Leishmania* por flebotomíneos, a manifestação da infecção pela doença requer mecanismos que permitam a replicação dos parasitos no hospedeiro vertebrado e que resista, pelo menos inicialmente, à defesa antileishmanicida inata e adquirida (Bogdan & Röllinghoff, 1997). O parasito evita o desencadeamento de respostas antimicrobianas, mesmo tendo sido fagocitados pelos macrófagos do sistema imune do hospedeiro, embora possam ser eliminados com o tempo, a partir do desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa efetiva (Olivier, Gregory & Forget, 2005).

Como todos os parasitos, os protozoários de *Leishmania* desenvolveram estratégias especializadas para evitar a destruição imune e completar seu ciclo de vida (Bogdan & Röllinghoff, 1997). Vários fatores específicos do hospedeiro e do parasito desempenham um papel na persistência da *Leishmania* nas células infectadas e na influência das manifestações clínicas da doença, que incluem úlceras cutâneas não cicatrizantes e envolvimento visceral. Entre esses fatores, a resposta da citocina do hospedeiro desempenha um papel fundamental ao efetuar respostas antimicrobianas inatas e promover a diferenciação de uma resposta protetora de células T (Schartonkersten e Scott, 1995).

1.2 O Fator Inibitório da Migração dos Macrófagos (MIF)

Citocinas são as moléculas mensageiras do sistema imune dos vertebrados que coordenam as respostas sistêmicas e locais de organismos infectados. Embora tenha sido identificada em 1966, como uma citocina produzida por linfócitos T que é liberado após uma ativação imune ou inflamatória e atua para inibir a migração aleatória de macrófagos (David, 1966; Bloom & Bennett, 1966), estudos ao longo das duas últimas décadas mostraram que o Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) está envolvido em uma grande variedade de processos celulares, incluindo regulação transcricional de produtos gênicos inflamatórios (Calandra, 2003), controle do ciclo celular (Pyle *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 1999), modulação da proliferação celular e diferenciação (Kleemann *et al.*, 2000), regulando a atividade de glucocorticóides (Calandra *et al.*, 1995) e inibição de p53 (Fingerle-Rowson *et al.*, 2003).

MIF é uma importante proteína pró-inflamatória e imunoreguladora que contribui para a patogenicidade de várias doenças, como a sepse, artrite reumatóide, cancro, diabetes e a esclerose múltipla, havendo uma correlação entre os níveis de MIF e a severidade dessas patologias (Calandra, 2003; Calandra *et al.*, 2000; Radstake & Bucala, 2007; Santos & Morand, 2006; Xu *et al.*, 2008; Bucala e Donnelly, 2007; Yabunaka *et al.*, 2000; Hoi *et al.*, 2007).

Em camundongos, MIF atuou como principal mediador liberado pela glândula pituitária em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) e amplificou a ação fatal do Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), causando endotoxemia letal (Bozza *et al.*, 1999; Calandra *et al.*, 2000). Foi observado em estudos prévios, que MIF poderia participar de um papel crítico na regulação da resistência do hospedeiro ao organismo patogênico; e por essa razão, o fator MIF está sendo estudado em camundongos infectados por diferentes patógenos.

MIF de mamíferos pode participar de um papel crítico na regulação da resistência do hospedeiro ao organismo patogênico; e por essa razão, o fator MIF vem sendo estudado em camundongos infectados por diferentes patógenos como *Salmonella serovar*, *Taenia crassiceps*, *Trypanosoma cruzi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* (Koebernick *et al.*, 2002; Rodriguez-Sosa *et al.*, 2003; Reyes *et al.*, 2006; Bozza *et al.*, 1999; Sashinami *et al.*, 2006). Esses estudos demonstraram que o fator MIF pode atuar positivamente ou negativamente nas infecções, dependendo do organismo patogênico. O MIF em camundongos, na presença de TNF- α endógeno, ressaltou a produção de óxido nítrico em macrófagos induzindo a morte de *L. major in vitro*. E foi observado também que em

camundongos infectados com *L. major*, tanto BALB/c suscetíveis quanto em C57BL/6 resistentes à infecção, expressaram alto nível de mRNA do MIF em seus nodos linfáticos (Juttner *et al.*, 1998). Além disso, os camundongos C57BL/6 (resistentes) deficientes de MIF (MIF^{-/-}) tornaram-se suscetíveis à infecção por *L. major*, desenvolvendo grandes lesões cutâneas, pois a atividade leishmanicida do macrófago foi prejudicada (Satoskar *et al.*, 2001). Do mesmo modo, os camundongos MIF^{-/-} foram suscetíveis à infecção por *T. cruzi*, com a redução na produção de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que MIF participa na ativação do sistema imune inato, e induz o início das respostas inflamatórias contra a infecção (Reyes *et al.*, 2006). Resultado similar foi relatado na infecção com *Taenia crassiceps*, na ausência de MIF em camundongos MIF^{-/-} (Rodriguez-Sosa *et al.*, 2003).

1.3 Homólogos do MIF em *Leishmania*

Um estudo do conteúdo solúvel da fração vesicular de espécies de *Leishmania* mostrou, pela primeira vez em tripanossomatídeos, a presença do Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) no extrato de *Leishmania*. A proteína, identificada em um único “spot”, possui peso molecular 12,5kDa e ponto isoelétrico em pH 8.2 (de Oliveira *et al.*, 2006). O mapeamento do genoma de *Leishmania major* (Ivens, *et al.*, 2005) revelou dois *locus* gênicos que apresentaram uma significativa identidade com a MIF de mamíferos, denominadas MIF1(*Lmj*MIF1) e MIF2(*Lmj*MIF2). Kamir e colaboradores (2008) descreveram a clonagem de ortólogos do MIF de *L. major* e a MIF1 apresentou uma sequência com 58-99% de identidade em relação aos genes homólogos em outras espécies de *Leishmania* e 22-31% de identidade com relação à sequência do MIF de mamíferos.

Por meio da análise por RT-PCR, preparados a partir do RNA total de promastigotas de *L. major*, foi confirmada a expressão dos genes MIF1 e MIF2 *in vivo*. As formas procíclicas expressaram mais MIF que as metacíclicas ou as formas amastigotas, sendo que a última foi observada nos gânglios linfáticos de camundongos infectados. A diferença entre os níveis de expressão de MIF1 e MIF2 foi quantificada mostrando que a segunda é expressa cerca de 2,5 vezes mais que a primeira. Funcionalmente MIF1 interage com o MIF receptor, CD74, e exibe uma atividade anti-apoptótica que pode facilitar a persistência intracelular de *Leishmania* em macrófagos. Assim como o seu homólogo mamífero, MIF1 induz a ativação da quinase ERK1/2 MAP na forma CD74-dependente e inibe a ativação da apoptose induzida de macrófagos. A capacidade de MIF1 em inibir apoptose pode facilitar a persistência de

Leishmania dentro do macrófago e contribuir para sua evasão da destruição imunológica (Kamir *et al.*, 2008).

A descrição na literatura da presença de MIF homólogas na secreção de parasitos como *B. malayi* (Pastrana, *et al.*, 1998), *Ancylostoma ceylonicum* (Cho, *et al.*, 2007), *Amblyoma americanum* (Jaworski, *et al.*, 2001) *T. spiralis* (Wu, *et al.*, 2003), *P. falciparum* (Cordero, *et al.*, 2007), *P. berghei* (Augustijn, *et al.*, 2007) e *E. acervulina* (Miska, *et al.*, 2007), mostram a importância dessa proteína na modulação da resposta imunológica em humanos e a sua presença em *Leishmania*, indicam que a caracterização estrutural e funcional dessa proteína no protozoário pode contribuir para o entendimento da função da MIF homóloga e seu papel na relação parasito/hospedeiro.

1.4 Estrutura tridimensional dos MIFs

A estrutura do MIF humano (Sun *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1996) e de camundongos (Suzuki *et al.*, 1996) foram resolvidas por cristalografia de raios-X, observou-se uma homologia estrutural entre essas proteínas com uma pequena diferença na região C-terminal. A parte central da estrutura monomérica do MIF humano consiste de uma mistura de quatro estruturas β -folha com duas α -hélices antiparalelas, as α -hélices estão rodeadas em um lado por uma β -folha e no outro lado por duas β -folhas (Sugimoto *et al.*, 1996) (Figura 4B).

Três monômeros do MIF se oligomerizam formando pontes de hidrogênio, e com folhas- β extras da região C-terminal, a molécula trimérica adota uma estrutura mais simétrica (Figura 4C). A estrutura do trímero consiste de sete folhas- β rodeadas por seis α -hélices que se envolvem para formar um barril, contendo um canal acessível ao solvente (Sugimoto *et al.*, 1996). As dimensões do trímero são aproximadamente 35x50x50Å. E esse trímero é estabilizado pelas interações entre resíduos da α -hélice de uma das subunidades (Asn-73, Arg-74, Ser-77, Lys-78 e Cys-81) e resíduos da região C-terminal de outra (Asn-111, Ser-112 e Thr-113) (Sun *et al.*, 1996).

A estrutura cristalina da proteína MIF1 do parasito *Leishmania major* foi resolvida com resolução de 1,03Å (Kamir *et al.*, 2008). A estrutura consiste de um protômero por unidade assimétrica que forma um trímero com dois protômeros de unidades assimétricas adjacentes (Figura 5).

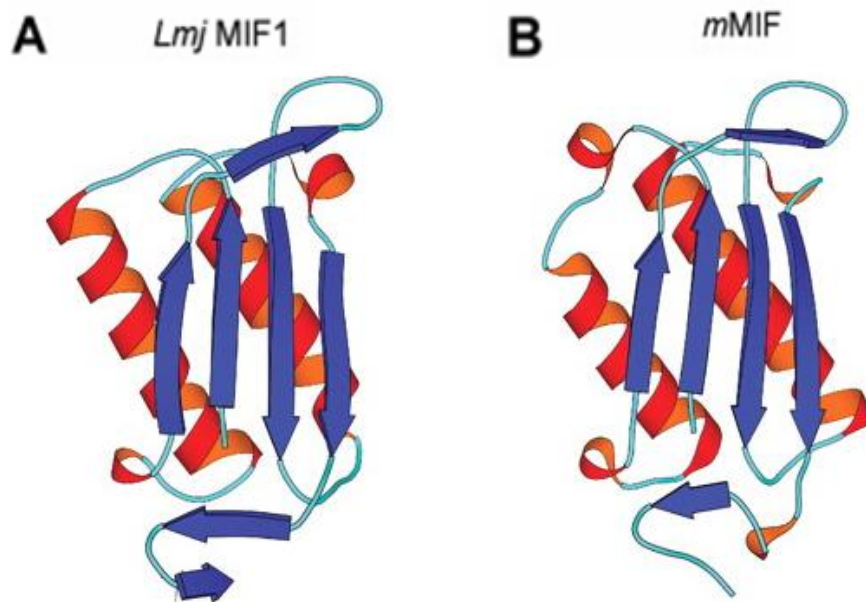


Figura 4. Estruturas monoméricas da MIF1 e mMIF (mamífero) com elementos da estrutura secundária folhas β mostrados em azul e, em vermelho, α -hélices.

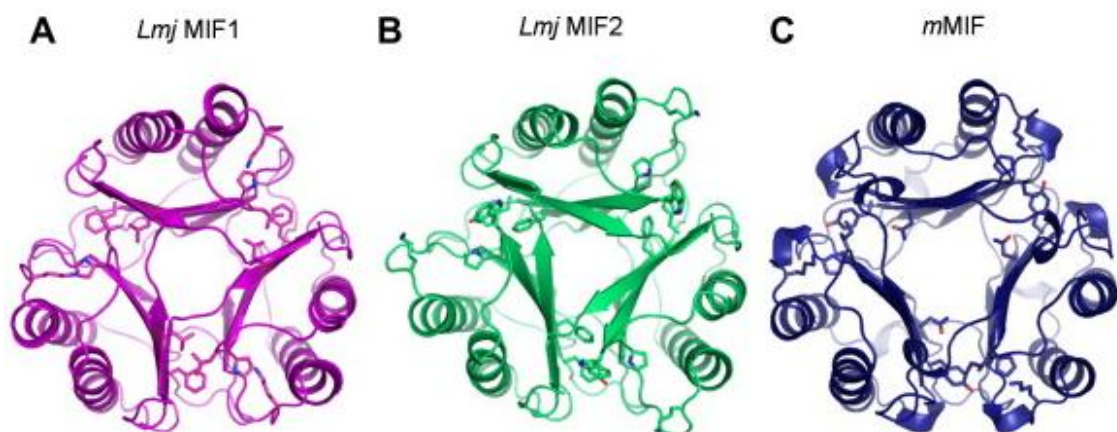


Figura 5. Estrutura conservada entre MIF1, MIF2 e mMIF, representação esquemática da forma trimérica.

A sobreposição dos átomos $C\alpha$ de cada monômero da MIF humana e da MIF1 resultou em desvio médio de 1,8 Å (Figura 4B) (Kamir *et al.*, 2008). A topologia da MIF1 foi similar a MIF de humanos e a MIF de camundongos (Sun *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1996), mas apresentou características distintas no sítio catalítico (Kamir *et al.*, 2008). Uma delas foi a nítida diferença no potencial eletrostático, relativo a proteína humana, devido a proximidade da Glu⁶⁵ do protômero A com o sítio catalítico e as outras foram as três substituições de aminoácidos na região catalítica N-terminal (Kamir *et al.*, 2008).

A forte homologia estrutural entre a MIF humana e a MIF de *L. major* indica que esta proteína pode ter um papel importante na relação parasito/hospedeiro, pois pode existir a possibilidade da MIF do parasito interagir com os alvos do MIF humano.

Sendo assim, o estudo de estrutura e função da proteína MIF2 pode contribuir para elucidar os aspectos envolvidos no mecanismo adotado pela *Leishmania* para evadir do sistema imune do hospedeiro, uma vez que já foi sugerido uma modulação de sistemas imunológicos de hospedeiros por outros parasitos que expressam MIF durante seu ciclo de vida.

1.5 Estudos do MIF2 de *Leishmania*

Estudos feitos em nosso laboratório mostraram que a MIF2 apresentou-se dimérica em solução, diferentemente da estrutura em cristal (Cunha, 2011). Essa diferença na estrutura cristalina para solução já foi descrita em outras MIFs (Zerovnik et al 1999, Tan *et al.*, 2001), e indica que mais estudos devem ser realizados para identificar qual estrutura do MIF é necessária para sua atividade de interação com o receptor no macrófago.

Nosso grupo de pesquisa produziu os mutantes P1G, K33E, W65L, W108F e Δ 104-113 que tiveram sua caracterização molecular parcialmente realizada. Experimentos de dicroísmo circular (CD) e de emissão de fluorescência intrínseca de triptofanos (IFTE) foram realizados para acompanhar as mudanças na estrutura secundária e terciária dessas proteínas na variação de pH do ambiente. Análises de CD UV-distante e UV-próximo mostraram que a mutação de apenas um aminoácido pode influenciar na estrutura secundária e terciária da MIF2 recombinante e que as mutações não alteraram a formação de estado de glóbulo fundido em baixos pHs (Cunha, 2011).

Os experimentos de IFTE mostraram que há um efeito de supressão intrínseca de fluorescência que foi abolido com a substituição do triptofano da posição 107. O mutante W65L mostrou uma intensidade de fluorescência 60% menor enquanto o mutante W107F apresentou uma intensidade 25% maior do que a MIF2 recombinante. Ensaios de inibição da migração de macrófagos mostraram que o mutante P1G apresentou atividade de inibição da migração similar à MIF2 recombinante, enquanto os outros mutantes inibiram em cerca de 50% a capacidade de inibir migração de macrófagos (Cunha, 2011).

A caracterização da manutenção da estrutura em solução de proteínas que enfrentam mudanças de pH é essencial para identificar regiões da proteína essenciais para sua atividade.

Ainda, esses estudos possibilitam relacionar essas atividades com a da proteína homóloga do hospedeiro que não enfrenta essas variações de pH, mas que pode estar sujeita a uma competição com a proteína do parasita. Esses estudos de caracterizações em solução dessas proteínas, como a MIF2 de *Leishmania*, e de suas mudanças conformacionais, associados com avaliação da atividade funcional permitem a identificação de novos sítios de manutenção de estrutura e atividade da proteína. Esses dados, no futuro, podem ser avaliados para a descoberta de sítios de ligação de drogas que poderão atuar na inativação das atividades da proteína e combater ao parasita, durante seu ciclo de vida.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Caracterizar a estrutura em solução do MIF de *L. major* (MIF2) e de mutantes da região C-terminal e investigar o efeito dessas mutações na estrutura e função desta proteína.

2.2 Específicos

- 1) Realizar mutagênese sítio-dirigida da sequência codificadora da MIF2 para obtenção de mutantes de triptofano único e ausência de cauda C-terminal (W107F Δ 5, W65L Δ 5, Wt Δ 10) e cloná-los em pET-28a(+);
- 2) Expressar em *E. coli* a MIF2 selvagem e os mutantes e realizar purificação por cromatografia de afinidade;
- 3) Avaliar a estrutura secundária e terciária do MIF2 e dos mutantes (W107F Δ 5, W65L Δ 5, Wt Δ 10) através de dicróismo circular e fluorescência intrínseca do triptofano, usando desnaturação por pH e agentes desnaturantes.
- 4) Avaliar a estrutura quaternária do MIF recombinante e dos mutantes através da técnica de filtração em gel e SEC-MALS;
- 5) Realizar ensaios de inibição da migração dos macrófagos para avaliar o efeito das mutações na atividade funcional da proteína recombinante MIF2;
- 6) Nocautear os genes que codificam as proteínas MIF1 a MIF2 em *Leishmania major* Friedlin, utilizando a tecnologia CRISPR (Cas9/T7);
- 7) Transfectar e clonar, em vetor pX63NEO, a sequência codificadora de MIF2 recombinante e com deleções de 05 e 10 aminoácidos na cauda C-terminal para verificar os efeitos desses mutantes na biologia do parasito.
- 8) Realizar localização intracelular de MIF1 e MIF2 na forma promastigota e amastigota de *L. major* através de microscopia de fluorescência após a inserção de uma tag endógena (Myc-mNeon) na porção C-terminal dos produtos gênicos de MIF1 e MIF2.
- 9) Avaliar comparativamente a virulência e a resposta inflamatória através da infecção *in vitro* e *in vivo* com os parasitos nocaute, superexpressores e controle;

3. CONCLUSÃO

Os estudos desenvolvidos neste trabalho possibilitam concluir que MIF2 de *Leishmania major* e os mutantes da região C-terminal tem estrutura trimérica em solução, apresentando uma estabilidade estrutural maior do que a descrita para MIF humano e, ainda, que a região C-terminal não é essencial para essa atividade de inibição da migração de macrófagos, como no MIF humano. Além disso, o nocaute da sequência codificadora de MIF2 diminuiu a virulência do parasita em 70% e a região C-terminal está envolvida na modulação desta virulência.

4. REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K. 2008 Cells and tissues of the immune system. In: ABBAS, A. K. Cellular and molecular immunology, Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 367-370.
- Abdeladhim, M.; Kamhawi, S. and Valenzuela, J. G. 2014 What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infect Genet Evol.*
- Andrade M. A., Chacon P., Merelo J. J., Moran F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng* 6: 383-90
- Antoine, J. C., Prina, E., Jouanne, C., Bongrand, P. 1990 Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infection and Immunity.* 58(3):779-87.
- Augustijn, K. D., R. Kleemann, J. Thompson, T. Kooistra, C. E. Crawford, S. E. Reece, A. Pain, A. H. G. Siebum, C. J. Janse, and A. P. Waters. 2007. Functional characterization of the Plasmodium falciparum and P. berghei homologues of macrophage migration inhibitory factor. *Infect. Immun.* 75: 1116–1128
- Bernhagen, J., Calandra, T., Mitchell, R. A., Martin, S. B., Tracey, K. J., Voelter, W., Manogue, K. R., Cerami, A., Bucala, R. 1993 MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature.* 365(6448):756-9.
- Beverley, S. M. 2003 Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age, *Nat. Rev. Genet.* 4:11–19
- Bismuto, E., Gratton, E., Lamb, D. C. 2001 Dynamics of ANS binding to tuna apomyoglobin measured with fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal.* 81(6):3510-21.
- Blackwell, J. M.; ezekowitz, R. A. *et al.* Macrophage complement and lectinlike receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *J. Exp. Med.*, v. 162, p. 324- 331,1985.
- Bloom, B. R., and Bennett, B. 1966 Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity *Science* 153 80 82
- Bogdan, C., and M. Rollinghoff. 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int. J. Parasitol.* 28: 121–134. 4.
- Boxer, D.H.; Zhang, H.; Gourley, D. G.; Hunter, W. N.; Kelly, S. M.; Price, N.C. (2004) Sensing of remote oxyanion binding at the DNA binding domain of the molybdate-dependent transcriptional regulator, ModE, *Org. Biomol. Chem.* 2: 2829– 2837
- Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, *et al.* Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 1999;189:341–6.
- Bradford, M. M. 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
- Bulheller, B. M.; Rodger A. and Hirst J. D. 2007 Circular and linear dichroism of proteins. *17: 2020-35.*

- Calandra, T. & Roger, T.; (2003) Macrophage Migration Inhibitory Factor: A regulator of innate immunity. *Nature*. 3: 791 - 800.
- Calandra, T. 2003 Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune responses to microbes *Scand. J. Infect. Dis.* 35 573 576.
- Calandra, T., Bernhagen, J., Metz, C. N., Spiegel, L. A., Bacher, M., Donnelly, T., Cerami, A., and Bucala, R. 1995 MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production *Nature* 377 68 71
- Cardoso, L. S.; Araújo, M. I; Góes, A. M.; Pacífico, L. G.; Oliveira, R. R. and Oliveira, S. C. (2007) Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis *Microbial Cell Factories*, 6:1
- Chang, K. P., G. Chaudhuri, and D. Fong. 1990. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 44:499-529.
- Cho, Y. S., B. F. Jones, J. J. Vermeire, L. Leng, L. DiFedele, L. M. Harrison, H. B. Xiong, Y. K. A. Kwong, Y. Chen, R. Bucala, *et al.* 2007. Structural and functional characterization of a secreted hookworm macrophage migration inhibitory factor (MIF) that interacts with the human MIF receptor CD74. *J. Biol. Chem.* 282: 23447–23456.
- Cooper, A. 1999 Thermodynamics of Protein Folding and Stability. *Protein: A Comprehensive Treatise*. 2:217-270.
- Cordery, D. V., U. Kishore, S. Kyes, M. J. Shafi, K. R. Watkins, T. N. Williams, K. Marsh, and B. C. Urban. 2007. Characterization of a *Plasmodium falciparum* macrophage-migration inhibitory factor homologue. *J. Infect. Dis.* 195: 905–912.
- Cunha, E. M. F. 2011 Mutações Sítio-dirigidas nas Regiões do Sítio-Ativo e da Interface Oligomérica do Fator Inibitório da Migração dos Macrófagos de *Leishmania major* (*LmjMIF2*). [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.
- Daniel, E., Weber, G. 1966 Cooperative effects in binding by bovine serum albumin. I. The binding of 1-anilino-8-naphthalenesulfonate. Fluorimetric titrations. *Biochemistry*. 5(6):1893-900.
- Das, A., Dasgupta, A., Sengupta, T. & Majumder, H. K. 1995 Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. *TRENDS Parasitol* 20(8): 381-387.
- David, J. R. 1966 Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56 72 77
- de Oliveira A.H.C., Cruz, A.K., Greene, L.J., Rosa, J.C., Ward, R.J. (2006) Subproteomic analysis of soluble proteins of the microsomal fraction from two *Leishmania* species. *Comp. Biochdm. Physiol Part D* 3: 300-308 .
- Desjeux, P. 2004 *Leishmaniasis*: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, v. 27, n. 5, p. 305-18.
- Dobson, S. E., Augustijn, K. D., Brannigan, J. A., Schnick, C., Janse, C. J., Dodson, E. J., Waters, A. P., Wilkinson, A. J. 2009 The crystal structures of macrophage migration inhibitory factor from *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei*. *Protein Science*. 18(12):2578-91.
- Duncan, S. M., Jones, N. G., Mottram, J. C. 2017 Recent advances in *Leishmania* reverse genetics: Manipulating a manipulative parasite. *Mol Biochem Parasitol*. 216:30-38.

- El-Turk, F., Fauvet, B., Ashrafi, A., Ouertatani-Sakouhi, H., Cho, M. K., Neri, M., Cascella, M., Rothlisberger, U., Pojer, F., Zweckstetter, M., Lashuel, H. 2012 Characterization of molecular determinants of the conformational stability of macrophage migration inhibitory factor: leucine 46 hydrophobic pocket. *PLoS One*. 7(9):e45024.
- El-Turk, F., Cascella, M., Ouertatani-Sakouhi, H., Narayanan, R. L., Leng, L., *et al.* (2008) The conformational flexibility of the carboxy terminal residues 105–114 is a key modulator of the catalytic activity and stability of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry* 47: 10740–10756.
- Fasman, G.D., *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* (1996) Plenum Press, New York.
- Fearon, D. T.; Locksley, R. M. 1996 The Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response. *Science*, v. 272, p. 50-54.
- Fingerle-Rowson, G., Petrenko, O., Metz, C. N., Forsthuber, T. G., Mitchell, R., Huss, R., Moll, U., Muller, W., and Bucala, R. 2003 The p53-dependent effects of macrophage migration inhibitory factor revealed by gene targeting *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 9354 9359
- Folta-Stogniew, E. 2006 Oligomeric states of proteins determined by size-exclusion chromatography coupled with light scattering, absorbance, and refractive index detectors. *Methods Mol Biol.* 328: 97-112.
- Gibson, T. J., Seiler, M. & Veitia, R. A. 2013 The transience of transient overexpression. *Nat. Methods* 10, 715–721.
- Guha, S., Bhattacharyya, B. 1995 A partially folded intermediate during tubulin unfolding: its detection and spectroscopic characterization. *Biochemistry*. 34(21):6925-31.
- Hashimoto, K.; Nishi, H.; Bryant, S.; Panchenko, A. R. 2011 Caught in self-interaction: evolutionary and functional mechanisms of protein homooligomerization. *Physical Biology*.
- Holowka, T.;Castilho, T.M.; Garcia, A. B.; Sun, T.; McMahon-Pratt, D., Bucala, R. 2016 *Leishmania*-encoded orthologs of macrophage migration inhibitory factor regulate host immunity to promote parasite persistence. *FASEB Journal*. 30(6):2249-65.
- Ivens A. C., Peacock C. S., Worthey E. A., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., Sisk E., Rajandream M. A., Adlem E., Aert R., Anupama A., Apostolou Z., Attipoe P., Bason N., Bauser C., Beck A., Beverley S. M., Bianchetti G., Borzym K., Bothe G., Bruschi C. V., Collins M., Cadag E., Ciarloni L., Clayton C., Coulson R. M., Cronin A., Cruz A. K., Davies R. M., De Gaudenzi J., Dobson D. E., Duesterhoeft A., Fazelina G., Fosker N., Frasch A. C., Fraser A., Fuchs M., Gabel C., Goble A., Goffeau A., Harris D., Hertz-Fowler C., Hilbert H., Horn D., Huang Y., Klages S., Knights A., Kube M., Larke N., Litvin L., Lord A., Louie T., Marra M., Masuy D., Matthews K., Michaeli S., Mottram J. C., Muller-Auer S., Munden H., Nelson S., Norbertczak H., Oliver K., O'Neil S., Pentony M., Pohl T. M., Price C., Purnelle B., Quail M. A., Rabinowitsch E., Reinhardt R., Rieger M., Rinta J., Robben J., Robertson L., Ruiz J. C., Rutter S., Saunders D., Schafer M., Schein J., Schwartz D. C., Seeger K., Seyler A., Sharp S., Shin H., Sivam D., Squares R., Squares S., Tosato V., Vogt C., Volckaert G., Wambutt R., Warren T., Wedler H., Woodward J., Zhou S., Zimmermann W., Smith D. F.,

- Blackwell J. M., Stuart K. D., Barrell B., *et al.* (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436 – 442.
- Jaworski, D. C., A. Jasinskas, C. N. Metz, R. Bucala, and A. G. Barbour. 2001. Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor in the tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Mol. Biol.* 10: 323–331.
- Kamir, D., Zierow, S., Leng, L., Cho, Y., Diaz, Y., Griffith, J., McDonald, C., Merk, M., Mitchell, A., Trent, J., Chen, Y., Kwong, Y.K.A., Xiong, H., Vermeire, J., Cappelio, M., McMahan-Pratt, D., Walker, J., Bernhagen, J., Lolis, E. e Bucala, R. (2008) A *Leishmania* ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. *J. Immunol.* 180, 8250–8261
- Kapler, G.M.; Coburn, C.M. and Beverley, S. M. 1990 Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol.* 10(3): 1084-94.
- Kato Y.; Muto T.; Tomura T.; Tsumura H.; Watarai H.; Mikayama T.; Ishizaka K.; Kuroki R. (1996) The crystal structure of human glycosylation-inhibiting factor is a trimeric barrel with three 6-stranded beta-sheets. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 30073010.
- Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C.; (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1751:119 – 139.
- Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Burger-Kentischer, A., Flieger, O., Johannes, F. J., Roger, T., Calandra, T., Kapurniotu, A., Grell, M., Finkelmeier, D., Brunner, H., and Bernhagen, J. 2000 Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1 *Nature* 408 211 216
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Frank, R. W., Gessner, A., Mischke, R., Flieger, O., Juttner, S., Brunner, H., and Bernhagen, J. 1998 Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase *J. Mol. Biol.* 280 85 102
- Kleemann, R., Mischke, R., Kapurniotu, A., Brunner, H., and Bernhagen, J. 1998 Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: potential role in cellular redox processes *FEBS Lett.* 430 191 196
- Koebnick H, Grode L, David JR, Rohde W, Rolph MS, Mittrucker HW, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13681–6.
- Kudrin A, Scott M, Martin S, Chung CW, Donn R, McMaster A, Ellison S, Ray D, Ray K, Binks M. Human macrophage migration inhibitory factor (MIF): A proven immunomodulatory cytokine? *J Biol Chem.* 2006 Aug 7;
- Kumar, A., Gaikwad, S. M. 2010 Multistate unfolding of α -mannosidase from *Canavalia ensiformis* (Jack Bean): evidence for the thermostable molten globule. *Biochem Biophys Res Commun.* 403(3-4):391-7
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Lakowicz J.R., (1983). “Principles of fluorescence spectroscopy”. Plenum Press. 495pp.

- Lubetsky, J. B., Swope, M., Dealwis, C., Blake, P., and Lolis, E. 1999 Pro-1 of macrophage migration inhibitory factor functions as a catalytic base in the phenylpyruvate tautomerase activity *Biochemistry* 38 7346-7354
- Lue, H.; Kleemann, R.; Calandra, T.; Roger, T.; Bernhagen, J. 2002 Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes and Infection*. 4(4):449-60.
- Mischke, R., Gessner, A., Kapurniotu, A., Jüttner, S., Kleemann, R., Brunner, H. & Bernhagen, J. (1997). Structure activity studies of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) reveal a critical role for its carboxy terminus. *FEBS Letters*, 414, 226-232.
- Mischke, R.; Kleemann, R.; Brunner, H.; Bernhagen, J. 1998 Cross-linking and mutational analysis of the oligomerization state of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *FEBS Letters* 427:85-90.
- Miska, K. B., R. H. Fetterer, H. S. Lillehoj, M. C. Jenkins, P. C. Allen, and S. B. Harper. 2007. Characterisation of macrophage migration inhibitory factor from *Eimeria* species infectious to chickens. *Mol. Biochem. Parasitol.* 151: 173–183.
- Nelson, D. L. & Cox M. M. 2014 *Lehninger - Princípios de Bioquímica*. 5a. Ed. Editora Sarvier.
- Nelson R.M., Long G.L., (1989). A general method of site-specific mutagenesis using a modification of the *Thermus aquaticus* polymerase chain reaction, *Anal. Biochem.* 180: 147-151.
- Olivier, M., Gregory D. J., and Forget, G. 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 293–305.
- Pace, C. N., Shirley, B. A., & Thomson, J. A. (1989) in *Protein Structure: a practical approach* (Creighton, T. E., Ed.) pp 311-330, IRL Press, Oxford.
- Pastrana, D. V., Raghavan, N., FitzGerald, P., Eisinger, S. W., Metz, C., Bucala, R., Schleimer, R. P., Bickel, C., and Scott, A. L. (1998) *Infect. Immun.* 66, 5955–5963
- Perez-Iratxeta C, Ma A.-N. (2007) K2D2: estimate of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *BMC Structural Biology* 8: 25
- Peters C.; Aebischer, T.; Stierhof, Y. D.; Fuchs, M.; Overath, P. (1995) The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Cell Sci* 108 Parte 12: 3715 – 3724.
- Philo, J.S.; Yang, T.H.; LaBarre, M. 2004 Re-examining the oligomerization state of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in solution. *J Biol Chem* 279(1-3):77-87.
- Pyle, M. E., Korbonits, M., Gueorguiev, M., Jordan, S., Kola, B., Morris, D. G., Meinhardt, A., Powell, M. P., Claret, F. X., Zhang, Q., Metz, C., Bucala, R., and Grossman, A. B. 2003 Macrophage migration inhibitory factor expression is increased in pituitary adenoma cell nuclei *J. Endocrinol.* 176 103-110.
- Reed, S. G., and Scott, P.; T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr. Opin, Immunol.* 5: 524-531.
- Reyes J. L., Terrazas LI, Espinoza B, Cruz-Robles D, Soto V, Rivera-Montoya I, Gomez-Garcia L, Snider H, Satoskar AR, Rodriguez-Sosa M. Macrophage migration inhibitory

- factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* 2006 Jun;74(6):3170-9.
- Richardson J. M., Morrison L. S., Bland N. D., Brucea S., Coombs, G. H., Mottramb, J. C. and Walkinshawa M. D. 2009 Structures of *Leishmania major* orthologues of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*
- Rizzo, M. A., Davidson, M. W. & Piston, D.W. Fluorescent protein tracking and detection: applications using fluorescent proteins in living cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2009, pdb top64 (2009).
- Robinson, K.A. and Beverley, S. M. 2003 Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 128(2): 217-28.
- Rodriguez-Sosa M, Rosas LE, David JR, Bojalil R, Satoşkar AR, Terrazas LI. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun* 2003;71:1247–54.
- Rogers, M. E.; Ilg, T.; Nikolaev, A. V., Ferguson, M. A. and Bates, P. A. 2004 Transmission of cutaneous *Leishmaniasis* by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, v. 430, n. 6998, p. 463-7.
- Russell, D. G.; wilhelm, H. The involvement of the *major Leishmania* promastigotes in surface glycoprotein (gp63) of attachment to macrophages. *J. Immunol.*, v. 136, p. 2613- 2620, 1986.
- Sambrook, J. & Russell D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sashinami H, Sakuraba H, Ishiguro Y, Munakata A, Nishihira J, Nakane A. The role of macrophage migration inhibitory factor in lethal *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Microb Pathog.* 2006 Aug-Sep;41(2-3):111-8. Epub 2006 Jul 25.
- Satoşkar AR, Bozza M, Rodriguez Sosa M, Lin G, David JR. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infect Immun* 2001;69:906–11.
- Schartonkersten, T., and P. Scott. 1995. The role of the innate immune-response in Th1 cell-development following *Leishmania major* infection. *J. Leukocyte Biol.* 57: 515–522.
- Semisotnov, G.V.; Rodionova, N.A.; Razgulyaev, O. I.; Uversky, V.N.; Gripas, A. F.; Gilmanshin, R. I. 1991 Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. 31(1):119-28.
- Shao, D., Han, Z., Lin, Y., Zhang, L., Zhong, X., Feng, M., Guo, Y., Wang, H. 2008 Detection of *Plasmodium falciparum* derived macrophage migration inhibitory factor homologue in the sera of malaria patients. *Acta tropica.* 106(1):9-15
- Sharma, U. and Singh, S. 2008 Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, v. 45, n. 4, p. 255-72.
- Simpson, L. 1986 Kinetoplast DNA in tripanosomid flagellates. *Int Rev Cytol.* 99:119-207.
- Slavík, J., Horák, J., Ríhová, L., Kotyk, A. 1982 Anilinonaphthalene sulfonate fluorescence and amino acid transport in yeast. *J. Membr. Biol.* 64(3):175-9.

- Sugimoto H, Suzuki M, Nakagawa A, Tanaka I, Nishihara J (1996) Crystal structure of macrophage migration inhibitory factor from human lymphocyte at 2.1 Å resolution. *FEBS Lett* 389:145–148
- Sun H-W, Bernhagen, J, Bucala, R, Lolis E (1996) Crystal structure at 2.6 Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5191–5196
- Suzuki M, Sugimoto H, Nakagawa A, Tanaka I, Nishihara, J, Sakai M (1996) Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver. *Nat Struct Biol* 3:259–266
- Swope M D, Lolis E. Macrophage migration inhibitory factor: cytokine, hormone, or enzyme? *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1999;139:1–32.
- T. Beneke, R. Madden, L. Makin, J. Valli, J. Sunter, E. Gluenz, A CRISPR Cas9 highthroughput genome editing toolkit for kinetoplastids, *R. Soc. Open Sci.* 4 (2017) 170095,
- Takagi T. (1990) Application of low-angle laser light scattering detection in the field of biochemistry: review of recent progress. *J. Chromatog. A* 506, 409–416.
- Tamura, M., Gu, J., Matsumoto, K., Aota, S., Parsons, R. and Yamada, K. M. (1998). Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 280, 1614-1617
- Tan, T. H.; Edgerton, S. A.; Kumari, R.; McAlister, M. S.; Roe, S. M.; Nagl, S.; Pearl, L. H.; Selkirk, M. E.; Bianco, A. E.; Totty, N. F.; Engwerda, C.; Gray, C. A.; Meyer, D. J. (2001) Macrophage migration inhibitory factor of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Biochem J.* 15:357(Pt 2):373-383. Erratum in: *Biochem J* 358 (Pt):791. Rowe SM [corrected to Roe SM].
- Tiuman, T. S.; Ueda-Nakamura, T.; Cortez, D. A. G.; Filho, B. P. D.; Morgado-Diaz, J. A.; De Souza, W.; Nakamura, C. V.; (2005) Anti*Leishmanial* Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.49(1):176 - 182.
- Uversky, V.N., Kutysenko, V. P., Protasova, N. Yu., Rogov, V. V., Vassilenko, K. S., Gudkov, A. T. 1996 Circularly permuted dihydrofolate reductase possesses all the properties of the molten globule state, but can resume functional tertiary structure by interaction with its ligands. *Protein Science.* 5(9):1844-51.
- Vickerman, K. 2000 Order Kinetoplastea Honigberg. *An Illustrated Guide to the Protozoa.* G. F. L. a. P. B. J.J. Lee, Lawrence, Kansas, Society of Protozoologists. 2: 1159-1185.
- Wanderley, J.L.M.; benjamin A.; Real, F. *et al.* Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. *Braz. J. Med. and Biol. Research.*, v. 38, p. 807- 812, 2005.
- Wang, J.C. 2002 Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Review. Mol and Cell Biol*; 3: 430-440.
- Wang, Z. E.; Reiner, S. L.; Zheng, S. *et al.* 1994 CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.*, v.179, p. 1367-1371.
- Wen J., Arakawa T., and Philo J. S. (1996) Size-exclusion chromatography with on-line light-scattering, absorbance, and refractive index detectors for studying proteins and their interactions. *Anal. Biochem.* 240, 155–166.
- WHO (2019) <http://www.who.int/Leishmaniasis/>. Acessado em 29/06/2019.

- Wu, Z., T. Boonmars, I. Nagano, T. Nakada, and Y. Takahashi. 2003. Molecular expression and characterization of a homologue of host cytokine macrophage migration inhibitory factor from *Trichinella* spp. *J. Parasitol.* 89: 507–515.
- Wyatt, P. J. (1993) Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta* 272, 1–40.
- Zang, X., Taylor, P., Wang, J. M., Meyer, D. J., Scott, A. L., Walkinshaw, M. D., Maizels, R. M. (2002) Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode. Gene cloning, protein activity and crystal structure. *J Biol Chem.* 277(46):44261-7.
- Zerovnik, E.; Janjicâ, V.; Francky, A. and Mozeticî-Francky, B. (1999) Equilibrium and transient intermediates in folding of human macrophage migration inhibitory factor. *Eur. J. Biochem.* v. 260: 609 – 618.