

THAÍS VIANA FIALHO MARTINS

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA LIGANTE  
DE HEPARINA DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania chagasi*:  
IMPLICAÇÕES NA INFECCIOSIDADE DO PARASITO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M386p  
2013  
Martins, Thaís Viana Fialho, 1987-  
Purificação e caracterização de proteína ligante de heparina  
de promastigotas de *Leishmania chagasi* : implicações na  
infecciosidade do parasito / Thaís Viana Fialho Martins. –  
Viçosa, MG, 2013.  
x, 61 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f. 53-61.

1. Leishmania. 2. Lectinas. 3. Heparina. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 579.4

THAÍS VIANA FIALHO MARTINS

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA LIGANTE  
DE HEPARINA DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania chagasi*:  
IMPLICAÇÕES NA INFECCIOSIDADE DO PARASITO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de julho de 2013.

---

Silvia Almeida Cardoso

---

Daniel Cláudio de Oliveira Gomes

---

Eduardo de Almeida Marques da Silva  
(Orientador)

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando a beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”*  
*(Isaac Newton)*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus pela oportunidade do estudo...*

*Aos meus pais Ademar e Itaci pelo apoio e incentivo. A luta de vocês sempre é um estímulo para que eu me dedique e busque sempre o melhor!*

*Aos meus irmãos Guilherme e Érica, vocês são muito importantes para mim!*

*Ao Eduardo, pela confiança depositada, pelos conhecimentos transmitidos e estar sempre disponível para tirar dúvidas. Orientação esplendida!!*

*Ao Leandro por todo ensinamento passado, pelas boas ideias no caminhar deste trabalho, sua ajuda foi imprescindível.*

*Ao Sérgio pelo apoio.*

*A Silvia pelo auxílio na realização de vários experimentos, pela paciência ao ensinar as técnicas e pela amizade.*

*A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e por ter dado condições para a realização deste trabalho.*

*Ao Departamento de Biologia Geral, ao Programa de Biologia Celular e Estrutural e aos professores da pós-graduação, pela oportunidade.*

*A secretária do programa Beth.*

*As professoras Juliana Fietto e Márcia Rogéria do laboratório LIMA do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, por ter permitido a realização de alguns experimentos.*

*Ao Matheus e a Cláudia do laboratório LIMA, pelo auxílio.*

*Ao professor José Eduardo Serrão por disponibilizar um reagente.*

*Ao NUBIOMOL/UFV pela grande contribuição.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo imprescindível apoio financeiro.*

*Aos componentes da banca por aceitarem o convite.*

*Aos amigos do Laboratório que me ajudaram resolvendo problemas do cotidiano da pesquisa, por compartilharem momentos bons que fizeram com que esses dois anos passassem rapidamente, sendo prazeroso ir trabalhar todos os dias (Robertinho, Mi, Carine, Lívinha, Ju, Mari, Monise, Lorena, Vinição, Eliziária, Vinícius, Luan, Camilo, Marilane, e todos os demais).*

*As companheiras Samara e Thaís e as estagiárias Bianca e Priscila, vocês ajudaram de mais!*

*Aos amigos de longa data Talitha, Renata, Carol, Aline, Lucas, Paxão, Patrícia (Xu), pela companhia e pelo suporte nos momentos de nervosismo.*

*As amigas flores, Glenda, Helen, Martinha e Aninha, pelos ótimos momentos durante a matéria prática de Biocel e pela amizade e companheirismo.*

**OBRIGADA!!!**

## INDICE

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Leishmanioses e seus agentes etiológicos.....</i>	<i>3</i>
2.1.1 <i>Leishmaniose Visceral.....</i>	<i>5</i>
2.1.1.1 <i>Distribuição geográfica.....</i>	<i>5</i>
2.1.1.2 <i>Vetor e Ciclo de Vida da Leishmania chagasi.....</i>	<i>5</i>
2.1.1.3 <i>O hospedeiro cão.....</i>	<i>7</i>
2.1.1.4 <i>Sinais Clínicos e Tratamento.....</i>	<i>8</i>
2.2 <i>Moléculas e receptores de interesse para vacinas e patogênese.....</i>	<i>9</i>
2.3 <i>Os processos de adesão e fagocitose.....</i>	<i>10</i>
2.3.1 <i>Lectinas.....</i>	<i>11</i>
2.3.1.1 <i>Proteínas ligantes de heparina (PLH).....</i>	<i>14</i>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
3.1 <i>Objetivo geral.....</i>	<i>16</i>
3.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>16</i>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
4.1 <i>Animal experimental.....</i>	<i>17</i>
4.2 <i>Obtenção dos parasitos.....</i>	<i>17</i>
4.3 <i>Cultura dos parasitos para obtenção de extrato proteico.....</i>	<i>17</i>
4.4 <i>Detecção, isolamento e purificação de proteínas ligantes de heparina do extrato parasitário (PLHLc).....</i>	<i>18</i>
4.5 <i>Análise eletroforética de PLHLc.....</i>	<i>19</i>
4.6 <i>Immunoblot.....</i>	<i>19</i>
4.7 <i>Sequenciamento de PLHLc.....</i>	<i>20</i>
4.7.1 <i>Digestão trípica.....</i>	<i>20</i>

4.7.2 Espectrometria de massa.....	20
4.7.3 Análise da sequência obtida.....	21
4.8 Produção de anticorpos policlonais antiPLHLc.....	20
4.9 Purificação de anticorpos IgG totais de soro.....	22
4.10 Cultura de macrófagos.....	22
4.11 Ensaios de adesão e de penetração.....	22
4.12 Fotomicroscopia de luz.....	25
4.13 Microscopia de fluorescência.....	25
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
5.1 Detecção, isolamento e purificação de proteínas de <i>L. chagasi</i> com atividade lectínica.....	27
5.2 Caracterização da PLHLc.....	28
5.2.1 Massa molecular.....	28
5.2.2 Immunoblot.....	29
5.2.3 Sequenciamento da PLHLc.....	30
5.3 Obtenção e purificação de anticorpos IgG policlonais de camundongos imunizados com PLHLc.....	35
5.4 Imunomarcação da PLHLc e detecção por microscopia de fluorescência.....	37
5.5 Ensaios de adesão e de penetração de <i>L. chagasi</i> em macrófagos.....	40
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>PERSPECTIVAS DO ESTUDO.....</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1: Morfologia das formas amastigota e promastigota de <i>Leishmania</i> sp.....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 3: Estrutura de membros da família de lectinas do tipo C.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 4: Adesão e internalização de <i>L. chagasi</i> em macrófagos J774 <i>in vitro</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 5: Cromatografia de afinidade em coluna de Heparina.....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 6: Cromatografia de exclusão molecular em coluna <i>D-salting</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 7: SDS-PAGE de extratos de formas promastigotas totais de <i>L. chagasi</i>..</b>	<b>29</b>
<b>Figura 8: <i>Western-blotting</i> de extratos de formas promastigotas totais de <i>L. chagasi</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 9: Histograma do score de sequenciamento.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 10: Análise de espectrometria de massa por Q-TOF da PLHLc.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 11: Sequências que produzem alinhamentos significantes a partir do algoritmo BLAST.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 12: SDS-PAGE para as amostras de IgG total purificado em coluna de proteína G Sepharose.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 13: Imunomarcção de PLHLc.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 14: Imunomarcção de PLHLc.....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 15: Ensaio de adesão de <i>L. chagasi</i> pré-tratada com anticorpos antiPLHLc em macrófagos J774.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 16: Ensaio de penetração de <i>L. chagasi</i> pré-tratada com anticorpo antiPLHLc em macrófagos J774.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 17: Ensaio de adesão de <i>L. chagasi</i> pré-tratada com heparina sódica em macrófagos J774.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 18: Ensaio de penetração de <i>L. chagasi</i> pré-tratada com heparina sódica em macrófagos J774.....</b>	<b>45</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

LC – leishmaniose cutânea

LMC – leishmaniose mucocutânea

LCD – leishmaniose cutânea difusa

LV – leishmaniose visceral

Sb<sup>V</sup> – antimoniais pentavalentes

Sb<sup>III</sup> – antimoniais trivalentes

LACK - proteína homóloga de *Leishmania* de receptores de proteína quinase C ativada

LPG – lipofosfoglicano

CR – receptores do complemento

GAG – glicosaminoglicanos

CRD – domínio de reconhecimento de carboidrato

CLR – receptor lectina do tipo C

CTLD – domínio lectina do tipo C

PLH – proteína ligante de heparina

PLHLc – proteína ligante de heparina de *Leishmania chagasi*

antiPLHLc – anticorpo anti-proteína ligante de heparina de *Leishmania chagasi*

PBS – phosphate buffered saline

SFB – soro fetal bovino

ACN – acetona

## RESUMO

MARTINS, Thaís Viana Fialho, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Purificação e caracterização de proteína ligante de heparina de promastigotas de *Leishmania chagasi*: implicações na infecciosidade do parasito.** Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva. Coorientador: Leandro Licursi de Oliveira.

A leishmaniose visceral é uma doença humana fatal causada pelo protozoário intracelular *Leishmania infantum/chagasi*. A captação de promastigotas de *Leishmania* por células do hospedeiro é um processo mediado por receptores clássicos que iniciam a fagocitose. A busca por moléculas que estejam envolvidas no processo de infecção da célula do hospedeiro pelo parasito é importante para a concepção de estratégias para o controle da doença. Entre estas moléculas estão a Proteína Ligante de Heparina (PLH), uma lectina do grupo das proteínas ubíquas, cuja característica principal é a capacidade de se ligar a carboidratos presentes em glicoproteínas ou glicolípidos. A presença dessas moléculas em espécies de *Leishmania* é pouco estudada. Portanto, neste trabalho, a presença de PLH em formas promastigotas de *L. chagasi* foi avaliada, assim como o seu papel no processo de infecção do parasito. PLH de *L. chagasi* (PLHLc) foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de heparina-agarose em sistema automatizado FPLC e a produção de anticorpos policlonais antiPLHLc foi realizada. Nós verificamos a afinidade do anticorpo pela proteína e sua localização por intermédio de ensaios de “Western blotting” e imunomarcação. Uma vez detectada, utilizamos o anticorpo antiPLHLc e heparina sódica como agentes bloqueadores da PLH e investigamos o efeito causado pelo seu bloqueio no processo de infecção de macrófagos J774 *in vitro*. Pudemos verificar que esta proteína é um importante receptor que medeia o processo de infecção parasitário. Seu bloqueio gerou uma redução parcial no processo de adesão e internalização de *Leishmania*. De acordo com os resultados apresentados, acredita-se que esta proteína com atividade lectínica possa se tornar, a partir de estudos futuros *in vivo*, uma alternativa profilática ou terapêutica para resolução da leishmaniose visceral.

## ABSTRACT

MARTINS, Thaís Viana Fialho, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Purification and characterization of *Leishmania chagasi* promastigotes heparin binding protein: implications on the parasite infectivity.** Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva. Coorientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Visceral leishmaniasis is a fatal human disease caused by the intracellular protozoan parasite *Leishmania infantum/chagasi*. The uptake of *Leishmania* promastigotes by host cells is a process mediated by classic receptors that initiate phagocytosis. The search for molecules that are involved in the infection process of the parasite to the host cell is important to design strategies to disease control. Among these molecules is the Heparin Binding Protein (HBP), a lectin of the group of ubiquitous proteins, whose main characteristic is to bind to carbohydrates present in glycoproteins or glycolipids. The presence of these molecules in *Leishmania* species is poorly studied. Therefore, in this work, the presence of HBP in *L. chagasi* promastigotes was assessed, as well its role in the parasite infection process. *L. chagasi* HBP was purified by affinity chromatography on a heparin-agarose column in FPLC automated system and the production of polyclonal antibody antiHBPLc was performed. We checked the affinity of the antibody for the protein and found the location of this in the parasite performing Western blotting and immunolabeling tests. Once detected, the antibody antiHBPLc and heparin were used as blocking agents of HBP and the effect caused by the blockage was investigated in the infection of J774 macrophages *in vitro*. We were able to verify that this protein is an important receptor that mediates the process of parasitic infection. Its blocking has generated a partial reduction in the accession and internalization of *Leishmania* by phagocytic cells. According to the results, it is believed that this protein may become, in *in vivo* future studies, a therapeutic alternative for resolution of visceral leishmaniasis.

## 1. INTRODUÇÃO

Lectinas são proteínas/glicoproteínas amplamente distribuídas em uma diversidade de organismos, que possuem a capacidade de se ligarem especificamente a carboidratos e também de aglutinar eritrócitos, apresentando pelo menos um domínio não catalítico que se liga reversivelmente a monossacarídeos e oligossacarídeos específicos. Elas apresentam uma ampla aplicação, podendo ser utilizadas para atividade antifúngica, antiparasitária, anti-inseto para controle de patógenos, além de serem aplicadas como base na produção de fármacos antitumorais e antivirais. O teor desse tipo de proteína é variável em diferentes organismos, porém técnicas recombinantes podem ser empregadas para a produção com maiores rendimentos (LAM; NG, 2011).

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* sp., que estão amplamente distribuídas em países tropicais subdesenvolvidos e em desenvolvimento. O calazar é uma doença que ocupa lugar de destaque dentre as várias formas clínicas de leishmaniose conhecidas, principalmente em decorrência da gravidade das lesões viscerais, especialmente em indivíduos imunossuprimidos ou desnutridos. A doença é causada por espécies de *Leishmania* do complexo *donovani* (*L. infantum/chagasi* no Novo Mundo e as espécies *L. infantum* e *L. donovani* no Velho Mundo). A porta de entrada desses parasitos no hospedeiro vertebrado são as células fagocitárias, dentre elas os macrófagos, no interior dos quais os parasitos proliferam como consequência do sucesso destes frente aos fatores leishmanicidas dessas células (NADERER; MCCONVILLE, 2008). *Leishmania infantum/chagasi* é transmitida no Novo Mundo pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, causando uma doença que acomete órgãos linfoides, fígado e baço (DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012a).

A busca por moléculas que estejam envolvidas no processo de penetração, sejam como participantes de mecanismos de reconhecimento, adesão ou internalização, é de grande valia para o delineamento de estratégias de controle dessa e de outras doenças infecciosas. Lectinas parasitárias são fortes candidatas a participantes desse processo, desde que sua principal característica é se ligar a carboidratos específicos que podem estar presentes nas células do hospedeiro, incluindo macrófagos.

Diferentemente do que se observa na literatura com referência a estudos sobre lectinas presentes em plantas ou micro-organismos, inclusive relacionando sua ação biológica sobre agentes infecciosos (LI *et al.*, 2010; NAGRE *et al.*, 2010; SWANSON

*et al.*, 2010), é limitado o número de trabalhos que se referem ao perfil de expressão de lectinas na superfície de parasitos do gênero *Leishmania* (SMITH; RANGARAJAN, 1995; SVOBODOVA *et al.*, 1997), muito menos à participação de lectinas desse protozoário em processos de adesão celular ou de sua influência na resposta imunológica do hospedeiro.

Uma proposta de caracterização da presença de lectinas em *L. infantum/chagasi* e a verificação do efeito das de maior atividade na adesão e na internalização desses parasitos em macrófagos pode elucidar um ainda desconhecido mecanismo de virulência desse parasito que, se bloqueado de maneira específica, pode prejudicar o decorrer do processo infeccioso, permitindo o controle da infecção.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

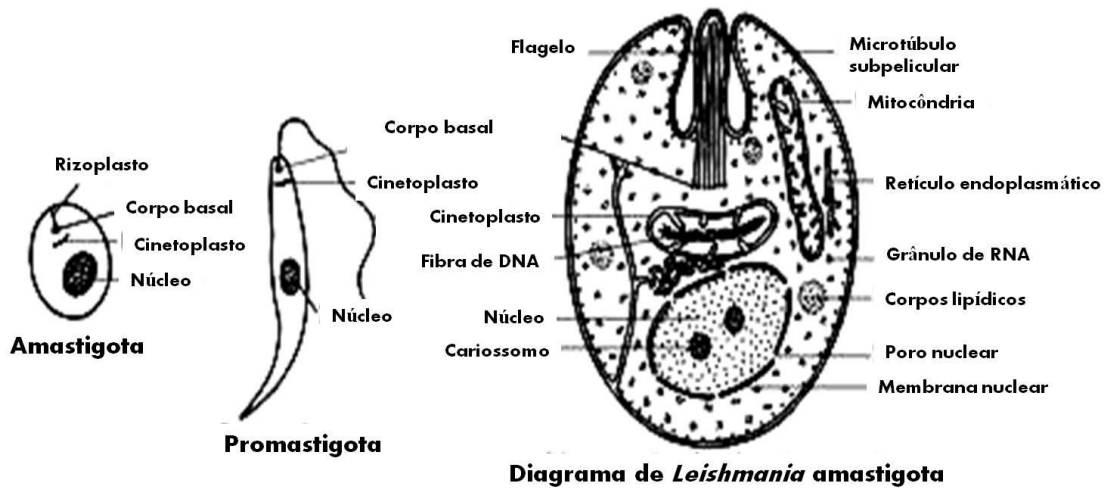
### 2.1 *Leishmanioses e seus agentes etiológicos*

As doenças tropicais negligenciadas, conforme definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), referem-se a doenças infecciosas que ocorrem em regiões tropicais do planeta e incluem várias enfermidades, dentre elas malária, leishmanioses, esquistossomose, oncocercose, filariose linfática, tripanossomíase e dengue. Estas doenças participam, juntamente com outras, da morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento e geram um claro ônus econômico para os países afetados (CHATELAIN; IOSET, 2011).

As leishmanioses, citadas como sendo do grupo de doenças tropicais negligenciadas, tem como agente infeccioso a *Leishmania* sp., um protozoário, parasita intracelular obrigatório que infecta humanos e outras espécies de mamíferos causando um amplo espectro de formas clínicas (OYOLA *et al.*, 2012), sendo responsáveis pelo segundo maior número de mortes por infecções parasitárias em todo mundo (COSTA *et al.*, 2011).

Os parasitos do gênero *Leishmania* sp. pertencem ao reino Protista, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, que pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e compreendem parasitos digenéticos. São parasitos dimórficos encontrados na natureza sob formas promastigotas alongadas, móveis e flageladas, presentes no tubo digestivo de insetos flebotomíneos ou em formas amastigotas imóveis e com morfologia arredondada que parasitam células do Sistema Fagocitário Mononuclear de mamíferos (BARI; RAHMAN, 2008a; DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012b).

As formas amastigotas são pequenas, medindo cerca de 2-5  $\mu\text{m}$ . O núcleo tem uma localização central, anterior ao cinetoplasto, que é uma parte da mitocôndria onde o DNA mitocondrial está organizado juntamente com uma matriz de fibras finas. As formas promastigotas ou flagelares são vistas em cultura e no intestino médio do flebotomíneo, medindo 10-15  $\mu\text{m}$  de comprimento com um único flagelo anterior (Figura 1). Estas formas promastigotas movimentam em um curso espiral. Microscopia eletrônica de imagens mostram que amastigotas apresentam uma membrana dupla apoiada por uma camada de fibrilas subpeliculares (BARI; RAHMAN, 2008b).



**Figura 1: Morfologia das formas amastigota e promastigota de *Leishmania* sp.** Modificado de: <<http://jpkc.sysu.edu.cn/jscx/Textbook/six-4.html>>

A manutenção de parasitos em sítios na derme ou uma posterior dispersão para órgãos internos contribuem para a progressão da doença, resultando em patologias distintas, tais como leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC), cutânea difusa (LCD) e visceral (LV). Estas doenças são frequentemente associadas com espécies distintas de parasitos, sendo, por exemplo, *L. infantum* e *L. major* responsáveis por causar a LV e LC respectivamente, enquanto *L. braziliensis* é o principal agente causador da LMC (OYOLA *et al.*, 2012).

Essas doenças apresentam uma prevalência estimada em 12 milhões de indivíduos infectados, com uma mortalidade de cerca de 20 a 40 mil mortes por ano devidas à LV no mundo (MCCALL *et al.*, 2013). Mais de 27 espécies de *Leishmania* já foram identificadas mundialmente, com algumas espécies recentemente identificadas no Novo Mundo (PASSERO *et al.*, 2012b).

As Leishmanioses apresentam ampla distribuição geográfica, afetando cerca de 90 países, dentre estes, 72 países classificados como países em desenvolvimento e 13 menos desenvolvidos (DESJEUX, 2004).

### **2.1.1 Leishmaniose Visceral**

#### **2.1.1.1 Distribuição geográfica**

A LV ou Kalazar (WILSON; PEARSON, 1984) é a forma mais severa das leishmanioses e é responsável pela maior incidência de óbitos associados a essas doenças, representando um grave problema de saúde pública. Apesar da ampla distribuição das leishmanioses, 90% dos casos de LV ocorrem apenas em cinco países, sendo esses: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. No subcontinente indiano, Ásia e África, a LV é causada por *L. donovani*, enquanto na região do Mediterrâneo, sudoeste da Ásia, Ásia Central e América do Sul o protozoário presente é a *L. infantum* ou *L. chagasi*. Outras espécies, como a *L. amazonensis*, de incidência na América do sul, são ocasionalmente viscerotrópicas (PALETTA-SILVA; MEYER-FERNANDES, 2012).

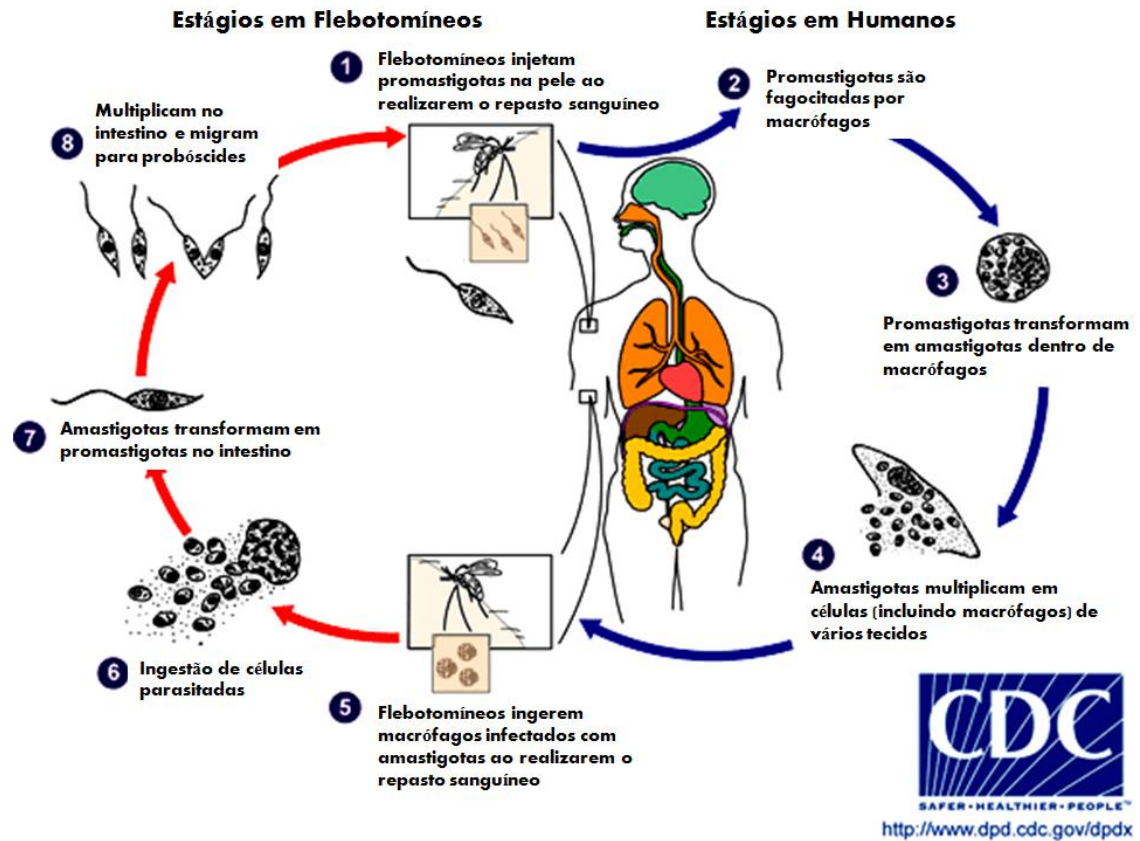
As espécies *L. infantum* e *L. chagasi* separadamente referidas anteriormente, agora são consideradas como sendo a mesma espécie, com base na sequência do genoma, às características biológicas e ao fato de que as manifestações clínicas das doenças são muito semelhantes (LIMA *et al.*, 2012). Recentemente, um estudo que comparou os perfis de microssatélites apoiou fortemente a hipótese de que *L. infantum* teria sido introduzida no Novo Mundo durante ou após o período Colonial (KUHLS *et al.*, 2011).

No Brasil, a dispersão da LV é associada a intensas migrações humanas que ocorreram a partir do Nordeste, onde 82,5% dos casos brasileiros ocorrem, para centros urbanos do Centro-Oeste e Sudeste (São Paulo e Minas Gerais). As leishmanioses são conhecidas por acompanhar os eventos antrópicos, como a expansão demográfica e migração para construção de usinas hidrelétricas, estradas ou gasodutos. Recentemente, a região Sul experimentou seu primeiro surto de LV canina, que pode ter sido importada de países vizinhos endêmicos (FERREIRA *et al.*, 2012).

#### **2.1.1.2 Vetor e Ciclo de Vida da Leishmania chagasi**

O parasito é transmitido pela picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, inseto que apresenta de 2-3 mm de comprimento e está amplamente distribuído pela América Latina. *L. infantum* é também transmitida por *L. cruzi* no Brasil e *L. evansi* na Colômbia e Venezuela (ROMERO; BOELAERT, 2010).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. Moléculas presentes na superfície destas formas amastigotas reconhecem componentes do intestino dos flebotomíneos, onde se ligam e se diferenciam rapidamente em formas flageladas denominadas promastigotas. Estas se diferenciam, finalmente, em formas promastigotas metacíclicas, que se alojam nas glândulas salivares do inseto. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas. Após esse período, as fêmeas infectantes, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva. Na derme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. As promastigotas metacíclicas se aderem a essas células via receptores e são capturadas por fagocitose, permanecendo em fagossomos que se fundem a lisossomos, formando, por fim, os fagolisossomos. Uma vez dentro dos macrófagos, promastigotas são submetidas a mudanças bioquímicas e metabólicas, se transformando em formas amastigotas, que são as formas intracelulares do parasito. Estas formas se multiplicam intensamente no interior dos macrófagos até o rompimento dos mesmos. Assim, ocorre a liberação das amastigotas, que serão fagocitadas por novos macrófagos em um processo contínuo até a disseminação hematogena para outros tecidos como linfonodos, fígado, baço e medula (AZEVEDO-PEREIRA *et al.*, 2007; BARROS, 2011; HANDMAN; BULLEN, 2002) (Figura 2).



**Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania* sp.** Modificado de: <<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/images/ParasiteImages/G-L/Leishmaniasis/LeishmaniaLife Cycle.gif>>

### 2.1.1.3 O hospedeiro cão

Uma importante consideração sobre a LV está relacionada com o processo de urbanização da doença, que tem como seu principal reservatório animal o cão doméstico presente no ambiente urbano, enquanto raposas e outros animais selvagens são responsáveis pela transmissão silvestre da doença. Esses animais silvestres são picados por insetos transmissores peridomiciliares, se tornando um elo importante para a transmissão para os cães e para o homem (ROMERO; BOELAERT, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

O cão susceptível à infecção é propenso a desenvolver doença clínica como consequência do desenvolvimento de maior carga parasitária, em comparação com cães imunologicamente resistentes (TRAVI *et al.*, 2001). Esse hospedeiro apresenta variações no quadro clínico da doença, passando de animais aparentemente saudáveis a oligossintomáticos podendo chegar a estágios graves da doença com intenso parasitismo cutâneo. Assim, o cão representa uma fonte de infecção para o vetor, precedendo a

maioria dos casos no homem e promovendo a dispersão da doença para áreas não-endêmicas (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Os estudos de prevalência da doença canina em diversas cidades do Brasil têm detectado índices de 9,7% em Montes Claros, Minas Gerais e 40,3% em Paulista, Pernambuco. Em Cuiabá, estudos de prevalência determinaram valores altos (64%), no período de 1997 a 1998, enquanto estudos realizados próximos a 2008 demonstraram índice de 8,4%. A realização de inquéritos sorológicos caninos (amostrais ou censitários), além de sua função de controle do reservatório canino em extensas áreas, tem papel fundamental na detecção de focos silenciosos da doença e na delimitação de regiões ou setores de maior prevalência, onde a execução das medidas de controle se faz necessária (JULIÃO *et al.*, 2007).

Medidas tomadas para controlar a infecção por *L. chagasi* no Brasil incluem eutanásia de cães com sorologia anti-*Leishmania* positiva, uso de inseticidas impregnados em colares utilizados pelos cães e pulverização para controle do vetor. No entanto, muitas vezes, a eliminação de cães infectados não resulta na erradicação da infecção em seres humanos. Várias possibilidades podem explicar esta observação, por exemplo o atraso entre a eutanásia dos cães e o desenvolvimento da LV em humanos, a alta prevalência de leishmaniose canina, um grande número de cães em áreas endêmicas e/ou a possibilidade de transmissão por outros animais, incluindo os seres humanos servindo como reservatórios (LIMA *et al.*, 2012).

#### **2.1.1.4 Sinais Clínicos e Tratamento**

Clinicamente a LV caracteriza-se por longo prazo de febre baixa, perda de peso, hepatomegalia e esplenomegalia. Investigações laboratoriais revelam pancitopenia, baixos níveis de albumina e hipergamaglobulinemia, e a doença se torna fatal se não tratada adequadamente (SERAFIM *et al.*, 2010; ROMERO; BOELAERT, 2010).

Antimoniais pentavalentes (Sb<sup>V</sup>) tais como estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) e antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento de todas as formas de leishmaniose na América do Sul, Norte da África, Turquia, Bangladesh e Nepal. Seu mecanismo de ação ainda não está elucidado, mas sabe-se que atua nas formas amastigotas do parasito, inibindo sua atividade glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. Uma das desvantagens do uso

destes antimoniais para tratamento das leishmanioses é o aparecimento de resistência – cerca de 60% dos pacientes com LV no Estado de Bihar, na Índia, não respondem ao tratamento. O surgimento de resistência ao antimônio está relacionado com a exposição inadequada à droga, aumentando a tolerância de parasitos frente a mesma. Outras drogas foram introduzidas na terapia medicamentosa das leishmanioses, incluindo pentamidinas, paromomicina, anfotericina B lipossomal e miltefosina. No entanto, efeitos colaterais, menor eficácia e alto custo limitam sua utilização (DO MONTE-NETO *et al.*, 2011). Uma outra desvantagem do uso dos  $Sb^V$  para o tratamento das leishmanioses é o seu alto grau de toxicidade. Apesar de apresentar efeitos colaterais menores que o composto antecessor utilizado ( $Sb^{III}$ ), o  $Sb^V$  ainda gera artralgia, mialgia, elevação transitória dos níveis enzimáticos hepatocelulares e mudanças nos perfis do eletrocardiograma (MUKHERJEE *et al.*, 2013; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

## ***2.2 Moléculas e receptores de interesse para vacinas e patogênese***

Muito esforço se despende no sentido de se encontrar uma estratégia que permita o controle da LV, seja no contexto de profilaxia ou de tratamento da doença. A busca de protocolos de imunização com vacinas que variam desde as convencionais até as genéticas, delineadas objetivando o uso em humanos, representa uma parte desse esforço (GHOSH *et al.*, 2001; MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2003; STAGER *et al.*, 2000).

Os imunógenos utilizados para formular vacinas podem ser classificados de acordo com o seu método de formulação. Na LC, o uso de parasitos vivos representam o modelo clássico de leishmanização. Classificadas como vacinas de primeira geração estão as que utilizam antígenos bruto dos parasitos, como de segunda geração as vacinas que utilizam antígenos fracionados, purificados ou antígenos recombinantes e as vacinas de terceira geração as que utilizam material genético como imunógeno (PASSERO *et al.*, 2012a). Uma grande parte de estudos recentes sobre as leishmanioses estão em torno da busca por moléculas específicas dos parasitos que induzam resposta imune protetora contra a doença. Dentre estes, podem ser citados trabalhos que investigaram o potencial protetor de proteínas como *LsPass1*, 2 e 3 e *LmL3* e *LmL5* (PASSERO *et al.*, 2012b; RAMIREZ *et al.*, 2013; STAGER *et al.*, 2000).

Adicionalmente, a busca por fórmulas terapêuticas ou profiláticas que consigam interromper determinada via importante para a virulência do micro-organismo

também se torna um alvo potencial, objetivando o controle da infecção. Nas leishmanioses, a caracterização de moléculas parasitárias específicas com potencial antigênico ou que participem dos mecanismos de virulência do parasito (denominadas fatores de virulência) é alvo de diversos grupos de pesquisa. Dentre essas moléculas, pode-se citar a proteína homóloga de *Leishmania* de receptores de proteína quinase C ativada (LACK) (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA *et al.*, 1999), o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína gp63 (BRITTINGHAM; MOSSER, 1996; HANDMAN; BULLEN, 2002; LO *et al.*, 1998; SPATH *et al.*, 2003), as cisteíno-peptidases (BUXBAUM *et al.*, 2003) e enzimas que participam do catabolismo de ATP extracelular (DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2008).

### **2.3 Os processos de adesão e fagocitose**

A fagocitose é uma importante arma do sistema imune inato contra patógenos invasores. Ela é realizada por macrófagos que envolvem os patógenos em um compartimento onde possam ser mortos. No entanto, parasitos do gênero *Leishmania* desenvolveram mecanismos para subverter a atividade microbicida dos macrófagos. Handman *et al.* 2002 descrevem a fagocitose como sendo composta por dois eventos ligados, os quais seriam a fixação via baixa afinidade com interações cinéticas rápidas e, em sequência, uma interiorização com elevada afinidade. Já a fagocitose de promastigotas ocorreria a partir de uma forma não clássica de captação, onde a fixação inicial do parasito aos receptores na fagocitose desencadearia o recrutamento de receptores adicionais na membrana.

A captação de formas promastigotas de *Leishmania* por células do hospedeiro é um processo mediado por receptores clássicos que iniciam a fagocitose. Algumas moléculas de superfície do parasito e dos macrófagos são responsáveis por essa interação. Receptores do complemento (CR)1, CR3 (Mac-1), receptor de fibronectina e o receptor fucose-manose (FM) na superfície de macrófagos desempenham papéis importantes na ligação das formas promastigotas e a ligação a múltiplos receptores é necessária para desencadear uma resposta imune protetora (LIU; UZONNA, 2012).

Observando a necessidade de moléculas para a ocorrência de interação parasito-hospedeiro e, conseqüentemente, a infecção, a busca por moléculas que consigam interferir nesse processo se torna um alvo para a pesquisa.

Tem sido proposto que receptores de glicosaminoglicanas (GAG) presentes na superfície de *Leishmania sp.* apresentem um importante papel na ligação aos macrófagos. Essas GAG's estão amplamente distribuídas nos tecidos do hospedeiro (AZEVEDO-PEREIRA *et al.*, 2007; DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012a; DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012b). A estrutura das GAG's apresenta polissacarídeos lineares constituídos por unidades repetidas de dissacarídeos contendo ácido urônico e uma exosamina. Estes dissacarídeos podem variar no tipo de hexosamina, hexose ou unidade de ácido hexurônico. Os glicosaminoglicanos sulfatados são classificados como heparina [2-O-sulfo- $\beta$ -D-ácido glucurônico (GlcUA-2 S), ou 2-O-sulfo- $\alpha$ -L-ácido idurônico (IdoUA-2 S) associado a N-acetilglucosamina (GlcNAc) ou N-sulfoglucosamina (GlcNS)], heparan sulfato [GlcUA, IdoUA ou IdoUA-2 S associado a GlcNAc ou GlcNS], sulfato de condroitina [GlcUA associado a N-acetylgalactosamina GalNAc)], dermatan sulfato [GlcUA ou IdoUA associada a GalNAc] e queratan sulfato [galactose (Gal) associada a GlcNAc]. Embora a heparina não seja encontrada na superfície das células do hospedeiro, sendo mais comum encontrar sulfato de condroitina, dermatan sulfato e heparan sulfato (LOVE *et al.*, 1993), ela é usualmente utilizada como uma ferramenta para estudos sobre interações celulares patógeno-hospedeiro (DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012a), uma vez que é muito semelhante estruturalmente ao heparan sulfato diferindo somente por ser mais sulfatada, contendo uma porção mais elevada de ácido idurônico, sendo produzida somente pelos mastócitos do tecido conjuntivo (LOVE *et al.*, 1993).

### **2.3.1 Lectinas**

Dentre as moléculas que podem estar envolvidas em processos infecciosos destacam-se as lectinas, um grupo de proteínas ubíquas, cuja principal característica é se ligar a carboidratos solúveis ou presentes em glicolipídeos ou glicoproteínas. Essa propriedade despertou o interesse sobre a possível participação das lectinas no processo de adesão de micro-organismos patogênicos a células de mamíferos. Na literatura, diversos trabalhos evidenciam a participação de lectinas presentes em células do hospedeiro no processo de reconhecimento de carboidratos presentes na superfície de diferentes espécies de patógenos (GEURTSSEN *et al.*, 2009b; PIPIROU *et al.*, 2011; VAN DER VELDEN *et al.*, 2010), dentre eles parasitos do gênero *Leishmania* (ANDRADE; SARAIVA, 1999; GHOSHAL *et al.*, 2009). Muitas vezes esse

reconhecimento implica na modulação da resposta imunológica do hospedeiro devida à ativação de vias de sinalização a partir da estimulação das lectinas de superfície das células do sistema imune por carboidratos presentes nos patógenos (GEURTSSEN *et al.*, 2009; VAN DER VELDEN *et al.*, 2010). Interessantemente, trabalhos recentes implicam lectinas como inibidores de infecção por HIV e potenciais agentes terapêuticos contra a AIDS: a lectina BanLec, extraída de bananas (*Musa acuminata*), que se liga à glicoproteína gp120 presente no envelope viral, impedindo seu reconhecimento e internalização por células do sistema imune (SWANSON *et al.*, 2010); e a aglutinina HEA (extraída do cogumelo *Hericium erinaceum*), que possui atividade inibidora sobre a transcriptase reversa do HIV, inibindo sua proliferação (LI *et al.*, 2010).

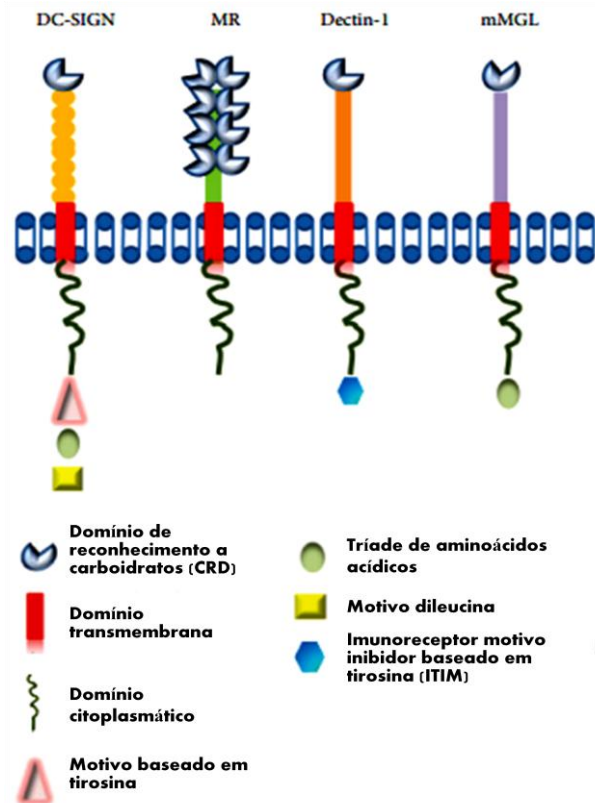
As lectinas são um grupo diverso de proteínas mono ou multivalentes, em relação aos domínios de ligação aos carboidratos, e glicoproteínas de origem não imune que têm afinidade seletiva por carboidratos ou um grupo de carboidratos. Estas proteínas são amplamente distribuídas em plantas, animais e micro-organismos. Em animais, as lectinas foram identificados em um grande número de células. Elas podem estar incorporadas às membranas da superfície celular, em compartimentos intracelulares, presentes no citoplasma ou no núcleo, desempenhando um papel crucial em processos fisiológicos e patológicos em animais. Interações específicas entre lectinas e carboidratos complexos (glicoproteínas, glicolípidos, polissacáridos, ou proteoglicanos) estão envolvidas em numerosos fenômenos básicos, como o desenvolvimento embrionário, tráfego intracelular, reconhecimento célula-célula e célula-matriz, *homing* celular, endocitose, fagocitose, inflamação e metástase de células cancerosas (VAZQUEZ-MENDOZA *et al.*, 2013).

Como característica, as lectinas apresentam, no mínimo, um domínio não catalítico capaz de estabelecer ligações não hidrofóbicas altamente específicas de maneira reversível a um monossacarídeo ou oligossacarídeo. Essas proteínas apresentam homologia conservada evolutivamente e uma diversidade dessas moléculas já foram isoladas e caracterizadas em todos os seres vivos desde a sua descoberta (SHARON; LIS, 2004).

Apesar da grande diversidade dessas moléculas na natureza, a capacidade dessas proteínas se ligarem a moléculas de carboidratos é restrita a um domínio específico da proteína, denominada domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD's) (DRICKAMER; TAYLOR, 1993). Com base na estrutura primária destes CRD's, nos padrões dobráveis e em seus requisitos de cátions, lectinas animais podem ser

classificadas em várias famílias, incluindo lectinas do tipo C, F, P e I, galectina, pentraxina, dentre outras.

As lectinas do tipo C são representadas por glicoproteínas transmembrana, em sua maioria, ou encontradas na matriz extracelular que dependem do íon cálcio para a sua atividade, podendo se ligar a diferentes açúcares (VAZQUEZ-MENDOZA *et al.*, 2013a). Os receptores lectina do tipo C (CLR's) constituem uma superfamília de mais de 1000 proteínas classificadas em 17 grupos com base em sua filogenia e organização de domínio. A maioria dos CLR's possuem um ou mais domínios de reconhecimento a carboidratos (CRD's) ou domínios lectina do tipo C (CTLD's). Este é um motivo estrutural conservado contendo dois *loops* estabilizados por duas pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína altamente conservados na base de cada volta. O segundo ciclo é mais flexível do que o primeiro e, geralmente, contém o local de ligação ao ligante (figura 3). A maioria CLR's estão associados à membrana e estão envolvidos na captura e apresentação de antígenos (KERSCHER *et al.*, 2013).



**Figura 3: Estrutura de membros da família de lectinas do tipo C.** Estes receptores contém um ou mais domínios de reconhecimento de carboidratos (CDR's), domínio transmembrana e domínio citoplasmático podendo conter motivos baseados em tirosina, tríade de aminoácidos ácidos, motivo dileucina ou motivo imunorreceptor de inibição baseado em tirosina (VAZQUEZ-MENDOZA *et al.*, 2013).

Tendo em vista a função das lectinas e a sua especificidade de interação com carboidratos, elas são uma valiosa ferramenta de pesquisa na área da saúde, na compreensão de processos chaves que medeiam a invasão celular por parasitos.

### 2.3.1.1 Proteínas ligantes de heparina (PLH)

Proteínas Ligantes de Heparina (PLH) são CLR's que podem estar envolvidos nas interações parasito-hospedeiro durante o processo de infecção (DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012b) por mediar a adesão a células de mamíferos via proteoglicanos heparan sulfato expressos na superfície destas células (LOVE *et al.*, 1993). Essas proteínas estão presentes em protozoários, estando envolvidas nos processos infecciosos causando doenças importantes em seres humanos, o que é mostrado em vários trabalhos, dentre eles: PLH presentes na superfície de formas infectantes de

*Trypanosoma cruzi*, que estão envolvidas nos processos de adesão de amastigotas a células do hospedeiro e de epimastigotas ao epitélio intestinal de triatomíneos (BAMBINO-MEDEIROS *et al.*, 2011; OLIVEIRA-JR *et al.*, 2013; OLIVEIRA, JR. *et al.*, 2012); Lectinas ligantes de galactose e de N-acetil-galactosaminas presentes na superfície de *Entamoeba histolytica* são fatores de virulência importantes para a infecção por este protozoário, que é responsável pelo terceiro maior número de casos de morte por doenças parasitárias no mundo, depois da malária e da esquistossomose. Formas trofozoítas móveis deste parasito se aderem e invadem a mucosa do indivíduo infectado, podendo, por intermédio da disseminação pela circulação sanguínea, causar abscessos extraintestinais, principalmente no fígado. Tais lectinas são importantes tanto para os processos de adesão quanto de citotoxicidade desta espécie de *Entamoeba*, diferentemente do que acontece com outras espécies não virulentas, como *E. coli* ou *E. dispar* (CANO-MANCERA; LOPEZ-REVILLA, 1987; JANTSCHER-KRENN *et al.*, 2012; SAFFER; PETRI, JR., 1991).

Alguns trabalhos baseados na investigação da presença de ligantes de heparina em promastigotas de *L. braziliensis* demonstraram a expressão de PLH nesta espécie, sugerindo sua participação na interação do parasito com células intestinais de *Lutzomyia*, o que pode ter implicações deste tipo de lectina no ciclo de vida do parasito (DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012a; DE CASTRO CORTES *et al.*, 2012b; AZEVEDO-PEREIRA *et al.*, 2007).

O quadro acima descrito evidencia, portanto, a importância da verificação e da caracterização da presença dessas moléculas em *L. Infantum/chagasi* e da sua participação no processo infeccioso causado por este parasito, o que pode dar sustentação a novas possibilidades de bloqueio da infecção por esse protozoário de grande importância na saúde pública.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo geral*

Detectar, identificar e caracterizar proteínas ligantes de heparina (com atividade lectínica) em formas promastigotas de *L. chagasi* e avaliar a participação das mesmas na adesão e na internalização do parasito em células fagocitárias.

#### 3.2 *Objetivos específicos*

- ✓ Detectar e isolar proteínas ligantes de heparina provenientes de extrato de formas promastigotas de *L. chagasi* (PLHLc) por Cromatografia Líquida de Proteínas por Pressão (FPLC) utilizando coluna de heparina-agarose imobilizada;
- ✓ Avaliar a pureza e caracterizar a PLHLc de maior atividade utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE);
- ✓ Determinar a sequência proteica da PLHLc;
- ✓ Produzir, em camundongos C57BL/6, anticorpos IgG totais policlonais contra PLHLc purificada;
- ✓ Imunolocalizar, com o anticorpo antiPLHLc purificado, a proteína ligante de heparina presente no parasito, pela técnica de imunofluorescência.
- ✓ Avaliar a participação da PLHLc no processo de adesão e de penetração de formas promastigotas de *L. chagasi* em macrófagos utilizando bloqueio das PLHLc parasitárias com anticorpos policlonais específicos ou com heparina sódica, seguido de infecção de células J774 (testes de adesão e penetração “in vitro”).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 *Animal experimental*

Camundongos BALB/c ou C57BL/6 de 4 a 8 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa – UFV, mantidos e manuseados no biotério do setor de Imunologia e Virologia do Departamento de Biologia Geral – DBG/UFV, onde permaneceram em ciclo fotoperiódico claro/escuro de 12 h e receberam água e alimento *ad libidum*. A experimentação animal foi feita respeitando princípios éticos do Código Profissional do Médico Veterinário, de acordo com o parecer da Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFV – Projeto de pesquisa – processo número: 22/2011).

### 4.2 *Obtenção dos parasitos*

Formas promastigotas totais de *Leishmania (Leishmania) infantum/chagasi* cepa (MHOM/BR/75/M2682), mantidas em cultura em laboratório, foram inoculadas em camundongo BALB/c ( $1 \times 10^7$  parasitos/100  $\mu$ L de tampão PBS (*phosphate buffered saline*), pH 7,2, aplicados intravenosamente pela veia da cauda) para recuperação de novos parasitos, conforme descrito a seguir: após 28 dias os animais foram eutanasiados e deles foram retirados o baço e o fígado, que foram macerados e diluídos em placa de 24 poços de forma seriada, em meio de Grace<sup>®</sup> (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y., USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino Inativado (SFB; LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), L-glutamina 2 mM (GIBCO BRL) e penicilina G 100 U/mL (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) (Grace completo). A placa foi mantida em estufa a 26°C. Parasitos isolados desta cultura foram utilizados para os experimentos posteriores ou estocados em nitrogênio líquido (-196°C).

### 4.3 *Cultura dos parasitos para obtenção de extrato proteico*

Formas promastigotas de *L. chagasi* foram cultivadas partindo de cultura com densidade celular de  $10^5$  células/mL em meio Grace completo, pH 6,5, 26°C. No quinto

dia de cultura o material foi centrifugado a  $1540 \times g/4^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$  e os parasitos foram lavados 2 vezes com PBS, pH7,2. Precipitados correspondentes a  $2 \times 10^9$  parasitos foram congelados e mantidos em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Estes precipitados parasitários foram descongelados e reunidos em tubo de fundo cônico de 50 mL. Quantidade correspondente a  $1,5 \times 10^{11}$  parasitos foram resuspendidos em 10 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH7,0 e sonicados em sonicador (Q-Sonica), na frequência de 6 KHz realizando seis ciclos de 15 segundos com intervalos de 1 min, sempre em banho de gelo. Todo o material resultante foi centrifugado a  $7000 \times g/4^{\circ}\text{C}/20 \text{ min}$  para recuperação do sobrenadante de proteínas solúveis, que foi filtrado em membrana com poro de  $0,45 \mu\text{m}$  de diâmetro e armazenado em gelo.

#### ***4.4 Detecção, isolamento e purificação de proteínas ligantes de heparina do extrato parasitário (PLHLc)***

O extrato de proteínas solúveis de *L. chagasi* foi submetido a cromatografia de afinidade em coluna de heparina-agarose. Para equilibrar e retirar o material não adsorvido à coluna foi utilizado tampão fosfato de sódio 50 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH 7,0. A fração adsorvida foi eluída com o mesmo tampão acrescido de NaCl 2 M. A purificação foi realizada em sistema automatizado FPLC, com fluxo de 1 mL/min e monitorizada pela leitura de absorbância em 280 nm. O material eluído foi coletado e submetido à técnica de cromatografia de exclusão molecular em coluna de dessalinização “dessalting” (GE) (volume de leito de 1 mL). O tampão utilizado para eluição foi o tampão fosfato de sódio 50 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH 7,0. As novas amostras foram coletadas e submetidas à dosagem de proteínas pela técnica de dosagem por Bradford (BRADFORD, 1976) (Bio Agency Laboratórios). Parte do material foi submetido à liofilização, parte submetida aos ensaios de caracterização e outra parte aliqüotada e armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### ***4.5 Análise eletroforética de PLHLc***

O perfil proteico do material purificado foi obtido a partir da análise eletroforética realizada em gel de poliacrilamida em condições dissociantes (SDS-PAGE), em sistema "Mini V-8.10 Vertical Gel Electrophoresis System" (GIBCO BRL). A quantidade de 30 µg das amostras das preparações foram suspensas em tampão de amostra (Tris-HCl a 0,5 M pH 6,5 contendo 2,5% de SDS, 2,5% de 2-mercaptoetanol e 50% de glicerol para as amostras reduzidas ou sem 2-mercaptoetanol para as amostras não reduzidas), e aplicadas no gel. A corrida eletroforética teve duração aproximada de 50 minutos a 80-120 mA e 190 V. Os géis foram corados com prata ou com azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Pierce Chemical Co.; Rockford, USA).

#### ***4.6 Immunoblot***

Inicialmente foi feita uma análise eletroforética em gel de poliacrilamida 12%, com amostras de concentrações previamente padronizadas (corrida contendo 30 µg de proteína purificada, além de extrato total e marcador de peso molecular pré-corado). Ao fim da corrida, o gel foi transferido para o sistema de transferência de proteínas "Mini-Protean 3 Cell" para transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose. A corrida foi realizada a 200 mA por aproximadamente 2 horas. Em seguida a membrana de nitrocelulose foi embebida em uma solução de bloqueio (PBS acrescido de 5% de leite em pó) e deixada sob agitação por um período de 30 min. Após este período a solução foi retirada e foi realizada a lavagem com PBS por 3 vezes consecutivas. A membrana foi incubada com soro de camundongo imunizado (IgG antiPLHLc - 1 mL da solução estoque, 240 µg/mL, diluída 1:5), por 1 hora e em seguida lavada com PBS por 3 vezes e incubada com anticorpo secundário de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA - St. Louis, MO, USA) por 30 minutos de acordo com a diluição recomendada pelo fabricante (1:5000). A membrana foi lavada e em seguida revelada com revelador NBT/BCIP – Liquid Substrate System (SIGMA).

## **4.7 Sequenciamento de PLHLc**

### **4.7.1 Digestão triptica**

A banda de massa molecular aparente de 95 kD, correspondente à proteína de interesse reconhecida pelo anticorpo no ensaio de immunoblotting, foi excisado do gel de poliacrilamida e submetido ao protocolo de tripsinização a seguir: os pedaços de gel foram descorados em solução de acetonitrila (ACN) 50%/NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM, pH 8,0 e desidratados com 200 µL de acetonitrila 100%. Esta solução foi retirada e os pedaços completamente secos em SpeedVac (Mi-Vac; Gene-Vac) por 15 minutos. O material foi reduzido em 100 µL de ditioneitol (DTT) 65 mM/ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM por 30 min a 56 °C. O volume líquido foi removido e os pedaços de gel foram alquilados com 100 µL de iodoacetamida 200 mM/ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM, em temperatura ambiente, no escuro. Em sequencia, o volume líquido foi removido e os pedaços de gel foram lavados com 200 µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM sob agitação por 10 min, desidratados com 200 µL de ACN 100%, reidratados com 200 µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100 mM, novamente desidratados com ACN e secos no SpeedVac por 15 min. Para digestão das proteínas, foram adicionados aos pedaços de gel 30 µL de solução de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM/ CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM/ tripsina 25 ng/µL, com posterior incubação por 45 min/4°C. Após este tempo, 50 µL de solução de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25 mM/CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM foram adicionados e a preparação foi deixada *overnight* em banho-maria a 37°C. Para extração dos peptídeos do gel, a amostra foi sonicada, a parte líquida foi removida para outro tubo e concentrada em SpeedVac. Os peptídeos foram purificados em coluna Pierce® C18 Spin Columns (Thermo Scientific – Rockford, IL, USA), seguindo as especificações do fabricante. Os peptídeos foram armazenados em freezer a -20°C até análise por espectrometria de massa.

### **4.7.2 Espectrometria de massa**

As proteínas foram sequenciadas em espectrômetro de massas tipo Q-TOF, modelo micrOTOF QII (BRUKER DALTONICS, Fremon, CA, USA), acoplado a aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), modelo Prominence (SHIMADZU, Kyoto, Japan) associado a uma coluna C-18, pertencentes ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa. Para a realização do

sequenciamento, os peptídeos foram ressuspensos em 200 µL de solução de acetonitrila 5%/ácido fórmico 1%.

#### **4.7.3 Análise da sequência obtida**

Os espectros de massa das amostras foram analisados e processados utilizando o programa START PEAKS<sup>®</sup> STUDIO - Complete Software for Proteomics e submetidos para identificação e comparação das sequências de aminoácidos por intermédio do sistema BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) em uma consulta em banco de dados específico de espécies de *Leishmania* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### **4.8 Produção de anticorpos policlonais antiPLHLc**

O volume de 1.050 µL de solução de PLHLc (200 µg de proteína purificada) foi concentrado em SpeedVac até volume de 500 µL, que foram adicionados a 500 µL de adjuvante alumen, concentração 15 mg/mL. Quatro camundongos C57BL/6 foram imunizados intraperitonealmente (i.p.) com 200 µL do extrato (40 µg de proteína purificada). Nos dias 15 e 30 após a primeira inoculação os animais receberam o reforço da imunização, constituído de 20 µg de proteína purificada juntamente com adjuvante alumen. Uma semana depois os animais foram eutanasiados para coleta de sangue por punção cardíaca.

Após formação do coágulo, o sangue coletado foi centrifugado a 520 x g/25°C/10 min para separação do soro imune. Foi feito um *pool* de soro dos animais e este foi deixado em banho maria a 57°C por 30 min e posteriormente congelado e armazenado a -20°C.

Camundongos que não foram imunizados (4 animais), foram utilizados como controle do experimento. O mesmo protocolo de coleta de sangue e obtenção de soro foi utilizado conforme descrito para os animais imunizados.

#### **4.9 Purificação de anticorpos IgG totais de soro**

Para a purificação dos anticorpos, as amostras de soro dos camundongos imunizados ou não foram submetidos à cromatografia de afinidade em coluna de proteína G Sepharose (volume leito de 3 mL), que foi equilibrada previamente com tampão fosfato de sódio 20 mM/ pH 7,0. O material não adsorvido à coluna foi retirado com o mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna, enquanto o material adsorvido foi eluído com glicina-HCl 100 mM/ pH 2,7, sendo este coletado em alíquotas de 1 mL em microtubos contendo 70 µL de Tris-HCl 1 M/ pH 9,0. Todas as frações (1 mL cada) tiveram sua absorbância determinada sob luz de 280 nm para dimensionamento do conteúdo proteico. As amostras de interesse foram reunidas em *pool* e dosadas pela técnica de Bradford, conforme citado anteriormente. O conteúdo proteico das amostras de anticorpos controle não imunes purificados foi dosado pela técnica do ácido bicinconínico (BCA), de acordo com a técnica descrita no kit BioAgency, código 600-0510N.

#### **4.10 Cultura de macrófagos**

Macrófagos da linhagem J774 foram adquiridos do Laboratório LIMA do Departamento de Biologia Geral DBG/UFV e foram mantidos em meio de cultura de células RPMI-1640 (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. A-516, Swastik Disha Business Park, Via Vadhani Ind. Est., LBS Marg, Mumbai-400086, India), acrescidos de 1% de penicilina e 10% de SFB, em estufa úmida a 33 °C/5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.11 Ensaios de adesão e de penetração**

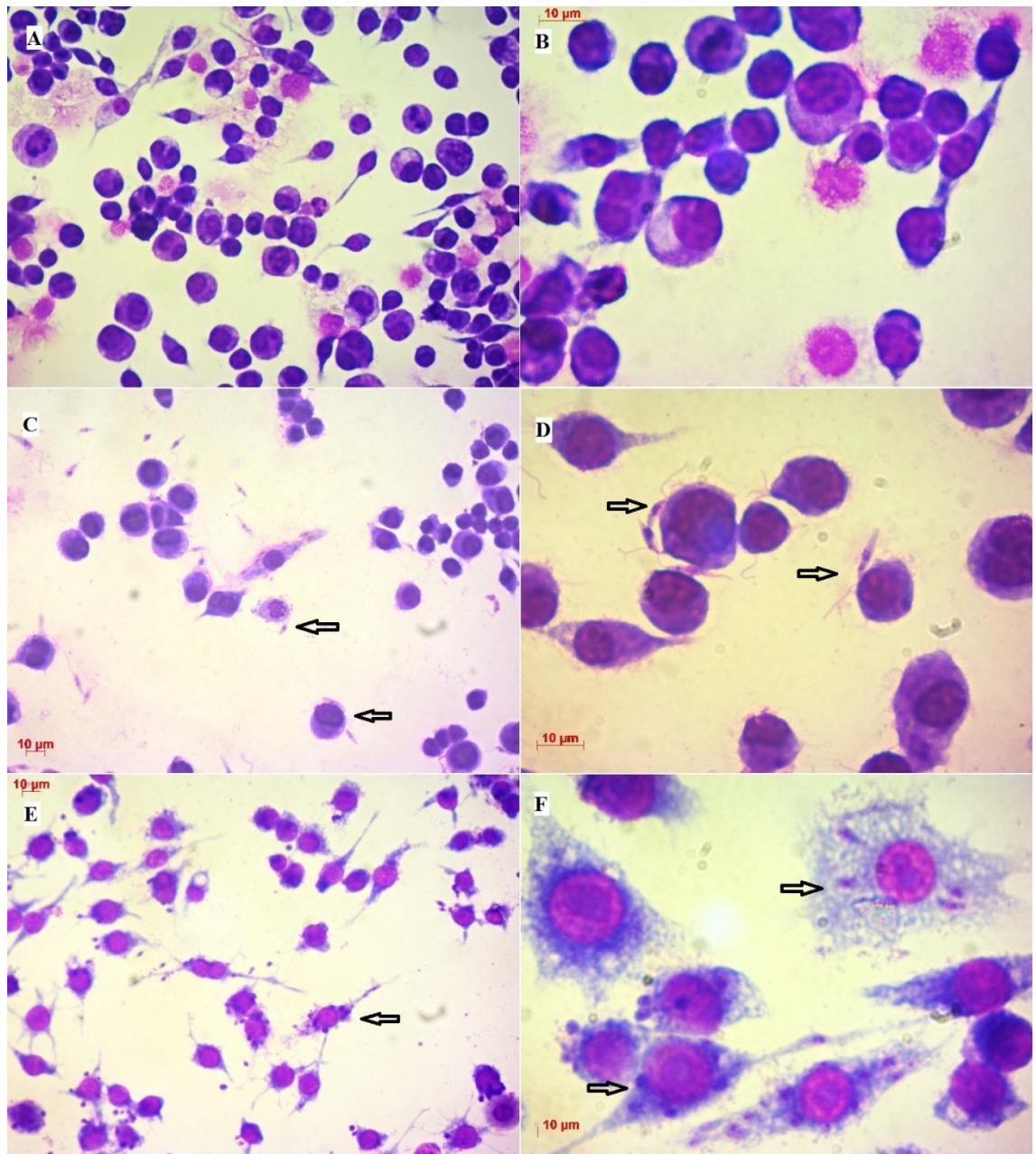
Para os ensaios de adesão e de penetração de *Leishmania* em macrófagos, placas de cultura de 24 poços cobertos com lamínulas circulares de vidro (Ø13 mm) foram utilizadas, onde 500 µL de uma suspensão contendo  $2,5 \times 10^5$  macrófagos em meio RPMI (HiMedia Laboratories) 10% de SFB, pH 7,2, foram adicionados a cada poço. A placa foi deixada *overnight* em estufa a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> para adesão dos macrófagos à lamínula. Após este período, o sobrenadante da cultura foi aspirado e os poços lavados duas vezes com PBS pH 7,2 para remoção dos macrófagos não aderidos.

Previamente, os parasitos a serem utilizados nos ensaios foram contados, lavados com PBS pH 7,2, ressuspendidos em meio RPMI (HiMedia Laboratories) 10% de SFB, pH 7,2, tendo sua concentração ajustada para  $5 \times 10^6$  parasitos/mL.

Os grupos testados foram divididos de acordo com cada tratamento:

- $5 \times 10^6$  formas totais de *L. chagasi*, por mL, pré-tratadas com anticorpo antiPLHLc, para os ensaios de adesão (30 min na estufa) e de penetração (3 horas na estufa), testando concentrações diferentes desse anticorpo (5 µg/mL, 10 µg/mL e 50 µg/mL), mais grupo controle com IgG de soro não imune, na concentração de 50 µg/mL, além de grupos não tratados, todos em duplicata.
- $5 \times 10^6$  formas totais de *L. chagasi*, por mL, pré-tratadas com heparina, para os ensaios de adesão (30 min na estufa) e de penetração (3 horas na estufa), além de grupos não tratados, todos em duplicata. Os pré-tratamentos foram feitos com heparina nas concentrações de 0,4 UI/mL, 2 UI/mL ou 4UI/mL.

Para os pré-tratamentos, os parasitos foram incubados por 30 minutos em estufa a 25°C juntamente com anticorpo antiPLHLc ou heparina e sofreram lavagens com PBS pH 7,2 antes de serem ressuspendidos em meio RPMI (HiMedia Laboratories) 10% de SFB e adicionados na placa para o ensaio. Após passados os tempos do ensaio, de 30 minutos ou 3 horas, as lamínulas, após serem lavadas com PBS pH 7,2, foram retiradas da placa, fixadas em metanol e coradas utilizando Kit de coloração Panótica (Renylab, Barbacena, MG, Brasil), seguindo o protocolo do fabricante. Na figura 4 está representado o controle do experimento, onde *Leishmania* sem prévio tratamento, foi posta em contato com macrófagos e em seguida contadas para ensaio de adesão e internalização.



**Figura 4: Adesão e internalização de *L. chagasi* em macrófagos J774 *in vitro*.** Controle com: apenas macrófagos (400X e 1000X, respectivamente) (A e B); Macrófagos apresentando formas promastigotas de *L. chagasi* não tratadas com anticorpo aderidas à membrana dos macrófagos - seta (400X e 1000X, respectivamente) (C e D); macrófagos apresentando formas promastigotas de *L. chagasi* não tratadas com anticorpo internalizadas - seta (400X e 1000X respectivamente) (E e F). Lamínulas submetidas à coloração panótica, conforme descrito na metodologia.

#### ***4.12 Fotomicroscopia de luz***

As lamínulas foram analisadas em microscópio óptico de luz (Zeiss Primo-Star), onde foram contados cerca de 200 macrófagos por lamínula. As fotomicrografias foram manipuladas no programa Axio-Cam ERc5s e impressas em aumento de 400X e 1000X.

#### ***4.13 Microscopia de fluorescência***

Formas promastigotas de *L. chagasi* provenientes de cultura realizada conforme descrito para obtenção de extrato proteico, foram contadas, lavadas 2 vezes em PBS pH 7,2 e sua concentração foi ajustada para  $1 \times 10^7$  parasitos/mL neste mesmo tampão. Lamínulas circulares de vidro ( $\text{Ø}13$  mm) foram preparadas mantidas em etanol 100% e, em seguida, secas com algodão. Gotas contendo 50  $\mu\text{L}$  de poli-L-lisina 0,1% foram adicionadas em uma película Parafilm<sup>®</sup>, e as lamínulas foram colocadas em cima de cada gota, permanecendo assim por 10 minutos. As lamínulas foram lavadas com PBS e o lado tratado com poli-L-lisina foi exposto a 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de parasitos, previamente preparada em Parafilm<sup>®</sup>, como feito no passo anterior. As lamínulas foram mantidas nesta posição por 10 minutos para adesão dos parasitos a elas. Após este período, as lamínulas foram adicionadas a uma placa de 24 poços com a região de interesse voltada para cima (placa mantida no gelo), e os poços foram lavados cuidadosamente pelas paredes da placa com 800  $\mu\text{L}$  de PBS gelado. Elas receberam tratamento para fixação com 200  $\mu\text{L}$  de paraformaldeído 4% em PBS por 10 minutos e em seguida foram lavadas novamente com PBS gelado. O experimento foi delineado apresentando um grupo tratado para permeabilização de membrana plasmática e outro grupo sem este tratamento, mantendo íntegras as membranas celulares dos parasitos. O grupo permeabilizado recebeu tratamento com 200  $\mu\text{L}$  de triton X 0,3% em PBS por 10 minutos e, na sequência, teve seus poços lavados 2 vezes com PBS gelado. O processo de marcação dos parasitos iniciou com a adição de 200  $\mu\text{L}$  de solução de bloqueio (SFB 1% em PBS) às lamínulas, permanecendo por 30 minutos, seguido da lavagem com PBS gelado. Gotas com 30  $\mu\text{L}$  de anticorpo primário (anticorpo antiPLHLc em diluição 1:10) foram adicionadas à Parafilm<sup>®</sup> e receberam as lamínulas, deixando-as em contato por 1 hora. As lamínulas foram lavadas 5 vezes com PBS e, em seguida, o mesmo procedimento foi realizado com o anticorpo secundário (anti-Fc de camundongo

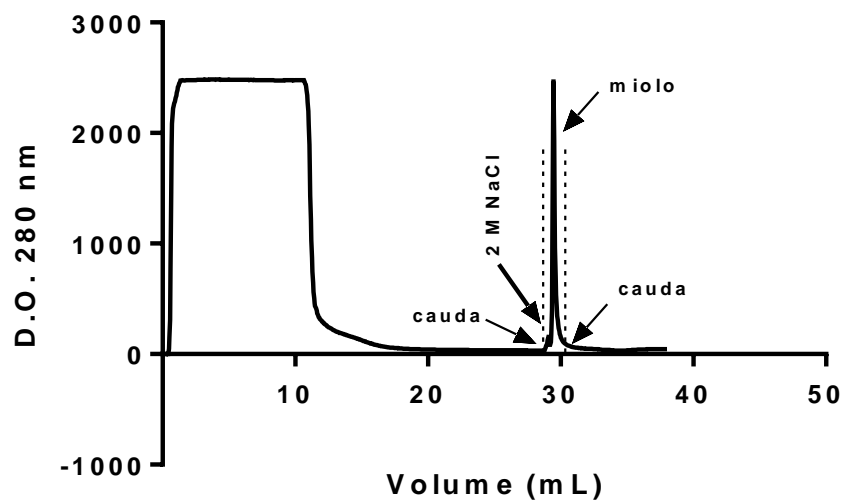
marcado com FITC – SIGMA, em diluição 1:400 em PBS). Após lavagem novamente com PBS, as lamínulas foram colocadas em contato por 20 minutos com uma solução 0,6 µg/mL de 4,6-diamidino-2-phenylindole dye (DAPI). As lamínulas foram lavadas, secas em temperatura ambiente, mantidas no escuro e montadas sobre uma gota de N-propil-galacto (0,1 M dissolvido em PBS/Glicerol 9:1, conforme recomendado pelo fabricante – SIGMA), em uma lâmina de microscopia.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência BX60 Olympus, utilizando objetiva de 100X, e filtros de excitação WU (comprimento de onda 330 - 385 nm) e WB (comprimento de onda 450 – 480 nm) para DAPI e FITC, respectivamente. Foi utilizado a câmera Olympus Q – color 3 e o programa Q – capture para captura das imagens.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Detecção, isolamento e purificação de proteínas de *L. chagasi* com atividade lectínica

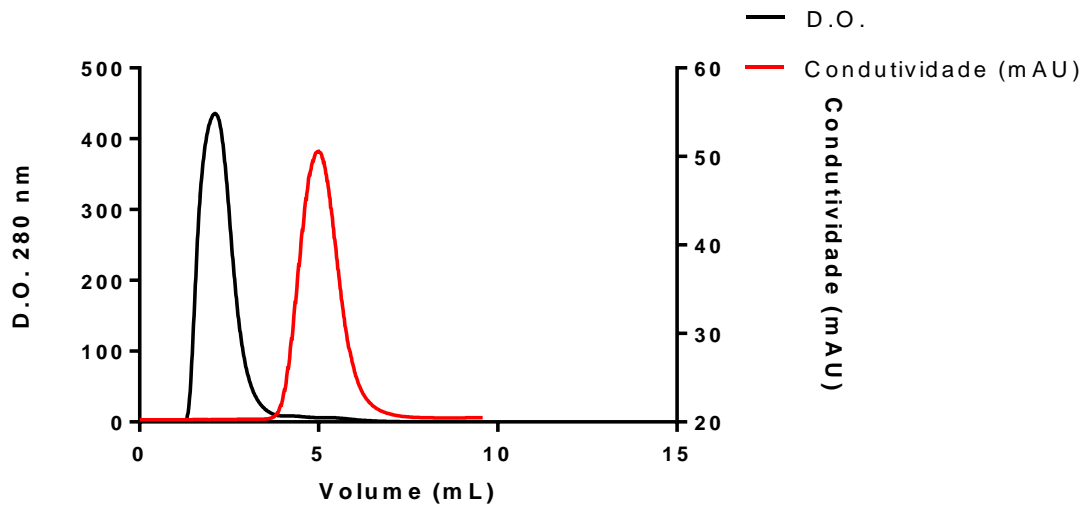
Com o propósito de detectar e identificar proteínas ligantes de heparina as quais possam desempenhar um papel crucial na interação entre o parasito *L. chagasi* e células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado foi utilizado a técnica de cromatografia de afinidade em coluna de heparina-agarose. Uma fração de 10 mL de extrato de formas promastigotas totais de *L. chagasi* foram aplicados em sistema de FPLC previamente equilibrado com tampão fosfato de sódio 50 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH7,0. O material adsorvido à coluna foi eluído com o mesmo tampão contendo NaCl 2 M (Figura 5). Este material foi denominado PLHLc.



**Figura 5: Cromatografia de afinidade em coluna de Heparina.** Extrato proteico de formas promastigotas de *L. infantum chagasi* foi submetido a FPLC utilizando fosfato de sódio 50 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH7,0 como tampão de equilíbrio (tampão A) e fosfato de sódio 50 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH7 + NaCl 2 M (tampão B) para eluição da amostra. O sistema de trabalho foi por fluxo constante, com detecção em absorvância a 280 nm.

Para retirada do NaCl da amostra utilizado no processo de eluição, as amostras foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular em coluna dessalting. O extrato purificado foi submetido novamente ao sistema de FPLC previamente

equilibrado com tampão fosfato de sódio 50 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH7,0 (Figura 6). As amostras foram eluídas em frações de 1 mL.



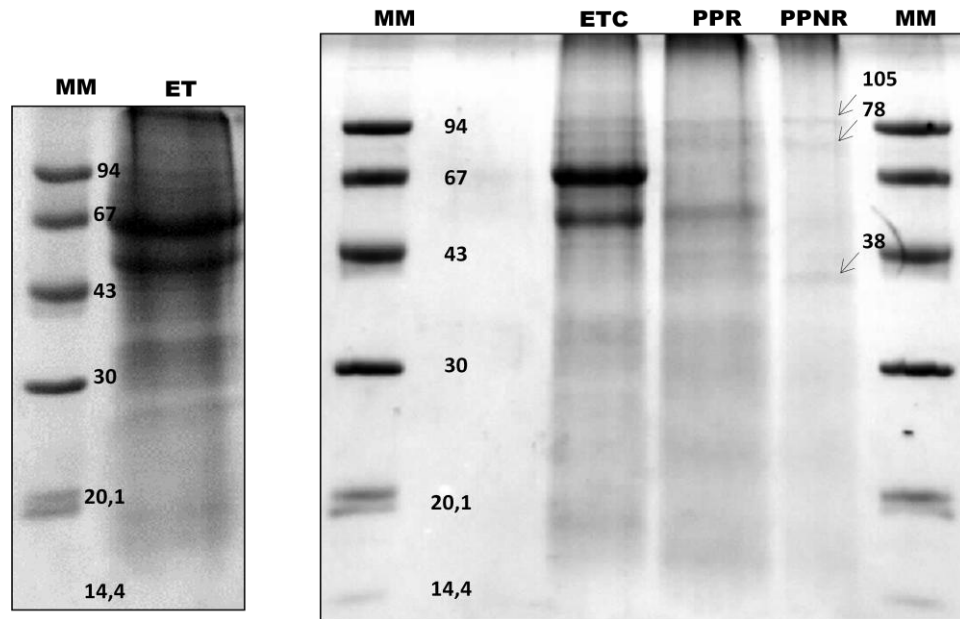
**Figura 6: Cromatografia de exclusão molecular em coluna *D-salting*.** Perfil de eluição da proteína PLHLc utilizando fosfato de sódio 50 mM/cloreto de sódio 150 mM, pH7,0 como tampão de equilíbrio e eluição. O sistema de trabalho foi por fluxo constante, com detecção em absorbância a 280 nm.

Alíquotas das frações purificadas foram dosadas, sendo que a de maior concentração apresentou 193  $\mu\text{g/mL}$  de proteína sendo escolhida para realização de todos os testes de caracterização e para os ensaios realizados. As demais frações de menor concentração foram submetidas ao processo de liofilização e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para uso caso fosse necessário.

## 5.2 Caracterização da PLHLc

### 5.2.1 Massa molecular

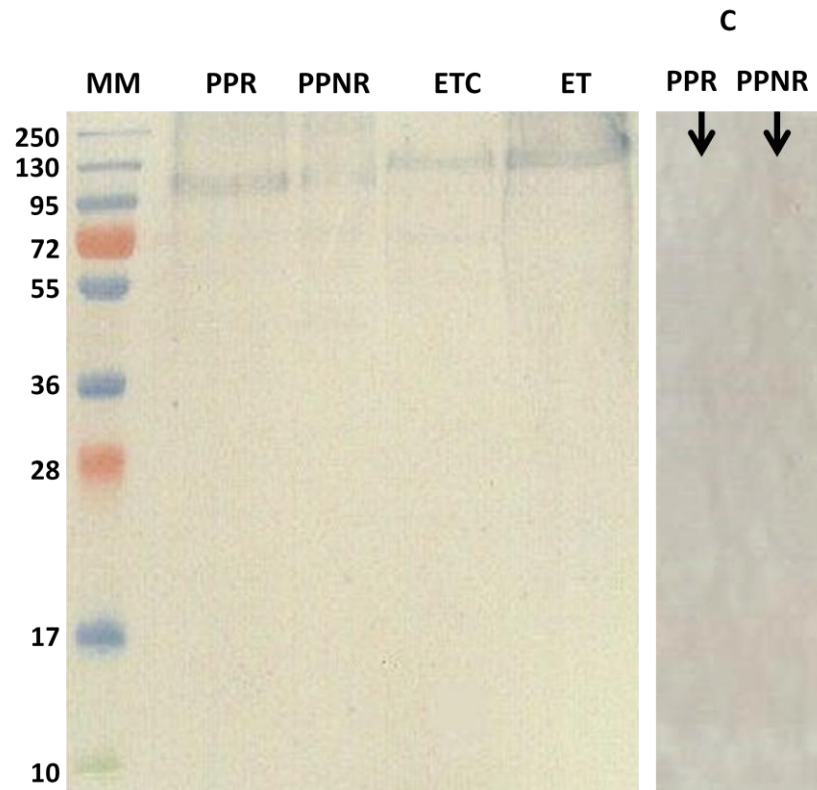
Com o propósito de verificar a pureza e caracterização da PLHLc quanto à sua massa molecular, 30  $\mu\text{g}$  de proteína purificada foi aplicada em gel SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras, revelando, após a corrida eletroforética e coloração com azul de Coomassie, a presença de três bandas, com massas moleculares de, aproximadamente 105, 78 e 38 kDa (Figura 7).



**Figura 7: SDS-PAGE de extratos de formas promastigotas totais de *L. chagasi*.** Proteínas do extrato total de *L. chagasi* (ET), extrato total centrifugado (ETC), extrato proteico purificado adicionado de tampão de amostra com redutor (PPR), extrato proteico purificado adicionado de tampão de amostra sem redutor (PPNR) e o marcador de peso molecular em kDa (MM) foram submetidas a SDS-PAGE e coradas com azul de Coomassie, conforme descrito na metodologia. Todas as amostras, exceto PPNR, foram diluídas em tampão de amostra contendo  $\beta$ -mercaptoetanol. As setas indicam a posição das proteínas de interesse.

### 5.2.2 Immunoblot

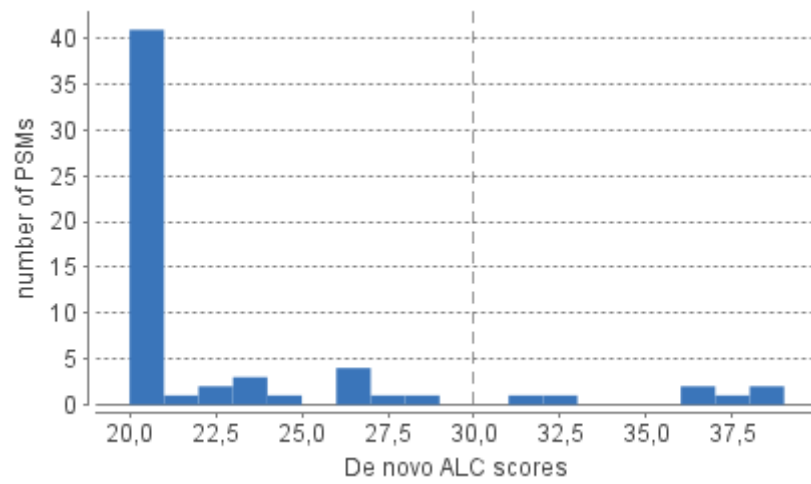
As proteínas purificadas foram caracterizadas por Western-blot utilizando o anticorpo IgG antiPLHLc, produzido a partir da imunização de camundongos com a proteína, para verificar a sua especificidade pela proteína. O resultado apresentado na figura 8 mostra que o anticorpo purificado reage com a proteína de peso molecular 105 KDa presente no extrato proteico purificado. Observou-se também o mesmo reconhecimento para extrato total de *L. chagasi*, revelando apenas uma banda para cada extrato utilizado no teste, o que indica a especificidade deste anticorpo em reconhecer a PLHLc.



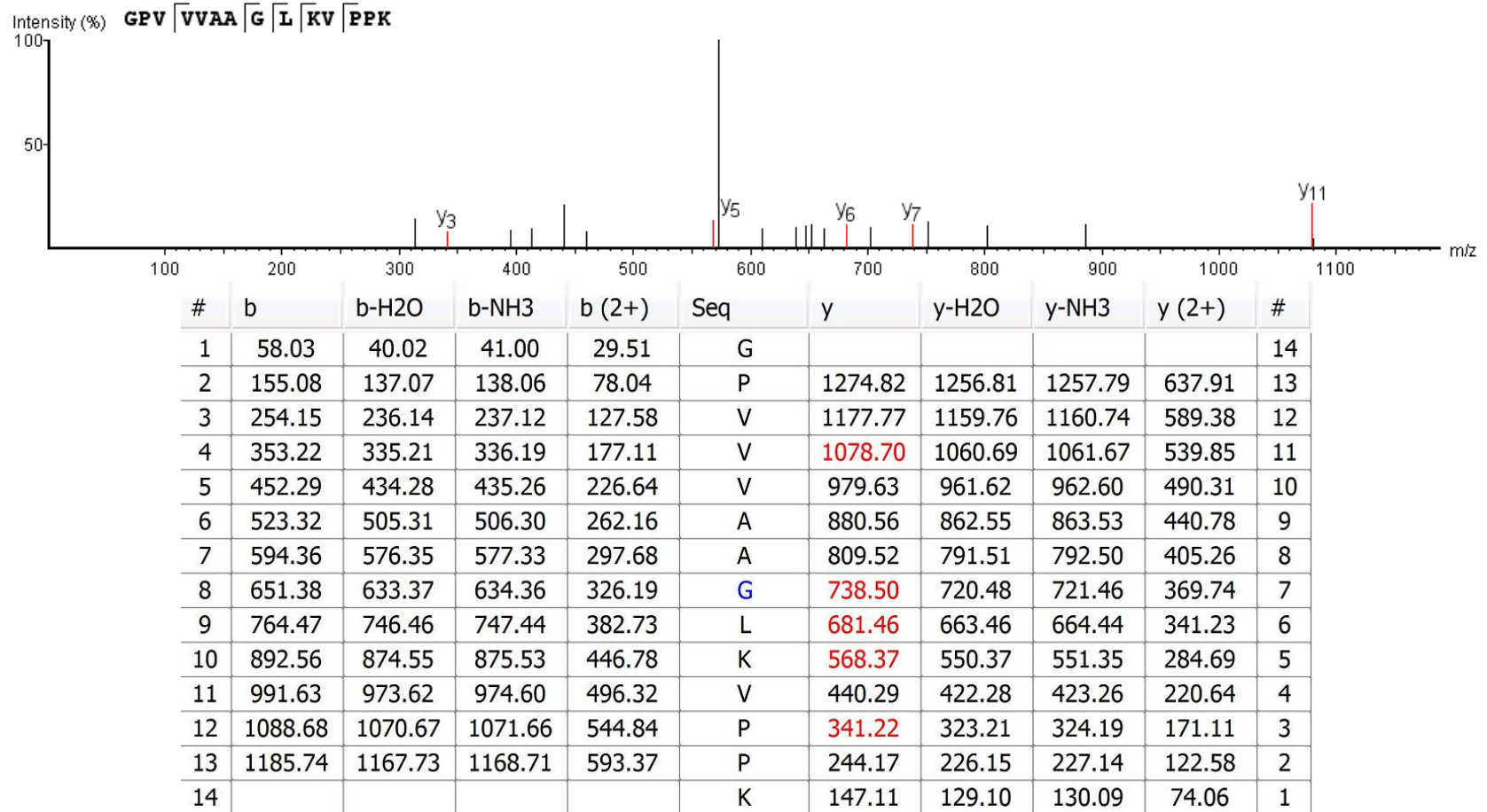
**Figura 8: Western-blotting de extratos de formas promastigotas totais de *L. chagasi*.** Proteína ligante de heparina em amostras de extrato total de *L. chagasi* (ET), extrato total centrifugado (ETC), extrato proteico purificado adicionado de tampão de amostra com redutor (PPR), extrato proteico purificado adicionado de tampão de amostra sem redutor (PPNR), marcadas com anticorpo IgG total antiPLHLc. Controle (C): PPR e PPNR marcadas com IgG total de soro não imune. (MM) Marcador molecular pré-corado.

### 5.2.3 Sequenciamento da PLHLc

Com o propósito de identificar a constituição da PLHLc, a banda de 105 kDa presente no extrato, detectada pelo anticorpo antiPLHLc, foi recortada do gel SDS-PAGE e tratada quimicamente, sofrendo processos de redução, alquilação e digestão (com tripsina) para ser submetida a sequenciamento dos aminoácidos por espectrometria de massa em aparelho modelo Q-TOF. As massas dos peptídeos clivados foram processadas no programa Start Peaks® Studio. A análise dos peptídeos sequenciados, realizada pelo programa, identificou um fragmento proteico de maior confiabilidade (sequência GPVVVAAGLKVPPK), resultado gerado a partir da análise de 82 fragmentos por MS/MS scan (Figuras 9 e 10).



**Figura 9: Histograma do score de sequenciamento.** Dados e resultados estatísticos da análise de 82 peptídeos por MS/MS, encontrando 1 peptídeo após filtragem.



**Figura 10: Análise de espectrometria de massa por Q-TOF da PLHLc.** Gráfico representativo do sequenciamento evidenciando picos correspondentes aos aminoácidos identificados pelo programa PEAKS® e tabela gerada pelo programa identificando a sequência Seq: GPVVVAAGLKVPPK.

De posse deste fragmento sequenciado, realizou-se a análise em sistema de algoritmo BLAST (BLASTp) na busca de se obter um alinhamento ótimo do peptídeo com sequências alvo presentes no banco de dados de organismo *Leishmania*.

A busca foi realizada selecionando sequências proteicas não redundantes de micro-organismos do gênero *Leishmania* (taxid:5658). Como resultado, foi identificada uma proteína tipo transportador mitocondrial de *Leishmania major* cepa Friedlin e de *Leishmania braziliensis* cepa MHOM/BR/75/M2904 com um E-value de 4,5, score total de 38,2, uma cobertura dentro da sequência de partida de 71% e identidade máxima de 100%. Interessantemente também foi encontrado alinhamento com uma proteína hipotética conservada de *Leishmania infantum* JPCM5 que apresenta uma região correspondente a lectina tipo concanavalina A, da família das glucanases, com um E-value de 12, score total de 49,8, cobertura dentro da sequência de partida de 64% e identidade máxima de 100% (Figura 11).

## Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments							Download	GenPept	Graphics	Distance tree of results	Multiple alignment	
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession					
<input type="checkbox"/>	<a href="#">mitochondrial carrier protein-like protein [Leishmania major strain Friedlin] &gt;embICAJ04909.1</a>   <a href="#">mitochondrial carrier protein-like protein [Leishmania major strain Friedlin] &gt;embICAJ04909.1</a>	23.5	38.2	71%	4.5	100%	<a href="#">XP_001683483.1</a>					
<input type="checkbox"/>	<a href="#">mitochondrial carrier protein-like protein [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904] &gt;embICAM36656.2</a>   <a href="#">mitochondrial carrier protein-like protein [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904] &gt;embICAM36656.2</a>	23.5	38.2	71%	4.5	100%	<a href="#">XP_001565221.2</a>					
<input type="checkbox"/>	<a href="#">conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103] &gt;embICBZ27090.1</a>   <a href="#">conserved hypothetical protein [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103] &gt;embICBZ27090.1</a>	22.3	22.3	71%	12	70%	<a href="#">XP_003875579.1</a>					
<input type="checkbox"/>	<a href="#">serine/threonine protein phosphatase-like protein [Leishmania donovani] &gt;embICBZ35097.1</a>   <a href="#">serine/threonine protein phosphatase-like protein [Leishmania donovani] &gt;embICBZ35097.1</a>	22.3	39.5	78%	12	100%	<a href="#">XP_003861795.1</a>					
<input type="checkbox"/>	<a href="#">serine/threonine protein phosphatase-like protein [Leishmania infantum JPCM5] &gt;embICAM68927.1</a>   <a href="#">serine/threonine protein phosphatase-like protein [Leishmania infantum JPCM5] &gt;embICAM68927.1</a>	22.3	39.5	78%	12	100%	<a href="#">XP_001470549.1</a>					
<input type="checkbox"/>	<a href="#">cation-transporting ATPase, putative [Leishmania donovani] &gt;embICBZ31827.1</a>   <a href="#">cation-transporting ATPase, putative [Leishmania donovani] &gt;embICBZ31827.1</a>	22.3	33.5	71%	12	78%	<a href="#">XP_003858549.1</a>					
<input type="checkbox"/>	<a href="#">putative cation-transporting ATPase [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103] &gt;embICBZ23726.1</a>   <a href="#">putative cation-transporting ATPase [Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103] &gt;embICBZ23726.1</a>	22.3	33.5	71%	12	78%	<a href="#">XP_003872257.1</a>					
<input type="checkbox"/>	<a href="#">putative cation-transporting ATPase [Leishmania infantum JPCM5] &gt;embICAM65678.1</a>   <a href="#">putative cation-transporting ATPase [Leishmania infantum JPCM5] &gt;embICAM65678.1</a>	22.3	33.5	71%	12	78%	<a href="#">XP_001463321.1</a>					
<input type="checkbox"/>	<a href="#">putative cation-transporting ATPase [Leishmania major strain Friedlin] &gt;embICAJ07071.1</a>   <a href="#">putative cation-transporting ATPase [Leishmania major strain Friedlin] &gt;embICAJ07071.1</a>	22.3	45.2	85%	12	78%	<a href="#">XP_001681016.1</a>					
<input type="checkbox"/>	<a href="#">conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5] &gt;embICAM66543.2</a>   <a href="#">conserved hypothetical protein [Leishmania infantum JPCM5] &gt;embICAM66543.2</a>	22.3	49.8	64%	12	100%	<a href="#">XP_001464166.2</a>					

**Figura 11: Sequências que produzem alinhamentos significantes a partir do algoritmo BLAST.** As proteínas destacadas correspondem a proteínas tipo carreadoras mitocondriais de *L. major* e de *L. braziliensis* (quadro superior em destaque) e proteína hipotética de *Leishmania infantum* JPCM5, que possui região de 141 aminoácidos que alinham com lectina tipo concanavalina A, da família das glucanases (quadro inferior em destaque).

### 5.3 Obtenção e purificação de anticorpos IgG policlonais de camundongos imunizados com PLHLc

Anticorpos IgG totais antiPLHLc foram produzidos em camundongos e purificados a partir do soro em coluna de proteína G Sepharose, conforme descrito na metodologia. O material eluído foi dividido em 5 porções, das quais a porção 4 apresentou concentração de 680  $\mu\text{g/mL}$  e as 4 porções restantes reunidas apresentaram concentração de 240  $\mu\text{g/mL}$  (Tabela 1).

**Tabela 1:** Concentração das amostras de anticorpos IgG totais antiPLHLc. Conteúdo proteico determinado pela técnica de Bradford.

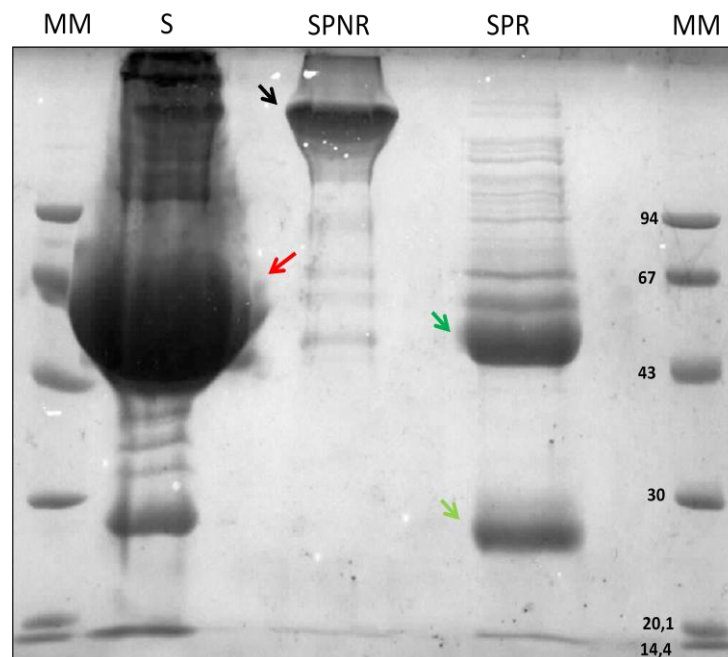
Amostra	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume (mL)
IgG amostra 4	680 $\mu\text{g/mL}$	1 mL
IgG amostra 2,3,5 e 6	240 $\mu\text{g/mL}$	4 mL

Soro de camundongos controle (não imunizados) também foi purificado pelo mesmo método. O conteúdo proteico mensurado e as concentrações das amostras estão representados na tabela 2.

**Tabela 2:** Concentração das amostras de anticorpos IgG totais de soro de camundongos controle não imunizados com PLHLc. Conteúdo proteico determinado pela técnica de BCA.

Amostra	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume (mL)
IgG amostra 3	1296 $\mu\text{g/mL}$	1 mL
IgG amostra 2, 4 e 5	246 $\mu\text{g/mL}$	3 mL

Para verificar o grau de pureza dos anticorpos IgG antiPLHLc, o produto coletado após a purificação em coluna G Sepharose foi submetido a SDS-PAGE em condições redutoras ou não redutoras, revelando, após a corrida eletroforética e coloração com azul de Coomassie, bandas correspondentes ao anticorpo IgG (amostra sem agente redutor: banda correspondente ao anticorpo íntegro; amostra com agente redutor: bandas correspondentes à cadeia leve (aproximadamente 25 kDa) e à cadeia pesada (aproximadamente 55 kDa). Verificou-se também grande redução no tamanho da banda correspondente à albumina (66 kDa) como consequência da diminuição da concentração de albumina, quando comparada ao controle demonstrado pelo soro não purificado (Figura 12). Estes anticorpos purificados foram utilizados para os testes de immunoblot, imunomarcção e ensaios de adesão e penetração dos parasitos em macrófagos.

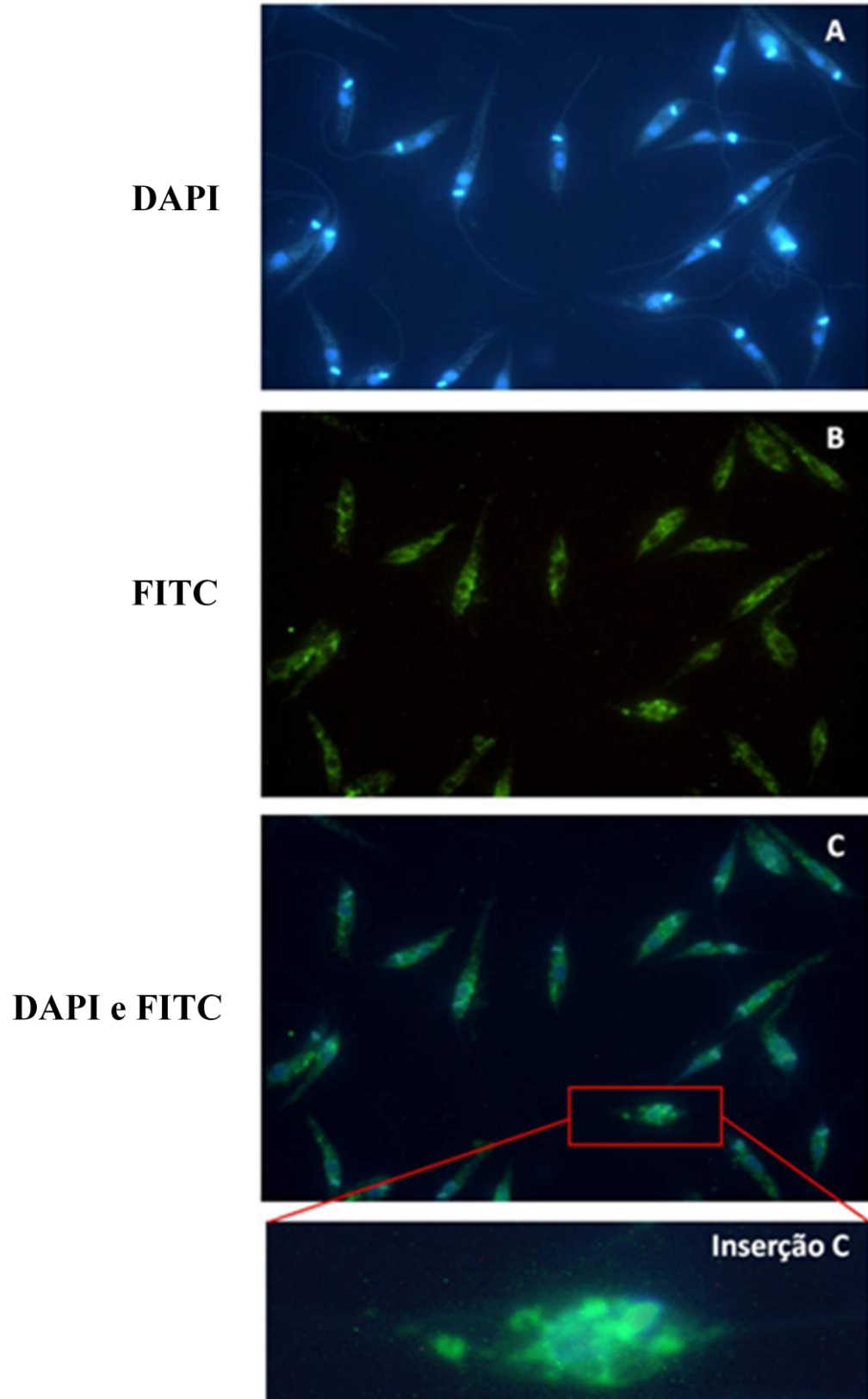


**Figura 12: SDS-PAGE para as amostras de IgG total purificado em coluna de proteína G Sepharose.** S: soro total, SPNR: Anticorpos IgG purificados com tampão de amostra sem redutor, SPR: Anticorpos IgG purificados com tampão de amostra com redutor e MM: marcador de peso molecular em KDa. Seta vermelha: banda de albumina; seta preta: anticorpo IgG antiPLHLc; setas verde escuro e claro: cadeias pesada e leve do anticorpo antiPLHLc, respectivamente.

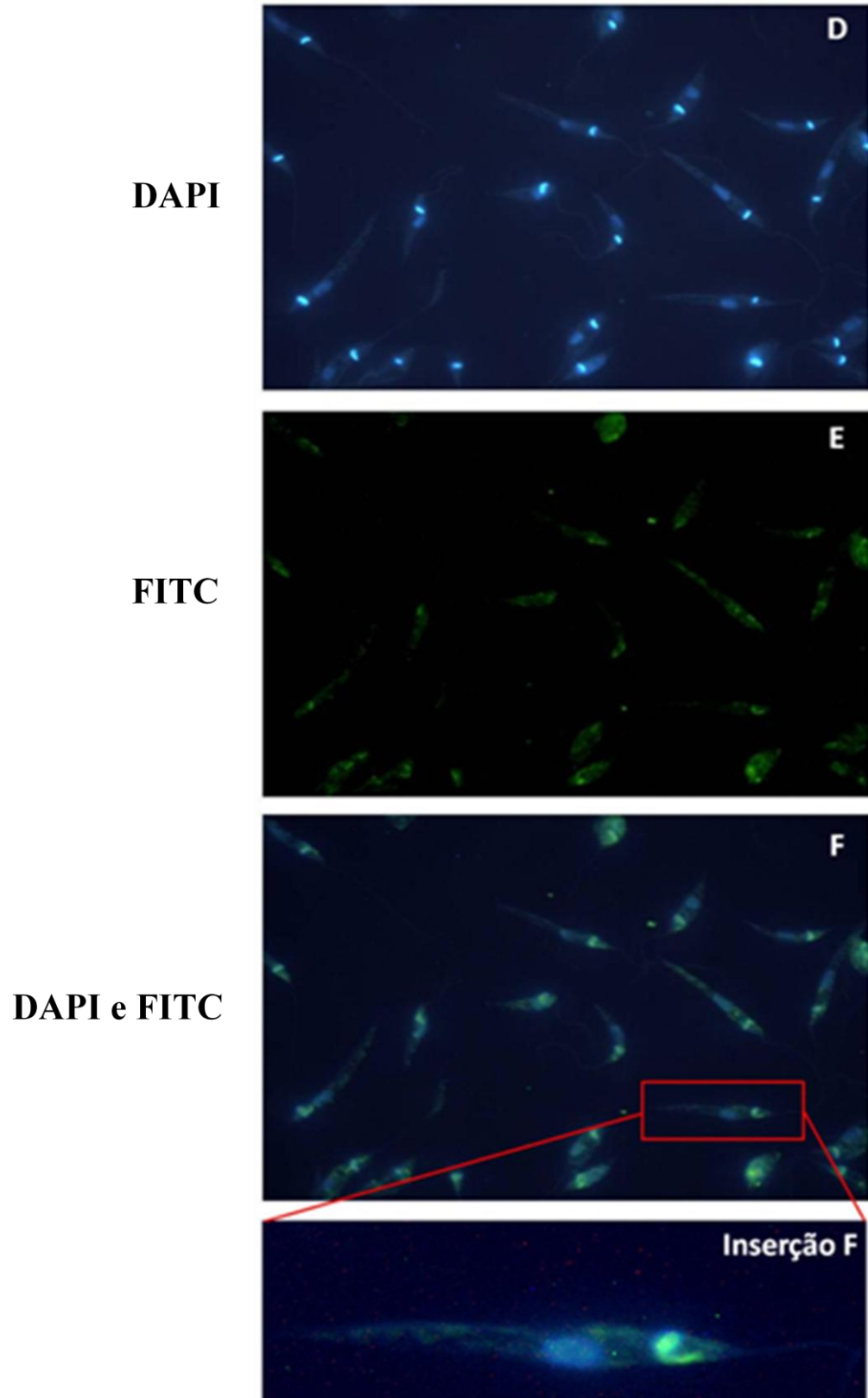
#### ***5.4 Imunomarcção da PLHLc e detecção por microscopia de fluorescência***

Para identificar e localizar a PLHLc no parasito, realizamos o ensaio de imunomarcção. Observou-se uma ampla distribuição desta proteína pela membrana plasmática do parasito, exceto em seu flagelo (Figura 14C - Inserção C). Quando os parasitos foram permeabilizados, detectamos a presença desta proteína no citoplasma do parasito, sendo mais evidente em regiões próximas ao cinetoplasto (Figura 14F - Inserção F).

Como controle realizou-se marcação com DAPI evidenciando o núcleo e o cinetoplasto.



**Figura 13: Imunomarcação de PLHLc. *L. chagasi* não tratada com Triton X 0,3%.** Marcação do DNA com DAPI (A); PLH dos parasitos marcados com FITC (B); Parasitos marcados com DAPI e FITC – imagens sobrepostas (C) – 1000X; Parasitos destacados e ampliados da figura C (inserção C).



**Figura 14: Imunomarcção de PLHLc. *L. chagasi* tratada com Triton X 0,3%. Marcação do DNA com DAPI (D); PLH dos parasitos marcados com FITC (E); Parasitos marcados com DAPI e FITC – imagens sobrepostas (F) – 1000X; Parasitos destacados e ampliados da figura F (Inserção F).**

### ***5.5 Ensaios de adesão e de penetração de L. chagasi em macrófagos***

Para avaliar a participação da PLHLc no processo de invasão do parasito em macrófagos, foi realizado o bloqueio deste receptor utilizando anticorpos antiPLHLc e, em um outro ensaio, heparina. Após o bloqueio do receptor presente no parasito, foi investigada a influência deste no processo de adesão e no processo de internalização do parasito, em dois ensaios realizados separadamente. Em cada ensaio contou-se em torno de 200 macrófagos e os parasitos presentes aderidos ou internalizados (de acordo com o ensaio).

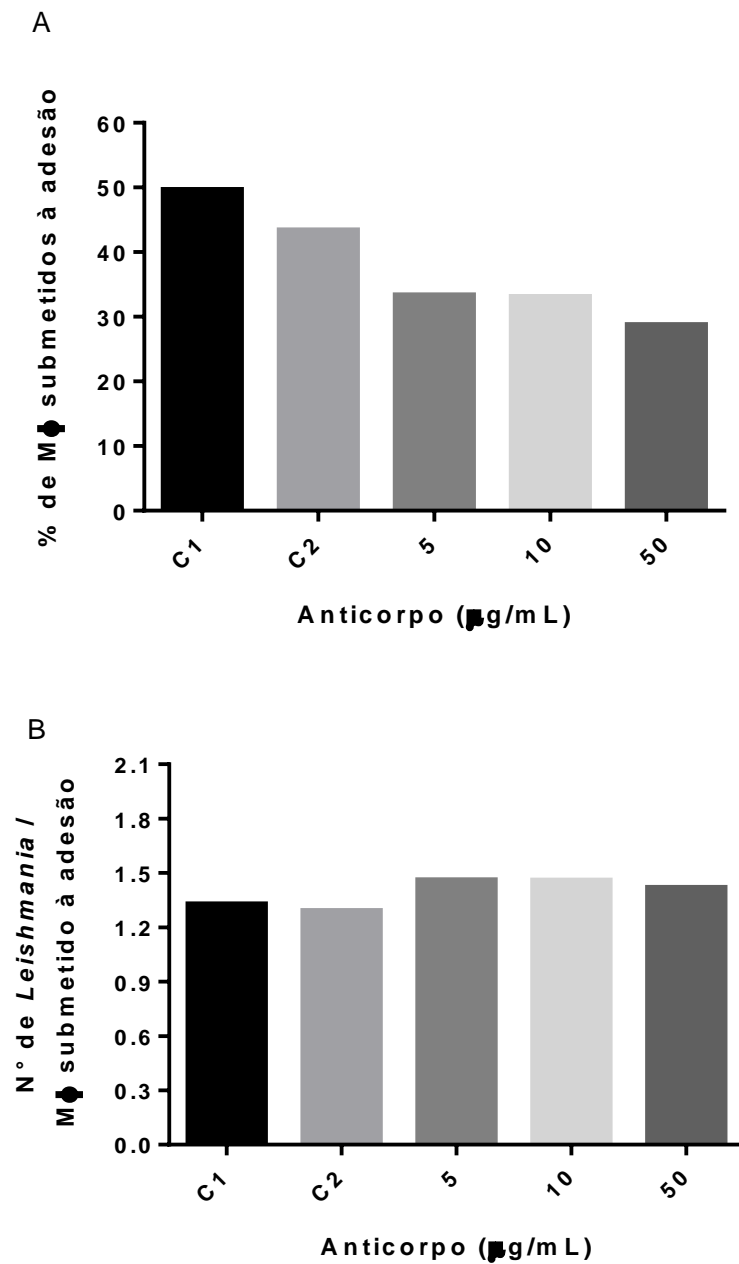
Primeiramente foi avaliada a capacidade do anticorpo antiPLHLc em bloquear a PLHLc e impedir a adesão do parasito ao macrófago. Verificou-se que o bloqueio da proteína influencia no processo de adesão: quando os parasitos foram pré-tratados com 5, 10 e 50 µg/mL de anticorpo antiPLHLc, a porcentagem de macrófagos submetidos à adesão parasitária foi reduzida em 32,8%, 33,3% e 57,94%, respectivamente, quando comparados ao controle, mostrando, também, que a capacidade de impedir a adesão é dose dependente do tratamento (Figura 15 A). Neste mesmo ensaio foi avaliado o número médio de parasitos aderidos a cada macrófago submetido à adesão parasitária. Verificaram-se valores entre 1,4 e 1,5 parasito por macrófago nos tratamentos com o anticorpo. Estes valores foram próximos ao valor encontrado para o controle, sem anticorpo, que foi de 1,3 parasito por macrófago (Figura 15 B).

Por outro lado, os anticorpos antiPLHLc não foram capazes de impedir a internalização dos parasitos nos macrófagos, pelo contrário: um aumento de 7% e 22,13% de macrófagos infectados foi verificado quando os parasitos foram pré-tratados com 5, 10 e 50 µg/mL de anticorpo antiPLHLc, respectivamente, em relação ao controle de internalização - *L. chagasi* não tratado com antiPLHLc. Apenas quando os parasitos foram pré-tratados com 10 µg/mL de anticorpo antiPLHLc se viu uma redução do número de macrófagos infectados em 15,27% (Figura 16 A). Além desse aumento do número de macrófagos infectados visto em dois tratamentos, como descrito acima, quando se avaliou o número médio de parasitos presentes no interior dos macrófagos infectados, verificou-se um pequeno aumento neste número nos três tratamentos: enquanto o controle de internalização - *L. chagasi* não tratado com antiPLHLc – apresentou uma média de 1,3 parasito por macrófago infectado, os valores encontrados para os tratamentos foram 1,6 e 1,8 e 1,8 parasito por macrófago infectado, relativos aos tratamentos dos parasitos com 5, 10 e 50 µg/mL de anticorpo antiPLHLc, respectivamente (Figura 16 B).

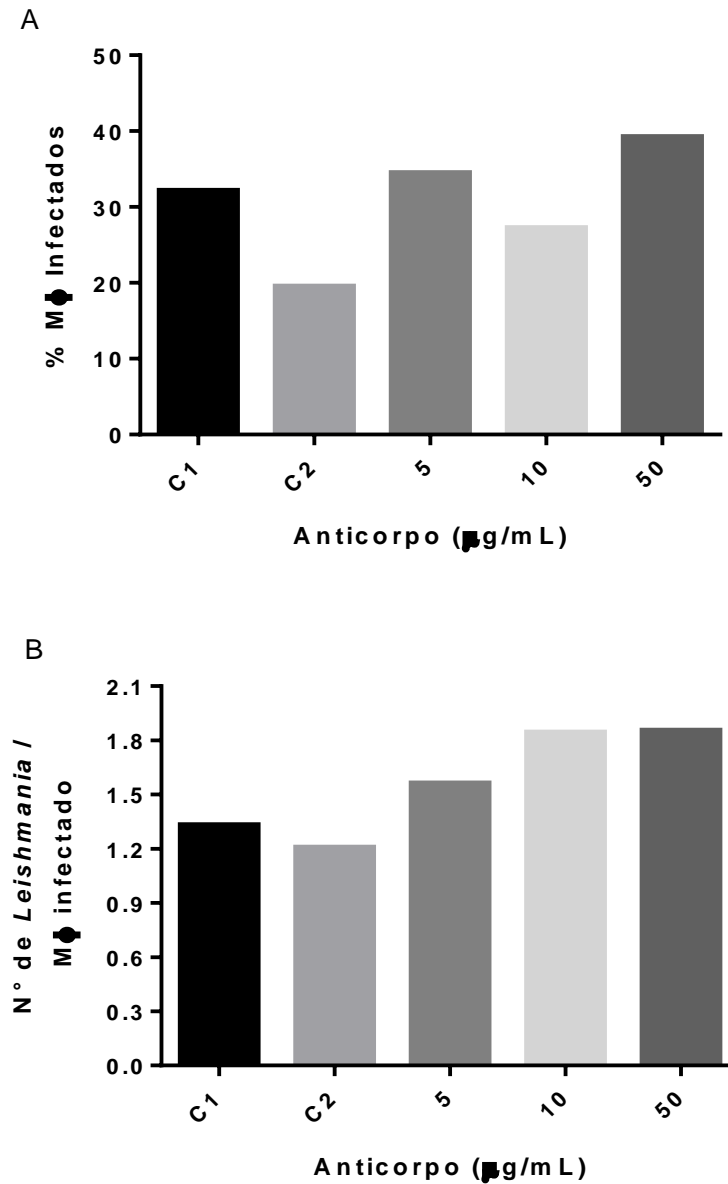
Paralelamente ao uso de anticorpos antiPLHLC para o bloqueio da lectina no parasito, foi utilizada a heparina sódica como bloqueadora do sítio de ligação da PLHLC. Quando os parasitos foram pré-tratados com 0,4, 2 e 4 UI/mL de heparina sódica, verificou-se uma redução na porcentagem de macrófagos submetidos à adesão parasitária, principalmente para os parasitos tratados com 0,4 e 4 UI/mL do açúcar (redução de 29,83% e 13,93%, respectivamente – Figura 17 A). O número médio de parasitos aderidos a cada macrófago submetido à adesão parasitária se manteve com valores próximos aos controles para todos os tratamentos realizados (Figura 17 B).

O tratamento com heparina foi capaz de impedir a internalização dos parasitos em macrófagos: uma redução de 17,12% de infecção foi verificada para o tratamento com 0,4 UI/mL de heparina. Um resultado ainda mais expressivo foi verificado para os tratamentos com 2 e 4 UI/mL de heparina, onde se verificou uma redução de infecção de 57,06% e 33,84%, respectivamente (Figura 18 A). O número médio de parasitos encontrados dentro de cada macrófago infectado se manteve, quando comparado ao controle (Figura 18 B).

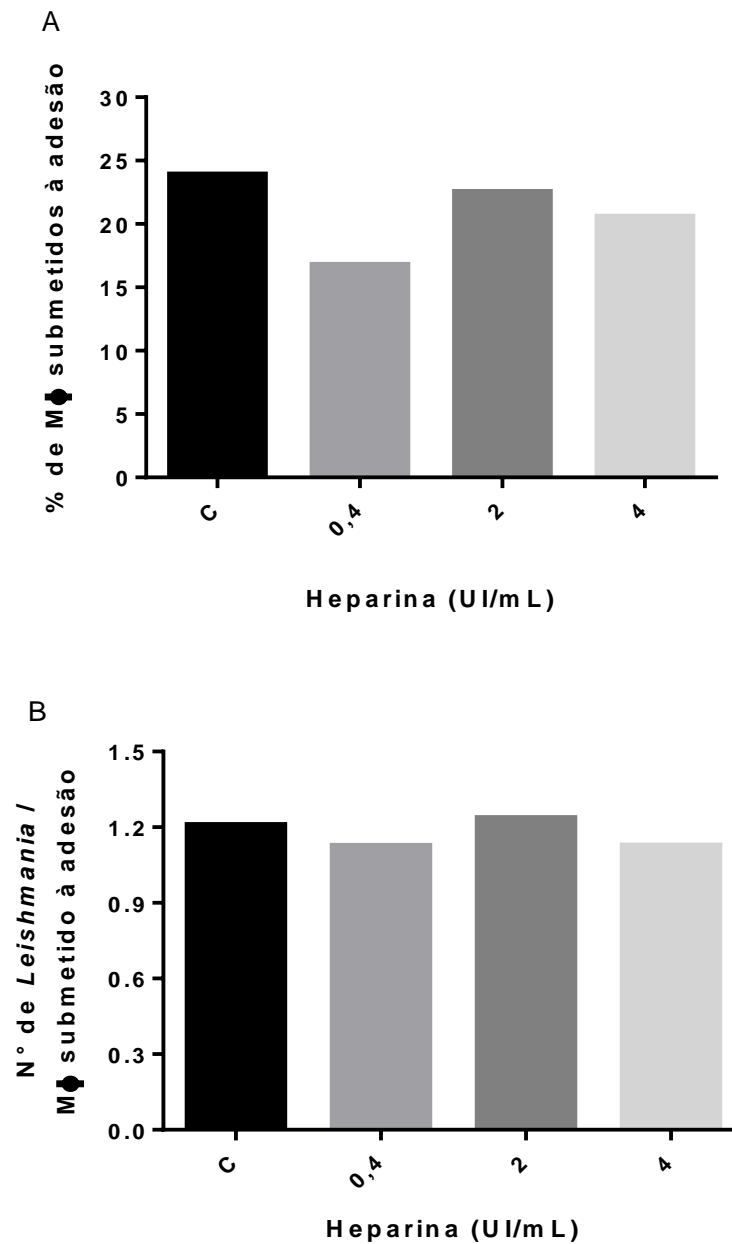
Devemos ressaltar que este experimento foi realizado apenas uma vez e que repetições do mesmo são necessárias para se obter um resultado com uma maior confiabilidade, suportado por dados estatísticos.



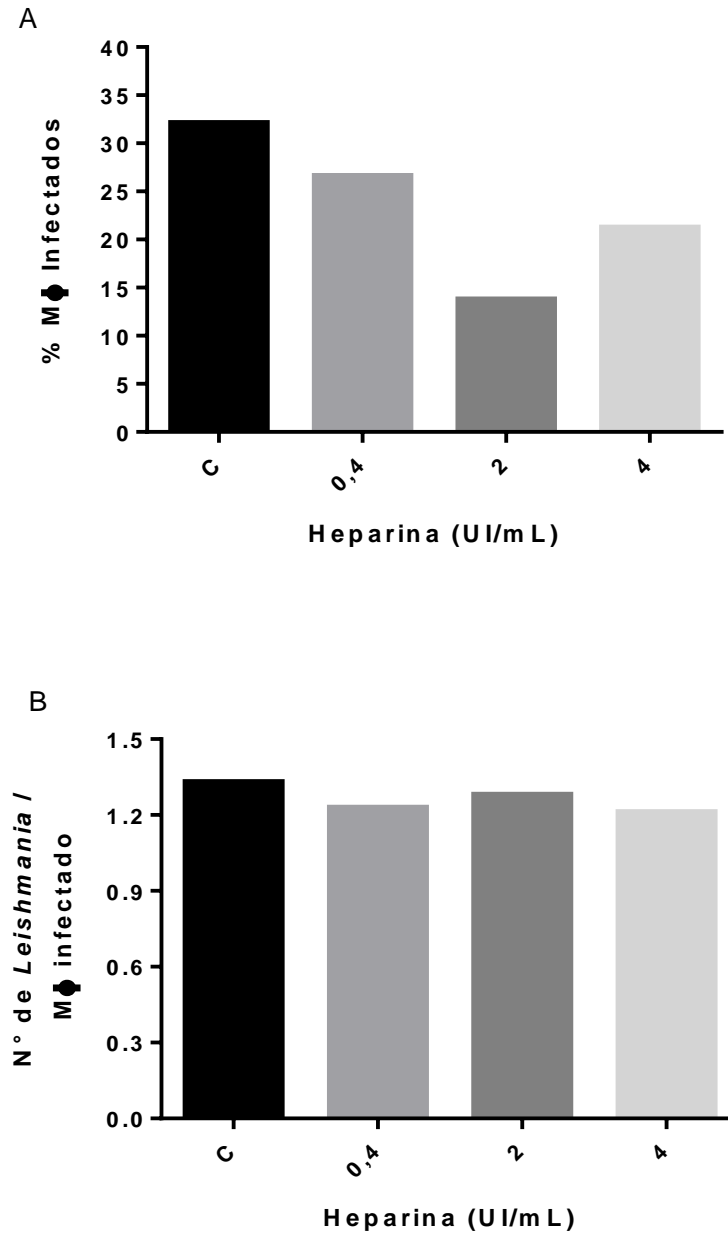
**Figura 15: Ensaio de adesão de *L. chagasi* pré-tratada com anticorpos antiPLHLc em macrófagos J774.** (A) Porcentagem de macrófagos submetidos à adesão (após 30 minutos de contato parasito/macrófago). (B) Média do número de parasitos aderidos por macrófagos submetidos à adesão. C1: controle de adesão - *L. chagasi* não tratada com antiPLHLc. C2: controle de adesão - *L. chagasi* pré-tratada com anticorpo de camundongo não imunizado com PLHLc. 5, 10 e 50: pré-tratamentos dos parasitos com 5, 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$  de antiPLHLc, respectivamente.



**Figura 16: Ensaio de penetração de *L. chagasi* pré-tratada com anticorpo antiPLHLc em macrófagos J774.** (A) Porcentagem de macrófagos infectados (após 3 horas de contato parasito/macrófago). (B) Média do número de parasitos internalizados por macrófago infectado. C1: controle de internalização - *L. chagasi* não tratada com antiPLHLc. C2: controle de internalização - *L. chagasi* pré-tratada com anticorpo de camundongo não imunizado com PLHLc. 5, 10 e 50: pré-tratamentos dos parasitos com 5, 10 e 50 µg/mL de antiPLHLc, respectivamente.



**Figura 17: Ensaio de adesão de *L. chagasi* pré-tratada com heparina sódica em macrófagos J774.** (A) Porcentagem de macrófagos submetidos à adesão (após 30 minutos de contato parasito/macrófago). (B) Média do número de parasitos aderidos por macrófagos submetidos à adesão. C: controle de adesão - *L. chagasi* não tratada com heparina sódica. 0,4, 2 e 4: pré-tratamentos dos parasitos 0,4, 2 e 4 UI/mL de heparina sódica, respectivamente.



**Figura 18: Ensaio de penetração de *L. chagasi* pré-tratada com heparina sódica em macrófagos J774.** ((A) Porcentagem de macrófagos infectados (após 3 horas de contato parasito/macrófago). (B) Média do número de parasitos internalizados por macrófago infectado. C: controle de internalização - *L. chagasi* não tratada com heparina sódica. 0,4, 2 e 4: pré-tratamentos dos parasitos com 0,4, 2 e 4 UI/mL de heparina sódica, respectivamente.

## 6. DISCUSSÃO

Interações celulares entre patógenos e células do hospedeiro são processos dinâmicos e complexos (BAMBINO-MEDEIROS *et al.*, 2011), onde o reconhecimento de moléculas entre a célula hospedeira e a superfície do patógeno é um passo importante no processo de invasão (BASU; RAY, 2005). Neste contexto, uma classe de PLH é um foco de investigação: tem-se demonstrado que GAG's reagem especificamente com lectinas presentes em parasitos, podendo particularmente influenciar o ciclo de vida do parasito *Leishmania*, em ambos hospedeiros vertebrados e invertebrados (AZEVEDO-PEREIRA *et al.*, 2007). Estruturas que se ligam a GAG's das células do hospedeiro já foram identificadas em muitos patógenos (AZEVEDO-PEREIRA *et al.*, 2007; LOVE *et al.*, 1993; NAGRE *et al.*, 2010), no entanto, a investigação da presença de PLH em promastigotas de *L. chagasi*, formas evolutivas importantes nos processos iniciais de infecção, ainda não havia sido descrita e caracterizada.

Neste trabalho, nós purificamos uma proteína ligante de heparina em formas promastigotas de *L. chagasi*, a denominada PLHLc, a qual caracterizamos quanto à sua massa molecular e sequência de aminoácidos, a detectamos no parasito e investigamos seu comportamento como molécula de adesão, uma vez que elas podem ser importantes para os processos de reconhecimento, de adesão e/ou internalização do parasito em macrófagos de hospedeiros mamíferos.

Para purificação desta proteína, escolhemos o método de cromatografia de afinidade, pois este representa um marco no isolamento de lectinas, sendo uma técnica muito sensível e específica de purificação de proteínas. Adicionalmente, esta técnica seleciona biomoléculas com base em sua função biológica ou de afinidade, com alto grau de recuperação (KENNEDY *et al.*, 1995).

Azevedo-Pereira *et al.* (2007) relataram uma PLH de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, com massas moleculares de 54,5 e 65 kDa, e sugerem que a proteína pode ser formada por uma organização estrutural complexa com mais de uma subunidade. Nós detectamos três bandas proteicas após a corrida em SDS-PAGE da PLHLc, apresentando massas moleculares de 105, 78 e 38 kDa, aproximadamente (Figura 7 – PPNR). No entanto, ensaio de “Western blotting” realizado com o anticorpo policlonal antiPLHLc (Figura 8) revelou o reconhecimento de apenas uma banda (105 kD), sugerindo que PLHLc é um complexo de proteínas ou que apresenta mais de uma proteína diferente em sua composição. Sendo assim, a proteína teria uma massa molecular de 221 kDa. Em ambos os casos, o anticorpo policlonal utilizado teria

reconhecido apenas uma das porções desta proteína em quantidade suficiente para ser revelada.

Dentre as classes de PLH conhecidas, comumente são encontrados proteínas com diferentes massas moleculares de acordo com as espécies a partir das quais elas são extraídas. Como exemplo, *Anadara granosa*, que exibe uma massa molecular nativa de 300 kDa, é composta por subunidades idênticas de 60 kDa (DAM *et al.*, 1994). De Castro-Côrtes *et al.* (2012) investigaram a presença de PLH em duas frações de *L. (V.) braziliensis*, PLH do flagelo e da membrana plasmática, que, quando analisadas por SDS-PAGE, revelaram duas bandas proteicas principais, de 55 e 65 kDa, em ambas frações. Além disso, o estudo relacionado ao isolamento desta classe de proteínas de formas epimastigotas de *T. cruzi* mostrou massas moleculares de 59 e 65,8 kDa (OLIVEIRA, JR. *et al.*, 2012). Essas diferenças estruturais entre PLH de ambos os tripanossomatídeos podem refletir no envolvimento dessas proteínas em distintos processos fisiológicos em seus ciclos de vida (AZEVEDO-PEREIRA *et al.*, 2007).

Em nosso trabalho, os anticorpos policlonais produzidos apresentaram boa capacidade de reconhecimento e especificidade para PLHLc, conforme verificado pelo experimento de transferência, no qual somente uma banda foi reconhecida tanto nos para a proteína purificada quanto para o extrato total (Figura 8). Isto nos permitiu, por intermédio de análise por microscopia de fluorescência, a imunolocalização da proteína em formas promastigotas do parasito, onde nós visualizamos uma distribuição homogênea da lectina em sua superfície (Figura 13 - Inserção C), mas não no flagelo (Figura 14), e próxima ao cinetoplasto do parasito (Figura 14 - Inserção F), sugerindo que esta proteína é codificada por esta estrutura.

A análise comparativa em banco de dados BLAST da sequência de aminoácidos obtida do fragmento proteico isolado no presente trabalho nos indicou um alinhamento com uma região das sequências de proteínas tipo transportadores mitocondriais de *L. major* e de *L. braziliensis*. Esses achados, juntamente com os dados obtidos em ensaio de imunomarcção, onde se vê a proteína localizada próxima ao cinetoplasto do parasito e, sendo este uma estrutura que contém material genético mitocondrial, nos leva a destacar a possibilidade da codificação desta proteína pelo cinetoplasto. Uma análise mais refinada do sequenciamento proteico, obtendo-se outras regiões da proteína, além da análise em outros bancos de dados, deve ser realizada para confirmar esta hipótese gerada por este estudo preliminar de sequenciamento apresentado neste trabalho. Uma vez confirmada esta hipótese, a intervenção sobre a codificação desta proteína e sobre o cinetoplasto pode vir a se tornar viável, por esta

estrutura estar presente apenas em organismos da ordem kinetoplastida, evitando, assim, efeitos sobre os hospedeiros mamíferos.

Para a espécie *L. chagasi*, não se obteve alinhamento com proteína relacionada ao cinetoplasto. Porém, identificamos um alinhamento com uma proteína hipotética conservada de *Leishmania infantum* que apresenta uma região com atividade lectínica. Isto corrobora com a nossa investigação, que afirma a PLHLc como uma proteína do grupo das lectinas.

Love *et al.* (1993) mostraram em seu trabalho que formas amastigotas de *L. amazonensis* conseguem se ligar a aproximadamente 120.000 moléculas de heparina com uma alta afinidade, porém o mesmo resultado não foi encontrado para *L. major*, que apresentou uma menor afinidade pela heparina. Isso nos mostra que receptores ligantes de heparina variam em quantidade até mesmo dentro de um mesmo gênero de parasito.

O fato de proteoglicano heparan sulfato, presente na superfície das células do hospedeiro, poder ativar cascatas de sinalização envolvidas no remodelamento do citoesqueleto (DREYFUSS *et al.*, 2009) nos leva a supor que proteoglicanos sulfatados medeiam a invasão de patógenos. Isto foi comprovado nos ensaios de adesão e infecção realizados. Pudemos observar que o bloqueio da PLH identificada em *L. chagasi* impediu de forma parcial tanto a adesão quanto a internalização dos parasitos, quando a lectina foi bloqueada utilizando-se heparina (Figuras 17 e 18). Resultado similar foi encontrado na avaliação da capacidade da heparina de impedir a invasão por *T. cruzi* em cardiomiócitos em cultura, observando uma redução de 82% na infecção dessas células quando os parasitos foram pré-tratados com heparina (BAMBINO-MEDEIROS *et al.*, 2011). Uma redução de 60% de adesão de formas amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos também foi vista quando houve o pré-tratamento dos parasitos com heparina, sugerindo que os macrófagos apresentam um mecanismo adicional de reconhecimento às amastigotas de *L. amazonensis* (LOVE *et al.*, 1993).

Interessantemente, quando Love *et al.* (1993) e Bambino-Medeiros *et al.* (2011) utilizaram outros glicosaminoglicanos como condroitin sulfato, dermatan sulfato e keratan sulfato para impedir a adesão ou internalização dos parasitos estudados por cada um deles, não obtiveram resultados de inibição, mostrando que o processo de reconhecimento e infecção é altamente relacionado à presença de heparina.

Quando o bloqueio da PLHLc foi realizado utilizando-se o anticorpo antiPLHLc, verificamos uma redução na capacidade de adesão dos parasitos de até 57,94% (Figura 15 A), mostrando que esta proteína é importante para o processo de

adesão do patógeno à célula do hospedeiro e que o anticorpo produzido conseguiu impedir de forma parcial este processo.

Ao avaliar a capacidade de impedir a internalização dos parasitos, os anticorpos antiPLH*Lc* não se mostraram eficazes em impedir esse processo. A porcentagem de células infectadas e o número de parasitos encontrados nesses macrófagos foram, inclusive, maiores que no controle (Figura 16).

Tem-se discutido que, para leishmanioses, uma resposta imune protetora está associada a uma eficiente resposta celular Th1 com produção de citocinas como interleucinas IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Por outro lado, a susceptibilidade à doença está relacionada com reduzida resposta Th1, associada ao desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th2, com produção de citocinas IL-4 e IL-10 (CEZARIO *et al.*, 2011). Quando há o desenvolvimento da resposta Th2, associada a uma resposta humoral, além das citocinas produzidas, se vê a produção de anticorpos. Os anticorpos formam imunocomplexos com os patógenos e estes são identificados por receptores de Fc presentes em macrófagos, que se ligam à porção Fc dos anticorpos. Esse mecanismo facilita a fagocitose dos imunocomplexos.

*Leishmania donovani* em fase estacionária de cultivo apresenta formas evolutivas que se mostram resistente à lise por soro humano (HOWARD *et al.*, 1987). Observando esta resistência aos anticorpos, o mecanismo de formação de imunocomplexos pode facilitar o processo de infecção dos macrófagos por *Leishmania*. *In vivo*, também há relatos que IgG's não apenas falham em prover proteção contra patógenos intracelulares, como também contribuem para a progressão da leishmaniose (MILES *et al.*, 2005).

Este processo imune de reconhecimento dos imunocomplexos pelos macrófagos pode explicar os resultados encontrados em nosso ensaio de infecção realizados *in vitro*, utilizando o anticorpo antiPLH*Lc*. Os anticorpos reconheceram a PLH do parasito e pode ter ocorrido a formação de imunocomplexos. Se verdadeiro esta suposição, os imunocomplexos podem ter sido reconhecidos pelos macrófagos e os parasitos terem sido internalizados pela ativação de um mecanismo diferente do desencadeado pela PLH*Lc*, a qual ocorre pelo reconhecimento de GAG's presentes na superfície dos macrófagos hospedeiros.

Verificando esta discordância entre os resultados encontrados para o uso do anticorpo antiPLH*Lc* impedindo a adesão, porém contribuindo para uma maior internalização/infecção dos macrófagos, estudos *in vivo* devem ser realizados para verificar a contribuição deste mecanismo em procedimentos terapêuticos ou de

imunização utilizando a PLHLc como imunógeno. Mesmo que os anticorpos gerados durante o processo de imunização impossibilitem a proteção ao hospedeiro, nada impede que o bloqueio do reconhecimento da PLHLc pelos receptores dos macrófagos seja testado utilizando porções do anticorpo sem a região Fc, com o objetivo de controlar a disseminação da infecção. Para isto, também é necessário que se estude a participação da PLHLc no processo infeccioso de formas amastigotas do parasito.

Portanto, repetições do nosso ensaio também são necessárias para termos dados conclusivos sobre o grau de proteção gerado pelo bloqueio da PLHLc. Nossos resultados nos levam a supor que seu bloqueio é importante para proteção contra a infecção. Propomos que a PLH de *L.chagasi* é reconhecida pelo heparan sulfato da membrana das células fagocitárias do hospedeiro e engatilha o processo de infecção, como é visto para a infecção de células do miocárdio por *T.cruzi* (BAMBINO-MEDEIROS *et al.*, 2011).

Diante do que foi descrito no presente estudo e de acordo com os resultados apresentados, acredita-se que a proteína com atividade lectínica PLHLc seja mediadora do processo de infecção dos macrófagos do hospedeiro pelo parasito. Investigações *in vivo*, juntamente com o entendimento das vias de sinalização desencadeada pela ligação da PLHLc ao heparan sulfato, podem complementar os nossos resultados e abrir perspectivas para novos processos de intervenção terapêutica contra a leishmaniose visceral.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ Por intermédio do processo de purificação por cromatografia de afinidade em coluna de heparina-agarose imobilizada foi obtida uma proteína com atividade lectínica de promastigotas de *L. chagasi* com massa molar aproximada de 221 kDa;
- ✓ Foi possível obter anticorpos IgG totais policlonais contra a PLHLC, produzidos em camundongos C57BL6 e purificados em coluna de afinidade G Sepharose;
- ✓ Os anticorpos antiPLHLC apresentaram boa afinidade e alta especificidade pela PLHLC;
- ✓ A PLHLC foi imunolocalizada no parasito, estando esta bem distribuída por sua membrana, ausente no flagelo e presente próxima ao cinetoplasto do parasito.
- ✓ A PLHLC se mostrou importante no processo de reconhecimento, adesão e para o processo de infecção do parasito aos macrófagos, abrindo perspectivas para novos processos de intervenção terapêutica contra a leishmaniose visceral.

## PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Uma vez encontrada a PLH em promastigotas de *L. chagasi* com afinidade de ligação pela heparina e pelo anticorpo antiPLH*Lc*, e também mostrando que esta proteína é importante para o processo de infecção de macrófagos *in vitro*, novas perspectivas surgem para estudos futuros. O sequenciamento total, a expressão heteróloga do fragmento proteico isolado, seguidos de teste de infecção *in vivo*, além da avaliação do perfil de resposta imunológica gerado pela proteína, são os ensaios que poderão complementar nossos resultados. Investigações sobre a estrutura proteica, identificando a conformação da PLH e estudos sobre os sítios de ligação às GAG's, além da produção do anticorpo antiPLH*Lc* para submetê-lo a tecnologia de *phage display*, obtendo-se assim, somente a porção Fab para teste de seu potencial de bloqueio sobre a PLH*Lc*, também são importantes passos a serem investigados. Estes ensaios podem abrir perspectivas para o desenvolvimento de novas formas de tratamento, controle e prevenção da leishmaniose visceral causada por *Leishmania chagasi*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, A. F.; SARAIVA, E. M. Lectin-binding properties of different *Leishmania* species. **Parasitol Res**, v.85, p.576-581, 1999.

AZEVEDO-PEREIRA, R. L.; PEREIRA, M. C.; OLIVERIA-JUNIOR, F. O.; BRAZIL, R. P.; CORTES, L. M.; MADEIRA, M. F.; SANTOS, A. L.; TOMA, L.; ALVES, C. R. Heparin binding proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **Vet Parasitol**, v.145, p.234-239, 2007.

BAMBINO-MEDEIROS, R.; OLIVEIRA, F. O.; CALVET, C. M.; VICENTE, D.; TOMA, L.; KRIEGER, M. A.; MEIRELLES, M. N.; PEREIRA, M. C. Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. **Parasitology**, v.138, p.593-601, 2011.

BARI, A. U.; RAHMAN, S. B. Many faces of cutaneous leishmaniasis. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v.74, p.23-27, 2008a.

BARI, A. U.; RAHMAN, S. B. Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and hosp-parasite-vector interrelationship. **J Pak Assoc Dermatol**, v.18, p.42-48, 2008b.

BARROS, R. M. Caracterização histopatológica da leishmaniose visceral canina no Distrito Federal. 2011. 102p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília. Brasília - DF. 2011.

BASU, M. K.; RAY, M. Macrophage and *Leishmania*: an unacceptable coexistence. **Crit Rev Microbiol**, v.31, p.145-154, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-254, 1976.

BRITTINGHAM, A.; MOSSER, D. M. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. **Parasitol Today**, v.12, p.444-447, 1996.

BUXBAUM, L. U.; DENISE, H.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J.; MOTTRAM, J. C.; SCOTT, P. Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. **J Immunol**, v.171, p.3711-3717, 2003.

CANO-MANCERA, R.; LOPEZ-REVILLA, R. Inhibition of the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes by carbohydrates. **Parasitol Res**, v.74, p.18-22, 1987.

CEZARIO, G. A.; DE OLIVEIRA, L. R.; PERESI, E.; NICOLETE, V. C.; POLETTINI, J.; DE LIMA, C. R.; GATTO, M.; CALVI, S. A. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.106, p.573-583, 2011.

CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug Des Devel Ther**, v.5, p.175-181, 2011.

COSTA, C. H.; PETERS, N. C.; MARUYAMA, S. R.; DE, B. E., JR.; SANTOS, I. K. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. **PLoS Negl Trop Dis**, v.5, p.e943, 2011.

DAM, T. K.; BANDYOPADHYAY, P.; SARKAR, M.; GHOSAL, J.; BHATTACHARYA, A.; CHOUDHURY, A. Purification and partial characterization of a heparin-binding lectin from the marine clam *Anadara granosa*. **Biochem Biophys Res Commun**, v.203, p.36-45, 1994.

DE ALMEIDA MARQUES-DA-SILVA; DE OLIVEIRA, J. C.; FIGUEIREDO, A. B.; DE SOUZA LIMA, J. D.; CARNEIRO, C. M.; RANGEL FIETTO, J. L.; CROCCO AFONSO, L. C. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. **Microbes Infect**, v.10, p.850-857, 2008.

DE CASTRO CORTES, L. M.; DE SOUZA PEREIRA, M. C.; DA SILVA, F. S.; PEREIRA, B. A.; DE OLIVEIRA JUNIOR, F. O.; DE ARAUJO SOARES, R. O.;

BRAZIL, R. P.; TOMA, L.; VICENTE, C. M.; NADER, H. B.; DE FATIMA, M. M.; BELLO, F. J.; ALVES, C. R. Participation of heparin binding proteins from the surface of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes in the adhesion of parasites to *Lutzomyia longipalpis* cells (Lulo) *in vitro*. **Parasit Vectors**, v.5, p.142, 2012a.

DE CASTRO CORTES, L. M.; DE SOUZA PEREIRA, M. C.; DE, O. F., JR.; CORTE-REAL, S.; DA SILVA, F. S.; PEREIRA, B. A.; DE FATIMA, M. M.; DE MORAES, M. T.; BRAZIL, R. P.; ALVES, C. R. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: insights on subcellular distribution and biochemical properties of heparin-binding proteins. **Parasitology**, v.139, p.200-207, 2012b.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. **Nat Rev Microbiol**, v.2, p.692, 2004.

DO MONTE-NETO, R. L.; COELHO, A. C.; RAYMOND, F.; LEGARE, D.; CORBEIL, J.; MELO, M. N.; FREZARD, F.; OUELLETTE, M. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. **PLoS Negl Trop Dis**, v.5, p.e1167, 2011.

DREYFUSS, J. L.; REGATIERI, C. V.; JARROUGE, T. R.; CAVALHEIRO, R. P.; SAMPAIO, L. O.; NADER, H. B. Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. **An Acad Bras Cienc**, v.81, p.409-429, 2009.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of animal lectins. **Annu Rev Cell Biol**, v.9, p.237-264, 1993.

FERREIRA, G. E.; DOS SANTOS, B. N.; DORVAL, M. E.; RAMOS, T. P.; PORROZZI, R.; PEIXOTO, A. A.; CUPOLILLO, E. The genetic structure of *Leishmania infantum* populations in Brazil and its possible association with the transmission cycle of visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v.7, p.e36242, 2012.

GEURTSSEN, J.; CHEDAMMI, S.; MESTERS, J.; COT, M.; DRIESSEN, N. N.; SAMBOU, T.; KAKUTANI, R.; UMMELS, R.; MAASKANT, J.; TAKATA, H.; BABA, O.; TERASHIMA, T.; BOVIN, N.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; NIGOU, J.; PUZO, G.; LEMASSU, A.; DAFFE, M.; APPELMELK, B. J. Identification of mycobacterial alpha-glucan as a novel ligand for DC-SIGN: involvement of

mycobacterial capsular polysaccharides in host immune modulation. **J Immunol**, v.183, p.5221-5231, 2009.

GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, v.20, p.59-66, 2001.

GHOSHAL, A.; MUKHOPADHYAY, S.; CHAVA, A. K.; GERWIG, G. J.; KAMERLING, J. P.; CHATTERJEE, M.; MANDAL, C. 9- O-acetylated sialic acids enhance entry of virulent *Leishmania donovani* promastigotes into macrophages. **Parasitology**, v.136, p.159-173, 2009.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; TALADRIZ, S.; MARQUET, A.; LARRAGA, V. Molecular cloning, cell localization and binding affinity to DNA replication proteins of the p36/LACK protective antigen from *Leishmania infantum*. **Eur J Biochem**, v.259, p.909-916, 1999.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol**, v.18, p.332-334, 2002.

HOWARD, M. K.; SAYERS, G.; MILES, M. A. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation *in vitro*, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. **Exp Parasitol**, v.64, p.147-156, 1987.

JANTSCHER-KRENN, E.; LAUWAET, T.; BLISS, L. A.; REED, S. L.; GILLIN, F. D.; BODE, L. Human milk oligosaccharides reduce *Entamoeba histolytica* attachment and cytotoxicity *in vitro*. **Br J Nutr**, v.108, p.1839-1846, 2012.

JULIÃO, F. S.; SOUZA, B. M. P. S.; FREITAS, D. S.; OLIVEIRA, L. S.; LARANJEIRA, D. F.; DIAS-LIMA, A. G.; SOUZA, V. M. M.; BARROUIN-MELO, S. M.; MOREIRA JR, E. D.; PAULE, B. J. A.; FRANKE, C. R. Investigação de áreas de risco como metodologia complementar ao controle da leishmaniose visceral canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, p.319-324, 2007.

KENNEDY, J. F.; PALVA, P. M. G.; CORELLA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.26, p.219-230, 1995.

KERSCHER, B.; WILLMENT, J. A.; BROWN, G. D. The Dectin-2 family of C-type lectin-like receptors: an update. **Int Immunol**, v.25, p.271-277, 2013.

KUHLS, K.; ALAM, M. Z.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R.; FELICIANGELI, M. D.; WIRTH, T.; MILES, M. A.; SCHONIAN, G. Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Negl Trop Dis**, v.5, p.e1155, 2011.

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.89, p.45-55, 2011.

LI, Y.; ZHANG, G.; NG, T. B.; WANG, H. A novel lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from dried fruiting bodies of the monkey head mushroom *Hericium erinaceum*. **J Biomed Biotechnol**, v.2010, p.716515, 2010.

LIMA, I. D.; QUEIROZ, J. W.; LACERDA, H. G.; QUEIROZ, P. V.; PONTES, N. N.; BARBOSA, J. D.; MARTINS, D. R.; WEIRATHER, J. L.; PEARSON, R. D.; WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. *Leishmania infantum chagasi* in northeastern Brazil: asymptomatic infection at the urban perimeter. **Am J Trop Med Hyg**, v.86, p.99-107, 2012.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**, v.2, p.83, 2012.

LO, S. K.; BOVIS, L.; MATURA, R.; ZHU, B.; HE, S.; LUM, H.; TURCO, S. J.; HO, J. L. *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. **J Immunol**, v.160, p.1857-1865, 1998.

LOVE, D. C.; ESKO, J. D.; MOSSER, D. M. A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. **J Cell Biol**, v.123, p.759-766, 1993.

MARQUES-DA-SILVA, E. A.; COELHO, E. A.; GOMES, D. C.; VILELA, M. C.; MASIOLI, C. Z.; TAVARES, C. A.; FERNANDES, A. P.; AFONSO, L. C.; REZENDE, S. A. Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN-gamma production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. **Parasitol Res**, v.98, p.67-74, 2005.

MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **PLoS Pathog**, v.9, p.e1003053, 2013.

MILES, S. A.; CONRAD, S. M.; ALVES, R. G.; JERONIMO, S. M.; MOSSER, D. M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **J Exp Med**, v.201, p.747-754, 2005.

MONTEIRO, E. M.; SILVA, J. C. F.; COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev Soc Bras Med Tropical**, v.38, p.147-152, 2005.

MUKHERJEE, B.; MUKHOPADHYAY, R.; BANNERJEE, B.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; NASKAR, K.; ALLAM, U. S.; CHAKRAVORTTY, D.; SUNDAR, S.; DUJARDIN, J. C.; ROY, S. Antimony-resistant but not antimony-sensitive *Leishmania donovani* up-regulates host IL-10 to overexpress multidrug-resistant protein 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.110, p.E575-E582, 2013.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cell Microbiol**, v.10, p.301-308, 2008.

NAGRE, N. N.; CHACHADI, V. B.; ELIGAR, S. M.; SHUBHADA, C.; PUJARI, R.; SHASTRY, P.; SWAMY, B. M.; INAMDAR, S. R. Purification and characterization of a mitogenic lectin from *cephalosporium*, a pathogenic fungus causing mycotic keratitis. **Biochem Res Int**, v.2010, p.854656, 2010.

OLIVEIRA, C. D.; ASSUNCAO, R. M.; REIS, I. A.; PROIETTI, F. A. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cad Saude Publica**, v.17, p.1231-1239, 2001.

OLIVEIRA, F. O., JR.; ALVES, C. R.; SOUZA-SILVA, F.; CALVET, C. M.; CORTES, L. M.; GONZALEZ, M. S.; TOMA, L.; BOUCAS, R. I.; NADER, H. B.; PEREIRA, M. C. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins mediate the adherence of epimastigotes to the midgut epithelial cells of *Rhodnius prolixus*. **Parasitology**, v.139, p.735-743, 2012.

OLIVEIRA-JR, F. O.; ALVES, C. R.; SILVA, F. S.; CORTES, L. M.; TOMA, L.; BOUCAS, R. I.; AGUILAR, T.; NADER, H. B.; PEREIRA, M. C. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins present a flagellar membrane localization and serine proteinase activity. **Parasitology**, v.140, p.171-180, 2013.

OYOLA, S. O.; EVANS, K. J.; SMITH, T. K.; SMITH, B. A.; HILLEY, J. D.; MOTTRAM, J. C.; KAYE, P. M.; SMITH, D. F. Functional analysis of *Leishmania* cyclopropane fatty acid synthetase. **PLoS One**, v.7, p.e51300, 2012.

PALETTA-SILVA, R.; MEYER-FERNANDES, J. R. Adenosine and immune imbalance in visceral leishmaniasis: the possible role of ectonucleotidases. **J Trop Med**, v.2012, p.650874, 2012.

PASSERO, L. F.; CARVALHO, A. K.; BORDON, M. L.; BONFIM-MELO, A.; CARVALHO, K.; KALLAS, E. G.; SANTOS, B. B.; TOYAMA, M. H.; PAES-LEME, A.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D. Proteins of *Leishmania (Viannia) shawi* confer protection associated with Th1 immune response and memory generation. **Parasit Vectors**, v.5, p.64, 2012a.

PASSERO, L. F.; MARQUES, C.; VALE-GATO, I.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D.; SANTOS-GOMES, G. Analysis of the protective potential of antigens released by *Leishmania (Viannia) shawi* promastigotes. **Arch Dermatol Res**, v.304, p.47-55, 2012b.

PIPIROU, Z.; POWLESLAND, A. S.; STEFFEN, I.; POHLMANN, S.; TAYLOR, M. E.; DRICKAMER, K. Mouse LSECtin as a model for a human *Ebola virus* receptor. **Glycobiology**, v.21, p.806-812, 2011.

RAMIREZ, L.; SANTOS, D. M.; SOUZA, A. P.; COELHO, E. A.; BARRAL, A.; ALONSO, C.; ESCUTIA, M. R.; BONAY, P.; DE OLIVEIRA, C. I.; SOTO, M. Evaluation of immune responses and analysis of the effect of vaccination of the *Leishmania major* recombinant ribosomal proteins L3 or L5 in two different murine models of cutaneous leishmaniasis. **Vaccine**, v.31, p.1312-1319, 2013.

ROMERO, G. A.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v.4, p.e584, 2010.

SAFFER, L. D.; PETRI, W. A., JR. Role of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. **Infect Immun**, v.59, p.4681-4683, 1991.

SANTOS, W. R.; AGUIAR, I. A.; PARAGUAI DE, S. E.; DE, L., V; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. **Vaccine**, v.21, p.4668-4676, 2003.

SERAFIM, T. D.; MALAFAIA, G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; REZENDE, S. A. Immune response to *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection is reduced in malnourished BALB/c mice. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.811-817, 2010.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v.14, p.53R-62R, 2004.

SMITH, D. F.; RANGARAJAN, D. Cell surface components of *Leishmania*: identification of a novel parasite lectin? **Glycobiology**, v.5, p.161-166, 1995.

SPATH, G. F.; GARRAWAY, L. A.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, p.9536-9541, 2003.

STAGER, S.; SMITH, D. F.; KAYE, P. M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. **J Immunol**, v.165, p.7064-7071, 2000.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **Int J Environ Res Public Health**, v.7, p.4267-4277, 2010.

SVOBODOVA, M.; BATES, P. A.; VOLF, P. Detection of lectin activity in *Leishmania* promastigotes and amastigotes. **Acta Trop**, v.68, p.23-35, 1997.

SWANSON, M. D.; WINTER, H. C.; GOLDSTEIN, I. J.; MARKOVITZ, D. M. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. **J Biol Chem**, v.285, p.8646-8655, 2010.

TRAVI, B. L.; TABARES, C. J.; CADENA, H.; FERRO, C.; OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **Am J Trop Med Hyg**, v.64, p.119-124, 2001.

VAN DER VELDEN, W. J.; PLANTINGA, T. S.; DONNELLY, J. P.; KULLBERG, B. J.; BLIJLEVENS, N. M.; NETEA, M. G. Host-microbe interactions in stem cell transplantation: recognizing *Candida* in infection and inflammation. **Virulence**, v.1, p.180-184, 2010.

VAN, D., V.; PLANTINGA, T. S.; DONNELLY, J. P.; KULLBERG, B. J.; BLIJLEVENS, N. M.; NETEA, M. G. Host-microbe interactions in stem cell transplantation: recognizing *Candida* in infection and inflammation. **Virulence**, v.1, p.180-184, 2010.

VAZQUEZ-MENDOZA, A.; CARRERO, J. C.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Parasitic infections: a role for C-type lectins receptors. **Biomed Res Int**, v.2013, p.456352, 2013.  
WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Stage-specific variations in lectin binding to *Leishmania donovani*. **Infect Immun**, v.46, p.128-134, 1984.