

THAÍS VIANA FIALHO MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA LPG3 DE *Leishmania infantum chagasi*
COMO PROTEÍNA LIGANTE DE HEPARINA E AVALIAÇÃO DE SUA
APLICAÇÃO NO IMUNODIAGNÓSTICO DA LVC**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M386c
2017

Martins, Thaís Viana Fialho, 1987-

Caracterização da proteína LPG3 de *Leishmania infantum*
chagasi como proteína ligante de heparina e avaliação de sua
aplicação no imunodiagnóstico da LVC / Thaís Viana Fialho
Martins. – Viçosa, MG, 2017.

x, 69f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Leishmaniose visceral. 2. Heparina. 3. Diagnóstico.
4. Testes imunológicos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Outros Órgãos. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular
e Estrutural. II. Título.

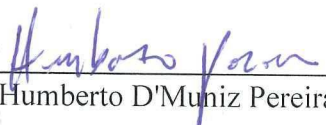
CDD 22 ed. 616.9364

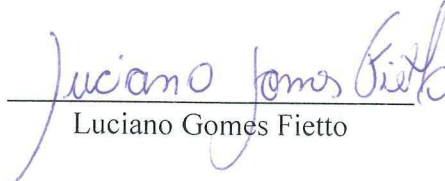
THAÍS VIANA FIALHO MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA LPG3 DE *Leishmania infantum chagasi*
COMO PROTEÍNA LIGANTE DE HEPARINA E AVALIAÇÃO DE SUA
APLICAÇÃO NO IMUNODIAGNÓSTICO DA LVC**

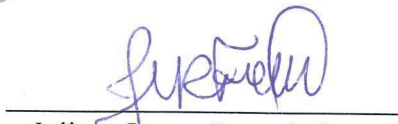
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

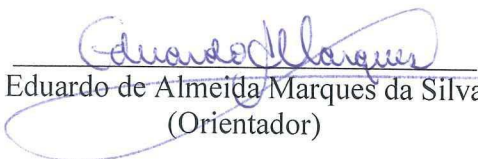
APROVADA: 30 de Junho de 2017.


Humberto D'Muniz Pereira


Luciano Gomes Fietto


Silvia Almeida Cardoso


Juliana Lopes Rangel Fietto


Eduardo de Almeida Marques da Silva
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de chegar tão longe nos estudos!

Sincero agradecimento aos meus pais Ademar e Itaci pelo incentivo, pela presença constante e ensinamentos que carregarei por toda vida!

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

Ao Eduardo, pela confiança depositada, por participar ativamente da minha formação científica, e também por compartilhar valores de vida que só ampliam a minha admiração como profissional. Terei a quem me espelhar quando estiver na função de orientadora!

Ao Leandro por toda contribuição na minha formação e todo auxílio no desenvolvimento dos trabalhos!

Aos professores Ricardo de Marco e Tiago Mendes por terem participado ativamente no desenvolvimento do trabalho e por terem transmitido tanto conhecimento!

A professora Juliana Fietto por ter cedido a biblioteca de soros para realização dos ensaios e por ter permitido a utilização do seu laboratório para realização dos experimentos!

Ao professor Sérgio de Paula por sempre disponibilizar os equipamentos de seu laboratório!

A Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Biologia Geral e ao Programa Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade e por ter dado condições para a realização deste trabalho!

A Universidade de São Paulo – USP São Carlos e ao Instituto de Física da USP São Carlos pela oportunidade de minha estadia para realização de parte dos experimentos!

Aos professores da pós-graduação por terem participado da minha formação!

A secretária do programa de pós-graduação, Beth, por sempre ser tão solícita e amiga!

Ao NUBIOMOL/UFV pela grande contribuição.

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

Ao CNPq/Casadinho pelo financiamento do projeto e pelo auxílio financeiro de minha estadia em São Carlos.

Aos componentes da banca por aceitarem o convite.

Ao meu namorado Eber, que chegou no momento em que eu mais precisava tornando mais tranquila a reta final do Doutorado!

Aos amigos Wendeo, Patrick, Daniel, Cris, Alessandra, Bianca, Sabrina, Adriana e Thaís do Laboratório LIG/LIP que me ajudaram resolvendo problemas da pesquisa e por terem proporcionado momentos felizes e engraçados, sendo prazeroso ir trabalhar todos os dias. Vou sentir falta disso!

As companheiras e amigas Jerusa e Grazi, pelo apoio de sempre! Está acabando companheiras!!

Aos amigos e funcionários do laboratório de São Carlos pelo auxílio e pela amizade!

Aos amigos de longa data pela companhia e pelo suporte nos momentos de nervosismo!

Obrigada!!!

BIOGRAFIA

Thaís Viana Fialho Martins nasceu na cidade de Viçosa no dia 18 de agosto de 1987, filha de Itaci Martins Viana Fialho e Ademar Fialho Martins.

Estudou por toda infância e adolescência na Escola Estadual Effie Rolfs, situada no campus da UFV. No ano de 2006, foi aprovada no curso de Farmácia na Faculdade UNIVIÇOSA com financiamento integral pelo programa PROUNI, onde se formou em janeiro de 2011, tendo trabalhado como estagiária no laboratório de Imunovirologia e Glicobiologia da UFV, onde realizou experimentos de seu TCC, relacionados a atividade antibacteriana de *Brassica oleracea*. No mesmo ano foi aprovada no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural sob orientação do Professor Doutor Eduardo de Almeida Marques da Silva, onde desenvolveu pesquisa de isolamento e caracterização de proteína ligante de heparina de *Leishmania infantum chagasi*.

No ano de 2013, obteve o título de mestre em Biologia Celular e Estrutural e foi aprovada no doutorado no mesmo programa de Pós-Graduação, trabalhando com a caracterização bioquímica e biofísica da proteína ligante de heparina de *Leishmania infantum chagasi*, sendo o trabalho desenvolvido na UFV e na USP-São Carlos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 <i>Epidemiologia da Leishmaniose Visceral (LV).....</i>	1
1.2 <i>Agentes etiológicos da LV</i>	3
1.3 <i>Ciclo de vida do parasito.....</i>	5
1.4 <i>Manifestações Clínicas na LV.....</i>	8
1.5 <i>Diagnóstico da doença.....</i>	8
1.6 <i>Tratamento da LV.....</i>	10
1.7 <i>Fatores de virulência da Leishmania.....</i>	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 <i>Objetivo geral.....</i>	21
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	21
3. RESULTADOS.....	22
CAPÍTULO I.....	23
Abstract.....	24
Author summary.....	24
Introduction.....	25
Methods.....	26
Protein sequencing.....	26
Bioinformatics and sequence analysis.....	27
Recombinant protein expression and purification.....	27
ITC analysis.....	28
Circular dichroism.....	28
Molecular exclusion chromatography.....	29
Cross-linking assay.....	29
Native Gel Electrophoresis.....	29
ATP Hydrolysis Assay.....	29
Molecular modeling.....	30
Results.....	31

HBPLc is Coded by LPG3 Gene.....	31
rLPG3 can bind heparin carbohydrate.....	31
LPG3 is a tetrameric complex.....	32
Modeling of LPG3 structure.....	34
rLPG3 displays hydrolytic activity over ATP.....	37
Evolutionary analysis.....	38
Discussion.....	41
Acknowledgments.....	44
Supporting information.....	45
References.....	46
CAPÍTULO II.....	53
Resumo.....	54
Introdução.....	54
Material e Métodos.....	56
Expressão e Purificação da proteína recombinante LPG3.....	56
Amostras de soro.....	57
Ensaio de ELISA.....	58
Análises Estatísticas.....	58
Resultados.....	58
Expressão e purificação do antígeno rLPG3 de <i>L. infantum chagasi</i>	59
Performance do antígeno rLPG3 no imunodiagnóstico da LVC.....	59
Discussão.....	62
Referências Bibliográficas.....	64
4. CONCLUSÕES GERAIS.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia das formas amastigota e promastigota de *Leishmania*.

Figura 2: Ciclo Biológico do parasito *Leishmania*.

Artigo 1

Figure 1: rLPG3 sugar-binding analysis.

Figure 2: rLPG3 oligomerization.

Figure 3: Secondary structure and 3D-model predictions to LPG3 protein.

Figure 4: The structural modeling of the LPG3 complex and ligand-binding sites.

Figure 5: Thermal stability analysis of the rLPG3 secondary structure in the presence of heparin.

Figure 6: ATPase activity of rLPG3.

Figure 7: Conservation of heparin and ATP-binding sites and evolutionary relationship among LPG3 from trypanosomatides.

S1 Figure: Mass spectrometric and bioinformatics analysis of HBPLc.

S2 Figure: The rLPG3 purification.

Artigo 2

Figura 1: Análise da pureza de rLPG3 por eletroforese capilar.

Figura 2: Curva ROC e *box plot* obtidos para o antígeno rLPG3.

Figura 3: Ensaio de ELISA utilizando o antígeno rLPG3.

LISTA DE ABREVIATURAS

- PLH** – Proteína Ligante de Heparina
- PLHLc** – Proteína Ligante de Heparina de *Leishmania infantum chagasi*
- rPLHLc** – Proteína recombinante Ligante de Heparina de *Leishmania infantum chagasi*
- HBP** – Heparin Binding Protein
- HBPLc** – *Leishmania infantum chagasi* Heparin Binding Protein
- LPG3** – Lipophosphoglycan 3 protein
- rLPG3** – Recombinant Lipophosphoglycan 3 protein
- LPG3** – Lipophosphoglycan 3 gene
- LPG** – Lipofosfoglicano
- NTD** – Doenças Tropicais Negligenciadas
- LV** – Leishmaniose Visceral
- LC** – Leishmaniose Cutânea
- LMC** – Leishmaniose Mucocutânea
- LCD** – Leishmaniose Cutânea Difusa
- SLA** – Antígeno Solúvel de *Leishmania*
- E-NTPDases** – Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases
- FPLC** – Fast Protein Liquid Chromatography
- ITC** – Isothermal Titration Calorimetry
- CD** – Circular Dichroism
- NCBI** – National Center for Biotechnology Information
- ELISA** – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- IFA** – Imunofluorescência Indireta
- Curva ROC** – Receiver-Operator Curve

RESUMO

MARTINS, Thaís Viana Fialho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2017.
Caracterização da proteína LPG3 de *Leishmania infantum chagasi* como Proteína Ligante de Heparina e avaliação de sua aplicação no imunodiagnóstico da LVC.
Orientador: Eduardo de Almeida Marques da Silva. Coorientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Leishmania infantum chagasi é um protozoário intracelular responsável por causar uma doença fatal em humanos, a leishmaniose visceral. Identificar 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. Dentre estas moléculas estão as Proteínas Ligantes de Heparina (PLH's), cuja característica principal é a capacidade de se ligar a carboidratos presentes em glicoproteínas ou glicolipídios. Há evidências de que PLH's presentes na superfície de *Leishmania* participam dos processos de adesão e penetração dos parasitos nos tecidos e células, tanto dos hospedeiros vertebrados quanto dos invertebrados. Portanto, compreender as interações entre a PLH de *L. chagasi* (PLHLc) e o açúcar ao qual ela se liga, a heparina, bem como demonstrar propriedades da proteína, é importante para desenvolver mecanismos que interrompam a progressão da infecção. Este trabalho foi dividido em dois manuscritos onde foi proposto para o primeiro identificar e realizar análises estruturais *in silico* e análises funcionais da PLHLc. A proteína foi sequenciada e identificada como sendo a proteína LPG3 de *L. infantum chagasi*, que foi então sintetizada, clonada e a composição da sua estrutura foi determinada. Cromatografia de gel filtração, eletroforese em gel não desnaturante e ensaio de *cross-linking* sugerem que a rPLHLc/LPG3 está organizada como um tetrâmero. Calorimetria de titulação isotérmica confirma a capacidade da proteína em se ligar a heparina com afinidade micromolar. A inibição da atividade ATPásica pela presença da heparina, juntamente com as análises *in silico*, sugerem que o sítio de ligação a heparina sobrepõe ao sítio de ligação ao ATP. No segundo trabalho a proteína recombinante produzida foi avaliada para o imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina apresentando sensibilidade de 79-87% e especificidade de 63-83%, indicando o potencial da rPLHLc/LPG3 recombinante no diagnóstico imunológico da LVC.

ABSTRACT

MARTINS, Thaís Viana Fialho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2017. **Characterization of *Leishmania infantum chagasi* LPG3 protein as Heparin Binding Protein and evaluation of its application in the LVC immunodiagnosis.** Advisor: Eduardo de Almeida Marques da Silva. Co-Advisor: Leandro Licursi de Oliveira.

Leishmania infantum chagasi is an intracellular protozoan parasite responsible for causing a fatal disease in humans, visceral leishmaniasis. Identification of molecules from the parasites involved in the host cell infection process is important for designing strategies to control this disease. Among these molecules is Heparin Binding Protein (HBP), whose main characteristic is the ability to bind to carbohydrates present in glycoproteins or glycolipids. Evidence suggests that HBP's present on *Leishmania* surface participate in the adhesion of parasites to tissues of both vertebrate and invertebrate hosts as well as in cell invasion. Therefore, understanding the interactions between *L. chagasi* HBP (HBPLc) and the sugar to which it binds, heparin, as well as demonstrating protein properties, is important to develop mechanisms that interrupt the infection progression. This work was divided into two manuscripts where it was proposed to first identify and perform *in silico* structural and functional PLHLc analyzes. The protein was sequenced and identified as the *L. infantum chagasi* LPG3 protein, which was then synthesized, cloned and the composition of its structure determined. Gel filtration chromatography, non-denaturing gel electrophoresis and cross-linking assay suggest that rPLHLc/LPG3 is organized as a tetramer. Isothermal titration calorimetry confirms the ability of the protein to bind heparin with micromolar affinity. Inhibition of ATPase activity by the presence of heparin, together with *in silico* analyzes, suggests that the heparin binding site overlaps the ATP binding site. In the second study, the recombinant protein was evaluated for the Canine Visceral Leishmaniasis immunodiagnosis presenting a sensitivity of 79-87% and specificity of 63-83%, indicating the potential of recombinant rPLHLc/LPG3 in the immunological LVC diagnosis.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral (LV)

Doenças tropicais infecciosas são responsáveis por causarem mais de 1 milhão de mortes por ano além de atingirem mais de 1 bilhão de pessoas, especialmente em países em desenvolvimento da África, Ásia, América Latina e Caribe. Essas mortes são apenas parte do impacto à saúde pública uma vez que são doenças debilitantes e causam incapacidade crônica de longo prazo às pessoas atingidas que vivem nas áreas de risco. Parte dessas doenças são classificadas como doenças tropicais negligenciadas (NTD), uma vez que são largamente ignoradas pela indústria farmacêutica e devido ao pouco investimento dos órgãos de fomento à saúde pública em pesquisas referentes ao controle das mesmas (Beaumier et al., 2013).

As leishmanioses, pertencentes ao grupo de NTD's, compreendem um espectro de doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. Essas doenças se distribuem em mais de 98 países e apresentam incidência global estimada em 900 mil a 1,6 milhão de casos por ano, afetando 12 milhões de pessoas, com 350 milhões vivendo em áreas de risco para infecção (Alvar et al., 2012). Embora seja a causa da nona maior carga de doença entre as doenças infecciosas individuais, a leishmaniose é amplamente ignorada nas discussões sobre as prioridades das doenças tropicais (Hotez et al., 2004)

Clinicamente, as leishmanioses se manifestam em formas diferentes de acordo com a espécie do parasito que acomete o hospedeiro, se distinguindo em leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC), cutânea difusa (LCD) e visceral (LV) (Kaye; Scott, 2011). Estimativas apontam que ocorram cerca de 700 mil a 1,2 milhão de casos de LC e 200 a 400 mil casos de LV por ano no mundo, com mais de 90% de LV ocorrendo em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. A LC é mais distribuída, com um terço

de casos ocorrendo em três regiões: nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e na Ásia Ocidental do Oriente Médio a Ásia Central. Os dez países com maior número de casos estimados são Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, que juntos somam de 70 a 75% dos casos globais de LC (Alvar et al., 2012).

Dentre as diferentes formas clínicas da leishmaniose, a LV é uma doença potencialmente fatal que representa um grave problema de saúde pública, com incidência principal nas Américas Central e do Sul e no Mediterrâneo. A doença é responsável por cerca de 20 a 40 mil mortes por ano no mundo, incluídos os casos causados por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* no Velho Mundo e *Leishmania chagasi* no Novo Mundo (Mccall; Zhang; Matlashewski, 2013). Em uma recente revisão sobre o histórico de classificação, evolução e dispersão do parasito *Leishmania* e seus vetores, *Leishmania chagasi* aparece como sinônimo de *Leishmania infatum* (Akhoundi et al., 2016).

A LV tem se espalhado para áreas não-endêmicas como Canadá, Estados Unidos, Itália e Alemanha (Petersen; Barr, 2010; Ready, 2010). A alta prevalência de portadores humanos assintomáticos de *L. infantum* no sul da Europa sugere que este parasita seja uma ameaça latente à saúde pública do continente, como demonstrado pelo aumento de coinfeção com vírus HIV desde a década de 80 (Ready, 2010).

Na América Latina o país mais afetado pela LV é o Brasil, com aproximadamente 97% dos casos humanos e com notificações de mais de 70.000 casos e mais de 3.800 mortes nas últimas três décadas (Werneck, 2010). De 2010 a 2014, cerca de 17 mil novos casos de LV foram relatados com mais de 1.100 mortes em um quarto dos municípios brasileiros. Mais de 70% dos casos ocorrem em 200 municípios, sendo que 50 deles possuem mais de 100.000 habitantes, incluindo Aracaju (Sergipe), Araguaína (Tocantins), Bauru (São Paulo), Belo Horizonte (Minas Gerais), Campo Grande (Mato Grosso do Sul), Fortaleza (Ceará), Montes Claros (Minas Gerais), São Luís (Maranhão) e Teresina (Piauí) (Werneck, 2016). A dispersão da LV é associada à intensa migração urbana que ocorreu do Nordeste do país, onde 82,5% dos casos ocorriam, para centros urbanos do Centro-Oeste e do Sudeste (Ferreira et al., 2012).

A LV nas Américas previamente foi associada a áreas rurais e regiões peri urbanas, mas agora tem se observado uma mudança do perfil, com presença comum de casos em regiões urbanas. Os cães são os principais reservatórios da LV e abrigos de animais

domésticos provavelmente atuam como criadouros para a manutenção da população de insetos vetores próximos às residências (Ferreira et al., 2012).

A Vigilância epidemiológica é um dos componentes do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) existente no Brasil, cujos objetivos são reduzir as taxas de letalidade e grau de morbidade por intermédio de diagnóstico dos casos e tratamento precoce dos indivíduos afetados, bem como diminuir os riscos de transmissão mediante controle da população de reservatórios e do inseto vetor. Porém o não cumprimento das normas do PCLV pelos municípios, seja por falta de recursos financeiros, pouco empenho dos gestores municipais ou até mesmo impedimento da população, tem gerado expansão dos casos autóctones humanos e das áreas endêmicas urbanas de LV no Brasil (Ministério da Saúde, 2014; Zuben; Donalísio, 2016).

1.2 Agentes etiológicos da LV

Os parasitos do gênero *Leishmania* pertencem ao reino Protista, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, que pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. 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 (Fig. 1) (Akhoundi et al., 2016; Ul Bari; Rahman, 2008).

As formas promastigotas ou flagelares medem de 10-15 μm de comprimento e possuem um único e longo flagelo anterior, que permitem motilidade e fixação no intestino do inseto flebotomíneo, vetor da doença. Essa forma do parasito é responsável pela infecção dos insetos vetores e dos hospedeiros vertebrados, sendo encontradas no intestino desses insetos e em meios de culturas formando aglomerados ou rosetas. As formas amastigotas são ovais ou redondas e medem cerca de 2-5 μm . Possuem um núcleo centralizado anterior ao cinetoplasto e, assim como a forma promastigota, uma mitocôndria única rica em DNA mitocondrial (kDNA). As formas amastigotas apresentam flagelo curto sem motilidade aparente, mas que possivelmente desempenha um importante papel na organização e, ou na percepção celular. Esta forma é a responsável pela propagação e manutenção da patologia no hospedeiro mamífero (Fig. 1) (Sacks; Kamhawi, 2001; Ul Bari; Rahman, 2008).

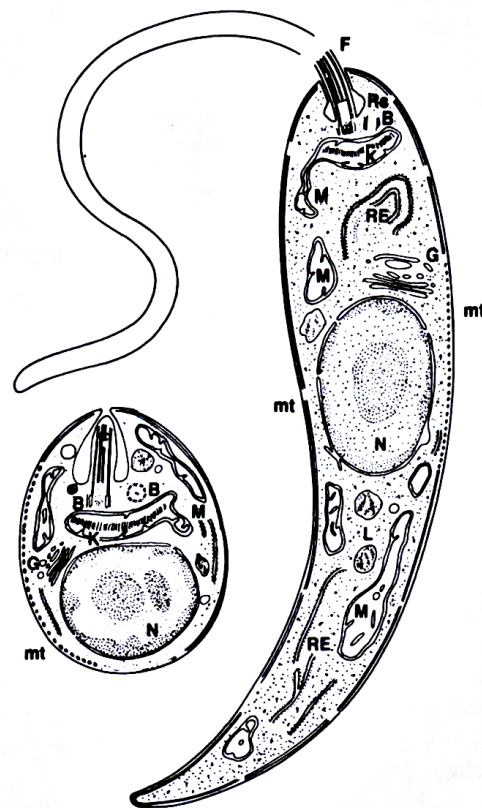


Figura 1: Morfologia das formas amastigota e promastigota de *Leishmania*. Esquerda: Amastigota; Direita: Promastigota; N: núcleo, K: cinetoplasto, M: mitocôndria, F: flagelo, RE: retículo endoplasmático, mt: membrana. Disponível em: Rey, L. Bases da Parasitologia. 2ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2002.

Já foram descritas até agora aproximadamente 53 espécies de *Leishmania*, onde 31 delas são conhecidas por parasitarem mamíferos e 20 espécie são patogênicas para o homem (Akhoundi et al., 2016). Análises filogenéticas entre espécies de *Leishmania* baseadas em abordagens taxonômicas numéricas, como a comparação de sequências de DNA e eletroforese de isoenzimas multilocus, indicam uma divergência entre os complexos de *Leishmania* – *L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani* e subgênero *L. (Viannia)*. Esses parasitos causam quatro formas clínicas distintas, de acordo com o tecido ou órgão afetado, podendo ser LV, LC, LMC e a LCD. *L. donovani* e *L. infantum* são responsáveis por causar a LV e *L. major* a LC, enquanto *L. braziliensis* é o principal agente causador da LMC (revisado por Lipoldová; Demant, 2006).

O parasito é transmitido no Novo Mundo pela picada do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, inseto que apresenta de 2-3 mm de comprimento, corpo revestido de pelos e coloração castanho claro ou cor de palha, conhecido no Brasil como mosquito-palha ou birigui (Lainson; Rangel, 2005). No entanto, a relevância dos vetores secundários é discutida: na Colômbia, o flebotomíneo *Lu. evansi* foi relatado como vetor alternativo de *L. infantum*, já *Lu. migonei* foi indicado como um possível vetor em Pernambuco (PE), Brasil, com base na observação de sua infecção natural com *L. infantum* e pela ausência de *Lu. longipalpis* na área. Em alguns estados brasileiros da Região Centro-Oeste, como Mato Grosso (MT) e Mato Grosso do Sul (MS), há relatos de *Lu. cruzi*, flebotomíneo pertencente ao complexo de *Lu. longipalpis*, infectados por *L. infantum* (revisado por Ferreira et al., 2012).

1.3 Ciclo de vida do parasito

Em seu ciclo de vida, *Leishmania* está presente ora no trato digestivo do vetor flebotomíneo, ora nos fagolisossomos dos macrófagos de hospedeiros vertebrados. Importantes alterações morfológicas e bioquímicas ocorrem durante as diferenciações envolvidas no ciclo de vida do parasito. Essas alterações são resultado de mudanças na regulação da expressão gênica em resposta aos sinais ambientais encontrados pelo parasito, como alterações de pH e temperatura distintos entre os ambientes em que o parasito permanece no hospedeiro invertebrado e vertebrado (Saxena et al., 2007). Também foi mostrado em *L. infantum* que a maior parte do genoma do parasito é expresso constitutivamente e que uma minoria são de genes regulados. Parece que a regulação ocorre principalmente durante o desenvolvimento de promastigotas e que há regulação negativa durante a transição de promastigotas para amastigotas, apoiando a hipótese de pré-adaptação do parasito à sobrevivência intracelular nos macrófagos (Alcolea et al., 2010).

Ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, as fêmeas de flebotomíneos ingerem, juntamente com o sangue, formas amastigotas do parasito, livres ou fagocitadas por células que desempenham esta função. No trato intestinal do vetor, as formas amastigotas se transformam em formas promastigotas procíclicas, que apresentam um pequeno flagelo na extremidade anterior e pouca motilidade, dando início ao ciclo proliferativo do parasito. Após 48 a 72 horas, inicia-se o processo de metaciclogênese, onde a taxa de replicação diminui e o parasito sofre uma série de transformações morfológicas e bioquímicas, se transformando nas formas promastigotas metacíclicas infectantes. Neste

estágio, o parasito obstrui a válvula estomodeal do inseto, induzindo seu regurgitamento no momento em que o vetor realiza o repasto sanguíneo. No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são introduzidas na epiderme do hospedeiro juntamente com a saliva e são fagocitadas por células do Sistema Fagocitário Mononuclear. No interior dos macrófagos, os parasitos, induzidos pela temperatura elevada dos mamíferos e pelo baixo pH do vacúolo parasitóforo, se transformam em formas amastigotas e se multiplicam. Os macrófagos, apesar de serem células fagocitárias especializadas em combater agentes infecciosos, não conseguem impedir a replicação do parasito em seu interior e sofrem lise, liberando formas amastigotas na circulação sanguínea. Uma vez livres, as formas amastigotas podem infectar novas células fagocitárias, propagando a infecção para outros tecidos ricos em células do Sistema Fagocitário Mononuclear como baço, fígado, medula óssea e órgãos linfoides ou serem ingeridas, durante repasto sanguíneo, por um flebotomíneo não infectado (Fig. 2) (Freitas et al., 2012; Lipoldová; Demant, 2006; Nieto et al., 2011).

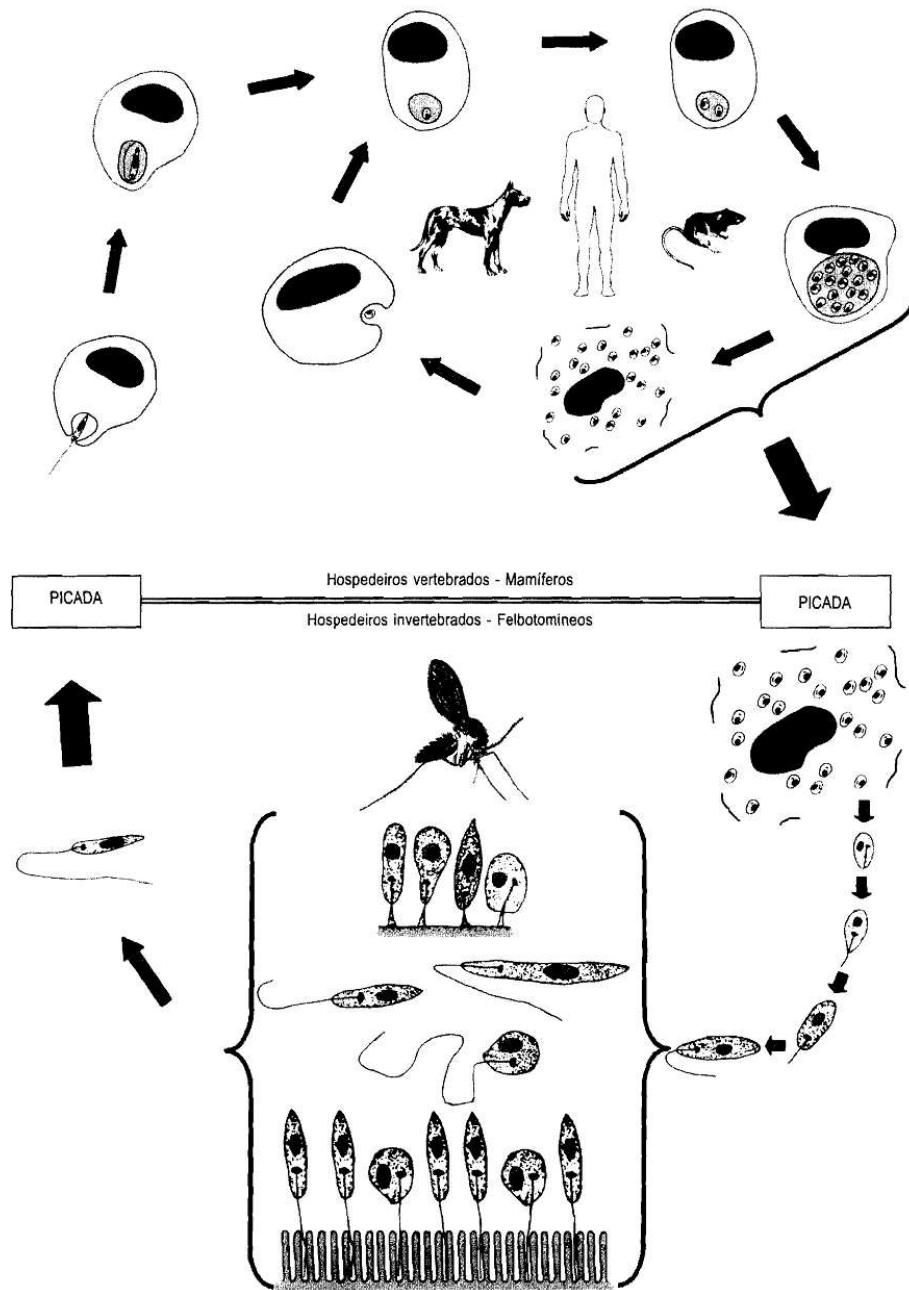


Figura 2: Ciclo Biológico do parasito *Leishmania*. Neider F. Gontijo. Disponível em Neves, D. P. Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

1.4 Manifestações Clínicas na LV

A patologia causada pelo parasito *Leishmania* irá depender da espécie, do genótipo e estado nutricional e imunológico do hospedeiro, do vetor transmissor e de variações ambientais e fatores sociais. É visto que diferentes espécies de *Leishmania* podem induzir diferentes sintomas, mas pacientes infectados pela mesma espécie podem apresentar sintomas distintos e diferentes respostas à terapia, não sendo claras as razões para tais variações (Lipoldová; Demant, 2006; McMahon-Pratt; Alexander, 2004; Zijlstra et al., 2003).

Na LV os parasitos migram do local da infecção e alojam-se em órgãos como fígado, baço, medula óssea e linfonodos distantes. Esse perfil de disseminação pode estar relacionado a propriedades parasitárias como sensibilidade à temperatura, tropismo tecidual, capacidade de evasão imunológica e persistência (Murray et al., 2005).

O período de incubação da doença ocorre entre 2 a 6 meses após a infecção. Os pacientes frequentemente apresentam febre por mais de 3 semanas, perda de peso e dor abdominal causado pelo quadro de hepatoesplenomegalia. Outras características clínicas incluem hemorragias nasais que podem ser severas. Um número pequeno de pacientes podem desenvolver leishmanioma, nódulo cutâneo no local onde ocorre a picada do flebotomíneo, e uma parte dos pacientes podem desenvolver linfadenopatia. Os pacientes também podem apresentar tosse ou diarreia, dependendo da localização da infecção. Manifestações autoimunes como artrite, vasculite cutânea e púrpura podem ocorrer, mas são menos presentes (revisado por Zijlstra, 2016). Acometimentos neurológicos são comuns e incluem neuropatia periférica, paralisia do nervo craniano e perda de audição (Maia et al., 2015).

A LV ativa também pode reaparecer após tratamento aparentemente bem-sucedido. A reativação pode ser espontânea, mas é frequentemente provocada por intercorrência do número de células T CD4⁺, pela função corticosteroide ou ainda pela terapia citotóxica, características observadas no tratamento antirejeição em pacientes transplantados ou no avanço da doença em portadores de HIV (Murray et al., 2005).

1.5 Diagnóstico da doença

O diagnóstico laboratorial das leishmanioses pode ser realizado por diferentes técnicas, dentre elas pela investigação do parasito corado em tecidos de relevância, por exame em microscópio de luz, cultura *in vitro* ou inoculação em animal, detecção de DNA do parasito em amostras de tecido ou imunodiagnóstico por detecção de antígenos do parasito

em amostras de tecidos, sangue ou urina pela detecção de anticorpos anti*Leishmania* não-específicos ou específicos ou ainda por ensaio *Leishmania*-específico mediado por imunidade celular (Sundar; Rai, 2002).

O padrão ouro para o diagnóstico da LV é realizado por visualização direta dos parasitos em aspirados de linfonodos, medula óssea ou baço que apresentam sensibilidade de 60%, 55 a 97% e maior que 95%, respectivamente. Biópsias hepáticas também são utilizadas e apresentam sensibilidade em torno de 40% (Zijlstra, 2016).

Testes sorológicos de aglutinação direta e imunofluorescência são eficientes quando há altos títulos de imunoglobulina G. Essas técnicas produzem resultados com alta sensibilidade, mas com especificidade menor. Resultados falso-positivos frequentemente são encontrados em soro de pacientes infectados por *Trypanosoma cruzi* (Vexenat; Santana; Teixeira, 1996).

O ensaio de ELISA tem sido utilizado como potencial ferramenta de sorodiagnóstico. A técnica é altamente sensível, mas a sua especificidade depende do antígeno utilizado. Muitos antígenos têm sido investigados e têm apresentado potencial para uso, dentre eles o antígeno solúvel do extrato bruto do parasito (SLA). A sensibilidade do ELISA utilizando SLA varia de 80 a 100%, mas foram registradas reações cruzadas com soros de pacientes com tripanossomíase, tuberculose e toxoplasmose (Sundar; Rai, 2002). O antígeno rK39 é utilizado em teste rápido para detecção da doença, é de fácil uso e apresenta bons resultados para a primeira linha de diagnóstico no subcontinente indiano, com valor de sensibilidade em torno de 90%, porém com especificidade variável em cada região. A reprodutibilidade da sensibilidade do teste em outros continentes não ocorre, por exemplo na África, onde provavelmente a produção de IgG anti*Leishmania* pelos pacientes é menor. Assim, o método parasitológico ainda continua sendo o método sugerido para este continente (revisado por Murray et al., 2005; Zijlstra, 2016).

A investigação do parasito por PCR detectando DNA leishmanial apresenta altas sensibilidade e especificidade e é realizado em laboratórios bem equipados, porém não é acessível para todos os portadores da doença. Assim, melhorar os testes sorológicos para o diagnóstico de leishmaniose é importante pois são rápidos, fáceis de executar e podem ser facilmente implementados nas condições comumente encontradas nos países em desenvolvimento (Maurya et al., 2005; Menezes-Souza et al., 2015).

1.6 Tratamento da LV

Na maior parte do mundo os antimoniais pentavalentes, incluindo estibogluconato de sódio (Pentostam[®], C₁₂H₃₈O₂₆Sb) e antimoniato de meglumina (Glucantime[®], C₁₄H₂₉O₁₀N₂Sb) são considerados os fármacos de primeira linha e padrão-ouro no tratamento da LV. Seu mecanismo de ação ainda não é bem compreendido, mas sugere-se a ação de forma multifatorial sobre os processos moleculares do parasito, de modo a influenciar na atividade microbida dos macrófagos (No, 2016). Entretanto, essas drogas são muito tóxicas e necessitam de longos períodos de tratamento, com administração geralmente por intermédio de injeções intramusculares. Além do desconforto para a administração, essas drogas ainda apresentam efeitos adversos como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, pancreatite, insuficiência renal reversível, anemia, leucopenia, trombocitopenia, dor abdominal, náusea, vômitos e distúrbios do sangue. Atualmente, vários estudos têm demonstrado que a eficácia destes fármacos tem se reduzido significativamente, optando-se, nestes casos de resistência, pela administração de outras drogas (Akbari; Oryan, 2017; Sundar; Chakravarty, 2010).

A anfotericina B (C₄₇H₇₃NO₁₇), um antibiótico natural isolado pela primeira vez em 1955 a partir de *Streptomyces nocclus* da Venezuela, apresenta atividades antifúngica e antiparasitária e é utilizada geralmente como segunda linha de tratamento para as leishmanioses, apresentando boa resposta clínica. No entanto, os efeitos adversos são fatores limitantes na administração desta droga. Os pacientes podem relatar febre, náuseas, vômitos e ainda apresentar anemia, hipocalemia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade, hipersensibilidade e anafilaxia. Ainda, o tratamento pode requerer internações prolongadas para administração intravenosa da droga, uma vez que a mesma apresenta baixa absorção intestinal (Akbari; Oryan, 2017; No, 2016). Recentemente, vários tipos de formulações, incluindo algumas que diminuem a concentração livre de anfotericina B na corrente sanguínea, foram investigadas para reduzir a toxicidade. Atualmente, a fórmula lipossômica de Anfotericina B (AmBisome[®]) é administrada por via intravenosa para tratar a LV e tem uma taxa de cura de 95% com apenas uma administração. O impasse para o uso é o alto custo do tratamento (No, 2016; Sinha; Bhattacharya, 2014).

A miltefosina se tornou, em 2002, o primeiro tratamento oral para LV. A desvantagem do uso desta droga é a teratogenicidade encontrada em ensaios de toxicidade em modelos animais, sendo assim contraindicado para gestantes (Sundar et al., 2012).

A pentamidina é altamente eficaz contra a fase aguda da tripanossomíase humana africana também conhecida como doença do sono, causada por *Trypanosoma brucei*. Ela é atualmente utilizada como tratamento de segunda linha para LV e para pacientes que apresentam recidivas após tratamento com antimonial pentavalente. Porém, a sua taxa crescente de falha no tratamento e alta toxicidade resultaram numa diminuição gradual da sua utilização para o tratamento da LV (revisado por No, 2016).

1.7 Fatores de virulência de Leishmania

Muitas moléculas do parasito *Leishmania* que participam dos mecanismos de virulência têm sido estudadas por diversos grupos de pesquisa, na proposta de elucidar os mecanismos de sobrevivência do parasito, assim como investigar um possível papel das mesmas e suas aplicações no desenvolvimento de vacinas, drogas anti*Leishmania* e no diagnóstico da leishmaniose. Dentre essas moléculas, pode-se citar a proteína homóloga de *Leishmania* de receptores de proteína quinase C ativada (LACK) (Gonzalez-Aseguinolaza et al., 1999; Marques-Da-Silva et al., 2005), a LPG3/GRP94 (Descoteaux et al., 2002), o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína gp63 (Yao; Donelson; Wilson, 2003), a proteína A2 (Zhang; Matlashewski, 2001) e as enzimas que participam do catabolismo de ATP extracelular (Fietto et al., 2004; Marques-Da-Silva et al., 2008).

A proteína LACK de 36 kDa é expressa em formas promastigotas e amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*. Ela promove a produção de IL-4 sob ativação de células T $V\beta 4^+ V\alpha 8^+ CD4^+$ e é crítica para a susceptibilidade de camundongos BALB/c à infecção por *L. major* (Mougneau et al., 1995). Além disso, estudos indicam que LACK é necessária para a persistência do parasito dentro dos macrófagos e do hospedeiro mamífero (Kelly; Stetson; Locksley, 2003).

LPG3 é uma proteína homóloga a GRP94, membro da família das HSP90, chaperonas localizadas no retículo endoplasmático do parasito *Leishmania* e foi visto estar relacionada à virulência do parasito mas não na sua viabilidade. Em células de mamíferos, GRP94 está associada à vários processos celulares como apresentação de antígenos, dobramento de proteínas, secreção e é requerida para viabilidade (Descoteaux et al., 2002). A GRP94 homóloga de *Leishmania infantum* foi descrita como sendo altamente imunogênica, assim como as proteínas da família de HSP90 (Larreta et al., 2000). O gene *LPG3*, que codifica a proteína LPG3/GRP94, pertence ao grupo de genes *LPG* de Classe II,

que codificam proteínas envolvidas na compartimentalização e montagem do LPG (lipofosfoglicano), desempenhando papel no endereçamento para a superfície celular de LPG, classificando a LPG3/GRP94 como molécula participante da biossíntese de LPG (Beverley; Turco, 1998; Descoteaux et al., 2002).

O LPG é um complexo de glicofosfatidilinositol ancorado em fosfoglicano encontrada na superfície de promastigotas de todas as espécies de *Leishmania*. Essa molécula de superfície tem demonstrado serem críticas em vários mecanismos biológicos e de virulência importantes para sobrevivência do parasito, incluindo modulação da produção de óxido nítrico (NO), inibição de apoptose, atraso na maturação do fagolisossomo e inibição de transdução de sinal em macrófagos (revisado por McMahon-Pratt; Alexander, 2004).

A família de genes A2 foi primeiramente identificada em *L. donovani* devido a seus transcritos serem detectados em abundância em amastigotas, mas dificilmente encontrados em promastigotas (Charest; Matlashewski, 1994). As proteínas apresentam de 42 a 100 kDa e estão localizadas no citoplasma do parasito. O locus gênico A2 demonstrou ser importante para a virulência de *L. donovani*, uma vez que organismos deficientes em A2 não são capazes de infectar macrófagos e camundongos. Porém, em *L. major* não se observa expressão dos genes A2 (Zhang; Matlashewski, 2001).

As enzimas que participam do catabolismo do ATP extracelular compreendem a família das Ecto-Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases (E-NTPDases), que representam um conjunto de enzimas responsáveis por hidrolisarem nucleotídeos extracelulares (Sansom, 2012; Zimmermann; Zebisch; Sträter, 2012). Esses nucleotídeos têm a capacidade de atuar como moléculas sinalizadoras em diversos eventos, através de receptores purinérgicos e pirimidinérgicos (Bours et al., 2006). Vários trabalhos sugerem uma correlação entre a capacidade de hidrólise de ATP extracelular e processos de virulência, adesão celular e sobrevivência intracelular de patógenos. Espécies de *Leishmania* mais infectantes apresentam maior capacidade de hidrólise de nucleotídeos e diferentes isolados de uma mesma espécie com capacidades infectantes distintas apresentam diferente capacidade de hidrólise de nucleotídeos (Fietto et al., 2004; Marques-Da-Silva et al., 2008; Sansom, 2012; Serafim et al., 2012).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a presença de proteínas ligantes de heparina (PLH) em promastigotas de *L. infantum chagasi*. Estas mesmas moléculas de *L. braziliensis* já haviam sido descritas como tendo capacidade de interagirem com células do

intestino do flebotomíneo *Lu. longipalpis* (De Castro Côrtes et al., 2012) e PLH's de *T. cruzi* apresentam a mesma propriedade de interação com células do epitélio intestinal de triatomíneos (Oliveira-Jr et al., 2012). A PLH de *L. infantum chagasi* (PLHLc) foi detectada na membrana externa de formas promastigotas do parasito, no citoplasma, em vesículas e próximas ao cinetoplasto. Em sequência, foi visto que o bloqueio desta molécula com heparina impedia parcialmente a adesão e internalização do parasito em macrófagos RAW 264.7, sugerindo a participação da PLHLc no processo de infecção parasitária em células de mamíferos (Marques-Da-Silva; Martins, 2016; Martins et al., 2015).

Assim, ressaltando a importância da molécula no processo de infecção, foi proposto para o presente trabalho estudar de forma detalhada as características bioquímicas e biofísicas da PLHLc, bem como sua aplicação no diagnóstico da LV canina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbari, M.; Oryan, A. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, v. 172, n. April, p. 86–90, 2017.
- Akhoundi, M.; Kuhls, K.; Cannet, A.; Votýpka, J.; Marty, P.; Delaunay, P.; Sereno, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- Alcolea, P. J.; Alonso, A.; Gómez, M. J.; Moreno, I.; Domínguez, M.; Parro, V.; Larraga, V. Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: High down-regulation rate in the amastigote stage. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 13, p. 1497–1516, 2010.
- Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; De Boer, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- Beaumier, C. M.; Gillespie, P. M.; Hotez, P. J.; Bottazzi, M. E. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. **Translational Research**, v. 162, n. 3, p. 144–155, 2013.
- Beverley, S. M.; Turco, S. J. Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 35–40, 1998.
- Bours, M. J. L.; Swennen, E. L. R.; Virgilio, F. Di; Cronstein, B. N.; Dagnelie, P. C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 358–404, 2006.
- Charest, H.; Matlashewski, G. Developmental Gene Expression in *Leishmania donovani*: Differential Cloning and Analysis of an Amastigote-Stage- Specific Gene. **Molecular And Cellular Biology**, v. 14, n. 5, p. 2975–2984, 1994.

De Castro Côrtes, L.; De Souza Pereira, M.; Da Silva, F.; Pereira, B. A.; De Oliveira Junior, F.; De Araújo Soares, R.; Brazil, R.; Toma, L.; Vicente, C.; Nader, H.; De Fátima Madeira, M.; Bello, F. J.; Alves, C. 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. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 142, 2012.

Descoteaux, A.; Avila, H. A.; Zhang, K.; Turco, S. J.; Beverley, S. M. *Leishmania* LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. **The EMBO journal**, v. 21, n. 17, p. 4458–4469, 2002.

Ferreira, G. E. M.; Dos Santos, B. N.; Dorval, M. E. C.; Ramos, T. P. B.; 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, n. 5, p. 1–10, 2012.

Fietto, J. L. R.; Demarco, R.; Nascimento, I. P.; Castro, I. M.; Carvalho, T. M. U.; Souza, W. De; Bahia, M. T.; Alves, M. J. M.; Verjovski-Almeida, S. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 454–460, 2004.

Freitas, V. C.; Parreiras, K. P.; Duarte, A. P. M.; Secundino, N. F. C.; Pimenta, P. F. P. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Its Natural Sandfly Vector *Lutzomyia longipalpis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 606–612, 2012.

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*. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, n. 3, p. 909–916, 1999.

Hotez, P. J.; Remme, J. H. F.; Buss, P.; Alleyne, G.; Morel, C.; Breman, J. G. Combating

Tropical Infectious Diseases: Report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 871–878, 2004.

Kaye, P.; Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host – pathogen interface. **Nature Publishing Group**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

Kelly, B. L.; Stetson, D. B.; Locksley, R. M. *Leishmania major* LACK Antigen Is Required for Efficient Vertebrate Parasitization. **The Journal of experimental medicine**, v. 198, n. 11, p. 1689–1698, 2003.

Lainson, R.; Rangel, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

Larreta, R.; Soto, M.; Alonso, C.; Requena, J. M. *Leishmania infantum*: Gene Cloning of the GRP94 Homologue, Its Expression as Recombinant Protein, and Analysis of Antigenicity. **Experimental Parasitology**, v. 96, p. 108–115, 2000.

Lipoldová, M.; Demant, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nature Publishing Group**, v. 7, n. April, p. 294–305, 2006.

Maia, C. S. F.; Monteiro, M. C.; Gavioli, E. C.; Oliveira, F. R.; Oliveira, G. B.; Romão, P. R. T. Neurological disease in human and canine leishmaniasis – clinical features and immunopathogenesis. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 10, p. 385–393, 2015.

Marques-Da-Silva, E. A.; Coelho, E. A. F.; Gomes, D. C. O.; Vilela, M. C.; Masioli, C. Z.; Tavares, C. A. P.; Fernandes, A. P.; Afonso, L. C. C.; Rezende, S. A. Intramuscular immunization with p36(LACK) DNA vaccine induces IFN- γ production but does not protect BALB/c mice against *Leishmania chagasi* intravenous challenge. **Parasitology Research**, v. 98, n. 1, p. 67–74, 2005.

Marques-Da-Silva, E. D. A.; Martins, T. V. F. Parasite Lectins: More than Adhesion

Molecules? **Journal of Glycobiology**, v. 5, n. 1, p. 11–12, 2016.

Marques-Da-Silva, E. De A.; De Oliveira, J. C.; Figueiredo, A. B.; De Souza Lima Júnior, 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 and Infection**, v. 10, n. 8, p. 850–857, 2008.

Martins, T. V. F.; De Carvalho, T. V.; De Oliveira, C. V. M.; De Paula, S. O.; Cardoso, S. A.; De Oliveira, L. L.; Marques-Da-Silva, E. D. A. *Leishmania chagasi* heparin-binding protein: Cell localization and participation in *L. chagasi* infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 204, n. 1, p. 34–43, 2015.

Maurya, R.; Singh, R. K.; Kumar, B.; Salotra, P.; Rai, M.; Sundar, S. Evaluation of PCR for Diagnosis of Indian Kala-Azar and Assessment of Cure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3038–3041, 2005.

Mccall, L. I.; Zhang, W. W.; Matlashewski, G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003053, 2013.

Mcmahon-Pratt, D.; Alexander, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunological Reviews**, v. 201, p. 206–224, 2004.

Menezes-Souza, D.; Mendes, T. A. De O.; Gomes, M. De S.; Bartholomeu, D. C.; Fujiwara, R. T. Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e3426, 2015.

Ministério Da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica., 2014.

Mougneau, E.; Altare, F.; Wakil, A. E.; Zheng, S.; Coppola, T.; Wang, Z. E.; Waldmann, R.; Locksley, R. M.; Glaichenhaus, N. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. **Science**, v. 268, n. 5210, p. 563–6, 1995.

Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R.; Saravia, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, 2005.

Neves, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

Nieto, A.; Domínguez-Bernal, G.; Orden, J. A.; De La Fuente, R.; Madrid-Elena, N.; Carrión, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 39, 2011.

No, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113–123, 2016.

Oliveira-Jr, F. O. R.; Alves, C. R.; Souza-Silva, F.; Calvet, C. M.; Côrtes, L. M. C.; Gonzalez, M. S.; Toma, L.; Bouças, R. I.; Nader, H. B.; Pereira, M. C. S. *Trypanosoma cruzi* heparin-binding proteins mediate the adherence of epimastigotes to the midgut epithelial cells of *Rhodnius prolixus*. **Parasitology**, v. 139, n. 06, p. 735–743, 2012.

Petersen, C. A.; Barr, S. C. Canine Leishmaniasis in North America: Emerging or Newly Recognized? **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1065, 2010.

Ready, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Euro Surveillance**, v. 15, n. 10, p. 19505, 2010.

Rey, L. **Bases da Parasitologia**. 2ª edição. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2002.

Sacks, D.; Kamhawi, S. Molecular Aspects Of Parasite-Vector And Vector-Host Interactions In Leishmaniasis. **Annual Review Microbiology**, v. 55, p. 453–483, 2001.

Sansom, F. M. The role of the NTPDase enzyme family in parasites: what do we know, and where to from here? **Parasitology**, v. 139, p. 963–980, 2012.

Saxena, A.; Lahav, T.; Holland, N.; Aggarwal, G.; Anupama, A.; Huang, Y.; Volpin, H.; Myler, P. J.; Zilberstein, D. Analysis of the *Leishmania donovani* transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, p. 53–65, 2007.

Serafim, T. D.; Figueiredo, A. B.; Costa, P. A. C.; Marques-Da-Silva, E. A.; Gonçalves, R.; Moura, S. A. L. De; Gontijo, N. F.; Silva, S. M. Da; Michalick, M. S. M.; Meyer-Fernandes, J. R.; Carvalho, R. P. De; Uliana, S. R. B.; Fietto, J. L. R.; Afonso, L. C. C. *Leishmania* Metacyclogenesis Is Promoted in the Absence of Purines. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. e1833, 2012.

Sinha, P. K.; Bhattacharya, S. Single-dose liposomal amphotericin B: an effective treatment for visceral leishmaniasis. **The Lancet**, v. 2, n. 1, p. e7–e8, 2014.

Sundar, S.; Chakravarty, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 2010.

Sundar, S.; Rai, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951–958, 2002.

Sundar, S.; Singh, A.; Rai, M.; Prajapati, V. K.; Singh, A. K.; Ostyn, B.; Boelaert, M.; Dujardin, J.; Chakravarty, J. Efficacy of Miltefosine in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India After a Decade of Use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543–550, 2012.

Ul Bari, A.; Rahman, S. B. Cutaneous leishmaniasis: An overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, v. 18, n. 1, p. 42–48, 2008.

Vexenat, A. De C.; Santana, J. M.; Teixeira, A. R. L. Cross-Reactivity of Antibodies in Human Infections by The Kinetoplastid Protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. maio, p. 177–185, 1996.

Werneck, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 26, n. 4, p. 644–645, 2010.

Werneck, G. L. The control of visceral leishmaniasis in Brazil: end of a cycle? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. VI, p. 1–2, 2016.

Yao, C.; Donelson, J. E.; Wilson, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 132, p. 1–16, 2003.

Zhang, W.; Matlashewski, G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 935–948, 2001.

Zijlstra, E. E. Visceral leishmaniasis: a forgotten epidemic. **Archives of Disease in Childhood**, v. 0, p. 1–7, 2016.

Zijlstra, E. E.; Musa, A. M.; Khalil, E. A. G.; Hassan, I. M. El. Review Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **The Lancet**, v. 3, n. February, p. 87–98, 2003.

Zimmermann, H.; Zebisch, M.; Sträter, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signalling**, v. 8, p. 437–502, 2012.

Zuben, A. P. B. Von; Donalísio, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, p. e00087415, 2016.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Identificar, realizar análise estrutural e funcional da proteína ligante de heparina de *Leishmania infantum chagasi* (PLHLc) e avaliar seu potencial de aplicação no diagnóstico da leishmaniose visceral canina.

2.2 *Objetivos específicos*

- Sequenciar a proteína PLHLc;
- Expressar a PLHLc em sistema recombinante bacteriano;
- Purificar a PLHLc;
- Verificar a habilidade da proteína em reconhecer carboidrato heparina;
- Identificar a massa molecular da proteína e verificar seu potencial de formação de oligômeros em soluções aquosas;
- Analisar *in silico*, as estruturas secundária, terciária e quaternária da proteína PLHLc;
- Avaliar a influência da ligação ao carboidrato heparina sobre a estrutura e função da PLHLc;
- Avaliar a aplicabilidade do antígeno produzido no imunodiagnóstico da LV canina.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesse trabalho originaram dois manuscritos.

3.1 O primeiro manuscrito (Capítulo I), intitulado “Lipophosphoglycan 3 from *Leishmania infantum chagasi* binds heparin with micromolar affinity”, busca entender a estrutura e função da proteína PLHLc, previamente estudada pelo nosso grupo, e descreve a habilidade da mesma de se ligar à heparina e o envolvimento desta ligação em outras funções proteicas. Este manuscrito foi submetido para publicação no periódico científico “PLOS Neglected Tropical Diseases”.

3.2 O segundo manuscrito (Capítulo II), intitulado “Proteína recombinante LPG3 de *Leishmania infantum chagasi*: um promissor antígeno para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina”, aborda a aplicabilidade da proteína recombinante estudada no manuscrito anterior no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Este manuscrito está em fase final de preparação para publicação.

CAPÍTULO I

LIPOPHOSPHOGLYCAN 3 FROM *Leishmania infantum chagasi* BINDS HEPARIN WITH MICROMOLAR AFFINITY

**Thaís Viana Fialho Martins^{1¶}, Ana Eliza Zeraik^{2&}, Natália Oliveira Alves^{2&}, Leandro
Licursi de Oliveira^{1¶}, Tiago Antônio de Oliveira Mendes^{3&}, Ricardo DeMarco^{2&},
Eduardo de Almeida Marques-da-Silva^{1#a¶*}**

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

² Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil

³ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

^{#a}Current Address: Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

* Corresponding author

E-mail: eduardo.marques@ufv.br

[¶]These authors contributed equally to this work.

[&]These authors also contributed equally to this work.

Abstract

Leishmania infantum chagasi is an intracellular protozoan parasite responsible for visceral leishmaniasis, which is a fatal disease in humans. Identification of molecules from the parasites involved in the host cell infection process is important for designing strategies to control this disease. Heparin-binding proteins (HBPs) are proteins displaying as main characteristic the ability to bind to carbohydrates present in glycoproteins or glycolipids. Evidence suggests that HBPs present on *Leishmania* surface participate in the adhesion of parasites to tissues of both invertebrate and vertebrate hosts as well as in cell invasion. In this study, we identified by mass spectrometry the product with a HSP90 domain encoded by lipophosphoglycan (*LPG3*) gene as a *L. infantum chagasi* HBP (HBPLc). Gel filtration chromatography, non-denaturing gel electrophoresis and cross-linking assays with the recombinant version of the protein suggest that the protein is organized as a tetramer. Isothermal titration calorimetry confirms that it is capable of binding heparin with micromolar affinity. Inhibition of ATPase activity in the presence of heparin together with molecular modeling and *in silico* docking analysis suggests that heparin-binding site has superposition with the ATP-binding site. The ability of *LPG3* to bind heparin with high affinity together with its external location makes it a potentially important protein in host-parasite interaction.

Author summary

Visceral leishmaniasis (VL) is a fatal neglected tropical disease that represents a serious public health problem in American and Mediterranean countries. Actual drugs used to the VL treatment are toxic and available vaccines do not demonstrate satisfactory performance to prevent the disease. As well as to other parasitic diseases, strategies of prevention and control of VL are associated to the knowledge about parasitic molecules and biochemical pathways related to the maintenance of the parasite life cycle. *Leishmania infantum chagasi* *LPG3* is already described in the literature by containing HSP90 and H⁺-ATPase domains. In this work, we performed structural characterization of *LPG3*, demonstrated its ability to recognize heparin carbohydrates, and suggested that heparin coupling in its heparin-binding site delays the process of ATP hydrolysis by the parasite, impairing the acquisition of this extracellular metabolite used to form purine nucleotides. These functional aspects associated to the participation of *LPG3* in the *Leishmania* adhesion to the host cell together support and reinforce the use of this protein in the search by new drugs and vaccines against VL.

Introduction

Components from the extracellular environment can exert their functions in cells by binding specifically to the cell surface receptors, which when activated may be internalized or may transmit intracellular signals to the nucleus in order to regulate different biological functions. These receptors sometimes use glycosaminoglycans (GAGs) from the cell surface to recognize their ligands or to regulate their activation [1]. Heparin, a polysaccharide belonging to the family of sulfated GAGs, possess numerous biological functions related to interactions with different proteins [2] that plays a major role in cancer, such as in curing wounds, inflammation, and infectious diseases [3].

Visceral leishmaniasis (VL) is a potentially fatal disease that represents a serious public health problem, with the main focus in Central and South America and in Mediterranean countries. This disease is responsible for approximately 20 to 40,000 deaths per year worldwide, including casualties caused by *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum chagasi* [4]. Specific receptors present on the surface of *Leishmania* can bind to GAGs using a structure similar to heparin present in the host tissue [5].

Heparin receptors [also known as heparin-binding proteins (HBPs)] can influence host-parasite interactions during the infection process [5, 6]. The HBPs belong to a group of ubiquitous proteins, whose main characteristic is the ability to bind to carbohydrates present in glycoproteins or glycolipids. Evidences suggest that HBPs present on *Leishmania* surface participate in the regulation of biological activities of the host cell and participate directly in the adhesion and in the internalization of the parasites in cells from both vertebrate and invertebrate hosts: experiments with *L. donovani* promastigote forms showed that parasite HBP induces the inhibition of protein kinase C activity [7-9]; other studies have revealed the presence of these proteins in *Leishmania braziliensis* promastigotes forms and their influence on the adhesion of parasites in the insect vectors by recognizing molecules present in the *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia whitmani* midgut [5, 7, 10]; our research group purified and characterized HBP from *L. infantum chagasi* promastigotes (HBPLc), showing its distribution on the surface as well as inside the parasite. In addition, the participation of native protein in the parasite infection in macrophages *in vitro* was observed by a decrease in the intensity of internalization of parasites by macrophages when the parasites were previously treated with heparin [6].

In the present work, a HBPLc was sequenced and identified as product of lipophosphoglycan 3 (LPG3) gene. The protein was expressed in heterologous system as a recombinant HBPLc (rHBPLc) and their structural and functional properties were analyzed. *In silico* analyses were conducted to predict the three-dimensional (3D)

structure and the heparin-binding site of the protein. Our results demonstrated that rHBPLc is a tetrameric complex with an estimated molecular mass of 348 kDa. Each monomer is constituted by high-density structures in α -helices interspersed by β -sheets. The recombinant protein can bind to heparin carbohydrate and displays hydrolytic activity over ATP. Interestingly, ATP and heparin-binding sites overlap in the protein, indicating that the sugar may be used as an inhibitor of its ATPase activity. Noteworthy, HBPLc codified by *LPG3* gene has two regions described in the literature: heat shock protein 90 (HSP90 – folding-function domain) and H⁺-ATPase (ATP-binding domain). Together, these findings corroborate our results about the ATPase activity of the rHBPLc and allow us to establish a new function to the protein codified by *LPG3* gene, which is the ability to recognize heparin or heparin glycoproteins.

Methods

Protein sequencing

Native HBPLc was purified and submitted to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The band corresponding to HBPLc (molecular mass = 105 kDa) [6] was extracted from the polyacrylamide gel and treated as follows: the gel was destained in acetonitrile solution (ACN; 50%/NH₄HCO₃ 25 mM, pH 8.0) and dehydrated with 200 μ L of pure ACN. The gel pieces were dried on SpeedVac (Mi-Vac; Gene-Vac), reduced in dithiothreitol (DTT; 65 mM/NH₄HCO₃ 100 mM) at 56°C for 30 min and alkylated with 100 μ L iodoacetamide (200 mM/NH₄HCO₃ 100 mM) at the room temperature in the dark. The gel was washed with 200 μ L of 100 mM NH₄HCO₃ by stirring for 10 min, dehydrated with 200 μ L ACN, rehydrated with 200 μ L of 100 mM NH₄HCO₃, dehydrated again with ACN, and then dried on SpeedVac for 15 min. For protein digestion, the gel pieces were treated with 30 μ L of the solution of 25 mM NH₄HCO₃/2.5 mM CaCl₂/25 ng/ μ L trypsin at 4°C/45 min. In the sequence, 50 μ L of 25 mM NH₄HCO₃/2.5 mM CaCl₂ were added and the reaction occurred overnight at 37°C. Peptides were extracted, purified in a Pierce[®] C18 Spin Column ZipTip (Thermo Scientific; Rockford, IL, USA) and mass spectrometry was performed in the MALDI-TOF-TOF mass spectrometer, Ultraflex III (Bruker Daltonics, Fremont, CA, USA). The peptides were prepared in 10 mg/mL matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic 1:1 (v/v) prepared in 50% ACN/0.1% trifluoroacetic acid and, in the sequence, the sample was submitted to the sequencing. The peptides were detected in duplicate. The processing of MS1 and MS2 data was realized on FlexAnalysis 3.3 software (Bruker Daltonics,

Germany) and the identification of the amino acid sequence was performed using MASCOT 2.3.2 software (Matrix Science; United Kingdom).

Bioinformatics and sequence analysis

The sequence obtained in MASCOT was submitted to analysis in pBLAST-NCBI implemented in UNIPROT KB (European Bioinformatics Institute; Hinxton, UK, version august, 28 of 2015), parameterized with the values of *E-threshold* 0.0001, *matrix* blosum-62, *filtering* in low complexity regions, *gapped* and *hits* 50. Genome analysis was performed in pBLAST implemented in TritypDB [11]. The presence of the signal peptide sequence was verified using SignalP 4.1 Server [12, 13], and the presence of GPI-anchor regions were verified using GPI-SOM 1.5 [14], big-PI Predictor [15], and PredGPI-GPI [16]. To identify regions with *N*- and *O*-linked glycosylation, we used the NetNGlyc 1.0 [17] and NetOGlyc 4.0 Servers [18], respectively. The search for domains was performed using Pfam 30.0 database [19]. The multiple alignment of the LPG3 amino acid sequence for the species *L. infantum chagasi* (LinJ.29.0790), *Trypanosoma cruzi* (TcCLB.506989.190), *L. braziliensis* (LbrM.29.0780), *Leishmania tarentolae* (LtaP29.0800), *Leishmania major* (LmjF.29.0760), *L. donovani* (LdBPK_290790.1), and *Leishmania mexicana* (LmxM.08_29.0760) was performed using the program Clustal Omega. The phylogenetic tree was constructed using the MEGA 6 [20] with probabilities calculated by Clustal W, parameterized with BLOSUM matrix, and phylogenetic analysis by the maximum likelihood method, reliability by bootstrap method with 1000 re-sampling and pattern remaining of maximum likelihood.

Recombinant protein expression and purification

The DNA sequence encoding LPG3 was synthesized *in vitro* and cloned by GENONE company (GenOne, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). It was inserted into the cloning vector pUC19 in the *Nde*I and *Xho*I restriction site. The gene was sub-cloned into pET 28a(+) (Novagen, San Diego, CA, USA), which code for His-Tag in the portion N-terminal of the polypeptide. *Escherichia coli* DH5 α strain cells were transformed with the modified plasmid for the propagation of the vectors containing the insert of interest. The recombinant protein was expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) strain cells transformed with pET 28 constructs and grown at 37°C in the Luria-Bertani medium (LB) supplemented with kanamycin (50 μ g/mL) and chloramphenicol (34 μ g/mL) to achieve an optical density of 0.6-0.8, followed by expression induced by isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) at 0.5 mM in the LB medium at 18°C/16 h with shaking.

The cells were lysed by sonication in 10 mM sodium phosphate/150 mM sodium chloride, pH 7.0 (buffer A). The supernatant of soluble proteins was recovered and submitted to affinity chromatography on the Ni-NTA column (Qiagen, Hilden, Germany) equilibrated in buffer A. Immobilized proteins were eluted in buffer A containing 500 mM imidazole (buffer B). The proteins were analyzed by 10% SDS-PAGE. Subsequently, the eluates were separated by affinity chromatography on heparin-agarose assembled in a liquid chromatography system (AKTA purifier; GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany) equilibrated with buffer A. The adsorbed fraction was eluted with buffer A plus NaCl (2 M). Later, the eluate was separated on a Superdex 200 10/300 GL column (GE Healthcare Life Sciences) assembled in the same equipment. The purity of the eluate was assessed by Coomassie stained 12% SDS-PAGE.

ITC analysis

The binding affinity of recombinant LPG3 (rLPG3) for high molecular mass heparin (16,000 Da), as well as affinity for mannose at a concentration of 1.5 mg/mL were determined at 20°C using a VP-ITC calorimeter (Microcal, Northampton, MA, USA). The protein diluted in buffer A at a concentration of 0.54 mg/mL was added to the VP-ITC cell unit, and the sugars loaded into the injection syringe were titrated in independent trials. Titrations were performed in a series of 28 injections of 5 μ L each to achieve a complete isotherm binding. Titration of heparin or mannose in buffer were performed to obtain the heats of dilution, which were subtracted from the binding curve. The dissociation constant (K_d) and enthalpy were obtained using the Microcal[®] ITC Origin[™] software using one site binding model.

Circular dichroism

The circular dichroism spectra of the protein was performed using spectropolarimeter Jasco Model J - 815 CD Spectrometer (Jasco, Tokyo, Japan) connected to the temperature control system (Peltier). The spectra were collected in the range of 190 to 280 nm using a quartz bucket of 0.1 cm optical path. Spectra were determined as the average of six scans at a rate of 100 nm.min⁻¹. The structural analysis was performed at 25°C and the thermal stability was assessed from 25 to 90°C in 5°C intervals with 5 min equilibration time in each temperature. Heparin (1.5 mg/mL) was added to protein at a proportion of 2:1 protein/sugar. The spectra were converted to molar ellipticity average per residue (MRW – Mean Residue Weight), $[\theta_{MRW, \lambda}]$ defined as:

$$\theta_{MRW,\lambda} = MRW \times \frac{\theta_{\lambda}}{10 \times d \times c}$$

where:

$$MRW = M/(N - 1)$$

M is the molecular mass of the protein (Da) and N is the number of amino acids. θ_{λ} is the ellipticity in degrees at wavelength λ , d corresponds to the optical path (cm), and c is the protein concentration (g x mL⁻¹) [21].

Molecular exclusion chromatography

The quaternary structure of rLPG3 was assessed by molecular exclusion chromatography on the Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare Life Sciences) column through the protein apparent molecular mass calculated from the elution volume of the protein plotted in a calibration curve designed using the standards of ribonuclease (13.7 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), ovalbumin (43 kDa), conalbumin (75 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), and ferritin (440 kDa). The calibration curve was constructed according to constant K_{av} , calculated considering the elution volume of each protein (V_e , absorbance maximum volume), the column void volume (V_o , corresponding to the blue dextran elution volume), and the column volume (V_c), where:

$$K_{av} = (V_e - V_o)/(V_c - V_o)$$

Cross-linking assay

The cross-linking reaction was initiated by adding 1 mM disuccinimidyl suberate (DSS) or 1 mM ethylene glycol-*bis* succinimidyl succinate (EGS) in 0.4 mg/mL recombinant protein solution. After 25 min at room temperature, the reaction was stopped by adding the sample buffer containing β -mercaptoethanol, followed by heating to 95°C. Proteins were separated by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gel and stained by Coomassie blue.

Native Gel Electrophoresis

Electrophoresis in a native gel (PAGE) was performed on 8% polyacrylamide gel submitted to 90 V/4 h on an ice bath.

ATP Hydrolysis Assay

The hydrolytic activity of rLPG3 over ATP was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) as described elsewhere [22] with minor modifications.

Overall, 14 μ M recombinant protein were incubated with 45 μ M ATP or 1.5 mg/mL heparin plus 45 μ M ATP in the presence of 5 mM MgCl_2 . Aliquots were removed at different time intervals and immediately frozen in liquid nitrogen. Nucleotides were extracted from the samples as follows: ice-cold HClO_4 (0.5 M final concentration) was added to the samples and incubated at 4°C/10 min. The protein pellet was separated by centrifugation at 16,000 $\times g$ at 4°C/10 min. KOH and K_2HPO_4 were added to the supernatant (one-sixth volume of 3 M and 1 M stock solutions, respectively) followed by the addition of 0.5 M acetic acid (final concentration), and centrifugation at 20,000 $\times g$ at 4°C/10 min. ATP was separated from ADP by anion exchange chromatography on a Protein Pack DEAE 5 PW 7.5 mm $\times$ 7.5 cm column (Waters, Milford, MA, USA) attached to a Waters 2695 chromatography system. The column was equilibrated with 25 mM Tris at pH 8.0 and 200 μ L of each sample were loaded into the system and eluted with a NaCl gradient of 0.1-0.45 M in 10 min at 1 mL/min flow rate at room temperature. The absorbance was monitored at 253 nm. The retention times of each guanine nucleotide were determined in comparison with a mixture of 5 μ M ADP and 5 μ M ATP measured in the same sample buffer after treatment with HClO_4 .

Molecular modeling

Protein secondary structure predictions were performed using Phyre2 [23] and Jpred4 [24] softwares. The 3D structure of LPG3 protein was predicted by homology modeling using Phyre2 software: multiple protein templates were recovered from RCSB PDB [25] with at least 40% of identity, and a confidence score of 100% were used to build 1000 models. The best-scored model was selected and optimized by molecular dynamics simulation using YAMBER 3 [26] package for model refinement, reducing the steric clashes between residues. The high quality of model was evaluated by PROCHECK [27] and ProSA [28] softwares. The protein-protein docking to tetrameric complex modeling was performed using M-ZDOCK [29, 30] web server. The top 10 models of this program were compared and the most repetitive structure with smaller root-mean-square derivation (RMSD) against other models was selected as the consensus model. The heparin and ATP-binding sites were predicted using two independent methodologies. For heparin, we used the specific optimized package for this molecule implemented by Cluspro web server [31, 32] and the algorithm AutoDock Vina [33] to calculate the predicted affinity energy. ATP binding site was also performed with AutoDock Vina and SwissDock web servers [33, 34] using flexible ligand and rigid protein. PyMOL 1.3 [35]

was used to analyze the polar contacts between proteins in the tetramer and ligand-protein in the heparin-LPG3 complex as well as to design figures.

Results

HBPLc is Coded by LPG3 Gene

HBPLc was obtained from the total extract of *L. infantum chagasi* promastigotes, submitted to SDS-PAGE, and the 105-kDa band was extracted from the gel, as described elsewhere [6]. The protein was subjected to sequencing by MALDI TOF-TOF MS positive ion reflective mode, revealing the peaks analyzed in MS2 (S1 Fig A).

Tryptic peptides analysis realized in MASCOT database using the method of *peptide mass fingerprinting* was compared to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database for investigating the specific *Leishmania* species and allowed to detect matches with X peptides, producing a highly significant overall score of 556 (scores >33 are considered significant – data not shown). Peptide analysis in pBLAST implemented on Uniprot KB found most of the identified peptides, revealing 15% sequence coverage in comparison with the protein A4I4C9_LEIIN (S1 Fig B), a *L. infantum* protein identified as a putative LPG3 from the *LPG3* gene, which has two domains described in the Pfam database: ATP-binding domain (H⁺-ATPase 3 domain) and a domain related to protein with folding function (HSP90 domain - S1 Fig C). Using pBLAST implemented on TritypDB [11], the gene sequence was identified as LinJ. 29.0790 – codifying a heat shock protein 90/putative LPG3. HBPLc may hence be identified as the LPG3 protein. Analysis of LPG3 protein indicates the presence of a signal peptide, three possible N-linked glycosylation regions, and two O-linked glycosylation regions (S1 Fig B); but, it was not possible to find the GPI-anchoring regions.

rLPG3 can bind heparin carbohydrate

The *LPG3* gene excised from pUC 19 vector was transferred to pET 28a into the *Nde*I and *Xho*I restriction sites. rLPG3 was successfully expressed in *E. coli* and, after cell lysis and the removal of insoluble fraction, a band corresponding to the expected protein was detected in the soluble fraction by SDS-PAGE. This fraction was submitted to nickel affinity chromatography, followed by heparin affinity chromatography and later submitted to size exclusion chromatography for the purification of the recombinant protein (S2 Fig).

Isothermal titration calorimetry (ITC) analysis was performed to evaluate the sugar affinity of rLPG3. The binding isotherms obtained from rLPG3 titrated with heparin (Fig 1 left) revealed that the reaction with heparin is exothermic, with an enthalpy value (ΔH) of $-4.368 \times 10^4 \pm 4265$ kcal/mol and a K_d of 2.33×10^{-6} M. The number of heparin-binding sites was calculated ($N = 0.507 \pm 0.0402$, data not shown), indicating that not all sites on rLPG3 are occupied simultaneously. As a negative control, titration with mannose was performed and indicate no binding with the protein (Fig 1 right).

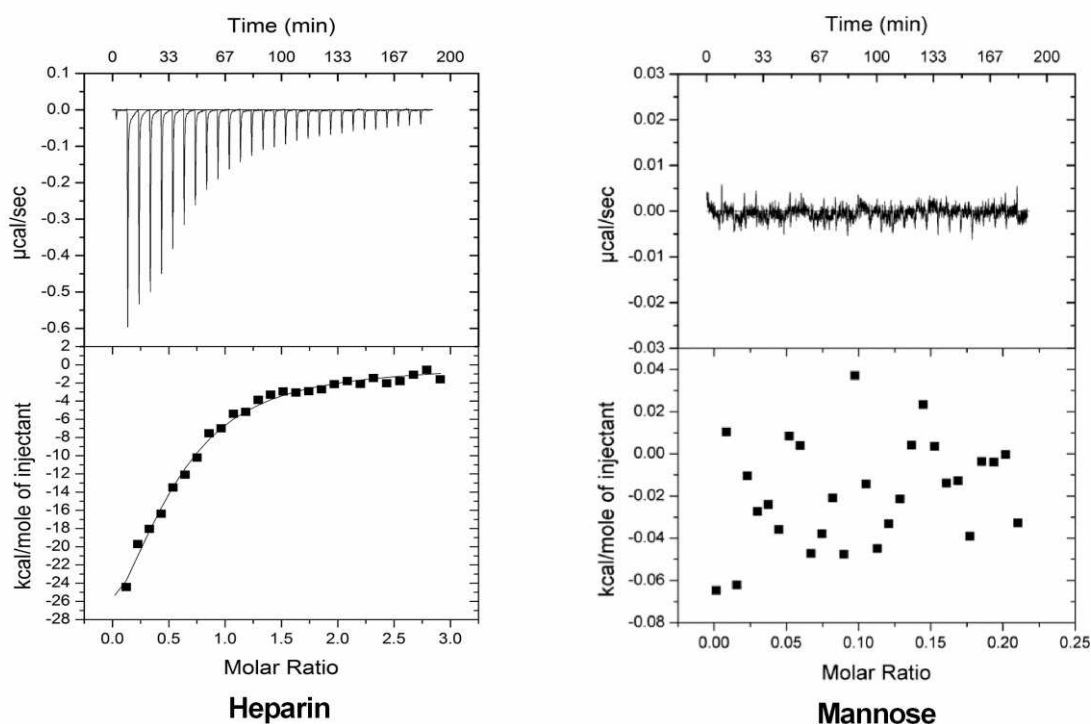


Fig 1. rLPG3 sugar-binding analysis. Graphics represent raw ITC data (*top*) and binding isotherms (*bottom*) from the sugar-binding assays using rLPG3 (6.5 μ M or 0.54 mg/mL) in standard buffer titrated with 1.5 mg/mL heparin or 1.5 mg/mL mannose. Each titration was performed with 28 injections of 5 μ L.

LPG3 is a tetrameric complex

Purified rLPG3 was subjected to size exclusion chromatography, which resulted in a chromatogram with a single peak, indicative of a pure and homogeneous sample (S2 Fig A). Comparison of the elution volume of the peak from rLPG3 sample with the calibration curve, allowed the determination of an apparent molecular weight of 380 kDa (Fig 2A). To confirm this result, rLPG3 was submitted to PAGE. The electrophoresis allowed the detection of two bands that would be compatible with expected masses of a monomer (86 kDa) and a tetramer (348 kDa) (Fig 2B). Cross-linking assay of rLPG3 with

two different bonding agents (EGS or DSS), allowed the detection of two bands with sizes compatible with a monomer and a tetramer (Fig 2C).

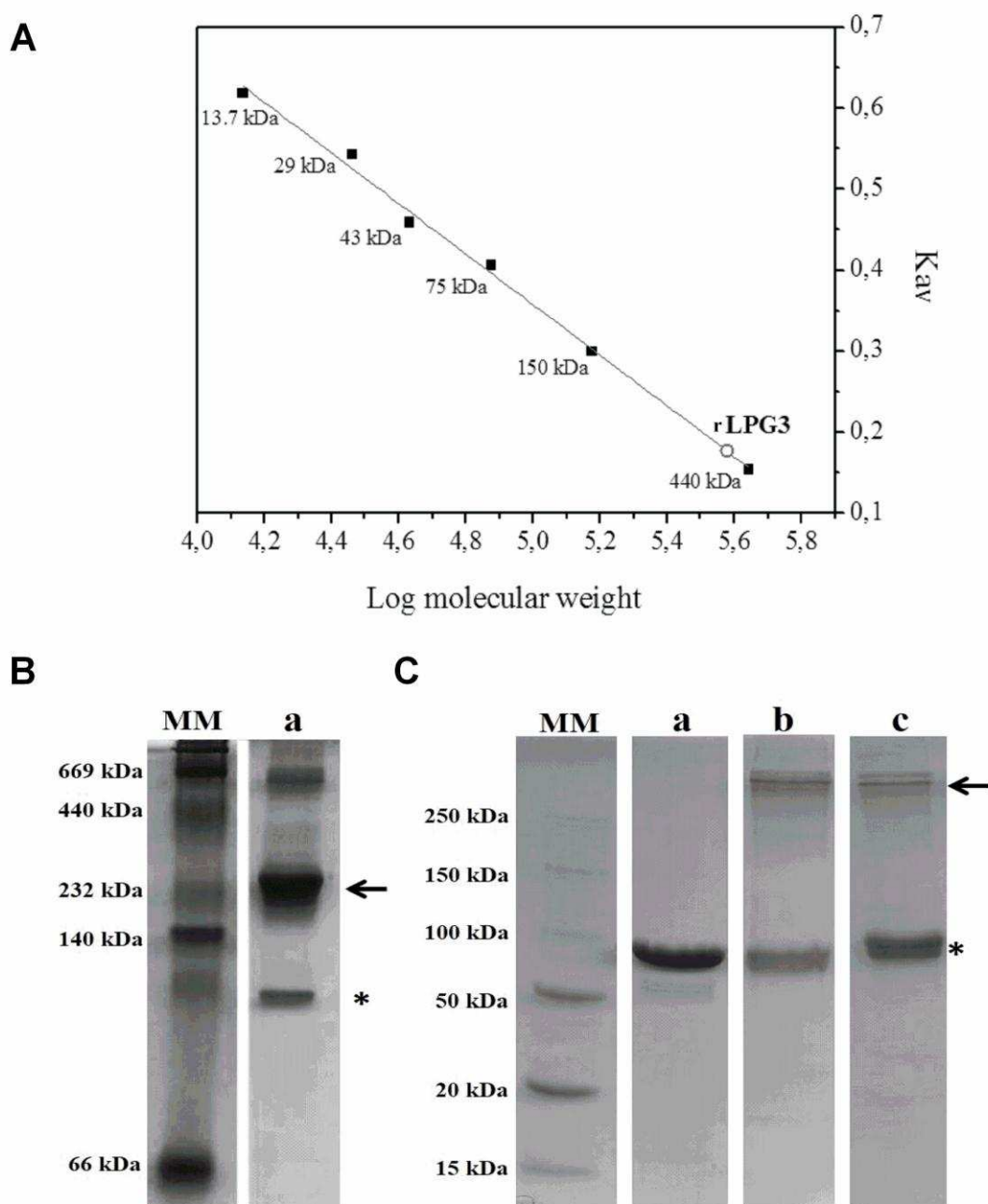


Fig 2. rLPG3 oligomerization. A, Molecular mass of rLPG3 was estimated by size exclusion chromatography using Superdex 200 10/300GL column, as described in the methodology. Calibration curve was designed using the standards: ribonuclease (13.7 kDa); carbonic anhydrase (29 kDa); ovalbumin (43 kDa); conalbumin (75 kDa); alcohol dehydrogenase (150 kDa), and ferritin (440 kDa). Estimated rLPG3 molecular mass: 380 kDa; B, Native gel electrophoresis: 20 μ g of rHBPLc (a) were submitted to PAGE and stained with Coomassie blue, as described in the methodology; MM: Molecular mass standard; C, *Cross linking* assay: rLPG3 was incubated in the presence of EGS or DSS by 25 min. The reaction was stopped and the samples were subjected

to 10% SDS-PAGE, as described in the methodology. MM: Molecular mass standard; a. 20 μ g rLPG3 without bonding agent; b. 20 μ g rLPG3 + 1 mM EGS; c. 20 μ g rLPG3 + 1 mM DSS. Arrows indicate oligomers and asterisks indicate monomers. Molecular masses of oligomer and monomer in C (348 and 86 kDa, respectively) were estimated by Relative Mobility calculated in relation to the standards positioning.

Modeling of LPG3 structure

The modeling of LPG3 protein was performed using the Phyre2 program [23]. The structural modeling was performed by homology against multiple templates, and the model was refined by molecular dynamics. After undergoing strict quality control, the distribution of secondary structures was compared to the predictor Jpred [24], resulting in high compatibility among them (Fig 3A). High-density structures of α -helices interspersed by β -sheets were detected (Fig 3A and 3B), as confirmed by circular dichroism analysis (data not shown).

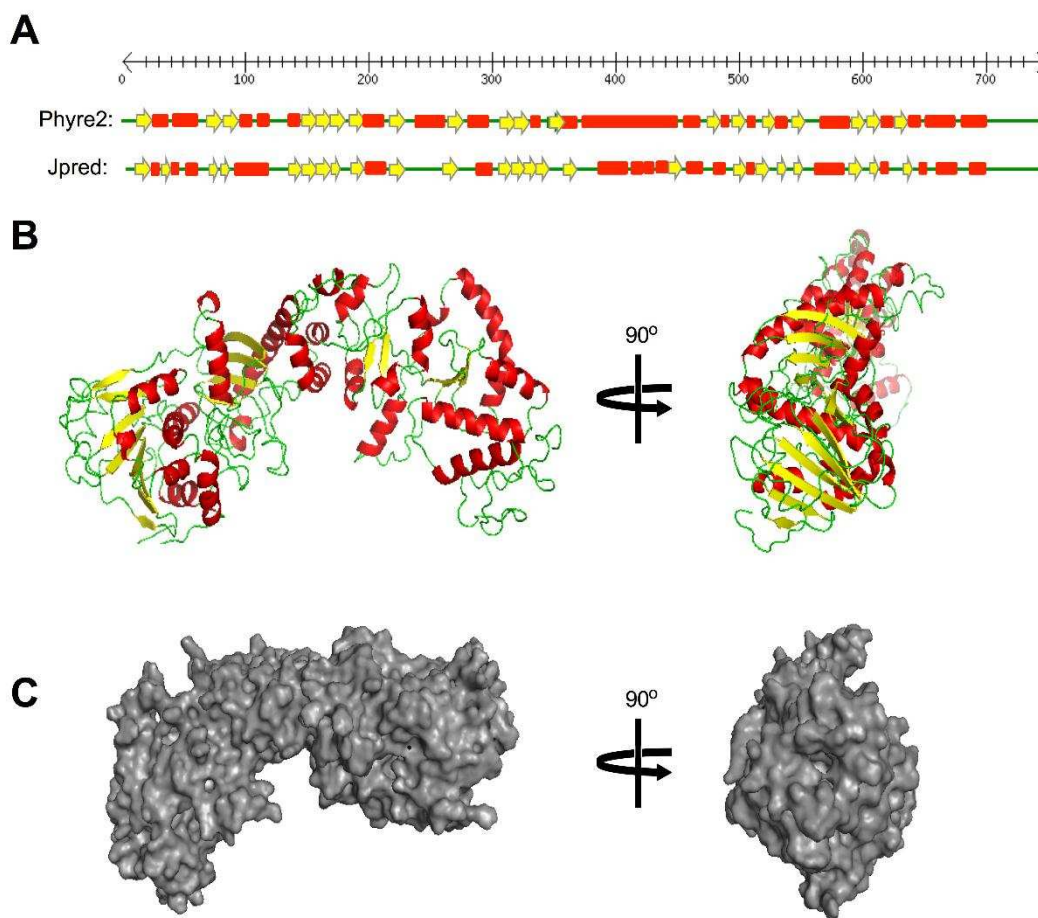


Fig 3. Secondary structure and 3D-model predictions to LPG3 protein. A, Secondary structure of LPG3 protein predicted by Phyre2 and Jpred softwares; B, Secondary structure of

LPG3 protein in 3D model; C, Surface structure prediction of LPG3 protein. Red ribbons, yellow arrows, and green lines represent α -helices, β -sheets, and unstructured regions, respectively.

The structure of the tetramer was predicted by modeling of a protein-protein *docking* using M-Zdock [29, 30]. Eight of the top ten models with the highest score created by the program showed similar conformation, suggesting that the model is suitable to represent the tetramer (Fig 4A). The heparin-binding site was identified using a specific and highly validated algorithmic function implemented in ClusPro [31, 32], predicting a binding interface between two monomers (Fig 4B). This site was also confirmed using the Autodock Vina program [33], and the predicted binding energy was higher to the tetramer than to the monomeric protein. Furthermore, this binding model suggests that heparin can influence the binding between two monomers. In fact, analysis of the secondary structure by circular dichroism under different temperatures revealed that the rLPG3 is stable against temperature and that heparin provides greater stability for the protein at higher temperatures (Fig 5).

In silico experiments of ATP-binding site predicts an overlap with the site of heparin, suggesting that heparin could acts as a competitive inhibitor of ATP hydrolytic activity (Fig 4B). Four key amino acids residues from LPG3 predicted to allow ATP binding also interact with heparin, including SER-457, THR-538, ASP-539, and ASP-659 (Fig 4C and 4D).

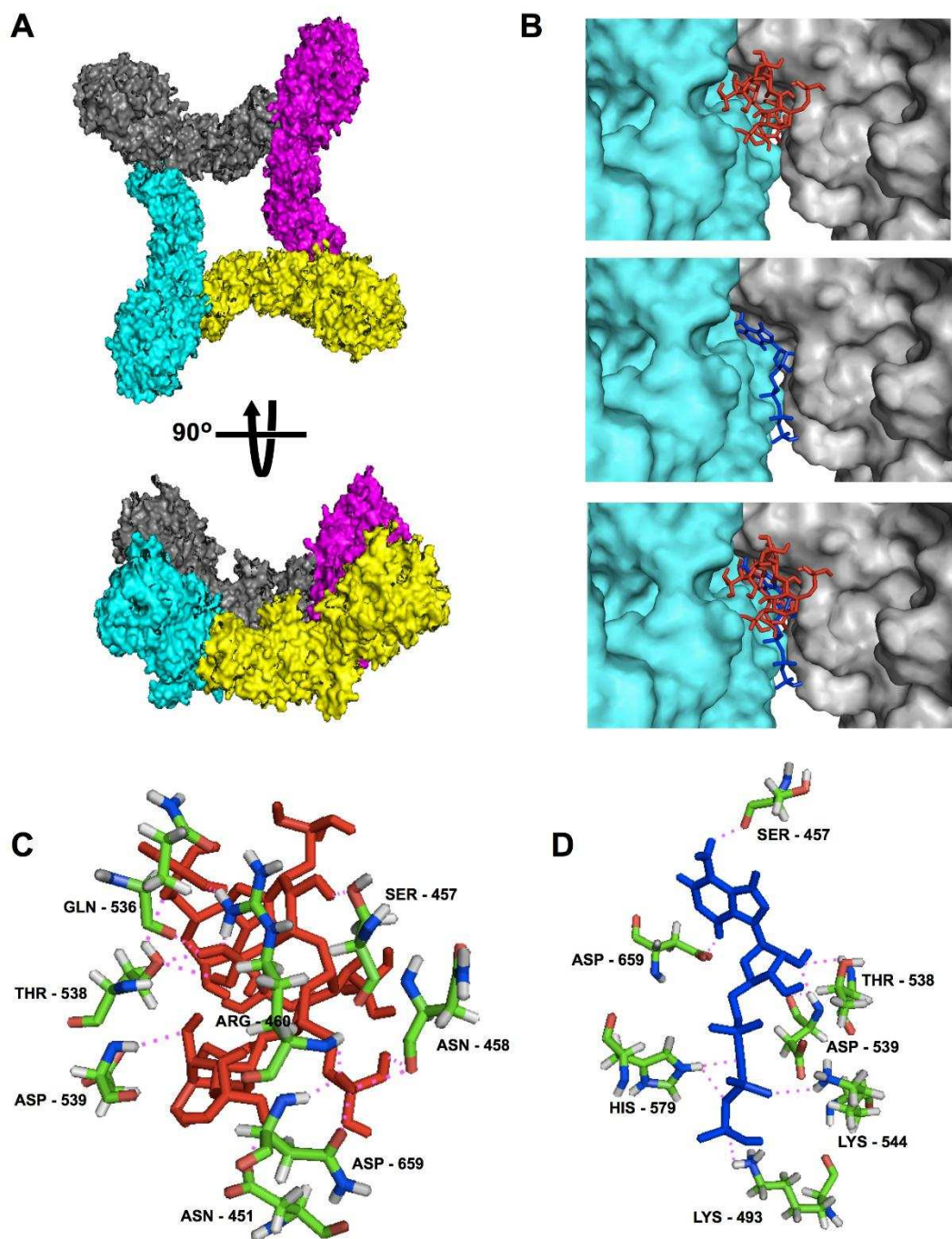


Fig 4. The structural modeling of the LPG3 complex and ligand-binding sites. A, Complex surface structure created by M-Zdock software; B, Predicted heparin and ATP-binding sites over intermolecular interface of contact between two LPG3 protein monomers and co-localization of heparin and ATP predicted sites; C, Predicted interactions between amino acids from heparin-binding site and heparin molecule; D, Predicted interactions between amino acids from ATP-binding site and ATP molecule. The surface structure of each LPG3 protein is represented by gray, cyan, purple, and yellow colors in A and B. Blue and red lines represent ATP and heparin molecules, respectively. Magenta dotted lines represent predicted polar contacts among atoms from LPG3 amino acids and ligand molecules.

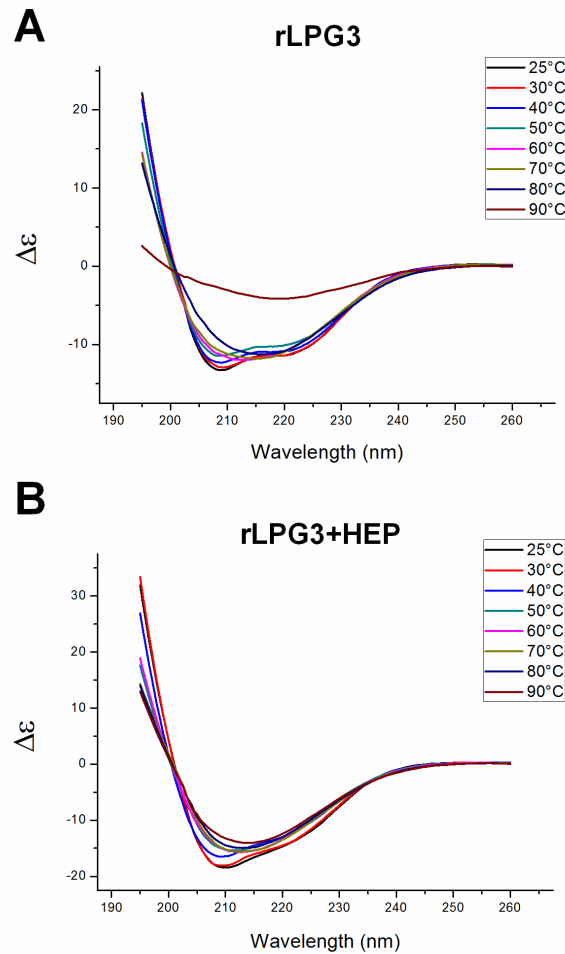


Fig 5. Thermal stability analysis of the rLPG3 secondary structure in the presence of heparin. A, rLPG3; and B, rLPG3 associated with heparin were analyzed by circular dichroism at different temperatures, as described in the methodology. HEP: heparin.

rLPG3 displays hydrolytic activity over ATP

ATPase activity assay was performed by incubating ATP with rLPG3 in the presence or absence of heparin for different intervals. ATP and ADP contents were determined by HPLC (Fig 6A and 6B, respectively). From 0.5 h, onward, the amount of ATP was reduced gradually, being practically depleted within 2.5 h (Fig 6C). When the protein was previously incubated with heparin, depletion of ATP took more than 3.5 h (Fig 6C), being suggestive of a catalytic inhibition promoted by heparin.

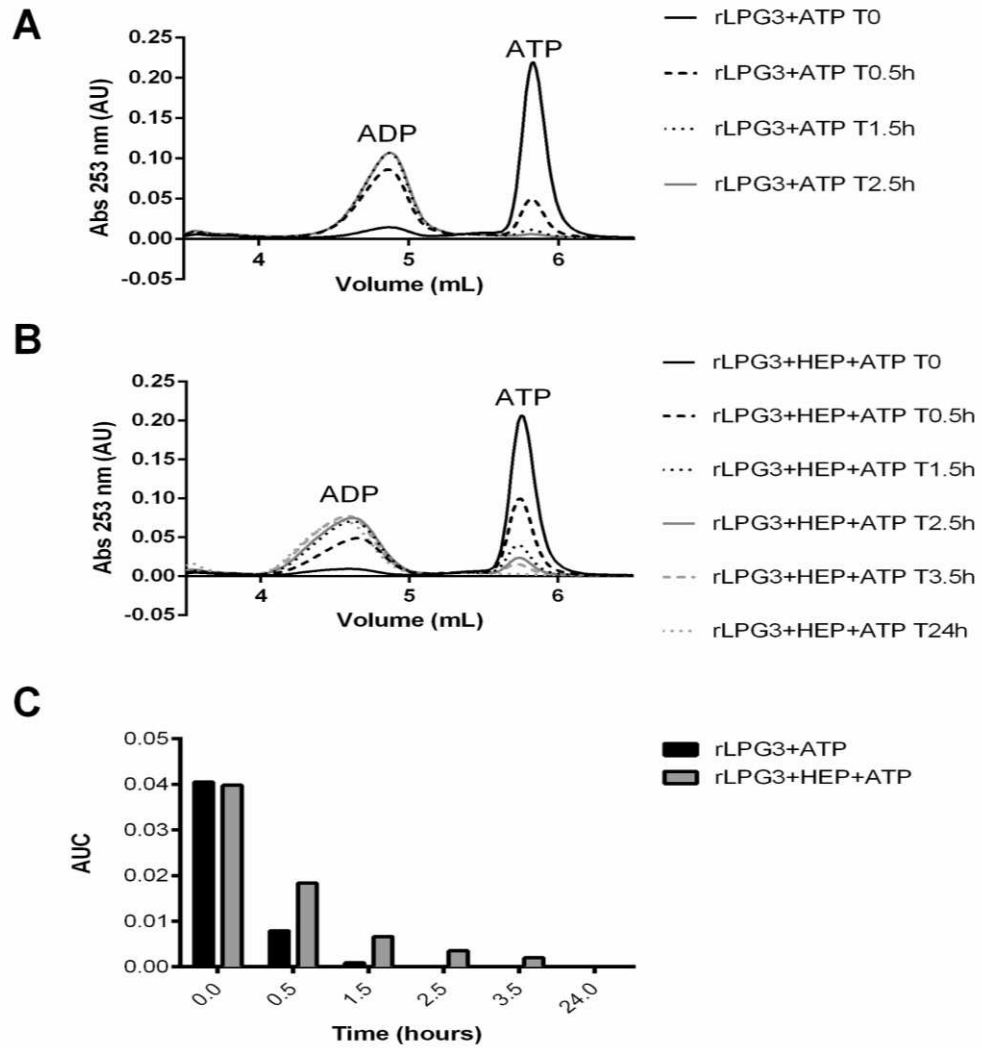


Fig 6. ATPase activity of rLPG3. The profile of adenosine nucleotides amounts after elution in DEAE-5PW anion exchange column: ATP and ADP were measured at 253 nm at different time intervals after incubation of ATP in the presence of rLPG3 or rLPG3 + heparin, as described in the methodology. AU, absorbance units. A, rLPG3 activity; B, rLPG3 + heparin activity; C, representative graphic of the area under the curve (AUC) for each ATPase activity at different time points.

Evolutionary analysis

Knowing that the LPG3 can interfere in the parasite infectivity [6], we used its amino acid sequence and functional heparin-binding domain to compare *L. infantum chagasi* with other trypanosomatids of medical importance. It was observed that the protein is highly conserved between the evaluated species, with 68% similarity to *T. cruzi*, 87% to *L. braziliensis*, 90% to *L. tarentolae*, 98% to *L. major* and *L. mexicana*, and 100% to *L. donovani* LPG3 (data not shown). The percentage of similarity of heparin-binding site from *L. infantum chagasi* was >89% for *T. cruzi*, 95% for *L. tarentolae* and *L.*

braziliensis, and 100% for the other evaluated species, revealing the evolutionary pressure for the conservation of this site (Fig 7A). We also observed heparin and ATP-binding sites overlapping after amino acids alignment using the program Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (black highlights in Fig 7A). Reconstruction of the evolutionary tree suggests that the LPG3 followed an evolutionary history similar to parasite speciation, allowing complete separation between *Trypanosoma* and *Leishmania* genus based on protein sequences (Fig 7B). This bias is strengthened by the presence of a clade associated with visceral *Leishmania* species (*L. infantum chagasi* and *L. donovani*) in the evolutionary model. The residues from the proposed heparin-binding site are highly conserved, which is suggestive of a critical role in protein function.

(LinJ.29.0790), *L. donovani* (LdBPK_290790.1), and *L. mexicana* (LmxM.08_29.0760) were aligned using the program Clustal Omega, as described in the methodology.

Discussion

Previously, we demonstrated that HBPLc participates in the infection by *L. infantum chagasi* promastigote forms in macrophages, as, when it is blocked with heparin, a decrease in infection was observed [6]. In the present study, we proposed elucidation of the biochemical and biophysical aspects of HBPLc related to its composition and functions.

In order to characterize the structural and functional properties of HBPLc, its partial sequencing was determined first. Data from the analysis using MALDI TOF-TOF mass spectrometer, confronted with MASCOT database, revealed that HBPLc is encoded by *LPG3* gene. In turn, *LPG3* gene codes for the sequence of a “Putative Lipophosphoglycan Biosynthetic Protein”, which has two functions already described: ATP binding and protein folding, derived from two functional domains (H⁺-ATPase_C and HSP90, respectively). Therefore, the ability to bind heparin is a novel function that described the protein coded by the *LPG3* gene.

The presence of HSP90 domain in *LPG3* gene suggests the importance of *LPG3* protein for the maintenance of the parasite life cycle, as HSP90 proteins contribute to the adaptation to stress caused during transmission of the insect vector to the mammalian host, where there is a change in the ambient temperature of over 10°C, which would be a key to trigger the promastigote to amastigote differentiation [36, 37]. On the other hand, HSPs can stimulate the innate immune response of the host, improving its adaptive immune response. In addition, they induce dendritic cells to produce pro-inflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, TNF- α , and IL-12 [38, 39], which consequently induce strong Th1 immune response and strong cellular immunity [40]. These observations lead us to consider *LPG3* protein as a strong candidate for anti-*Leishmania* vaccine, as also suggested by other authors [41-43].

In silico analysis of *LPG3* sequence allowed the detection of a signal sequence, which suggests that the secretion process responsible for the previously reported presence of the protein in the parasite vesicles and plasma membrane [6] probably occur through the canonical pathway. The observed presence of HBPLc in the plasma membrane suggests the presence of an uncleaved transmembrane signal or an interaction with protein and carbohydrate components of the parasite membrane.

rLPG3 was produced in the *E. coli* heterologous system and enable us to overcome limitations from previous studies, where limited amount of native protein was extracted and purified from the parasites [6]. The recombinant protein is highly soluble and produced in satisfactory purity grade, which was evident by the presence of a single peak after purification on Superdex 200 together with the presence of a single band of approximately 86 kDa on SDS-PAGE.

Gel filtration chromatography, non-denaturing electrophoresis and cross linking experiments suggests that LPG3 is organized mostly as a tetrameric complex. This is not surprising since previous studies have shown that porcine HSP90 are able to polymerize into tetrameric, hexameric and dodecameric complexes [44]. The model of the tetramer produced *in silico* suggests that it might be stabilized by heparin bond in the interface between two monomers. Its secondary structure is composed predominantly of α -helices, as predicted by *in silico* analysis and confirmed by circular dichroism, which revealed two negative peaks at around 208 and 222 nm. Circular dichroism spectra of the protein in varying temperatures indicates rLPG3 spectra transition between 40-50°C, with a shift suggestive of an enrichment in the content of beta-sheets, with the increase of a negative peak at ~ 215 nm. It also indicates that the protein remains structured in temperatures up to 80°C. It has been previously described that porcine HSP90 undergo a structural change between 53-63°C and that such change is important for the observed oligomerization of the protein in high temperatures [45, 46]. Therefore, it is possible that the observed changes in structure in rLPG3 generated by temperature increase are analogous to that described for porcine HSP90. Further studies are necessary to evaluate if the observed structural change in rLPG3 are also associated with the changes in the oligomerization states.

ITC analysis indicates that rLPG3 is able to bind to heparin sugar with micromolar affinity. Moreover, the fact that the presence of heparin stabilizes rLPG3 structure at high temperatures provide further evidence for interaction between them. It has been previously suggested that human HSP90 are anchored in the human cell surfaces through interactions with heparan sulfate proteoglycans (HSPGs), based on observations that treatment of cells with sodium chlorate, heparinase, and heparin leads to detachment of HSP90 from cell surface and inhibit binding of exogenous HSP90s [47]. Therefore, it is tempting to propose that rLPG3 could also interact with human cells using a similar mechanism.

ATP hydrolysis measurements allowed to infer that heparin displays an inhibitory activity towards ATP hydrolysis. *In silico* prediction suggests that such effect

would be the consequence of a superposition between the ATPase and heparin-binding domain. Interestingly, it has been shown that heparin blocks the binding of ATP in the protein Fibroblast growth factor 2 (FGF2) and that mutations in the heparin-binding site of this protein reduced the affinity for ATP [48]. Therefore, it is possible that certain general characteristics in the architecture of ATP-binding sites favors the binding of heparin, thus explaining the coincident effect of inhibition of ATP hydrolysis by heparin in both FGF2s and HSP90s.

Heparin-binding sites are commonly observed on the protein surface and correspond to shallow pockets of positive charge. A minimum requirement for binding that appears to be common among HBPs is the concentration of basic residues in a particular region of the protein surface (not necessarily near each other in a sequence), oriented in a geometry that matches the pattern of sulfate groups along heparin. Moreover, the presence of a geometry that can accommodate an elongated molecule seems to be necessary for the binding [2, 3, 49]. The molecular interactions that promote binding between heparin and protein are ionic interactions: wherein, positively charged clusters of basic amino acids form ion pairs with sulfo or carboxyl groups of negative charge in the heparin chain. However, in some cases, there is contribution of nonionic interactions such as hydrogen bond and hydrophobic forces, which may play a minor role in heparin-protein interaction [2]. The pattern of expected binding site was also observed in the binding model of heparin and rLPG3. Most of the amino acids near the binding site are composed of basic side chains as lysine, histidine and arginine. The enrichment of these amino acids suggests a positive formal charge of the binding site. Despite this, the model predicts the importance of another polar intermolecular interactions by stabilizing heparin binding, including hydrogen interactions with aspartate residues.

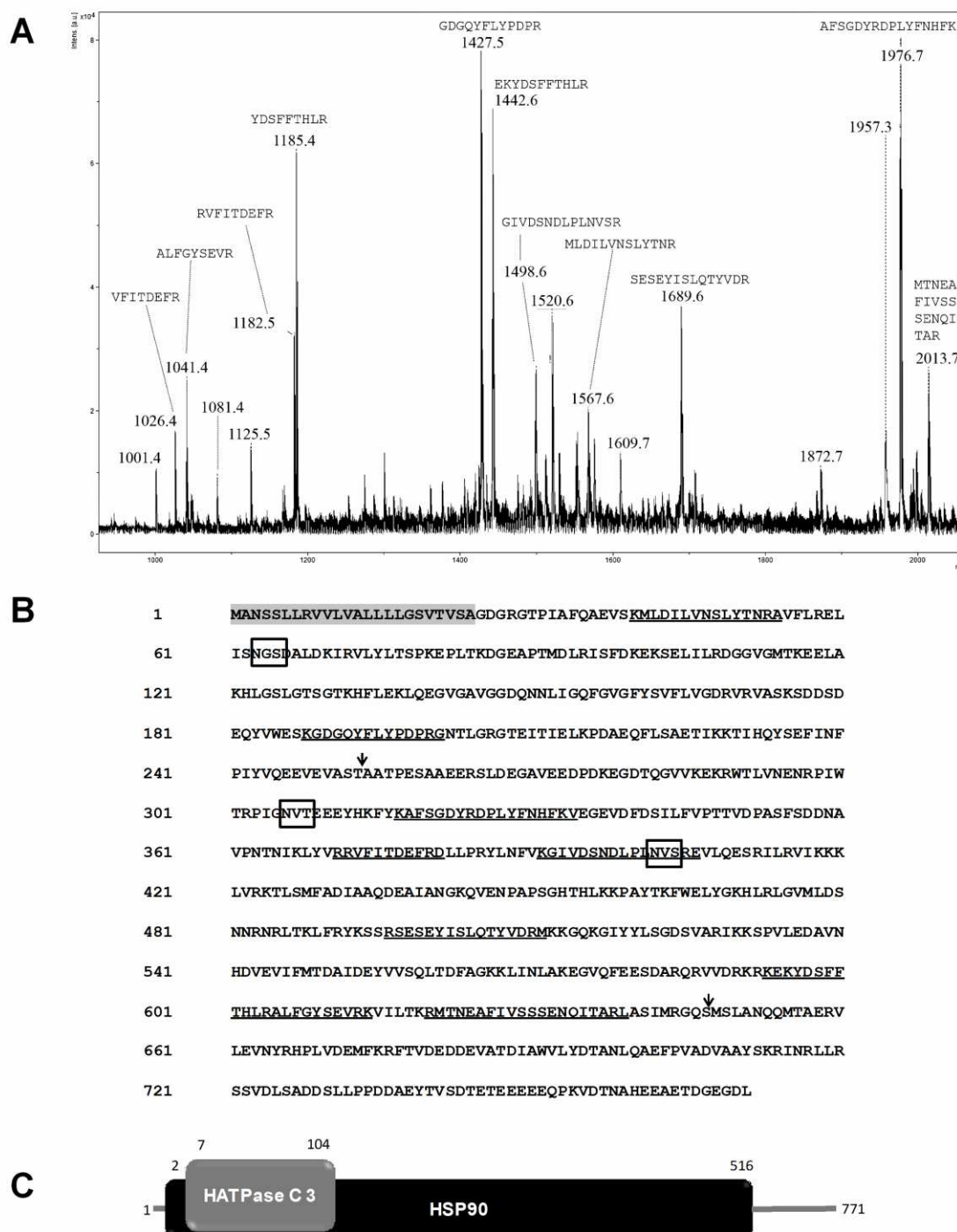
rLPG3 can bind to ATP and possess catalytic activity over this molecule to form ADP, as shown in the enzymatic activity assay, as is consistent with the presence of H⁺-ATPase domain described in the Pfam database. The parasites of the genus *Leishmania* are devoid of *de novo* synthesis of purine nucleotides and need to use preformed purine from the host environment to satisfy their demand for nucleotides, translocating these molecules through their plasma membrane [50]. ATP has previously been shown to be a “danger” extracellular signal induced by infection of pathogens or injury that can trigger different cellular events such as proliferation, differentiation and chemotaxis, release of cytokines and lysosomal constituents, and the generation of oxygen or nitrogen reactive species [51]. The ecto-ATPase activity of pathogens is an adaptive parasitic behavior that make these organisms more virulent because of their interference in the extracellular pro-

inflammatory content, as a result of a decrease in the extracellular ATP and a subsequent increase in ATP metabolites with anti-inflammatory properties and, additionally, in the case of trypanosomatides, they may be internalized and used to form purine nucleotides [52-54]. As the LPG3 is well distributed in the parasite plasma membrane [6], its involvement in the purine salvage process and parasite virulence mechanism is possible, even if not specialized for this activity since the catalytic activity occurs only on ATP but not on ADP differently from the other class of specialized proteins for such activity: the ecto-NTPDase (E-NTPDase) [55]. Interestingly, we also observed overlapping heparin and ATP-binding sites after analysis of amino acids alignment using the program Clustal Omega, which corroborate the results of *in silico* analysis and explains the observed changes in the hydrolytic activity from LPG3 over ATP. These results suggest that heparin possesses regulatory properties over the ATP metabolism and, consequently, over the acquisition of extracellular metabolites used to form purine nucleotides, as its bond to heparin-binding site in the parasite delays the process of ATP hydrolysis. Furthermore, the conservation of the heparin-binding domain of LPG3 between different parasite species demonstrates the importance of this protein to trypanosomatid biology. It is noteworthy that the participation of HBP in the parasite-host interaction proposed in this study deepens the knowledge on HBPLc function, since this has not yet been proposed for trypanosomatides. In addition, our findings about this novel function to LPG3 protein (the ability to recognize heparin carbohydrate) in addition to two features already described in the literature (the presence of HSP90 and H⁺-ATPase domains), reinforce that LPG3 plays a feasible role as a target for drug research and anti-*Leishmania* vaccine.

Acknowledgments

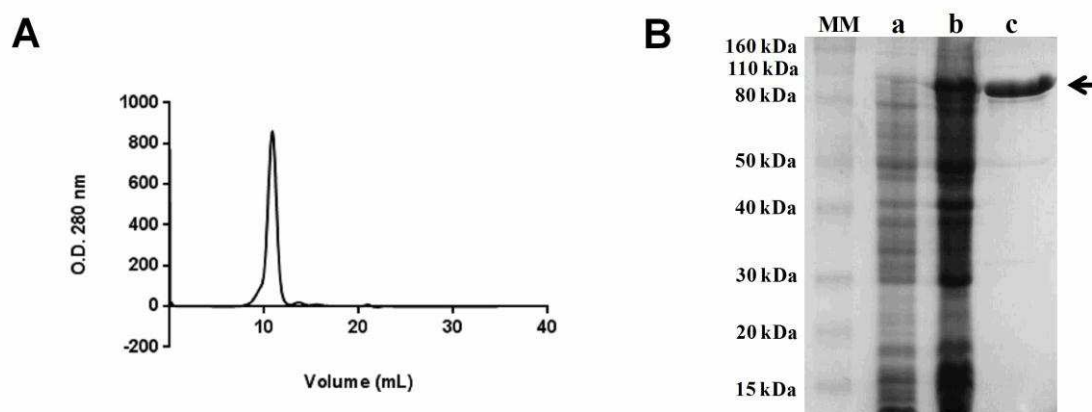
We are grateful to the Núcleo de Análise de Biomoléculas of the Universidade Federal de Viçosa for providing the facilities for the conduction of the experiments.

Supporting information



S1 Fig. Mass spectrometric and bioinformatics analysis of HBPLc. *A*, MALDI mass spectrum of reduced and alkylated HBPLc following incubation with trypsin. Monoisotopic masses of 18 proteolytic peptides are shown; *B*, Amino acid sequence of HBPLc determined from tryptic peptides by mass spectrometry (complete underline) and alignment in MASCOT database submitted to analysis in pBLAST implemented in UNIPROT KB: tr|A4I4C9|A4I4C9_LEIIN - Putative lipophosphoglycan biosynthetic protein; Gene: *LPG3*; Organism: *Leishmania infantum*. Identification in pBLAST inside TritrypDB: LinJ. 29.0790. The signal sequence (gray highlight)

was removed to optimize the construction of the plasmid; Squares indicate predicted *N*-linked glycosylation sites and arrows indicated predicted *O*-linked glycosylation site; *C*, Scheme of domains present in the protein with initiators and terminators amino acids.



S2 Fig. The rLPG3 purification. *A*, Chromatogram from rLPG3 purification; Supernatant of soluble proteins from *E. coli* Rosetta (DE3) strain cells transformed with pET 28 constructs with LPG3 gene was submitted to affinity chromatography on the nickel, heparin, and Superdex 200 columns, as described in the methodology; *B*, 12% SDS-PAGE of purified rLPG3; 15 μ g of protein were submitted to SDS-PAGE, and the gel was stained by Coomassie blue, as described in the methodology. MM: Molecular mass standard; a. Non-induced cultures; b. Induced cultures with 500 mM of imidazole; c. Purified rHBPLc.

References

1. Jorpes JE, Gardell S. On heparin monosulfuric acid. *J Biol Chem.* 1948;176(1):267-76. PubMed PMID: 18886167.
2. Capila I, Linhardt RJ. Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2002;41(3):391-412. PubMed PMID: 12491369.
3. Mottarella SE, Beglov D, Beglova N, Nugent MA, Kozakov D, Vajda S. Docking server for the identification of heparin binding sites on proteins. *J Chem Inf Model.* 2014;54(7):2068-78. doi: 10.1021/ci500115j. PubMed PMID: 24974889; PubMed Central PMCID: PMC4184157.
4. McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLoS Pathog.* 2013;9(1):e1003053. doi: 10.1371/journal.ppat.1003053. PubMed PMID: 23300451; PubMed Central PMCID: PMC4184157.

5. de Castro Cortes LM, de Souza Pereira MC, de Oliveira FO, Jr., Corte-Real S, da Silva FS, Pereira BA, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: insights on subcellular distribution and biochemical properties of heparin-binding proteins. *Parasitology*. 2012;139(2):200-7. doi: 10.1017/S0031182011001910. PubMed PMID: 22053722.
6. Martins TV, de Carvalho TV, de Oliveira CV, de Paula SO, Cardoso SA, de Oliveira LL, et al. *Leishmania chagasi* heparin-binding protein: Cell localization and participation in *L. chagasi* infection. *Mol Biochem Parasitol*. 2015;204(1):34-43. doi: 10.1016/j.molbiopara.2015.12.005. PubMed PMID: 26718393.
7. Azevedo-Pereira RL, Pereira MC, Oliveria-Junior FO, Brazil RP, Cortes LM, Madeira MF, et al. Heparin binding proteins from *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *Vet Parasitol*. 2007;145(3-4):234-9. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.12.019. PubMed PMID: 17292553.
8. Butcher BA, Sklar LA, Seamer LC, Glew RH. Heparin enhances the interaction of infective *Leishmania donovani* promastigotes with mouse peritoneal macrophages. A fluorescence flow cytometric analysis. *J Immunol*. 1992;148(9):2879-86. PubMed PMID: 1573275.
9. Mukhopadhyay NK, Shome K, Saha AK, Hassell JR, Glew RH. Heparin binds to *Leishmania donovani* promastigotes and inhibits protein phosphorylation. *Biochem J*. 1989;264(2):517-25. PubMed PMID: 2557842; PubMed Central PMCID: PMC1133610.
10. de Castro Cortes LM, de Souza Pereira MC, da Silva FS, Pereira BA, de Oliveira Junior FO, de Araujo Soares RO, et al. 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*. 2012;5:142. doi: 10.1186/1756-3305-5-142. PubMed PMID: 22805335; PubMed Central PMCID: PMC3419669.
11. Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(Database issue):D457-62. doi: 10.1093/nar/gkp851. PubMed PMID: 19843604; PubMed Central PMCID: PMC2808979.
12. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*. 1997;10(1):1-6. PubMed PMID: 9051728.

13. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*. 2011;8(10):785-6. doi: 10.1038/nmeth.1701. PubMed PMID: 21959131.
14. Fankhauser N, Maser P. Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics*. 2005;21(9):1846-52. doi: 10.1093/bioinformatics/bti299. PubMed PMID: 15691858.
15. Eisenhaber B, Bork P, Eisenhaber F. Sequence properties of GPI-anchored proteins near the omega-site: constraints for the polypeptide binding site of the putative transamidase. *Protein Eng*. 1998;11(12):1155-61. PubMed PMID: 9930665.
16. Pierleoni A, Martelli PL, Casadio R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:392. doi: 10.1186/1471-2105-9-392. PubMed PMID: 18811934; PubMed Central PMCID: PMC2571997.
17. Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput*. 2002:310-22. PubMed PMID: 11928486.
18. Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J*. 2013;32(10):1478-88. doi: 10.1038/emboj.2013.79. PubMed PMID: 23584533; PubMed Central PMCID: PMC3655468.
19. Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D279-85. doi: 10.1093/nar/gkv1344. PubMed PMID: 26673716; PubMed Central PMCID: PMC4702930.
20. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725-9. doi: 10.1093/molbev/mst197. PubMed PMID: 24132122; PubMed Central PMCID: PMC3840312.
21. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1751(2):119-39. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005. PubMed PMID: 16027053.
22. Seckler R, Wu GM, Timasheff SN. Interactions of tubulin with guanylyl-(beta-gamma-methylene)diphosphonate. Formation and assembly of a stoichiometric complex. *J Biol Chem*. 1990;265(13):7655-61. PubMed PMID: 2332445.

23. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc.* 2015;10(6):845-58. doi: 10.1038/nprot.2015.053. PubMed PMID: 25950237.
24. Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, Barton GJ. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W389-94. doi: 10.1093/nar/gkv332. PubMed PMID: 25883141; PubMed Central PMCID: PMC4489285.
25. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):235-42. PubMed PMID: 10592235; PubMed Central PMCID: PMC4489285.
26. Krieger E, Darden T, Nabuurs SB, Finkelstein A, Vriend G. Making optimal use of empirical energy functions: force-field parameterization in crystal space. *Proteins.* 2004;57(4):678-83. doi: 10.1002/prot.20251. PubMed PMID: 15390263.
27. Vriend G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph.* 1990;8(1):52-6, 29. PubMed PMID: 2268628.
28. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W407-10. doi: 10.1093/nar/gkm290. PubMed PMID: 17517781; PubMed Central PMCID: PMC4489285.
29. Pierce B, Tong W, Weng Z. M-ZDOCK: a grid-based approach for C_n symmetric multimer docking. *Bioinformatics.* 2005;21(8):1472-8. doi: 10.1093/bioinformatics/bti229. PubMed PMID: 15613396.
30. Pierce BG, Wiehe K, Hwang H, Kim BH, Vreven T, Weng Z. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics.* 2014;30(12):1771-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btu097. PubMed PMID: 24532726; PubMed Central PMCID: PMC4489285.
31. Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics.* 2004;20(1):45-50. PubMed PMID: 14693807.
32. Kozakov D, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, Hall DR, et al. How good is automated protein docking? *Proteins.* 2013;81(12):2159-66. doi: 10.1002/prot.24403. PubMed PMID: 23996272; PubMed Central PMCID: PMC4489285.

33. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455-61. doi: 10.1002/jcc.21334. PubMed PMID: 19499576; PubMed Central PMCID: PMC3041641.
34. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Web Server issue):W270-7. doi: 10.1093/nar/gkr366. PubMed PMID: 21624888; PubMed Central PMCID: PMC3125772.
35. DeLano WL. PyMOL: an open-source molecular graphics tool. *Ccp4 Newslett Protein Crystallogr* 2002;40.
36. Wiesgigl M, Clos J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell.* 2001;12(11):3307-16. PubMed PMID: 11694568; PubMed Central PMCID: PMC3041641.
37. Sundar S, Singh B. Identifying vaccine targets for anti-leishmanial vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 2014;13(4):489-505. doi: 10.1586/14760584.2014.894467. PubMed PMID: 24606556; PubMed Central PMCID: PMC4040457.
38. Gao B, Tsan MF. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. *J Biol Chem.* 2003;278(1):174-9. doi: 10.1074/jbc.M208742200. PubMed PMID: 12403778.
39. Kuppner MC, Gastpar R, Gelwer S, Nossner E, Ochmann O, Scharner A, et al. The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol.* 2001;31(5):1602-9. doi: 10.1002/1521-4141(200105)31:5<1602::AID-IMMU1602>3.0.CO;2-W. PubMed PMID: 11465118.
40. Tobian AA, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross-presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. *J Immunol.* 2004;172(9):5277-86. PubMed PMID: 15100266.
41. Larreta R, Guzman F, Patarroyo ME, Alonso C, Requena JM. Antigenic properties of the *Leishmania infantum* GRP94 and mapping of linear B-cell epitopes. *Immunol Lett.* 2002;80(3):199-205. PubMed PMID: 11803053.

42. Descoteaux A, Avila HA, Zhang K, Turco SJ, Beverley SM. *Leishmania* LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. *EMBO J.* 2002;21(17):4458-69. PubMed PMID: 12198148; PubMed Central PMCID: PMCPMC126187.
43. Abdian N, Gholami E, Zahedifard F, Safaee N, Rafati S. Evaluation of DNA/DNA and prime-boost vaccination using LPG3 against *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice and its antigenic properties in human leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2011;127(3):627-36. doi: 10.1016/j.exppara.2010.12.007. PubMed PMID: 21187087.
44. Moullintraffort L, Bruneaux M, Nazabal A, Allegro D, Giudice E, Zal F, et al. Biochemical and biophysical characterization of the Mg²⁺-induced 90-kDa heat shock protein oligomers. *J Biol Chem.* 2010;285(20):15100-10. doi: 10.1074/jbc.M109.094698. PubMed PMID: 20228408; PubMed Central PMCID: PMCPMC2865268.
45. Chadli A, Ladjimi MM, Baulieu EE, Catelli MG. Heat-induced oligomerization of the molecular chaperone Hsp90. Inhibition by ATP and geldanamycin and activation by transition metal oxyanions. *J Biol Chem.* 1999;274(7):4133-9. PubMed PMID: 9933607.
46. Garnier C, Protasevich I, Gilli R, Tsvetkov P, Lobachov V, Peyrot V, et al. The two-state process of the heat shock protein 90 thermal denaturation: effect of calcium and magnesium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;249(1):197-201. PubMed PMID: 9705856.
47. Snigireva AV, Vrublevskaya VV, Afanasyev VN, Morenkov OS. Cell surface heparan sulfate proteoglycans are involved in the binding of Hsp90alpha and Hsp90beta to the cell plasma membrane. *Cell Adh Migr.* 2015;9(6):460-8. doi: 10.1080/19336918.2015.1103421. PubMed PMID: 26651243; PubMed Central PMCID: PMCPMC4955955.
48. Rose K, Pallast S, Klumpp S, Krieglstein J. ATP-binding on fibroblast growth factor 2 partially overlaps with the heparin-binding domain. *J Biochem.* 2008;144(3):343-7. doi: 10.1093/jb/mvn072. PubMed PMID: 18511454.
49. Forster M, Mulloy B. Computational approaches to the identification of heparin-binding sites on the surfaces of proteins. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt 3):431-4. doi: 10.1042/BST0340431. PubMed PMID: 16709179.

50. Marr JJ, Berens RL, Nelson DJ. Purine metabolism in *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis*. *Biochim Biophys Acta*. 1978;544(2):360-71. PubMed PMID: 719006.
51. F. DV, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*. 2001;97(3):587-600.
52. Silverman JA, Qi H, Riehl A, Beckers C, Nakaar V, Joiner KA. Induced activation of the *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase leads to depletion of host cell ATP levels and rapid exit of intracellular parasites from infected cells. *J Biol Chem*. 1998;273(20):12352-9.
53. Marques-da-Silva dA, de Oliveira JC, Figueiredo AB, de Souza Lima JD, Carneiro CM, Rangel Fietto JL, et al. Extracellular nucleotide metabolism in *Leishmania*: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes Infect*. 2008;10(8):850-7.
54. Bisaggio DF, Peres-Sampaio CE, Meyer-Fernandes JR, Souto-Padron T. Ecto-ATPase activity on the surface of *Trypanosoma cruzi* and its possible role in the parasite-host cell interaction. *Parasitol Res*. 2003;91(4):273-82. doi: 10.1007/s00436-003-0965-8. PubMed PMID: 14574556.
55. Cohn CS, Gottlieb M. The acquisition of purines by trypanosomatids. *Parasitol Today*. 1997;13(6):231-5. PubMed PMID: 15275076.

CAPÍTULO II

PROTEÍNA RECOMBINANTE LPG3 DE *Leishmania infantum chagasi*: UM PROMISSOR ANTÍGENO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Thaís Viana Fialho Martins¹, Anna Cláudia Alves de Souza², Bianca Meireles Miranda¹, Ronny Francisco de Souza², Maria Terezinha Bahia³, Leandro Licursi de Oliveira¹, Juliana Lopes Rangel Fietto², Eduardo de Almeida Marques-da-Silva¹

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

³ Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil

PROTEÍNA RECOMBINANTE LPG3 DE *Leishmania infantum chagasi*: UM PROMISSOR ANTÍGENO PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Resumo

A leishmaniose visceral canina (LVC), causada pelo parasito intracelular *Leishmania infantum chagasi*, é foco de diversos estudos devido à relevância do cão como importante reservatório para a transmissão do parasito para humanos em meio urbano. O diagnóstico correto e precoce da LVC é de suma importância para o tratamento e possível cura da doença. Porém, as técnicas utilizadas apresentam limitações que justificam o aprimoramento do diagnóstico. Proteínas recombinantes são fortes candidatas a marcadores para sorodiagnóstico, uma vez que aumentam a sensibilidade e especificidade dos testes e apresentam alto potencial de padronização. A proteína LPG3 de *L. infantum chagasi* é importante para o metabolismo do parasito e é capaz de interferir no processo de infecção em células de mamíferos, o que sugere seu uso como marcador para o sorodiagnóstico da LVC. Nesse trabalho, o gene codificante de LPG3 foi sintetizado e expresso em sistema heterólogo e a proteína foi purificada e utilizada como antígeno em ensaio de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) para detectar anticorpos específicos contra *L. infantum chagasi* em soros de cães positivos para LVC. Um total de 397 amostras de soros foram testados e os resultados mostraram sensibilidade de 79-87% e especificidade de 63-83%, indicando o potencial da LPG3 recombinante para aplicação no diagnóstico imunológico da LVC.

Palavras chaves: LPG3; *Leishmania infantum chagasi*; imunodiagnóstico; ELISA.

Introdução

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que são parasitos intracelulares obrigatórios transmitidos a hospedeiros vertebrados pela picada de flebotomíneos fêmea durante o repasto sanguíneo. Sua incidência global é de 700 mil a 1,2 milhão de casos de leishmaniose cutânea (LC) e 200 a 400 mil casos de leishmaniose visceral (LV), afetando 12 milhões de pessoas com 350 milhões vivendo em áreas de risco para a infecção (Alvar et al., 2012).

A LV é uma doença potencialmente fatal que representa um grave problema de saúde pública, com incidência principal nas Américas Central e do Sul e em países do Mediterrâneo. A doença é responsável por cerca de 20 a 40 mil mortes por ano no mundo, incluídos os casos causados por *Leishmania donovani* e *L. infantum chagasi* no Velho Mundo e *L. infantum chagasi* no Novo Mundo (Mccall; Zhang; Matlashewski, 2013). Mais recentemente a doença tem se espalhado para áreas não-endêmicas como Canadá, Estados Unidos, Itália e Alemanha (Petersen; Barr, 2010; Ready, 2010).

Os cães são os reservatórios domésticos de *Leishmania* e são epidemiologicamente importantes no processo de urbanização das leishmanioses. Além de representarem um risco zoonótico para as populações humanas em áreas endêmicas, os cães podem sofrer de uma doença grave, leishmaniose visceral canina (LVC), caracterizada por uma vasta gama de sinais clínicos que se manifestam apenas alguns meses após a exposição à infecção (alterações na pele, perda de peso e linfadenomegalia generalizada) com risco de morte (Manzillo et al., 2013; Otranto; Dantas-Torres, 2013).

A identificação de cães infectados, juntamente com o precoce e correto diagnóstico da leishmaniose tanto em animais quanto em humanos, são estratégias para o controle da dispersão e mortalidade causada pela doença (Lainson; Rangel, 2005). Dentre as estratégias utilizadas para o controle de doenças infecciosas em geral, o imunodiagnóstico tem sido essencial para demonstrar infecção, para estudos de acompanhamento das doenças e como ferramentas para monitorar as estratégias de controle e assistência à vigilância em campanhas de prevenção e controle (Peeling; Nwaka, 2011). Portanto, o desenvolvimento de técnicas de imunodiagnóstico aplicadas às leishmanioses é de suma importância para o controle da doença em qualquer das suas formas clínicas, incluindo a LV e LVC.

É importante ressaltar que técnicas de diagnóstico baseadas na visualização dos parasitos em esfregaços de medula óssea e aspirados de baço, fígado e linfonodos são invasivos, dependem de muito tempo e não são apropriados para vigilância epidemiológica. Os métodos convencionais utilizados no diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), portanto, são os testes sorológicos de aglutinação direta, imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático (ELISA), que, por sua vez, geram resultados falso-positivos em cães infectados com outros agentes infecciosos. Essa reação cruzada com antígenos de animais co-infectados é fator limitante para a especificidade dos testes sorológicos (Barbosa-De-Deus et al., 2002; Gomes et al., 2008; Piarroux et al., 1994), que requerem a busca de antígenos que permitam melhor discriminação da LVC em relação a outras doenças infecciosas.

Proteínas recombinantes de *Leishmania* têm sido utilizadas como alvo para sorodiagnóstico em busca de melhores sensibilidade e especificidade. Neste cenário, várias proteínas mostram resultados promissores quando utilizadas como antígenos para o imunodiagnóstico, como as proteínas CatL, K39, LACK, KMPII, TRYP, rLic-NTPDase 2 e proteínas heat shock (Francisco-De-Souza et al., 2013; Menezes-Souza et al., 2015; Quijada et al., 1998; Scalone et al., 2002; Souza et al., 2013; Todolí et al., 2009).

A proteína LPG3 foi recentemente estudada pelo nosso grupo e foi constatada sua capacidade de ligação ao polissacarídeo heparina. Essa característica ainda não havia sido reportada na literatura, onde havia apenas a descrição das funções preditas de ligação a ATP e dobramento de proteínas, derivadas de dois domínios funcionais: HATPase_C e HSP90, respectivamente. Além da capacidade de ligação ao açúcar, nós mostramos por ensaios *in situ* a capacidade hidrolítica da LPG3 sobre ATP e, também, que a heparina compete pelo sítio de ligação ao ATP, interferindo na atividade ATPásica da proteína (dados em publicação). Esses resultados sugerem que a heparina possui propriedades reguladoras sobre o metabolismo de ATP, e consequentemente, sobre aquisição de metabólitos extracelulares usados para formar nucleotídeos de purina. É importante ressaltar que a LPG3 é a proteína ligante de heparina de *L. infatum chagasi* (PLHLc), que participa do processo de infecção de macrófagos por formas promastigotas de *L. infatum chagasi*, uma vez que bloqueada com heparina, o processo de infecção é reduzido (Martins et al., 2015).

No presente trabalho, a proteína LPG3 recombinante (rLPG3) foi expressa e purificada para ser empregada como antígeno em ensaio de ELISA, investigando seu potencial de aplicação no diagnóstico sorológico da LVC. 397 soros de cães com leishmaniose visceral, outras infecções e soros controles foram utilizados no ensaio e a proteína rLPG3 se mostrou promissora para esta aplicação.

Material e Métodos

Expressão e Purificação da proteína recombinante LPG3

A sequência de DNA que codifica a LPG3 foi sintetizada *in vitro* pela empresa GENONE (GENONE soluções em biotecnologia – Rio de Janeiro, RJ, BR) e clonada em vetor de clonagem pUC19 nos sítios de restrição *NdeI* e *XhoI*. O gene foi sub-clonado em vetor pET 28a(+) (Novagen, San Diego, CA, USA). Bactérias *E. coli* DH5α foram transformadas com o plasmídeo modificado para a propagação dos vetores contendo o inserto de interesse. A proteína recombinante foi expressa em *E. coli* Rosetta (DE3) transformada com o plasmídeo pET 28 e crescida a 37°C em meio Luria-Bertani (LB)

suplementado com kanamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL) até atingir densidade ótica entre 0,6 e 0,8, seguida pela expressão induzida por 0,5 mM de isopropyl β-D-thiogalactosideo (IPTG) em meio LB a 18°C/16 h com agitação.

As células foram lisadas por sonicação em tampão fosfato de sódio 10 mM/ cloreto de sódio 150 mM, pH 7,0 (tampão A). O sobrenadante de proteínas solúveis foi submetido a cromatografia de afinidade em coluna de níquel Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Germany) equilibrada com tampão A e as proteínas imobilizadas foram eluídas em tampão A + imidazol 500 mM (tampão B). Subsequentemente, os eluatos foram separados por cromatografia em coluna Superdex 200 10/300 GL em sistema automatizado FPLC (*Äkta Purifier*, GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Germany), com fluxo de 1 mL/min e monitorizada pela leitura de absorbância em 280 nm. A fração de interesse foi coletada e analisada por SDS-PAGE 12% e eletroforese por capilaridade em aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

Amostras de soro

Um total de 397 amostras de soros de cães foram utilizadas para o ensaio de ELISA. Destas, 48 amostras são provenientes de área endêmica para LVC (Caratinga, MG, Brasil) e positivas por imunofluorescência indireta (IFA-positivos). Essas amostras foram agrupadas em 16 amostras de cães assintomáticos, 16 amostras de cães oligossintomáticos e 16 amostras de cães polissintomáticos. Outro grupo corresponde a 155 amostras positivas para leishmaniose testados por teste rápido DPP® Bio-Manguinhos (Instituto de tecnologia em imunobiológicos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e confirmados por ELISA kit Bio-Manguinhos, também provenientes de área endêmica (Governador Valadares, MG, Brasil). Soros negativos para leishmaniose (30 amostras) foram obtidos de animais de biotério não infectados e confirmados por sorodiagnóstico e exame parasitológico. Soros de cães experimentalmente infectados por *T. cruzi* (39 amostras) e provenientes de áreas não-endêmicas para leishmaniose foram utilizados para teste de reação cruzada. Todas essas amostras compõem a biblioteca de soros da Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP e foram cedidos pela Professora Dra. Maria Terezinha Bahia. Outras amostras positivas para leishmaniose foram utilizadas: amostras provenientes da Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ) confirmadas por RIFI e por RIFI e ELISA kit Bio-Manguinhos (43 e 41 amostras, respectivamente) e 31 amostras provenientes da Fiocruz (sede Belo Horizonte, MG) testadas por exame parasitológico. Por fim, 10 amostras de soros de cães positivos para Erlichiose, provenientes da Fiocruz, também foram utilizados para teste de reação cruzada. Este

segundo grupo de soros foram cedidos pela Professora Dra. Celeste da Silva Freitas de Souza, do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia da FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Ensaio de ELISA

Microplacas de fundo chato de 96 poços foram cobertas com 0,5 µg de rLPG3 em tampão de cobertura ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9,6) a 4°C/18 h. As placas foram lavadas quatro vezes com PBS-0,05% Tween 20 e bloqueadas com PBS-3% BSA por 1 h em temperatura ambiente. Soro de cães diluídos 1:40 em PBS-1% BSA foram adicionados e incubados por 1 h em temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-0,05% Tween 20, anticorpos anti-IgG de cão, produzidos em coelho, conjugado com peroxidase (1:5000) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foram adicionados e o material foi incubado por 1 h em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas com PBS-0,05% Tween 20 e foram adicionados, por poço, 100 µL de substrato 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) sal diamônio (ABTS) (Sigma-Aldrich) em tampão citrato contendo peróxido de hidrogênio. A reação foi parada após 30 min em temperatura ambiente com SDS 1% e a leitura de absorbância foi feita a 405 nm. Cada amostra de soro foi avaliada em triplicata.

Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 6.0. O valor de ponto de corte (“cut-off”) para a rLPG3 foi estabelecido usando a “Receiver Operating Characteristic” (Curva ROC). O ponto de corte foi escolhido baseado nos melhores valores de sensibilidade e especificidade. Para os cálculos foram utilizados as seguintes fórmulas: valores preditivos positivos = $\text{VP}/(\text{VP} + \text{FP}) \times 100$, valores preditivos negativos = $\text{VN}/(\text{VN} + \text{FN}) \times 100$ e acurácia = $\text{VP} + \text{FN}/(\text{VP} + \text{FP} + \text{VN} + \text{FN}) \times 100$, onde VP são valores verdadeiramente positivos, FP falso-positivos, VN verdadeiramente positivos e FN valores falso-negativos. A significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA) e pelo teste de Tukey onde valores de $P < 0,001$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

Expressão e purificação do antígeno rLPG3 de *L. infantum chagasi*

A proteína rLPG3 foi expressa em *E. coli* e, após lise das células e remoção de frações insolúveis, foi purificada em coluna de afinidade contendo níquel imobilizado

(Ni-NTA), seguida de purificação por afinidade em coluna de heparina e ainda submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. O rendimento da purificação foi estimado entre 14 e 16 mg/L e a massa molecular da rLPG3 após os procedimentos de purificação foi avaliado por SDS-PAGE 12%, revelando uma única banda de aproximadamente 86 kDa (dados não mostrados). Este dado foi confirmado por técnica altamente sensível de eletroforese por capilaridade acoplada a detecção por fluorescência, verificando-se grau de pureza de 94,7% (Fig 1). Este antígeno purificado foi então testado para o imunodiagnóstico da LVC usando a técnica de ELISA.

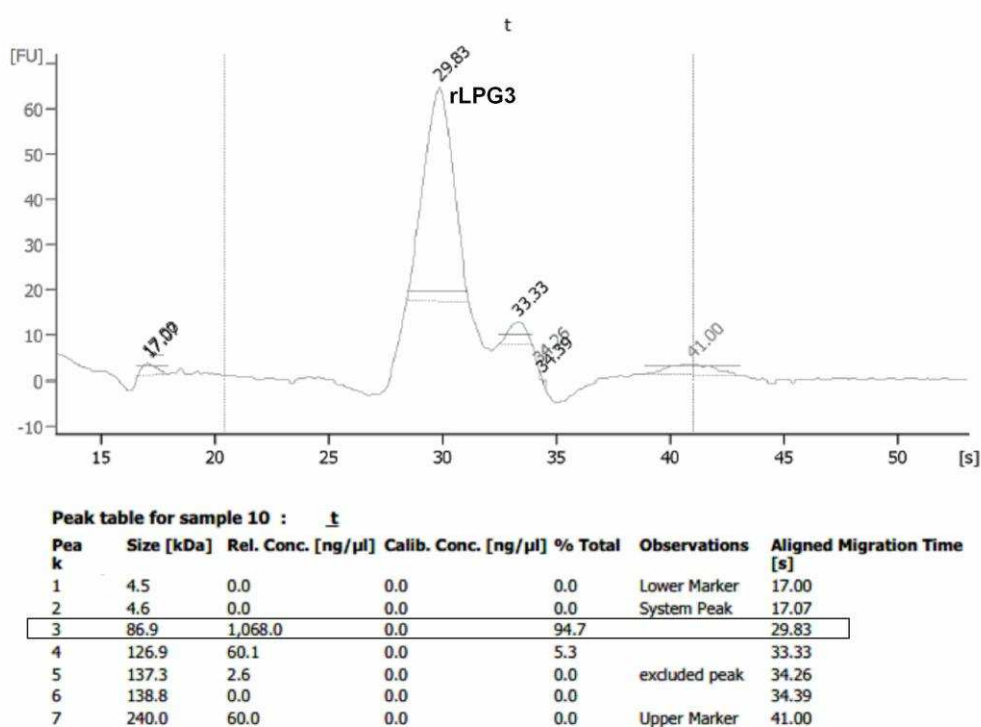


Figura 1: Análise da pureza de rLPG3 por eletroforese capilar. A pureza de rLPG3 foi avaliada utilizando a proteína purificada aplicada em Kit LabChip® Agilent Protein 230 (Agilent 2100 Bioanalyzer); Quantificação dos resultados: rLPG3 foi detectada apresentando 86,9 kDa, amostra concentrada a 1,068 ng/μL e grau de pureza de 94,7%.

Performance do antígeno rLPG3 no imunodiagnóstico da LVC

A proteína recombinante foi avaliada para o sorodiagnóstico da LVC como antígeno de cobertura em placas de ELISA. Inicialmente foram testadas diferentes concentrações de antígeno recombinante para melhor sensibilização das placas. Concentrações de 0,05, 0,1 e 0,5 μg de proteína foram avaliadas para três concentrações

de soro diferentes, em diluições 1:40, 1:80 e 1:160, de 3 amostras conhecidamente positivas e 3 negativas da biblioteca de soros (LVC-positivos e LVC-negativos, respectivamente). Assim, foi observado que 0,5 µg de antígeno por poço e fator de diluição do soro de 1:40 proporcionaram melhor discriminação dos valores de densidade óptica entre os grupos de amostras avaliadas (dados não mostrados). Padronizadas a massa de antígeno e a diluição dos soros a serem utilizadas, todas as amostras da biblioteca de soros foram testadas em triplicata (30 amostras LVC-negativas, 39 LVC-negativas/chagas-positivas, 10 LVC-negativas/erlichiose-positivas e 318 LVC-positivas). O valor de “cut-off” foi determinado por análise da curva ROC, buscando o melhor valor de sensibilidade e especificidade (“cut-off” = 0,151) apontado pela curva (Fig 2 e Tabela 1).

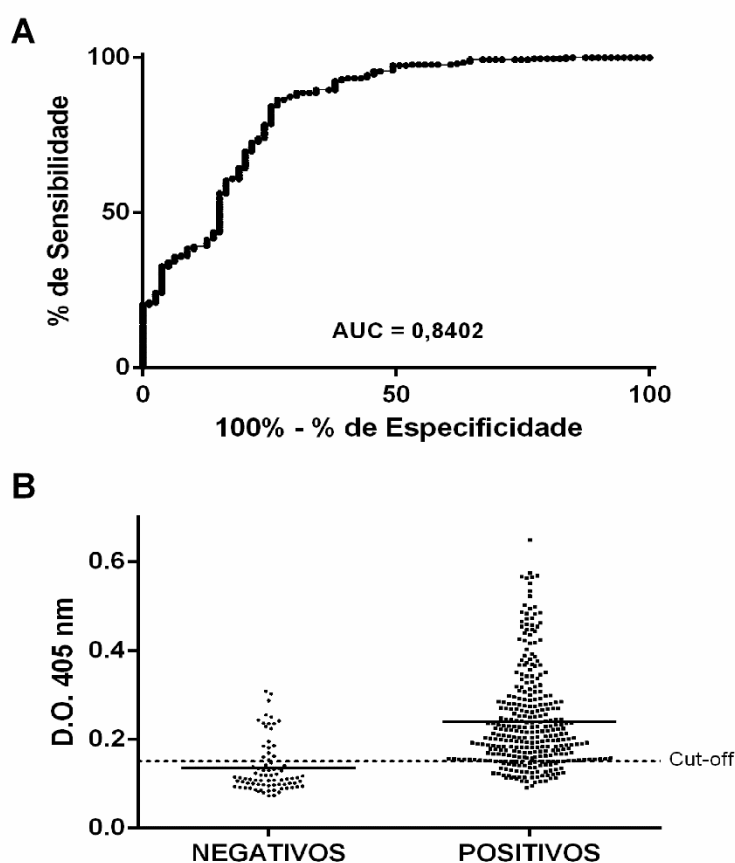


Figura 2: Curva ROC e box plot obtidos para o antígeno rLPG3. (A) Curva ROC utilizada para determinar “cut-off”, sensibilidade, especificidade do teste de ELISA; (B) Análise total do ensaio de ELISA usando rLPG3 e toda biblioteca de soros - 30 amostras LVC-negativas, 39 LVC-negativas/chagas-positivas, 10 LVC-negativas/erlichiose-positivas e 318 LVC-positivas; diluição do soro 1:40; AUC: área sob a curva.

O teste feito com a proteína recombinante apresentou valor de sensibilidade de 83,96% e 81,13% pela curva Roc e pelo valor absoluto encontrado, respectivamente (Tabelas 1 e 2).

A especificidade da rLPG3 no ensaio de ELISA foi determinado usando resultados obtidos de cães sadios (verdadeiramente negativos), soros de cães apresentando Doença de Chagas e Erlichiose. Os resultados apresentaram 74% de especificidade (Tabelas 1 e 2). Isto demonstra que a rLPG3 apresenta uma certa reatividade cruzada, principalmente com soros de cães acometidos por Erlichiose, uma vez que de 39 amostras chagas-positivos, apenas 9 reagiram cruzadamente, diferente do observado em amostras erlichiose-positivos, onde 9 das 10 amostras apresentaram reação cruzada (Fig 3).

A acurácia do teste analisado pela curva ROC, foi dada pela área sob a curva, apresentando valor de AUC=0,8402 (Fig 2). As análises estatísticas mostraram diferenças entre os grupos controle e todos os outros grupos avaliados, exceto o grupo de animais acometidos pela doença de chagas (Fig 3).

Tabela 1: Performance do diagnóstico com antígeno rLPG3 de *L. infantum chagasi* usando a Curva ROC

Teste (ROC)	“Cut-off”	S (%)	IC 95%	E (%)	IC 95%
rLPG3	0,151	83,96	79,46 – 87,82	74,68	63,64 – 83,80

S (sensibilidade); E (especificidade); IC (intervalo de confiança)

Dados curva ROC

Tabela 2: Performance do diagnóstico com antígeno rLPG3 de *L. infantum chagasi*

Teste	“Cut-off”	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	AC (%)
rLPG3	0,151	81,13	74,68	92,80	49,57	79,84

S (sensibilidade); E (especificidade); VPP (valor preditivo positivo); VPN (valor preditivo negativo); AC (acurácia do teste), onde:

$S = VP / (VP + FN) \times 100$; $E = VN / (FP + VN) \times 100$; $VPP = VP / (VP + FP) \times 100$; $VPN = VN / (VN + FN) \times 100$; $AC = VP + FP / (VP + FP + VN + FN) \times 100$.

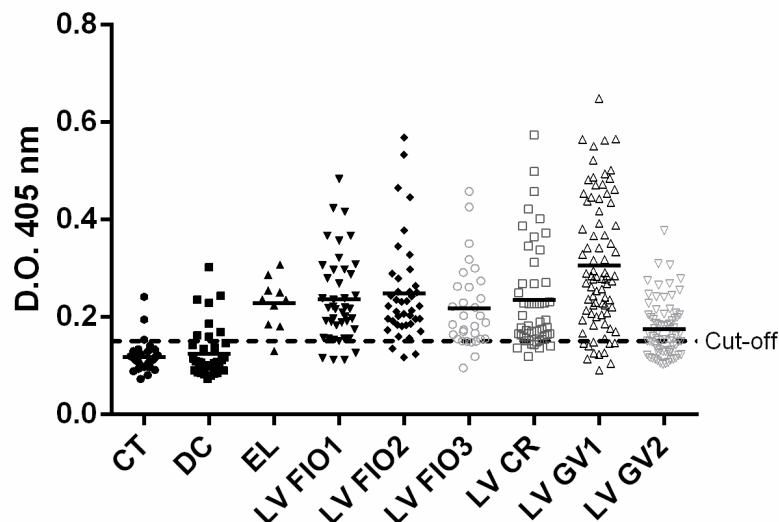


Figura 3: Ensaio de ELISA utilizando o antígeno rLPG3. Amostras de soros de toda a biblioteca, comparados por grupo; CT: controle LVC-negativos; DC: LVC-negativos/chagas-positivos; EL: LVC-negativos/erlichiose-positivos; LV FIO1: LVC-positivos Fiocruz RJ RIFI-positivos; LV FIO2: LVC-positivos Fiocruz RJ RIFI e ELISA positivos; LV FIO3: LVC-positivos Fiocruz BH parasitológico-positivos; LV CR: LVC-positivos Caratinga IFA-positivos; LV GV1: LVC-positivos Governador Valadares ELISA-positivos; LV GV2: LVC-positivos Governador Valadares parasitológico-positivos. Valores de $P < 0,001$ foram considerados estatisticamente significantes.

Discussão

O sucesso do tratamento das leishmanioses depende em grande parte do precoce e correto diagnóstico da doença. Técnicas de sorodiagnóstico são ferramentas utilizadas para a investigação das leishmanioses, pois as mesmas possibilitam fácil manuseio das amostras, coleta pouco invasiva e facilidade de testar várias amostras ao mesmo tempo (Mendes et al., 2013; Souza et al., 2013). Entretanto, o fato de nenhuma técnica de sorodiagnóstico poder ser utilizada como padrão-ouro tanto para pacientes humanos quanto animais é uma limitação para o controle da doença. Como consequência, liberação de resultados falso-negativos normalmente ocorre, o que influencia na dificuldade de controle (Paiva-Cavalcanti et al., 2015).

Proteínas associadas à infecção e à sobrevivência intracelular dos parasitos são importantes alvos para o imunodiagnóstico, uma vez que, quando secretadas ou expressas na superfície dos parasitos, normalmente são importantes marcadores celulares (Silverman et al., 2010). Neste contexto, rLPG3 é potencial alvo, uma vez que é expressa e secretada para a superfície celular (Descoteaux et al., 2002; Martins et al., 2015) e

interfere no processo de infecção parasitária às células de mamíferos (Martins et al., 2015).

Antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) são as proteínas parasitárias mais comumente empregadas no diagnóstico das leishmanioses por ELISA. As técnicas realizadas com SLA apresentam alta sensibilidade, porém inconsistência na especificidade, gerando resultados falso positivos em casos de doença de Chagas (Souza et al., 2013). Assim, vários grupos de pesquisa atualmente estão à procura de proteínas recombinantes para o emprego no diagnóstico das leishmanioses. Esses antígenos podem ser padronizados e são mais seguros do que os antígenos totais, pois não exigem a manutenção e o processamento de parasitos vivos, além de gerarem amostras puras e homogêneas (Menezes-Souza et al., 2015). A proteína rLPG3 foi expressa por nós em sistema heterólogo e foi obtida uma amostra com alto teor de pureza, própria para aplicação no imunodiagnóstico por ELISA. Os resultados encontrados mostram que o antígeno rLPG3 tem alto potencial para o imunodiagnóstico, pois a capacidade de detecção de anticorpos em soro de cães com LVC (79-87% de sensibilidade), foi próxima à obtida com a proteína recombinante K39, que quando utilizada em teste rápido para leishmaniose visceral, proporciona 87-93% de sensibilidade (Braz et al., 2002; Maia et al., 2012), e comparável à obtida com os antígenos A2 (Carvalho et al., 2002) e rCatL (Menezes-Souza et al., 2015), que apresentam sensibilidade de 87% e 80% para a LVC, respectivamente.

O teste de especificidade da rLPG3 no teste de ELISA mostrou valores de 63-83% para as amostras de soros analisadas. Estes valores foram influenciados pela reação cruzada observada com soros de animais acometidos por Erlichiose, onde 9 das 10 amostras testadas foram reativas. Ainda assim, estes valores são pouco menores que os encontrados para a rCatL, que variam entre 84 e 99% (Menezes-Souza et al., 2015). A reação cruzada com soros de cães acometidos por *T. cruzi*, ocorreu em 9 amostras das 39 analisadas. Assim, a reação cruzada com soros de animais portadores da doença de Chagas, foi menor que o encontrado para portadores de Erlichiose. Apesar da alta conservação da proteína nas espécies de *Leishmania* e em *T. cruzi* (dados em publicação), foi possível discriminar a LVC da doença de Chagas em 77% das amostras analisadas. Para a proteína GRP94 homóloga à LPG3, foi discutida a ineficiência da proteína em discriminar as doenças em ensaio de sorodiagnóstico pela alta conservação entre as espécies avaliadas (Larreta et al., 2002). Entretanto, em nosso ensaio foi possível verificar uma discriminação parcial entre as doenças.

A reação cruzada observada para os soros positivos para erlichiose pode ter relação com o organismo utilizado para a produção da proteína recombinante. Mesmo a rLPG3 apresentando alto teor de pureza, é possível que anticorpos presentes nos soros dos animais tenham conseguido reconhecer de forma inespecífica algum contaminante, mesmo em concentrações mínimas. Para afirmar de forma consistente, Western Blot do extrato proteico da bactéria utilizada como sistema de expressão, pode ser realizado para verificar ligação de anticorpos do *pool* de soros às proteínas. Para o antígeno A2 não foi observada reação cruzada entre LV e erlichiose (Carvalho et al., 2002), o que não ocorreu em testes utilizando extrato total de *L. chagasi* (Zanette et al., 2013).

Portanto, a proteína rLPG3 é um potencial alvo para a sorodiagnóstico da LVC, principalmente na triagem de animais com suspeita de infecção, sendo um teste inicial para detecção de animais positivos para a doença. Desta forma seria necessário um segundo teste para descartar reações cruzadas. Porém técnicas de refinamento do antígeno podem ser aplicadas à rLPG3 para melhora dos resultados encontrados. O mapeamento de epítomos seguido de síntese de peptídeos ou proteínas quiméricas podem ser aplicados ao estudo da molécula, com possibilidade de melhorias na capacidade de detecção, juntamente com melhor discriminação entre as doenças que comumente afetam os cães.

Referências Bibliográficas

Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; De Boer, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

Barbosa-De-Deus, R.; Mares-Guia, M. L. Dos; Nunes, A. Z.; Costa, K. M.; Junqueira, R. G.; Mayrink, W.; Genaro, O.; Tavares, C. A. P. *Leishmania major*-Like Antigen for Specific and Sensitive Serodiagnosis of Human and Canine Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1361–1366, 2002.

Braz, R. F. S.; Nascimento, E. T.; Martins, D. R. A.; Wilson, M. E.; Pearson, R. D.; Reed, S. G.; Jeronimo, S. M. B. The Sensitivity And Specificity Of *Leishmania chagasi* Recombinant K39 Antigen In The Diagnosis Of American Visceral Leishmaniasis And In Differentiating Active From Subclinical Infection. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 4, p. 344–348, 2002.

Carvalho, F. A. A.; Charest, H.; Tavares, C. A. P.; Matlashewski, G.; Valente, E. P.; Rabello, A.; Gazzinelli, R. T.; Fernandes, A. P. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 43, p. 289–295, 2002.

Descoteaux, A.; Avila, H. A.; Zhang, K.; Turco, S. J.; Beverley, S. M. *Leishmania* LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. **The EMBO journal**, v. 21, n. 17, p. 4458–4469, 2002.

Francisco-De-Souza, R.; Santos, Y. L. Dos; Vasconcellos, R. De S.; Borges-Pereira, L.; Caldas, I. S.; Almeida, M. R. De; Bahia, M. T.; Fietto, J. L. R.; L. Recombinant *Leishmania (Leishmania) infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a New Antigen in Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis. **Acta Tropica**, v. 125, p. 60–66, 2013.

Gomes, Y. M.; Cavalcanti, M. P.; Lira, R. A.; Abath, F. G. C.; Alves, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis : Biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v. 175, p. 45–52, 2008.

Lainson, R.; Rangel, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 811–827, 2005.

Larreta, R.; Guzman, F.; Patarroyo, M. E.; Alonso, C.; Requena, M. Antigenic properties of the *Leishmania infantum* GRP94 and mapping of linear B-cell epitopes. **Immunology Letters**, v. 80, p. 199–205, 2002.

Maia, Z.; Lírio, M.; Mistro, S.; Mendes, C. M. C.; Mehta, S. R.; Badaro, R. Comparative Study of rK39 *Leishmania* Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis : Systematic Review with Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1484, 2012.

Manzillo, V. F.; Muccio, T. Di; Cappiello, S.; Scalone, A.; Paparcone, R.; Fiorentino, E.; Gizzarelli, M.; Gramiccia, M.; Gradoni, L.; Oliva, G. Prospective Study on the Incidence and Progression of Clinical Signs in Naive Dogs Naturally Infected by *Leishmania*

infantum. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p. e2225, 2013.

Martins, T. V. F.; De Carvalho, T. V.; De Oliveira, C. V. M.; De Paula, S. O.; Cardoso, S. A.; De Oliveira, L. L.; Marques-Da-Silva, E. D. A. *Leishmania chagasi* heparin-binding protein: Cell localization and participation in *L. chagasi* infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 204, n. 1, p. 34–43, 2015.

Mccall, L. I.; Zhang, W. W.; Matlashewski, G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003053, 2013.

Mendes, T. A. De O.; Cunha, J. L. R.; Lourdes, R. De A.; Luiz, G. F. R.; Lemos, L. D.; Santos, A. R. R. Dos; Câmara, A. C. J. Da; Galvão, L. M. Da C.; Bern, C.; Gilman, R. H.; Fujiwara, R. T.; Gazzinelli, R. T.; Bartholomeu, D. C. Identification of Strain-Specific B-cell Epitopes in *Trypanosoma cruzi* Using Genome-Scale Epitope Prediction and High-Throughput Immunoscreening with Peptide Arrays. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. e2524, 2013.

Menezes-Souza, D.; Mendes, T. A. De O.; Gomes, M. De S.; Bartholomeu, D. C.; Fujiwara, R. T. Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant *Leishmania braziliensis* Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e3426, 2015.

Otranto, D.; Dantas-Torres, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 339–345, 2013.

Paiva-Cavalcanti, M. De; Carla, R.; Morais, S. De; Pessoa-E-Silva, R.; Trajano-Silva, L. A. M.; Gonçalves-De-Albuquerque, S. C.; Hollanda, D. De; Tavares, C.; Brelaz-De-Castro, M. C. A.; Freitas, R. De; Pereira, V. R. A. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, v. 5, n. 31, p. 1–10, 2015.

Peeling, R. W.; Nwaka, S. Drugs and Diagnostic Innovations to Improve Global Health. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 25, p. 693–705, 2011.

Petersen, C. A.; Barr, S. C. Canine Leishmaniasis in North America: Emerging or Newly Recognized? **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 6, p. 1065, 2010.

Piarroux, R.; Gambarelli, F.; Dumon, H.; Fontes, M.; Dunan, S.; Mary, C.; Toga, B.; Quilici, M. Comparison of PCR with Direct Examination of Bone Marrow Aspiration, Myeloculture, and Serology for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Immunocompromised Patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 746–749, 1994.

Quijada, L.; Requena, J. M.; Soto, M.; Alonso, C. Analysis of the antigenic properties of the *L. infantum* Hsp70: design of synthetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 63, p. 169–174, 1998.

Ready, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Euro Surveillance**, v. 15, n. 10, p. 19505, 2010.

Scalone, A.; Luna, R. De; G.Oliva; Baldi, L.; Satta, G.; Vesco, G.; Mignone, W.; Turilli, C.; Mondesireh, R. R.; Simpson, D.; Donoghue, A. R.; Frank, G. R.; Gradoni, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary parasitology**, v. 104, p. 275–285, 2002.

Silverman, J. M.; Clos, J.; Oliveira, C. C. De; Shirvani, O.; Fang, Y.; Wang, C.; Foster, L. J.; Reiner, N. E. An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. **Journal of Cell Science**, v. 123, p. 842–852, 2010.

Souza, A. P.; Soto, M.; Costa, J. M. L.; Boaventura, V. S.; Oliveira, C. I. De; Cristal, J. R.; Barral-Netto, M.; Barral, A. Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using *Leishmania* Recombinant Proteins. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e66110, 2013.

Todolí, F.; Pérez-Filgueira, M.; Galindo, I.; Gómez-Sebastián, S.; Escribano, J. M.; Rodríguez-Cortés, A.; Alberola, J. Seroreactivity against raw insect-erived recombinant

KMPH, TRYP, and LACK *Leishmania infantum* proteins in infected dogs. **Veterinary parasitology**, v. 164, p. 154–161, 2009.

Zanette, M. F.; Marçal, V.; Lima, F. De; Laurenti, M. D.; Rossi, C. N.; Vides, J. P.; Felipe, R.; Biondo, A. W.; Marcondes, M. Sorological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, n. February, p. 7–9, 2013.

4. CONCLUSÕES GERAIS

As leishmanioses fazem parte das doenças negligenciadas que afetam grande numero de pessoas em países em desenvolvimento, causando altas taxas de mortalidade e morbidade. Anualmente muitas pessoas são afetadas por essa patologia, no entanto, muitos casos não são relatados oficialmente, fazendo com que esta seja uma doença de destaque entre as dez doenças infecciosas de maior importância mundial.

Devido à importância das PLHs no processo de interação parasito-hospedeiro, foi proposto para este estudo aprofundar os conhecimentos sobre a estrutura e função da PLHLC, uma vez que ainda não havia sido demonstrado para nenhuma PLH de *Leishmania*, o que aqui é reportado. Os achados fazem dessa molécula um importante alvo para pesquisa de drogas, vacinas anti-*Leishmania* e para o desenvolvimento de kits diagnóstico para leishmaniose visceral canina, além de abrir uma possibilidade de estudo para uso no diagnóstico da leishmaniose visceral humana. Identificar moléculas com estas aplicações, são importantes, uma vez que a doença ainda é um risco iminente para a saúde pública de países em desenvolvimento no mundo.