

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Natália Tomich de Paiva Miranda

Caracterização e estudo funcional dos genes anotados como hemolisinas do tipo III em *Leishmania major*.

Orientadora: Maria de Fátima Martins Horta

Co-orientadora: Glória Regina Franco

Belo Horizonte- MG

2016

Natália Tomich de Paiva Miranda

**Caracterização e estudo funcional dos genes
anotados como hemolisinas do tipo III em
Leishmania major.**

Tese apresentada ao programa de
Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Ciências
(área de concentração em
Biologia Molecular)

**Orientadora: Maria de Fátima Martins Horta
Co-orientadora: Glória Regina Franco
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte – MG**

2016

As minhas filhas Yasmin e Melissa,
que com seus sorrisos e abraços apertados

me dão forças todos os dias.

Ao meu marido Admar,
pelo amor, incentivo e torcida.

Aos meus Pais,
pelo apoio e amor incondicional.

Agradecimentos:

À minha orientadora, Patiu, pela confiança, compreensão, paciência, pela oportunidade de crescimento profissional e, principalmente, pela amizade que pudemos construir.

À minha co-orientadora Glória Regina Franco pela dedicação, discussões, ensinamentos e também pelo meu crescimento profissional.

Aos colaboradores diretos deste projeto, Rosiane Aparecida da Silva Pereira, Silvane Murta, Rubens do Monte, Silvia Dias, Mainá Bittar, Priscilla Grymberg, Santuza Teixeira e Viviane Silva. Sem eles os resultados desta tese não teriam sido alcançados. Muito obrigada.

Ao grande amigo e técnico de laboratório Elimar de Faria pela dedicação e pelas infinitas vezes que nos ajudou em cada experimento.

Aos amigos do laboratório, que foram muito mais do que amigos! Foram professores, ajudantes, psicólogos, mães/pais, filho(a)s, conselheiros, tudo ao mesmo tempo!

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia pela excelência na formação dos alunos.

Ao CNPQ e à CAPES pelo suporte financeiro.

Sumário

Lista de figuras.....	6
Lista de abreviaturas.....	8
Resumo.....	9
1. Introdução.....	10
1.1. O protozoário do gênero <i>Leishmania</i> : ciclo de vida e patogênese.....	10
1.2. Citolisinas formadoras de poros.....	13
1.2.1. PFPs	13
1.2.2. Proteínas formadoras de poros em protozoários patogênicos.....	15
1.2.3. A leishporina.....	16
2. Justificativa.....	19
3. Objetivos.....	22
4. Material e métodos.....	23
4.1. Análises in silico.....	23
4.2. Cultivo e estoque de promastigotes e obtenção de formas amastigotas-like.....	24
4.3. Preparo dos extratos de parasito para ensaio hemolítico.....	25
4.4. Ensaio hemolítico.....	25
4.4.1. Padronização do número de hemácias.....	25
4.4.2. Determinação da atividade hemolítica.....	26
4.5. PCR em Tempo Real.....	26
4.6. Northern blot.....	27
4.7. Amplificação e purificação dos fragmentos dos genes de hemolisina III de <i>L. major</i>	28
4.8. Clonagem dos fragmentos amplificados no vetor LIC.....	29
4.9. Obtenção e transformação de bactérias termocompetentes.....	30
4.10. Obtenção do DNA plasmidiano em pequena escala.....	31
4.11. Expressão de proteínas recombinantes em pequena escala.....	31
4.12. Expressão das proteínas recombinantes em larga escala.....	32
4.13. Purificação das proteínas recombinantes.....	33
4.14. Western Blot com frações obtidas da purificação utilizando o anticorpo anti-histidinas (anti-His) e o soro dos animais imunizados.....	33
4.15. Imunização de camundongos.....	34
4.16. Imunolocalização.....	34
4.17. Amplificação dos genes de interesse e clonagem do vetor de superexpressão pSP72 α HYG α	35
4.18. Transfecção de DNA por eletroporação em <i>L. major</i>	36
4.19. Obtenção dos extratos totais dos clones superexpressores.....	36
5. Resultados.....	38

5.1. Busca por genes candidatos à codificarem proteínas com atividade citolítica.....	38
5.2. Características gerais das proteínas potencialmente codificadas pelos genes Lm5500, Lm5510 e Lm5520.....	38
5.3. Atividade hemolítica do extrato solúvel de membrana (Ext-ms) de promastigota de <i>L. major</i>	40
5.4. Expressão dos mRNAs dos genes anotados como hemolisinas III de <i>L. major</i>	43
5.5. Comparação da atividade hemolítica entre amastigotas e promastigotas de <i>L. major</i>	45
5.6. Localização das proteínas codificadas pelos genes Lm5500, Lm5510 e Lm5520 em promastigotas de <i>L. major</i>	46
5.6.1. Obtenção de anticorpos contra as proteínas codificadas pelos genes de hemolisina III de <i>L. major</i>	46
5.6.1.1. Amplificação dos genes Lm5500, Lm5510 e Lm5520 por PCR e clonagem no vetor LIC.....	46
5.6.1.2. Indução da expressão das proteínas recombinantes.....	48
5.6.1.3. Purificação das proteínas recombinantes.....	48
5.6.1.4. Reatividade dos soros imunes com as proteínas codificadas pelos genes Lm5500, Lm5510 e Lm5520.....	51
5.6.2. Localização das proteínas em promastigota de <i>L. major</i>	51
5.7. Análise funcional das proteínas Lm5500 e Lm5520 por sua superexpressão em promastigota de <i>L. major</i>	56
5.7.1. Análise da expressão dos mRNAs.....	59
5.7.2. Análise da expressão das proteínas.....	59
5.7.3. Ensaio funcional.....	59
6. Discussão.....	63
7. Referências bibliográficas.....	69

Lista de figuras

Figura 1: Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i>	12
Figura 2: Características das hemolisinas III de <i>L. major</i> , seus respectivos homólogos em <i>Leishmania sp</i> e o gene ortólogo em <i>Plasmodium falciparum</i>	39
Figura 3: Detalhes das hemolisinas do tipo III e seus ortólogos.....	41
Figura 4: Atividade hemolítica de extrato de membranas (Ext-ms) de promastigotas de <i>L. major</i>	42
Figura 5: Níveis de expressão dos genes de Lm5500 e Lm5520 em promastigotas e amastigotas de <i>L. major</i>	44
Figura 6:.. Comparação da atividade hemolítica do extrato de membranas (Ext-ms) entre promastigotas e amastigota de <i>L. major</i>	45
Figura 7: Amplificação dos fragmentos de interesse das sequências Lm5500, Lm5510 e Lm5520 e confirmação da clonagem no vetor LIC	47
Figura 8: Indução da expressão das proteínas recombinantes Lm5500, Lm5510 e Lm5520	49
Figura 9: Purificação das proteínas recombinantes	50
Figura 10: Western blot com o soro dos animais imunizados.....	52
Figura 11: Imunofluorescência com os anticorpos gerados para as proteínas Lm5520 em promastigotas	53
Figura 12: : Imunofluorescência com os anticorpos gerados para a proteína Lm5500 em promastigotas.....	54
Figura 13: Endossomo inicial de <i>L.major</i> marcado por FM 143-FX.....	55
Figura 14: Amplificação dos fragmentos de interesse das sequências Lm5500, Lm5520 e confirmação da clonagem no vetor pGEM-Teasy.....	57
Figura 15: Confirmação da clonagem dos amplicons Lm5500, Lm5520 no vetor de superexpressão pSP72 α HYG α	58
Figura 16: Níveis relativos de expressão dos mRNAs nos clones superexpressores Lm5500 e Lm5520 em relação ao WT e <i>mock</i> transfectados.....	60
Figura 17: Perfil eletroforético do extrato proteico dos clones superexpressores das proteínas Lm5500 e LM5520.....	61

Figura 18: Atividade hemolítica dos extratos totais dos clones
superexpressores e *mock* transfectados62

Lista de abreviaturas

AFM - microscopia de força atômica

BSA - Bovine serum albumin

cDNA - DNA complementar

C-terminal - Carboxi-terminal

GAPDH - Gliceraldeído 3 -fosfato desidrogenase

HlyIII - hemolisinas III

IPTG - isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kb - quilo bases

LPC - lipofosfolina

m - mili

M - molar

MACPF - membrane attack complex

Mb - mega bases

MBP - Maltose-Binding Protein

min - minuto

mRNA - RNA mensageiro

MVT - túbulo multivesicular

N-terminal - amino-terminal

pb - pares de base

PBS - *phosphate buffered saline*

PCR - reação em cadeia da polimerase

PFP - proteínas formadoras de poros

pH - potencial hidrogeniônico

rpm - rotação por minuto

rRNA - RNA ribossomal

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida- dodecil sulfato de Sódio

μ - micro

Resumo

Trabalhos anteriores de nosso grupo demonstraram que promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* possuem uma citolisina capaz de lisar eritrócitos e macrófagos, a qual chamamos de leishporina, devido ao seu mecanismo de lise ser por formação de poros na membrana de macrófagos. Embora a leishporina já tenha sido caracterizada por nós sob diversos aspectos bioquímicos, sua identidade molecular é ainda desconhecida. Uma vez que o genoma da *L. major* já foi completamente sequenciado, iniciamos nosso trabalho buscando por genes que pudessem codificar proteínas que tivessem atividade citolítica e ser responsável pela atividade da leishporina. Nossas pesquisas no banco de dados tritrypDB, revelaram a existência de 3 genes anotados como hemolisinas do tipo III putativas denominados LmjF36.5500, LmjF36.5510, LmjF36.5520. Estas sequências mostraram uma homologia significativa com outras hemolisinas do tipo III formadoras de poros e já caracterizadas em outros organismos. Mostramos por PCR em tempo real que 2 destes genes são expressos em promastigotas na fase estacionária, fase em que a expressão da atividade da leishporina é máxima. Quando comparamos a expressão destes mRNAs entre promastigotas e amastigotas, verificamos que o mRNA do gene Lm5500 é mais expresso em amastigotas, enquanto que para o mRNA de Lm5520 parece não haver diferenças significativas, como demonstrado por PCR em tempo real e *Northern blot*. Não detectamos mRNA para o gene Lm5510, o que sugere que este gene é pouco/ou não expresso. A fim de determinar a localização subcelular destas proteínas, anticorpos policlonais foram produzidos em camundongos BALB/c e utilizados em microscopia de imunofluorescência confocal. Aparentemente, a proteína codificada pelo gene LmjF36.5520 se localiza em uma estrutura alongada e única, que aparenta ser o Túbulo Multivesicular (MVT), que se estende do bolso flagelar até a extremidade posterior do parasito. A proteína codificada pelo gene LmjF36.5500 está localizada em estruturas que se assemelham aos acidocalcissomos. Confirmando os resultados PCR em tempo real, não foi possível detectar a fluorescência para a proteína codificada pelo gene LmjF36.5510. Parasitas superexpressores das proteínas Lm5500 e Lm5520 foram gerados para avaliarmos o fenótipo lítico dos mesmos. Nossos resultados demonstram que os clones que superexpressam as proteínas Lm5500 e Lm5520 têm sua atividade litica aumentada em relação aos *mock* transfectados. Esse resultado indica que essas proteínas são potencialmente candidatas a codificarem a leishporina ou a uma proteína importante para a ação da leishporina.

1. INTRODUÇÃO

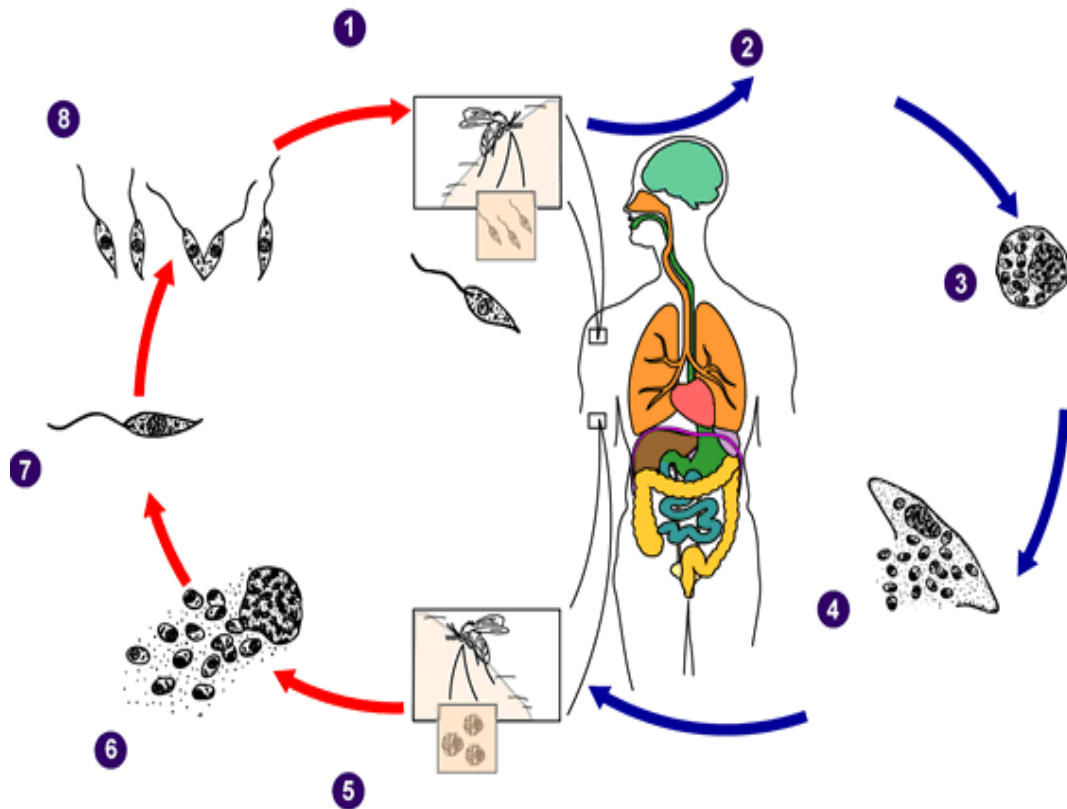
1.1. O protozoário do gênero *Leishmania*: ciclo de vida e patogênese

O gênero *Leishmania* pertence ao filo euglenozoa da ordem Kinetoplastida que são caracterizados pela presença de uma massa de DNA evidente chamada cinetoplasto, localizada no interior de uma mitocôndria grande, alongada e única. Dos cinetoplastídeos, os pertencentes à família Trypanosomatidae são parasitos intestinais de insetos e parasitos intra ou extracelulares de vertebrados, podendo nestes se desenvolver em células do Sistema Monocítico Fagocitário (SMF), no caso do gênero *Leishmania*, ou ainda viver no interstício, como observado em certas espécies do gênero *Trypanosoma*. Os tripanosomatídeos possuem um flagelo único que se localiza no cinetoplasto ou próximo a ele (Rey,1972). Parasitos do gênero *Leishmania* são causadores de doenças conhecidas como leishmanioses que podem se manifestar sob várias formas clínicas, dependendo da espécie do parasito, da resposta imune do hospedeiro, como também do flebotômico vetor (Sacks and Kamhawi 2001). A leishmaniose apresenta amplo espectro de quadros clínicos, que podem variar de lesões cutâneas até lesões internas que podem comprometer o funcionamento de órgãos, podendo levar inclusive à morte.

O gênero *Leishmania* é dividido em dois sub-gêneros, *Leishmania* e *Viannia*, classificação baseada, principalmente, no local de desenvolvimento no hospedeiro invertebrado e no desenvolvimento do protozoário na pele de hamsters e em meio de cultura. Assim sendo, no sub-gênero *Viannia* encontram-se as espécies do complexo chamado *braziliensis* causadoras das leishmanioses cutânea e mucocutânea, sendo exemplos a *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*. O outro sub-gênero, *Leishmania*, inclui as espécies do complexo donovani como a *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* bem como as espécies do complexo mexicana, como a *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* causadoras da leishmaniose cutânea e cutânea difusa, e do complexo major, representado pela *L. (L.) major* (Grimaldi and Tesh 1993). A leishmaniose é endêmica em 98 países e 3 territórios, sendo exceções a Austrália e a Antártica. As estatísticas epidemiológicas são subestimadas devido à falta de controle epidemiológico e de diagnósticos precisos. O número de casos de leishmaniose visceral pode chegar a 200 a 400 mil , sendo que 90% dos casos ocorrem na Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil (Pace 2014). A epidemiologia da leishmaniose é bastante diversa, sendo que 21 espécies de *Leishmania*

são patogênicas para os seres humanos e 30 espécies do mosquito flebotomíneo são vetores potenciais (Desjeux 2004).

O ciclo de vida da *Leishmania* (**Figura 1**) é do tipo heteroxeno, no qual um inseto flebotomíneo hematófago fêmea, do gênero *Lutzomyia* (no Novo Mundo) ou *Phlebotomus* (no Velho Mundo), pica um mamífero parasitado pelo protozoário e ingere, no momento do repasto, formas amastigotas juntamente com o sangue. Os parasitos ingeridos, ainda que pouco numerosos, transformam-se em promastigotas, formas capazes de se multiplicar extraordinariamente por divisão binária no intestino do inseto. Com relação à infecção do hospedeiro vertebrado no momento do repasto por uma fêmea contaminada, existem duas teorias que tentam explicar o mecanismo de contágio (de Almeida, Vilhena *et al.*, 2003). A primeira, mais antiga, presume que as formas promastigotas migram para a glândula salivar do inseto e são inoculadas junto com a saliva que é liberada no local da picada. Outra corrente de pensamento, mais moderna, entende que a multiplicação de promastigotas é tão grande que chega a formarem bolos de parasitos no proventrículo intestinal do inseto, o que impede o repasto sanguíneo. Deste modo, o inseto regurgitaria esse agregado de promastigotas, as quais seriam então fagocitadas pelas células do SMF dando continuidade ao ciclo. No interior do hospedeiro invertebrado, as formas promastigotas passam ainda por modificações morfológicas e bioquímicas antes de se tornarem infectantes. Esse conjunto de transformações é conhecido como metaciclogênese (Sacks, 1989). Para ter sucesso na infecção, as promastigotas metacíclicas (mais alongadas e extremamente infectantes) inoculadas pelo inseto vetor precisam penetrar em sua célula hospedeira, em geral um fagócito, onde se diferenciam, reproduzem e de onde, em algum momento, saem para penetrar em outras células. Os mecanismos de penetração do parasito na célula fagocitária continuam objeto de muita controvérsia, podendo envolver uma série de moléculas, mecanismos de facilitação da fagocitose e até penetração ativa (Wyler, 1982; Chang *et al.*, 1985; Schwartzman & Pearson, 1985; Kima, 2007). Uma vez fagocitado, o parasito vive no interior da célula hospedeira em um compartimento membranosos chamado vacúolo parasitóforo, formado após a fusão de lisossomos com o vacúolo fagocítico. É no interior do vacúolo parasitóforo, que as promastigotas se transformam em amastigotas, formas arredondadas e com flagelo não aparente. Após a reprodução, as amastigotas ganham o interstício e são fagocitadas por outras células, amplificando a infecção (Chang, 1985; Kima, 2007). A etapa de saída das promastigotas



Adaptado de:

www.med.sc.edu:85/parasitology/Leishmania-lc.gif

Figura 1 – Ciclo de vida de *Leishmania sp* - As etapas representadas no esquema acima são as seguintes: 1) promastigotas no inseto; 2) inoculação de promastigotas; 3) multiplicação de amastigotas; 4) rompimento do macrófago; 5) ingestão de células infectadas; 6) liberação de amastigotas; 7) transformação em promastigotas; 8) multiplicação das promastigotas.

do vacúolo parasitóforo e do macrófago é, ainda hoje, objeto de muita discussão, não se sabendo ao certo como isso ocorre. A saída de patógenos intracelulares de células hospedeiras é passo chave para continuação do ciclo de vida desses organismos e, conseqüentemente, é importante compreender os mecanismos e interações moleculares que ocorrem durante essa evasão. Nosso grupo descreveu uma molécula citolítica, que foi denominada leishporina por formar poros em macrófagos, e propôs que esta citolisina esteja envolvida no processo de rompimento das membranas do vacúolo parasitóforo e do próprio macrófago, liberando assim as amastigotas e amplificando a infecção (Noronha, Ramalho-Pinto *et al.*, 1994, Noronha, Ramalho-Pinto *et al.*, 1996, Horta 1997, Noronha, Cruz *et al.*, 2000, Almeida-Campos and Horta 2000, Castro-Gomes, Almeida-Campos *et al.*, 2009). A utilização de moléculas membranolíticas para esse rompimento, como proteínas ou peptídeos formadores de poros, tem sido postulada por outros grupos e comprovada para uma série de organismos, de vírus a mamíferos, sendo uma ferramenta importante para a adaptação às condições ambientais (Andreeva-Kovalevskaya Zh, Solonin *et al.*, 2008, Hybiske and Stephens 2008).

1.2. Citolisinas formadoras de poros

Citolisinas formadoras de poros são moléculas capazes de interagir com a bicamada lipídica formando canais transmembrana que permitem a passagem de íons e de moléculas de baixo peso molecular. A maioria das moléculas formadoras de poros já descritas são proteínas (ou peptídeos) (PFPs). Essas proteínas estão envolvidas em vários processos biológicos importantes como comunicação celular, citólise e apoptose . Atualmente há cerca de 300 PFPs descritas e estima-se que um terço delas aja rompendo membranas (Parker and Feil 2005), embora várias outras funções tenham sido atribuídas a essas moléculas (Almeida-Campos, Noronha *et al.*, 2002).

1.2.1. PFPs

As PFPs podem exercer diversas funções já descritas ou propostas. Há PFPs cujas funções estão relacionadas à defesa do hospedeiro contra patógenos ou agressores. Fazem parte desse grupo a perforina e o componente C9 do sistema do complemento, presente no sistema imune dos mamíferos, os cnidoporos dos cnidários, as PFPs que integram a composição de alguns venenos de insetos e aracnídeos e as PFPs dos anelídeos e de alguns vegetais do gênero *Passiflora* (Yuldasheva, Carvalho *et al.*, 2005). Há ainda PFPs com funções possivelmente nutricionais, entre as quais podemos citar os amebaporos de

Entamoeba histolytica, já que parecem ajudar na digestão de bactérias, a principal fonte alimentar deste protozoário (Leippe 1997, Andra, Berninghausen *et al.*, 2004) e as PFPs encontradas na saliva de alguns insetos hematófagos como *Triatoma infestans* (Amino, Martins *et al.*, 2002) que parecem estar envolvidas na digestão das células ingeridas por estes insetos, ou na facilitação do aporte de sangue durante o repasto. PFPs podem ainda ser uma boa arma para assegurar a competitividade, o bom desempenho e o sucesso de um organismo ao explorar seu nicho, pois podem utilizá-las para impedir a aproximação ou crescimento de competidores, ou para evadir de um determinado local e explorar outro quando o meio se torna hostil ou saturado. Neste grupo podemos citar as PFPs produzidas por algumas bactérias intracelulares dos gêneros *Legionella*, *Yersinia*, *Listeria* e *Neisseria* (Almeida-Campos, Noronha *et al.*, 2002), que parecem ajudar esses organismos ao induzir a entrada na célula hospedeira ou seu escape desta, possibilitando a evasão dos mecanismos de defesa de seus hospedeiros. PFPs podem induzir a célula hospedeira a entrar em apoptose matando-a, como verificado em infecções por *Salmonella* e *Shigella*, possivelmente possibilitando que a bactéria invada outra célula quando há escassez de nutrientes (Lundberg, Vinatzer *et al.*, 1999), revisado por Almeida-Campos *et al.*, 2002.

Estudos recentes demonstram que várias hemolisinas que foram descritas no passado são PFPs e são consideradas fatores de virulência importantes para diversos patógenos. Algumas hemolisinas foram primeiramente descritas em *Bacillus cereus*. Baida e Kuzmin (1995) (1996) descreveram 4 tipos de hemolisinas: hemolisina I ou cereolisina O, hemolisina II, hemolisina III e hemolisina IV, todas caracterizadas como PFPs. A hemolisina III de *B. cereus* é uma proteína termo-sensível, cuja atividade hemolítica não é dependente de colesterol, como várias outras PFPs. Seu precursor molecular tem 24,4 kDa e sua sequência de aminoácidos não contém peptídeo sinal para secreção. A HlyIII forma poros transmembrana com diâmetro aproximado de 3-3,5nm (Ramarao and Sanchis 2013).

Estudos com a hemolisina III de *Vibrio vulnificus* corroboram a importância desta citolisina como fator de virulência. Quando a hlyIII de *V. vulnificus* é expressa em *Escherichia coli*, o extrato exibe uma atividade lítica similar à atividade lítica de *B. cereus*. Ao inativar o gene hlyIII de *V. vulnificus*, os autores observaram que os mutantes apresentavam virulência atenuada quando comparados ao tipo selvagem ao serem administrados intraperitonealmente em camundongos (Chen, Chang *et al.*, 2004).

1.2.2. PFPs em protozoários patogênicos

Microrganismos intracelulares são adaptados ao crescimento e desenvolvimento dentro da célula hospedeira. Este nicho fornece uma proteção parcial ao sistema imune e uma fonte de nutrientes para o patógeno. A evasão do patógeno do meio intracelular é bem menos conhecida do que o processo de invasão celular. O escape do parasito requer a quebra de múltiplas barreiras como o vacúolo parasitóforo, organelas citosólicas do hospedeiro e a membrana plasmática. Nosso grupo propôs para protozoários do gênero *Leishmania* (Noronha *et al.*, 1996; Almeida-Campos *et al.*, 2002) e vários estudos sugerem que esta evasão é um processo ativo e que as PFPs estariam envolvidas nos passos principais (Roiko and Carruthers 2009). Além disso, outras funções para PFPs de protozoários extracelulares também já foram descritas.

Como já mencionado, *E. histolytica*, protozoário causador da amebíase humana, parece utilizar suas PFPs, os *amebaporos*, para a digestão do conteúdo alimentar. Contudo, essas PFPs podem também ser secretadas e acabam gerando a principal manifestação clínica da infecção ao destruir o tecido da mucosa intestinal do hospedeiro (Young, Young *et al.*, 1982, Leippe 1997, Hecht, Van Nuland *et al.*, 2004). Dentre as PFPs de protozoários, a mais bem caracterizada é a *amebaporo*, uma molécula com 77 resíduos de aminoácidos (Hecht, Van Nuland *et al.*, 2004). A ameba de vida livre *Naegleria fowleri*, causadora de uma meningocefalite humana, também produz uma PFP chamada *naegleriaporo*, molécula que parece estar envolvida nos danos teciduais presentes na infecção (Herbst, Marciano-Cabral *et al.*, 2004). *Trypanosoma cruzi*, protozoário intracelular causador da doença de Chagas, possui uma atividade lítica cujo mecanismo é por formação de poros. Essa atividade lítica foi atribuída a uma citolisina que foi chamada Tc-TOX e, algumas evidências sugerem que esta molécula possa estar envolvida no rompimento do vacúolo parasitóforo, com consequente escape do parasito para o citoplasma. A Tc-TOX possui peso molecular em torno de 70 kDa e apresenta similaridade com o C9 do sistema do complemento e com a perforina de camundongo (Andrews 1990, Andrews 1994). Em 2001, (Manning-Cela, Cortes *et al.*, 2001) clonaram um gene em *T. cruzi*, denominado *Lyt1*, que codifica uma proteína cuja mutação diminui a hemólise mediada pelo parasito. Essa proteína possui tamanho semelhante à Tc-TOX e, como ela, é similar ao componente C9 do complemento, sendo uma candidata a exercer a atividade previamente descrita da Tc-TOX. No entanto, ainda não foi determinado se as duas correspondem à mesma molécula. O genoma do parasita *Plasmodium falciparum*,

um dos agentes causadores da malária humana, codifica 5 PPLPs (plasmodium perforin-like protein), todas envolvidas no rompimento de barreiras celulares (revisado por Roiko and Carruthers, 2009; Kafsack and Carruthers, 2010). Esta família de genes codifica proteínas com domínios semelhantes ao da família de Complexo de Ataque a Membranas e Perforina (MACPF-likedomains) (Kaiser, Camargo et al., 2004, Ishino, Chinzei *et al.*, 2005). Foi demonstrado que as citolisinas PPLP3, PPLP4 e PPLP5 participam da travessia do epitélio intestinal do inseto vetor pelo oocinetto (Kadota et al., 2004; Ecker et al., 2007, Christine C. Wirth et al, 2015), enquanto a PPLP1 participa da travessia do endotélio dos capilares sinusóides pelos esporozoítos com posterior infecção dos hepatócitos (Ishino et al., 2005). A proteína descoberta mais recentemente, PPLP2 é crucial para o rompimento dos eritrócitos do hospedeiro por sua atividade membranolítica (Christine C. Wirth *et al.*, 2015). Outra proteína, a TgPLP1 de *Toxoplasma gondii*, também apresenta uma alta similaridade com o domínio MACPF de mamíferos, bactérias e protozoários e apresenta o motivo (Y/W)-X6-(F/Y)GTH(F/Y)-X6-GG, conhecido como a assinatura deste grupo de proteínas. TgPLP1 apresenta um papel central no escape do parasito do vacúolo parasitóforo, uma vez que parasitos com deficiência da proteína não conseguem sair de seus vacúolos parasitóforos (Kafsack, Pena *et al.*, 2009) (Michael J Blackman *et al* 2013). Por conterem o domínio MACPF, assume-se que o mecanismo de escape do *P. falciparum* e do *T. gondii*, seja por formação de poros.

Mais recentemente, Moonah e colaboradores demonstraram que a hemolisina III de *Plasmodium falciparum* é capaz de lisar eritrócitos por formação de poros transmembrana. A atividade lítica desta proteína é ótima a 37 graus sendo que ela se localiza no vacúolo digestivo do parasito e o poro formado tem aproximadamente 3,2nm. Os autores sugerem que esta hemolisina tem um papel importante na lise de eritrócitos não infectados resultando em severa anemia em pacientes com malária (Moonah, Sanders *et al.*, 2014). A **Tabela 1** resume as principais características de PFPs já descritas em protozoários e bactérias.

Tabela 1: proteínas formadoras de poros de protozoários e bactérias patogênicas.

Protozoário	PFP – características	Função
<p><i>Entamoeba histolytica</i> . Young <i>et al.</i> (1982) . Leippe <i>et al.</i> (1991)</p>	<p>Amoebapores . ~ 8 kDa . Localizada em vesículas citoplasmáticas . pH ótimo= ácido . Tamanho do poro= 2 nm</p>	<p>Citólise mediada por contato – dano ao tecido do hospedeiro;</p>
<p><i>Naegleria fowleri</i> . Young & Lowrey (1989) . Herbst <i>et al.</i> (2002)</p>	<p>Naegleriapores . 10-13 kDa . pH ótimo=ácido . Associada a membrane</p>	<p>Citólise - meningo-encefalite invasiva com alto grau de dano tecidual.</p>
<p><i>Plasmodium falciparum</i> . Kaiser <i>et al.</i> (2004) . Ishino <i>et al.</i> (2005) . Ecker <i>et al.</i> (2007) . Sullivan Jr. (2014)</p>	<p>Spect2 . Localizada em micronemas. . Similar a proteínas da família MACPF-like domains (complex of membrane attack and perforin) Hemolisina III .Localizada no vacúolo digestivo .Poro de aproximadamente 3,2nm .Atividade ótima à 37 graus</p>	<p>Evasão do parasita dos capilares sanguíneos e entrada no hepatócito; Lise de eritrócitos não infectados;</p>
<p><i>Toxoplasma gondii</i> Kafsack <i>et al.</i> (2009)</p>	<p>Tg-PLP . Localizada em micronemas. . Similar a proteínas da família MACPF . Provavelmente maior que 40 nm</p>	<p>Escape do vacúolo parasitóforo;</p>
<p><i>Trypanossoma cruzi</i> Andrews <i>et al.</i> (1990) Manning-Cela <i>et al.</i> (2001)</p>	<p>LYT1 . ~ 70 kDa / Homóloga a C9 . Secretada por amastigotas . pH ótimo = ácido / Tamanho do poro = ~ 10 nm</p>	<p>Ruptura do fagolisossomo</p>
<p><i>Leishmania sp.</i> . Noronha <i>et al.</i> (2000) .. Almeida-Campos <i>et al.</i> (2002) . Noronha <i>et al.</i> (1996) . Horta (1997) . Castro-gomes <i>et.al</i> (2009)</p>	<p>Leishporina Tamanho do poro: 1.6 a 6.1nm Capaz de lisar macrófagos pH ótimo: ácido</p>	<p>Escape do vacúolo parasitóforo e posterior rompimento da membrana plasmática</p>
<p>Vibrio vulnificus Chen, Chang <i>et al.</i> (2004) Bacillus cereus Baida and Kuzmin (1995) Baida and Kuzmin (1996) Ramarao and Sanchis (2013)</p>	<p>Hemolisina III Similar à hemolisina de <i>B.cereus</i> Hemolisina III Tamanho do poro: 3,0 a 3,5nm Termo sensível</p>	<p>Relacionada à virulência da bactéria. Mutantes para o gene HlyIII possuem virulência atenuada Lise de hemácias. Responsável pela virulência da bactéria junto com as demais hemolisinas (I, II e IV)</p>

1.2.3 A leishporina

A leishporina é uma citolisina descrita pelo nosso grupo inicialmente em *L. amazonensis*, *L. major*, *L. panamensis* (Noronha, Ramalho-Pinto *et al.*, 1994, Noronha, Ramalho-Pinto *et al.*, 1996) e posteriormente em *L. guyanensis* (Almeida-Campos and Horta, 2000). Suas características descritas até o momento foram, em sua maioria, provenientes de *L. amazonensis* e algumas de *L. guyanensis*, espécies causadoras da leishmaniose cutânea e/ou mucocutânea no Novo Mundo. Presente em extratos de promastigotas e amastigotas, a leishporina lisa hemácias e células nucleadas, incluindo o macrófago. Pela técnica de *patch-clamp*, Noronha *et al.* (2000) mostraram que o dano celular causado no macrófago por extratos do parasito é mediado pela formação de poros não seletivos na membrana alvo. O diâmetro dos poros formados aumenta com o tempo, ou com a concentração da citolisina, variando de 1,6 a > 6,1nm, o que mostra que o mecanismo de ação é provavelmente pela polimerização de monômeros. Mais recentemente, Castro-Gomes *et al.*, mostraram por microscopia de força atômica, poros com profundidade suficiente para atravessar membranas tanto em hemácias como em lipossomos (Castro-Gomes, 2010).

Uma característica interessante da leishporina é que sua atividade lítica ótima é em pH ácido de 5,5 e na temperatura de 37°C, o que sugere o hospedeiro vertebrado e suas células alvo, particularmente o interior do fagolisossoma, como microambiente ótimo para atuação desta citolisina (Noronha, Ramalho-Pinto *et al.*, 1994, Noronha, Ramalho-Pinto *et al.*, 1996). No entanto, a leishporina também é ativa em pH neutro, o que permite que ela possa agir também no citoplasma da célula hospedeira ou no interior do inseto vetor. Assim, possíveis funções para a leishporina seriam 1) a facilitação da penetração na célula hospedeira, 2) a ruptura de hemácias no interior do inseto vetor para a obtenção de nutrientes, 3) a nutrição dos parasitos através de poros no vacúolo parasitóforo e 4) a ruptura da membrana do fagolisossomo e do próprio macrófago, etapa que propicia a amplificação da infecção com conseqüente comprometimento tecidual. Quaisquer dessas funções poderiam ter um papel importante para a sobrevivência do parasito e para a patogenia da leishmaniose.

A leishporina está presente na fração rica em membranas do parasito, provavelmente em forma solúvel no interior de vesículas. Ensaio realizados com

hemácias humanas demonstraram que a lise mediada pela leishporina ocorre em pelo menos duas etapas distintas: 1) ligação da citolisina à membrana da célula-alvo, etapa independente da temperatura, 2) lise propriamente dita, provavelmente pela inserção da citolisina na membrana-alvo e polimerização de subunidades com a formação do poro, etapa que não ocorre em baixas temperaturas e cuja temperatura ótima de ação é 37 °C (Noronha, Ramalho-Pinto *et al.*, 2000). Nosso grupo ainda mostrou que a leishporina liga-se diretamente a fosfolipídeos da membrana, sem a necessidade de outros receptores como o colesterol, proteínas ou carboidratos (Castro-Gomes, Almeida-Campos *et al.*, 2009).

Foi ainda mostrado que, para apresentar atividade citolítica, a leishporina precisa ser antes ativada (Almeida-Campos and Horta 2000). Esta ativação consiste na remoção de um oligopeptídeo inibidor não covalentemente ligado à leishporina, o que faz com que a citolisina não só tenha maior afinidade para fosfolípidos, como provavelmente também se torne capaz de inserir na bicamada lipídica e polimerizar (Almeida-Campos, Castro-Gomes *et al.*, 2013).

Embora várias tentativas tenham sido feitas para identificar a leishporina, até o momento sua natureza molecular não é conhecida. O fato de o tratamento de extratos líticos do parasito com tripsina, em certas condições, abolir a atividade lítica desses extratos (Noronha, Ramalho-Pinto *et al.*, 1996), sugere que a leishporina possa ser uma proteína ou depender de proteínas para sua ação lítica. No entanto, mais recentemente, Castro-Gomes (2010) purificou lipídeos, identificados como lipofosfolinas (LPC), com atividade hemolítica. No entanto, ainda não foi possível demonstrar que esses lipídeos são capazes de formar poros em membranas biológicas, como foi visto no extrato total de promastigotas. Assim, é possível que proteínas e lipídeos possam estar envolvidos na atividade citolítica do que chamamos leishporina.

1. JUSTIFICATIVA

Por ser endêmica em vários países, ser de difícil tratamento e se manifestar com uma variedade de sintomas e formas, algumas fatais, a leishmaniose é ainda uma preocupação mundial da saúde pública. Embora muito já se conheça sobre a interação parasito-hospedeiro e a resposta imune do hospedeiro, quase nada sabemos sobre moléculas envolvidas na patogenia desta doença.

Nossa hipótese é que a leishporina esteja diretamente envolvida com a ruptura do macrófago no hospedeiro vertebrado, etapa já bem estabelecida no ciclo do parasito, mas cuja(s) causa(s) não possui(em) respaldo experimental. A plausibilidade de nossa hipótese de que a leishporina possa estar envolvida na saída do parasito da célula hospedeira tem sido reforçada em vários estudos, os quais sustentam a idéia de que esta evasão da célula hospedeira é um processo ativo e que as PFPs estariam envolvidas nas etapas principais (Roiko and Carruthers 2009). A proteína TgPLP1 de *T.gongii*, possui uma região de alta similaridade com o domínio MACPF de mamíferos, bactérias e protozoários e apresenta um papel central no escape do parasito, uma vez que parasitos com deficiência desta proteína não conseguem sair de seus vacúolos parasitóforos (Kafsack, Pena *et al.*, 2009). As características da leishporina (em particular sua atividade ótima em pH ácido e sua ativação em condições dissociantes (baixo pH, por exemplo, ou por proteólise) juntamente com outros trabalhos relacionados da literatura, dão suporte ao seu papel potencial na ruptura do macrófago. Assim, esta citolisina tem todo o potencial de agir dentro do fagolisossoma, colocando-a como uma ótima candidata ao papel de lisar a célula hospedeira (lesão tecidual e processo inflamatório) com a consequente liberação das amastigotas intracelulares (amplificação da infecção). Desta forma, investigar a função da leishporina e indagar sobre seu envolvimento na patogênese da leishmaniose é fundamental. Esse conhecimento poderá ser então utilizado para profilaxia ou terapêutica de modo a interferir na continuidade do ciclo parasitário.

A leishporina é a única citolisina formadora de poros descrita em *Leishmania* e, apesar de todo o trabalho desenvolvido até então, a identidade molecular da leishporina ainda não é conhecida e quaisquer estudos funcionais da leishporina dependem diretamente da sua identificação. Embora nosso grupo tenha purificado um lipídeo com atividade lítica, alguns resultados do nosso laboratório apontam para uma proteína como responsável, ou parcialmente responsável pela atividade da leishporina. Com o

sequenciamento completo do genoma de *L. major*, *L. infantum*, *L. brasiliensis*, *L. mexicana* (Peacock, Seeger *et al.*, 2007) e mais recentemente de *L. donovani* (Singh, Chikara *et al.*, 2013) tornou-se viável a identificação de genes que pudessem estar envolvidos com a atividade citolítica do parasito. Assim, nossas pesquisas no banco de dados tritrypDB, revelaram a existência de 3 genes anotados como hemolisinas do tipo III putativas denominados LmjF36.5500, LmjF36.5510, LmjF36.5520.

Uma vez que as hemolisinas III de outros organismos já foram apontadas como sendo PFPs (Baida and Kuzmin 1996, Chen, Chang *et al.*, 2004, Moonah, Sanders *et al.*, 2014), nos indagamos se as hemolisinas do tipo III de *L. major* poderiam codificar proteínas que fossem responsáveis pela atividade formadora de poros da leishporina ou que fossem fundamental para esta atividade.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi estudar os genes anotados como hemolisinas III de *L. major*, caracterizando-os em vários aspectos.

Foram os seguintes os nossos objetivos específicos:

1. Analisar *in silico* as sequências anotadas como hemolisinas do tipo III
2. Verificar a expressão de mRNAs dos os genes alvo e comparar a expressão relativa dos mRNAs em promastigotas e amastigotas de *L. major*.
3. Localizar no parasito as proteínas codificadas por esses genes.
3. Avaliar a se a superexpressão desses genes no parasito aumenta sua atividade hemolítica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análises *in silico*:

As sequências de aminoácidos das 3 proteínas de *L. major* anotadas como hemolisinas do tipo III foram obtidas do banco de dados TriTrypDB disponível em <http://tritrypdb.org/tritrypdb>. As sequências depositadas possuem os seguintes identificadores: LmjF.36.5500, LmjF.36.5510 e LmjF.36.5520 e serão nomeadas de agora em diante como Lm5500, Lm5510 e Lm5520. Todas as sequências foram submetidas a buscas minuciosas de similaridade usando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Utilizamos o programa *blastp*, com os parâmetros padrão e restringindo a busca para *Leishmania sp.*, com o intuito de analisar proteínas homólogas em espécies do gênero. As 4 proteínas homólogas mais bem ranqueadas para cada uma das 3 proteínas de *L. major* de acordo com o e-value, o percentual de cobertura e identidade, foram escolhidas. Além disso, realizamos as mesmas análises de bioinformática com a hemolisina III de *P. falciparum* (acession code XP_001348702.2), como referência, conforme investigado por Moonah e colaboradores (Moonah, Sanders *et al.*, 2014). A caracterização das sequências mencionadas foram realizadas utilizando a ferramenta CDSearch do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), o Disopred service do servidor PsiPred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred>) e o servidor TMHMM v.2,0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Para buscar domínios conservados utilizamos a versão 3,14 do CD database. A desordem intrínseca e as regiões putativas de ligação a proteínas foram identificadas pelo Disopred3 com um *score* de confiança mínimo de 0,5. Hélices transmembrana foram preditas usando o servidor TMHMM, que foi classificado como o melhor servidor para predição de regiões transmembrana por um estudo independente de Moller e colaboradores (Moller, Croning *et al.*, 2001), embora, segundo este estudo, o erro mais comum é a orientação da proteína, ou seja, a inversão dos segmentos intracelulares e extracelulares. Moonah e colaboradores (2014) descreveram o alinhamento de regiões conservadas de hemolisina III de vários patógenos. Além das características conservadas, um motivo altamente conservado foi identificado (DxxxIxxxIxG). Buscamos manualmente este motivo nas proteínas de *L. major* estudadas e em seus respectivos homólogos.

4.2. Cultivo e estoque de promastigotes e obtenção de formas amastigotas-like.

A espécie de *Leishmania* utilizada neste trabalho foi a *L. major*, linhagem Friedlin. As amostras preservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e inoculadas em meio de cultura Schneider (Sigma Chem. Co.) acrescido de 10% v/v de soro fetal bovino. O crescimento dos parasitos foi acompanhado ao microscópio invertido (Olympus IMT, Tóquio, Japão) para verificar o crescimento adequado do parasito e a ausência de contaminação. Os parasitos utilizados foram colhidos no quarto ou quinto dia de cultivo, no ponto máximo de seu crescimento e início da fase estacionária, quando a atividade hemolítica era máxima (Noronha, Ramalho-Pinto *et al.*, 1996). A contagem das promastigotas foi feita utilizando uma pequena alíquota retirada das garrafas de cultura. Essa alíquota foi diluída num determinado volume de ISOTON (ácido cítrico 0,05 M, NaCl 0,12 M, formaldeído 0,5 % v/v, pH 7,2), 10 µl dessa diluição foram então aplicados em câmara hemacitométrica de Neubauer (C. A. Hausser&Son, Philadelphia, USA) e a contagem das promastigotas foi feita em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. A média aritmética dos quatro quadrantes para contagem de células foi obtida e multiplicada pelo inverso da diluição em ISOTON e novamente multiplicada por 10⁴, o fator de correção da câmara, para a obtenção do número de parasitos por ml de cultura. O número máximo de passagens que as promastigotas foram submetidas foi dez, uma vez que parasitos mantidos em culturas *in vitro* por longo tempo perdem algumas de suas características, incluindo a virulência

Após serem lavadas cinco vezes com PBS1X (132 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,2), as promastigotas foram alíquotadas e congeladas a -80 °C em tubos tipo Eppendorf até o momento do uso. Essas massas de parasitos foram posteriormente ressuspensas em tampões apropriados para extração de DNA genômico, extração de RNA, ou preparação de extratos para ensaio hemolítico.

A diferenciação axênica de promastigotas de *L. major* em formas amastigotas-like, foi feita como descrito previamente (Doyle *et al.*, 1991). Brevemente, promastigotas foram mantidas a 34°C com 5% de CO₂ em 100% de soro fetal bovino inativado, por 72 horas. As amastigotas obtidas após esse período mostraram características morfológicas similares a amastigotas isoladas *in vivo*.

4.3. Preparo dos extratos de parasito para ensaio hemolítico

Alíquotas de 2×10^9 promastigotas de *L. major* foram ressuspendidas em tampão ácido bórico-NaOH 50mM pH 7,0. Esta suspensão foi então submetida a cinco ciclos de congelamento-descongelamento em N₂ líquido e banho-maria 37°C para rompimento dos parasitos. Este extrato total foi então submetido a uma rápida centrifugação a 1000g durante 5 minutos para sedimentação dos núcleos e parasitos íntegros. O sobrenadante, o extrato total, foi então transferido para outro tubo de 1,5ml e centrifugado durante uma hora a 10.000g para sedimentar as frações de membrana. Em seguida o sobrenadante foi desprezado, o sedimento rico em membranas ressuspendido para o volume inicial acrescido de 0,4% de CHAPS (3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amônio]-1-propanosulfato) (Sigma), concentração sublítica para as hemácias, e incubado por 1 hora a 4°C com agitação ocasional. Depois desse tratamento, a fração de membranas solubilizada foi novamente centrifugada a 10.000g e o sobrenadante, o extrato da fração de membranas solubilizado (Ext-ms), foi então utilizado nos experimentos.

4.4. Ensaio hemolítico

4.4.1. Padronização do número de hemácias

Hemácias humanas foram colhidas e mantidas diluídas em solução preservativa de Alsever (glicose 100mM, citrato de sódio 30mM, NaCl 70mM, pH 6,0) na proporção 1:3, onde ficaram guardadas a 4°C por até três semanas. Antes de serem utilizadas, as hemácias foram lavadas três vezes com PBS. O número de células foi determinado de modo indireto através da liberação da hemoglobina na lise das hemácias em água. Após a última lavagem, 100µl do sedimento de hemácias foram colocados em 900µl de PBS e 100µl dessa nova suspensão foram colocados em 1400µl de água destilada para rompimento das células. O produto da lise foi então lido a 545nm e, uma vez conhecida a densidade óptica, obtínhamos o número de hemácias presentes nos 1000µl da suspensão formada. Sabendo que 0,7 unidades de absorbância correspondem a 1×10^9 hemácias, o número de células foi determinado.

4.4.2. Determinação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica dos extratos foi determinada fazendo-se a sua diluição em série (1:2) em placa de microensaio Nunc (Dinamarca). Após a diluição, 200µl de tampão acetato (acetato de sódio-ácido acético 20mM, pH 5,5 com 150mM de cloreto de sódio) contendo 5×10^6 hemácias foram acrescentados em cada compartimento. Após incubação por 30 minutos a 37°C, a placa foi então centrifugada por 10 minutos a 500g para sedimentar as hemácias não rompidas. A hemoglobina liberada no sobrenadante foi lida em placa de fundo chato Nunc a 414nm, em leitor de ELISA. Para os cálculos de porcentagem de lise, a quantidade total de hemoglobina liberada foi obtida provocando-se a lise da mesma quantidade de hemácias de cada compartimento com 10µl de solução de Triton X-100 a 0,25%. Foram ainda reservados compartimentos que continham somente as hemácias e tampão para se fazer o controle da lise espontânea que foi sempre deduzida dos valores obtidos.

4.5. PCR em Tempo Real

A PCR em tempo real é uma técnica que quantifica os níveis de cDNA pela coleta de dados de emissão de fluorescência ao longo da reação de amplificação do DNA. Assim, quanto maior o número de cópias iniciais da sequência alvo, mais rápido será observado o aumento da fluorescência.

Cerca de 2×10^8 promastigotas em início da fase estacionária e amastigotas-like após 72 horas de incubação, foram utilizadas para extração e purificação de RNA total. Os parasitos foram centrifugados a 10.000 rpm (centrífuga Hitachi CR216II) por 10min e lavados 2 vezes em PBS. O *pellet* de parasitos foi armazenado a -80°C até sua utilização. A extração foi realizada utilizando TRIzol, conforme instruções do fabricante. A eficiência da extração de RNA foi analisada por espectrofotometria a 260nm. Os RNAs totais extraídos e purificados foram tratados com DNase e usados para a síntese subsequente de cDNA, utilizando o kit Superscript III cDNA Synthesis (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi armazenado a -20°C até ser utilizado. Utilizamos o SYBR Green como fluoróforo e o gene GAPDH como normalizador. Os iniciadores foram desenhados usando os softwares GenScript Real-

time PCR (TaqMan) Primer Design (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>) e Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Os iniciadores utilizados estão na Tabela 2.

Tabela 2: Iniciadores utilizados para PCR em Tempo Real

	Direto	Reverso	Amplicon
Lm5500	5' TCCCCACGATTCACTTGTCG 3'	5' GCGGAAGGCGTAGATGAAGA 3'	116pB
Lm5510	5'GCTGGAGGAACCAGAACACTC 3'	5' AGTTCCTTTGCTGCTCCCTC 3'	149pB
Lm55520	5' TGTCTTCTCGGTGTTTCAGC 3'	5' GGAGGTGATGCCGAAGTAGT 3'	133pB
GAPDH	5' TCAAGGGTGGTGCGAAGAAG 3'	5' TCGCCGTGTAGGAGTGGATG 3'	140pB

Para fins de padronização, nove diferentes combinações de concentrações de iniciadores (300/300, 300/600, 300/900, 600/300, 600/600, 600/900, 900/300, 900/600, 900/900 nM) e quatro quantidades iniciais de cDNA (10 ng, 1 ng, 0,1 ng e 0,01 ng) foram testadas para a geração das curvas de dissociação e padrão, valores de *slope*, taxa de eficiência (que deve apresentar valores próximos de 2) e valores de coeficiência R2 para cada iniciador. Assim, a mistura para a reação de qRT-PCR foi composta por 10 ng de cDNA, 600 nM de cada iniciador, 2,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, CA) e água deionizada, totalizando 5 µL de volume final de reação. As amostras foram aplicadas em placas de 384 poços (AppliedBiosystems, Foster City, CA) em triplicata, além do controle negativo (branco) e controle positivo (amplificação do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - GAPDH, usado para a posterior normalização). As placas foram lidas no equipamento AB7900 (AppliedBiosystems). A normalização foi realizada aplicando o método $-2\Delta\Delta C_t$. A parte estatística foi realizada utilizando o software GraphPadPrism V5.04.

4.6 Northern blot

Para os ensaios de Northern blot com RNA total, 10 µg do RNA de Promastigotas e amastigotas foram separados em gel de agarose a 1.2% em tampão MOPS pH 7.0 por 2 horas. Após a eletroforese, os géis foram tratados duas vezes com SSC 10x (NaCl a 3M; citrato de sódio a 0.3 mM; pH 7.0) por 20 minutos. Os RNAs foram transferidos por capilaridade, em SSC 10x, para membranas de Hybond-N+ QIABRANE NYLON (QIAGEN) também tratadas previamente com SSC 10x por 5 minutos. Após a

transferência, as membranas foram lavadas em SSC 6x e os RNAs foram imobilizados por irradiação com luz UV no aparelho UVSTRATALINKER (Stratagene). A hibridação foi realizada como descrito previamente por Ausubel et al. (1995). Brevemente, as membranas foram pré-hibridadas por 3h, a 42°C, sob rotação, em solução de formamida a 50%, SSC 6x, Denhardt's 10x, SDS a 0,2% e DNA de esperma de salmão a 75 µg/mL. Posteriormente, as membranas foram hibridadas por 16 h a 42 °C com 100 ng de sonda purificada, previamente marcada com [α -32P]-dCTP, usando o kit *Amersham Ready-To-Go DNA Labelling Beads* (GE Healthcare), conforme recomendações do fabricante. Após a hibridação, as membranas foram lavadas duas vezes com SSC 2X/0,1% SDS a 42°C durante 30 min cada. Todas as membranas foram expostas a filmes de raio-X (Kodak) ou reveladas usando o sistema de fotodocumentação STORM820 PhosphoImager (GE Healthcare).

4.7. Amplificação e purificação dos fragmentos dos genes de hemolisina III de *L. major*

As sequências de interesse foram amplificadas por PCR a partir de DNA genômico utilizando o SuperMix High Fidelity (Invitrogen) que possui a enzima Taq DNA polimerase e uma DNA polimerase de *Pyrococcus* com atividade corretora 3' e 5'. Foram desenhados pares de iniciadores específicos para amplificar os fragmentos de interesse de cada gene (**Tabela 3**). Estes fragmentos gênicos foram isentos de sequencias codificadoras de regiões transmembrana e/ou hidrofóbicas. Cada reação continha 80ng de DNA plasmidiano, 1µl de cada iniciador a 10 pmoles/µl e 45µl do Supermix, em um volume final de 50µl. As reações foram feitas em termociclador PTC-100TM (MJ Research Inc.) utilizando o seguinte programa: desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos; 72°C por 10 minutos final. Os produtos da amplificação foram submetidos à separação por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídio 0,1mg/ml, e visualizados em luz ultravioleta.

Após a separação dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose, os fragmentos de interesse foram excisados do gel e purificados usando o kit GFX gel and PCRpurification kit (GE Healthcare), que se baseia na adsorção de DNA em sílica, conforme instruções do fabricante.

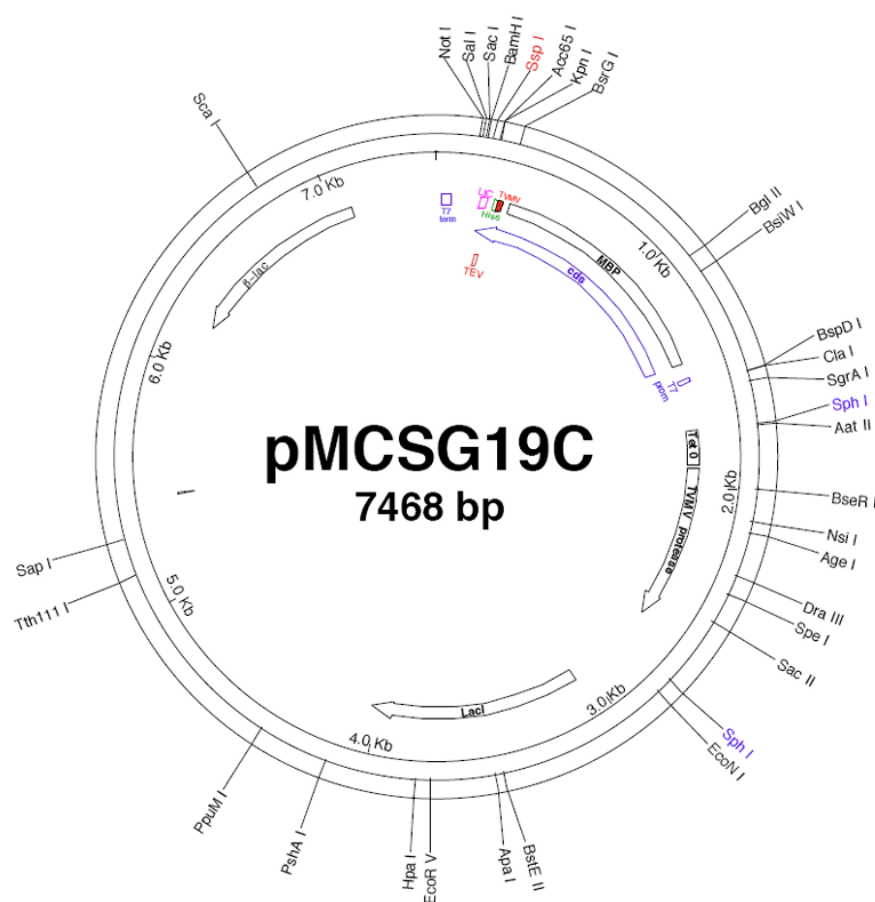
Tabela 3: Iniciadores utilizados para clonagem no vetor LIC

	Direto	Reverso	Amplicon
Lm5500	5' TACTTCCAATCCAATGGGA TGTTTTCTCGCAAGAGCT 3'	5' TTATCCACTTCCAATGGCT TCCATGTGTAGTAGGC 3'	308pB
Lm5510	5' TACTTCCAATCCAATGGGA TGCTCTGAAGGCAACAGA 3'	5' TTATCCACTTCCAATGC CATCGTGATCAAGTTCCTT 3'	686pB
Lm55520	5' TACTTCCAATCCAATGGGAT GAACGACGCACTAACCAGC 3'	5' TTATCCACTTCCAATGGT GTCTCGTTGTGGAGGGCG 3'	312pB

4.8. Clonagem dos fragmentos amplificados no vetor LIC

Os produtos de PCR purificados foram clonados no vetor LIC (*Ligation Independent Cloning*) conforme instruções do fabricante (Novagen). Este vetor foi desenvolvido para a clonagem direcional de produtos de PCR sem a utilização de enzimas de restrição ou reações de ligação. A proteína de interesse é traduzida em fusão com uma cauda de histidina (His6-tag) na região N-terminal, que facilita sua purificação e com a proteína MBP (*maltose-binding protein*), que aumenta sua solubilidade e expressão. A MBP é clivada da construção após a expressão.

Mapa do vetor:



4.9. Obtenção e transformação de bactérias termocompetentes

Para os experimentos de transformação bacteriana, foi utilizada a linhagem de *E. coli* XL1-Blue recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proABlacIqZ M15 Tn10 (Tetr)] termocompetente, preparada pela inoculação de uma colônia isolada em 10ml de meio LB e incubação sob agitação (180 rpm) a 37°C por 12 horas. Cerca de 1ml da pré-cultura foi transferido para uma nova cultura de 50ml de meio LB e novamente incubada a 37°C sob forte agitação até a obtenção de OD_{600nm} entre 0,2-0,6. As células foram coletadas por centrifugação a 5000g por 10 minutos, concentradas em 3ml de solução para indução de competência (1g tripton; 0,5g extrato de levedura; 0,5g NaCl; 10mM MgCl₂; 10mM MgSO₄; PEG 8.000 10% (p/v) e 5ml DMSO para 100ml de solução, pH 7,5) e incubadas por 10 minutos no gelo. Após a adição de glicerol para a concentração final de 15% e homogeneização, a suspensão foi dividida em alíquotas de 300µl. Estas células foram congeladas imediatamente em gelo seco e estocadas a -80°C até o uso.

Bactérias *E. coli* XL1-Blue termocompetentes foram utilizadas para transformação por choque térmico. A transformação foi feita adicionando 1µl da solução de DNA a uma alíquota de 50µl da suspensão de bactérias e incubando a mistura em gelo por 30 minutos. A solução foi submetida a um choque térmico de 42°C por 1 minuto e 0°C no gelo por mais 1 minuto. Adicionou-se 250µl de meio LB e incubou-se a 37°C por 1 hora. A cultura transformada foi plaqueada em meio LB-ágar (LB + 15g/L ágar) acrescido de 100 µg/ml de ampicilina e incubada por 37°C por 16 horas.

4.10. Obtenção do DNA plasmidiano em pequena escala

Preparações de DNA plasmidiano em pequena escala (miniprep) foram obtidas utilizando o kit GFX Plasmid mini kit (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. A eficiência da purificação foi analisada pela separação de 1µl das amostras de DNA obtidas em géis de agarose 1% e por espectrofotometria a 260nm.

4.11. Expressão de proteínas recombinantes em pequena escala

As colônias positivas, selecionadas por PCR de colônia, foram utilizadas para um teste de expressão em pequena escala realizado para verificar a adequada expressão das proteínas recombinantes (conjugadas com a cauda de 6xHis). As colônias de bactérias foram crescidas em 3ml de meio LB contendo ampicilina (100µg/ml) por aproximadamente 16 horas, a 37°C, em agitador (200 rpm). Em seguida foi feito um repique de 1:100 em frascos contendo 10ml de meio LB e o mesmo antibiótico. Após cerca de 2 horas, foram obtidas leituras de densidade óptica das culturas a 600nm. Ao atingir a OD₆₀₀ de 0,4, foi coletado 1ml das culturas (0h) antes de adicionar IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosideo) 1mM. Novas amostras foram coletadas após 4 horas de indução, mantendo-se sempre o mesmo número de células, de acordo com a densidade óptica das amostras colhidas no tempo 0h. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm (Eppendorf) e os *pellets* ressuspensos em 75µl de água. Após a adição de 25µl de tampão da amostra (Tris-HCl 62,5mM pH 6,8; Glicerol 10%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,00125%) as amostras foram fervidas por 5 min. O material foi

então utilizado para separação por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5%, como descrito em Ausubel e Cols. (1995).

4.12. Expressão das proteínas recombinantes em larga escala

Após o teste anterior, as colônias que apresentavam as melhores eficiências de expressão de proteínas recombinantes foram utilizadas para a expressão das proteínas em larga escala. Para isso, os clones selecionados foram retirados diretamente da placa de cultura e inoculados em 10 mL de meio CircleGrow suplementado com 100 µg/mL de ampicilina (pré-inóculo). Os pré-inóculos foram incubados por 16 horas a 37°C sob agitação (180 rpm). Depois deste tempo, todo o volume foi inoculado em 1 L de meio CircleGrow suplementado com ampicilina. Mais uma vez, as culturas foram incubadas a 37° C sob agitação de 180 rpm com boa aeração e o crescimento das células foi controlado até uma OD₆₀₀ de 0,4-0,6. Neste momento, alíquotas de 1mL das culturas foram coletadas para posterior verificação da expressão (T0). A expressão foi então induzida com o acréscimo de IPTG em uma concentração final de 1,2 mM por 4 horas. A cada hora de expressão, alíquotas com volume devidamente corrigido com a OD₆₀₀ do T0, foram coletadas (T1, T2, T3, T4 da expressão) com o objetivo de acompanhar a cinética da expressão. Essas alíquotas foram centrifugadas por 10 minutos a 16000 g e as células foram ressuspensas em tampão de amostra 2x (Tris-HCl 62,5mM pH 6,8; Glicerol 10%; SDS 2%; β-Mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,00125%), fervidas por 5 min e então submetidas à eletroforese em SDS-PAGE 14 % em tampão Tris-glicina (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 250 mM glicina, 0,1 % SDS) a 120 V por aproximadamente 2 horas. Os géis foram corados por Coomassie Blue (0,25 % Coomassie blue R 250, 50 % metanol, 10 % ácido acético) em temperatura ambiente e lavados várias vezes com solução descorante (50 % metanol, 10 % ácido acético). Os pesos moleculares das proteínas de fusão foram confirmados por comparação com padrões de peso molecular de proteínas (*Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder*, Fermentas). Após o término do período de expressão, as células foram coletadas por centrifugação a 4000 g, a 4°C, por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas com auxílio de pipeta em 30 mL de tampão de coluna (20 mM fosfato de sódio; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol pH 7,4; 10% glicerol) acrescido de 1 % (p/v) de sarcosyl (Sigma Aldrich) e submetidas a 3 ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 37°C em banho.

Antes e após o congelamento e descongelamento do extrato protéico foi adicionado à suspensão lisozima na concentração final de 100 µg/mL. As bactérias foram então sonicadas com 3 pulsos de 15 segundos cada, com potência de 30% em sonicador (Fischer Scientific) para a liberação total das proteínas citoplasmáticas. A suspensão foi então centrifugada a 9000 g, 4° C por 30 minutos. O sobrenadante foi filtrado utilizando filtro 0,45 µM.

4.13. Purificação das proteínas recombinantes

As purificações foram feitas em aparelho ÄKTA primeplus (GE Healthcare) e as frações purificadas foram analisadas por SDS-PAGE 12%. A purificação das proteínas recombinantes foi feita por cromatografia de afinidade utilizando coluna HisTrap™ HP 5 mL (GE Healthcare). Na eluição dessa coluna obtém-se a proteína recombinante em fusão com uma cauda de 6xHis. O tampão de ligação para esta cromatografia foi 20 mM fosfato de sódio; 500 mM NaCl; 20 mM imidazol pH 7,4. O tampão de eluição foi 20 mM fosfato de sódio; 500 mM NaCl; 500 mM imidazol pH 7,4.

4.14. Western Blot com frações obtidas da purificação utilizando o anticorpo anti-histidinas (anti-His) e o soro dos animais imunizados.

Aproximadamente 2µg de proteínas obtidas das purificações citadas no item acima foram submetidas a SDS-PAGE 14%. Para confirmação do peso molecular das proteínas foi utilizado um padrão de peso molecular previamente corado (*Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Fermentas). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) utilizando um aparelho de eletrotransferência *Trans-blot Semi-Dry* (Bio-Rad) a 20 V e 200 mA por 30 minutos em tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20 % metanol, 0,1 % SDS). A membrana foi bloqueada por 16 horas em PBS-Tween 20 0,05 % (PBS-Tween 0,05 %) com 5 % (p/v) de leite em pó desnatado, lavada por três vezes de 10 minutos cada em PBS-Tween 0,02 % e então incubada por 1 hora e 30 minutos com o anticorpo anti-His (GE Healthcare), diluído 1:2000 em PBS-Tween 0,05 % ou então incubada por 1 hora e 30 minutos com o soro dos animais imunizados diluído 1:1000. A membrana foi lavada por mais três vezes em PBS-Tween 0,05 % e incubada por 1 hora com anticorpo anti-IgG

de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich) diluído 1:2000 em PBS-Tween 0,05 %. Em seguida, a membrana foi lavada por mais três vezes em PBS-Tween 0,05 %, tratada com substrato para peroxidase e revelada no fotodocumentador.

4.15. Imunização de camundongos

Após a confirmação da expressão das proteínas recombinantes, camundongos machos ou fêmeas da linhagem BALB/c, com idade entre 6-8 semanas, fornecidos pelo Biotério Central do ICB/UFMG, foram imunizados com três doses de 25 µg de proteína recombinante em adjuvante de Freund (completo – primeira dose – ou incompleto – segunda e terceira doses), com intervalos de 15 dias entre as doses. Antes da primeira imunização, cerca de 300 µL de sangue foi coletado do plexo orbital dos animais, com a ajuda de pipeta de Pasteur longa de vidro (soro pré-imune). Dez dias após a última dose, foi coletado cerca de 1,5mL de sangue do plexo orbital e, em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Todos os protocolos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CETEA)/UFMG, protocolo no. 109/2012, válido até 09/04/2019.

4.16. Imunolocalização

Um mililitro de cultura de promastigotas de *L. major*, em início de fase estacionária, foi coletada, centrifugada 5 minutos a 4.000 rpm e lavada 1x com PBS. Após a lavagem, os parasitos foram fixados em 500µl de paraformaldeído 4% por 20 minutos, lavados 2x com 500µl de PBS e ressuspensos também em PBS de modo que ficassem 2×10^6 parasitos em cada 20µl (quantidade usada por poço da lâmina). Os parasitos foram aderidos na lâmina previamente tratada com poli-L-lisina por 20 minutos dentro de câmara úmida e depois permeabilizadas com PBS-Triton 0,01% por 10 minutos. Após 2 etapas de lavagem com PBS foi feito o bloqueio com PBS-BSA 4% por 1 hora seguido de mais 2 lavagens. Desta forma as promastigotas ficavam prontas para serem tratadas com os anticorpos, a saber:

- Anticorpo primário – 20µl do soro de camundongo imunizado com cada uma das três proteínas diluídos 1:100 por 2hrs.

- Anticorpo secundário conjugado ao ALEXA 488 – após a lavagem do anticorpo primário 2x com PBS, foi adicionado o anticorpo secundário diluído 1:1000 por 1 hora
- DAPI – após lavagem do anticorpo secundário 2x com PBS foi adicionado DAPI para a marcação nuclear 20 µl (1:5000) por 5 minutos.

Após as marcações, a lâmina foi montada com Prolong GOLD (Invitrogen) e selada com esmalte.

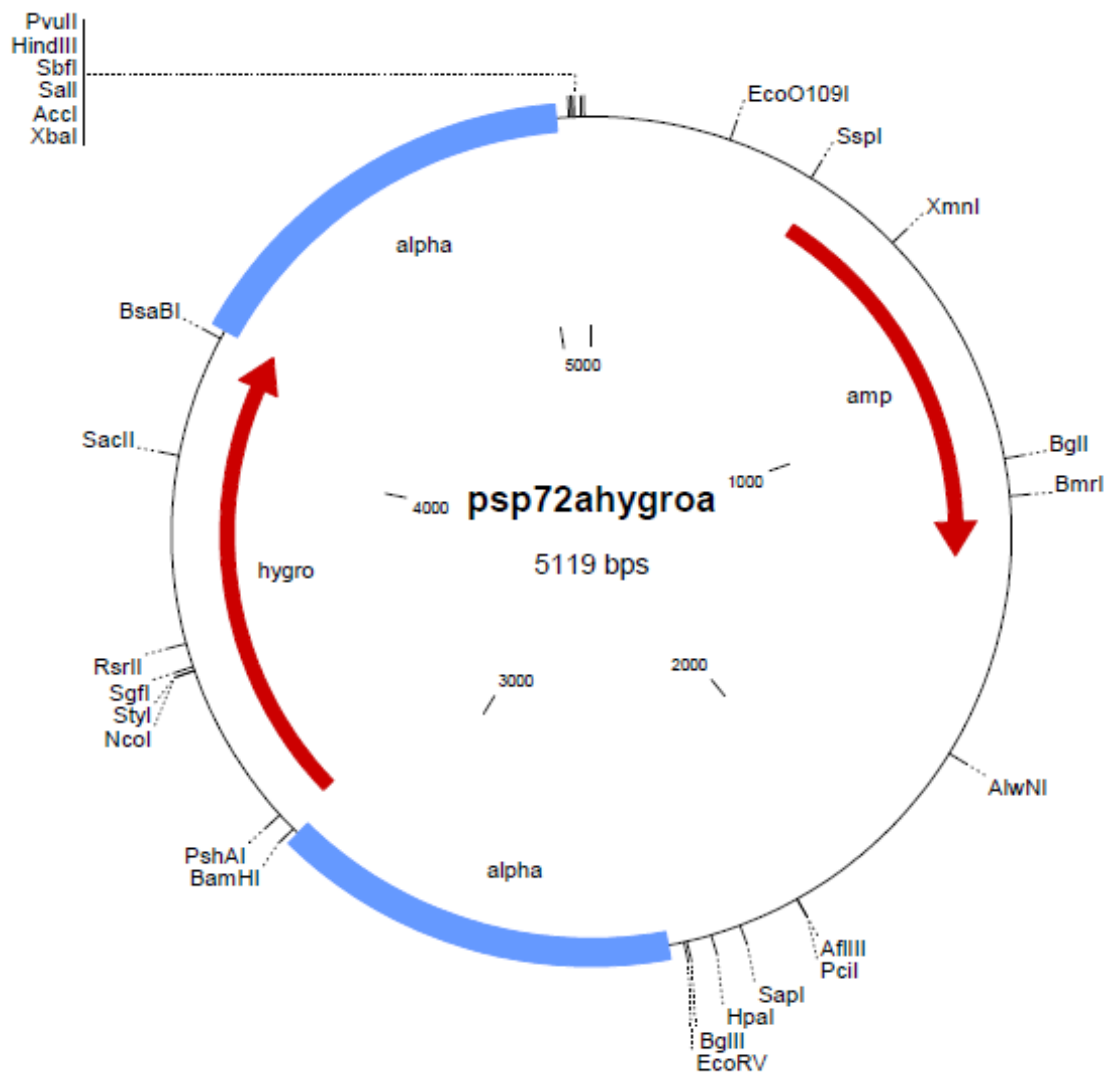
4.17. Amplificação dos genes de interesse e clonagem do vetor de superexpressão pSP72αHYGα

Para o estudo funcional, os genes expressos *Lm5500* e *Lm5520* foram clonados e transfectados em *L. major*. A clonagem foi inicialmente realizada com os amplicons obtidos pela PCR específica para cada gene, utilizando DNA genômico de *L. major* como molde. Os amplicons foram clonados no vetor pGEM[®]T-easy (Promega, Madison, WI, EUA) e, em seguida, subclonados em vetor de expressão pSP72αHYGα. Este plasmídeo foi construído clonando-se um fragmento de 0,78kb da região intergênica de alfa tubulina de *Leishmania enriette* a 5' e a 3' do gene que codifica higromicinafosfotransferase no vetor pSP72 (Promega) (Richard, Leprohon *et al.*, 2004) (El Fadili, Kundig *et al.*, 2002). Os vetores contendo as fases de leitura de cada um dos genes pSP72αHYGα::*Lm5500* e pSP72αHYGα::*Lm5520* foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* termocompetentes (Top 10F'). Ambos os genes foram clonados nos sítios de restrição das enzimas *Xba*I e *Hind*III no vetor de expressão contendo o gene marcador de seleção que codifica a proteína higromicina fosfotransferase (HYG), o qual confere resistência ao antibiótico higromicina. Os iniciadores utilizados para a amplificação dos genes estão na **Tabela 4**. Para a confirmação da clonagem, os plasmídeos foram amplificados em bactérias, isolados por miniprep, digeridos com *Xba*I e *Hind*III por 3 h, os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose 1% e os produtos confirmados pela presença das bandas específicas de aproximadamente 1 kb. Além disso, os genes clonados foram sequenciados e o resultado obtido foi comparado com o genoma de referência de *L. major*, disponível em tritrypdb.org.

Tabela 4: Iniciadores utilizados para clonagem no vetor pSP72aHYGα

	Direto	Reverso	Amplicon
Lm5500	5' TCTAGAATGTTTTCTC GCAAGAGCTCGAGT 3'	5' AAGCTTCTACACGCA CACGATCGTTTCACG 3'	1102pB
Lm5520	5' TCTAGAATGAACGAC GCACTAACCAGCGAC 3'	5' AAGCTTTTACGCGCAC TCACCGCCCACTCC 3'	1026pB

Mapa do vetor:



4.18 - Transfecção de DNA por eletroporação em *L. major*

A superexpressão dos genes *Lm5500* e *Lm5520* em *L. major* WT foi realizada por eletroporação das construções pSP72 α HYG α ::*Lm5500* e pSP72 α HYG α ::*Lm5520*. O protocolo de transfecção foi baseado no método descrito por Beverley e Clayton (1993). Para cada transfecção foram utilizadas aproximadamente 6×10^7 formas promastigotas de *L. major* em fase logarítmica final de crescimento e 10-20 μ g do plasmídeo a ser transfectado, purificado e eluído em água. As culturas foram centrifugadas durante 5 minutos a 3.000 rpm e lavadas em tampão HEPES/NaCl (21 mM HEPES; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM Na₂HPO₄; 6 mM Glicose; pH 7,05). O sedimento celular resultante foi suspenso em 0,5 mL de tampão HEPES/NaCl, homogeneizado com o DNA a ser transfectado e mantido em gelo por 10 minutos. As células foram então transferidas para uma cubeta de transfecção de 0,4 cm (Gene Pulser[®], BioRad Laboratories, Hercules, EUA) e submetidos à eletroporação utilizando 1500 volts e 25 μ F (micro Faraday), com tempo constante entre 3 e 4 milisegundos em eletroporador Gene Pulser II (BioRad Laboratories, Hercules, EUA). Após a descarga elétrica, 1 mL de meio de cultura α -MEM foi adicionado à cubeta de eletroporação, a qual foi incubada em gelo por 10 minutos adicionais. As células recém transfectadas foram transferidas para um frasco de cultura celular de 25 cm² (Corning, NY, USA) contendo 10 mL de meio cultura α -MEM e incubadas a 25 °C durante 24 h. Após esse período, a cada frasco foi adicionado o antibiótico de seleção higromicina (pré-seleção). As culturas foram mais uma vez mantidas em estufa a 25 °C e, após 24 h, uma alíquota de 1 mL foi adicionada em frasco de cultura celular contendo 5 mL de meio α -MEM na presença de 30 μ g/mL de higromicina (seleção). Para cada experimento foram transfectadas células na ausência do vetor como controle negativo de seleção, ou transfectadas com o vetor vazio (sem o gene de interesse) (Mock).

4.19 - Obtenção dos extratos totais dos clones superexpressores

Promastigotas de *L. major* foram ressuspensas em tampão ácido bórico-NaOH, pH 7,0, com 0,4% de CHAPS (concentração subletal) para uma densidade de 2×10^9 parasitos/ml e incubadas no gelo por 1hr, vortexando a cada 10min. Logo após, o extrato foi centrifugado por 1min a 3000 rpm, o sobrenadante foi coletado e utilizado como extrato total (Ext-T) para ensaio hemolítico, *Western blot* ou SDS PAGE.

5. RESULTADOS

5.1. Busca por genes candidatos à codificarem proteínas com atividade citolítica

A disponibilidade do genoma sequenciado de algumas espécies de *Leishmania* nos permitiu analisar os bancos de dados disponíveis em busca de genes candidatos à codificarem proteínas citolíticas. Proteínas geralmente possuem uma ou mais regiões funcionais conhecidas como domínios, cuja identificação pode dar uma ideia de sua função. Pfam é um banco de dados de famílias de proteínas que inclui anotações geradas a partir de alinhamentos múltiplos. Desta forma, o banco de dados Pfam agrupa famílias de proteínas a partir da identificação de domínios. Analisando a lista de domínios Pfam no banco de dados GeneDB em proteínas descritas para *L. major*, encontramos 3 sequências anotadas como hemolisinas do tipo III, cuja identificação de Pfam é PF03006: LmjF36.5500, LmjF36.5510, LmjF36.5520, sequências que serão nomeadas de agora em diante como hemolisinas do tipo III de *L. major*, de forma geral, ou Lm5500, Lm5510 e Lm5520. Essas três sequências foram descritas como codificadoras de proteínas hipotéticas, conservadas, possuindo uma janela de leitura completa, do códon de iniciação ao códon de terminação. As sequências de aminoácidos das 3 proteínas de *L. major* foram obtidas do banco de dados TriTrypDB. Membros desta família são proteínas integrais de membrana incluindo uma proteína com atividade hemolítica de *B. cereus*.

5.2. Características gerais das proteínas potencialmente codificadas pelos genes Lm5500, Lm5510 e Lm5520

A **Figura 2** mostra as características gerais de cada uma das proteínas. Todas as sequências foram submetidas a buscas minuciosas de homologia com o intuito de analisar proteínas ortólogas em outras espécies de *Leishmania*. A busca revelou 4 proteínas ortólogas em *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. brasiliensis* e *L. panamensis* para cada uma das proteínas estudadas. O resultado dessa busca mostra que as hemolisinas do tipo III possuem 7 hélices transmembranas, seus tamanhos variando de 338 a 670 aa, com pesos moleculares de aproximadamente 38 a 70 kDa. O resultado da busca no CDSearch tool para domínios conservados mostrou a presença do domínio característico da superfamília das hemolisinas do tipo III - HlyIII (PSSMID 275797) na porção N-terminal das

proteínas. Esses domínios estão representados na figura como blocos sólidos. Regiões desordenadas foram encontradas na porção C-terminal, representado na figura como linhas onduladas.

Juntamente com os ortólogos em *Leishmania* sp, comparamos também na **Figura 2** o gene ortólogo em *P. falciparum*, uma vez que Moonah e colaboradores (2014) o descreveram como uma hemolisina III formadora de poros. Nesse trabalho, os autores identificaram um motivo altamente conservado (DxxxIxxxIxG) que caracteriza as hemolisinas III formadoras de poros. Buscamos manualmente este motivo nas proteínas de *L. major* estudadas e em seus respectivos ortólogos. Esse motivo foi encontrado em todas as hemolisinas III de *Leishmania* e está representado na figura por um pequeno círculo dentro da sequência proteica. A **Figura 3A** mostra em detalhes o motivo DxxxIxxxIxG nas sequências Lm5500, Lm5510 e Lm5520 e em seus respectivos ortólogos. As hemolisinas III estudadas também possuem ortólogos em outras espécies de tripanossomatídeos, como *T. gondii*, *E. histolytica* e *Plasmodium* sp. A **Figura 3B** mostra em detalhes a similaridade da região do domínio de HlyIII entre as proteínas estudadas e suas ortólogas. Podemos ver que o domínio HlyIII é bastante conservado em todos as proteínas analisadas.

5.3 Atividade hemolítica do extrato solúvel de membrana (Ext-ms) de promastigota de *L. major*

Como dito anteriormente, chamamos de leishporina uma atividade citolítica que foi descrita inicialmente em *L. amazonensis*, mas que foi também detectada em *L. major*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (Noronha *et al.*, 1996; Almeida-Campos *et al.*, 2000). Como nossas buscas foram feitas em *L. major* e esta é a espécie utilizada neste trabalho, mostramos na **Figura 4** a atividade hemolítica de *L. major*, utilizando extratos de proteínas solubilizadas de membrana de promastigotas (Ext-ms). Verificamos que a atividade hemolítica de Ext-ms de *L. major* é muito semelhante à da *L. amazonensis*, como já havíamos mostrado anteriormente (Noronha *et al.*, 1996).

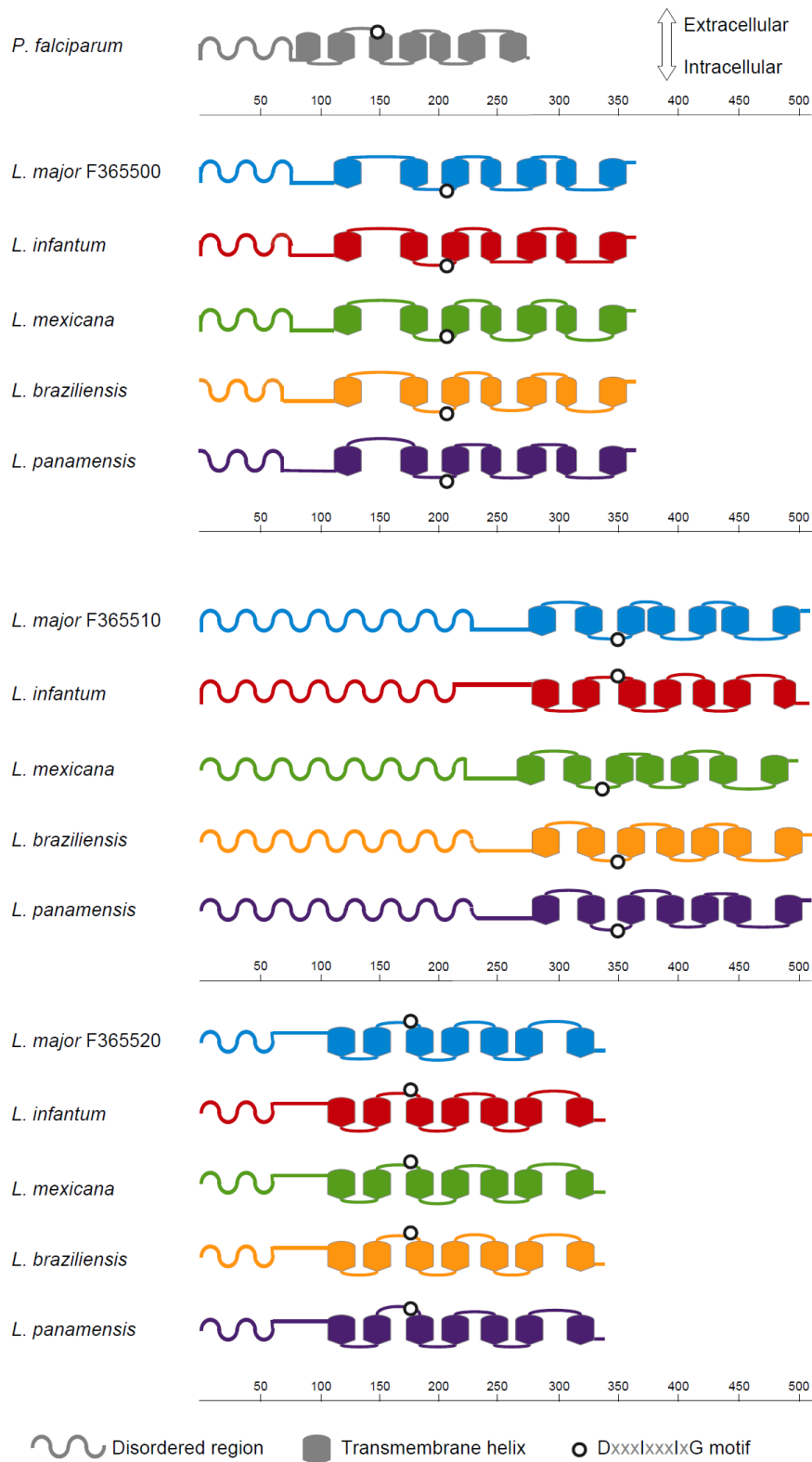


Figura 2- Características das hemolisinas III de *L. major*, seus respectivos homólogos em *Leishmania sp* e o gene ortólogo em *Plasmodium falciparum*.

A)

```

XP001348702.2      LLHNFWEWPKPFFFIIEKMDHFGIFLMISSGSLLPVQALLFNKI KLL---FFISLQFFAILF
Lbraziliensis5500 HTFLCHMSEEFYHRMHALDYAITLLVVGSLPFCFYAMHSCAPAWRNAYLSMISSF-GVI
Lpanamensis5500   HTFLCHMSEEFYHRMHALDYAITLLVVGSLPFCFYAMHSCAPAWRNAYLSMISSF-GVV
Lmexicana5500     HTFLCHMSEDFYHRMHALDYGITFLVVGSLPFCFYAMSCAPEWRNAYLSMIGSF-GVV
LmjF365500        HTFLCHMSEDFYHRMHALDYGITFLVVGSLPFCFYAMSCAPEWRNAYLSMIGSF-GLV
Linfantum5500     HTFLCHMSEDFYHRMHALDYGITFLVVGSLPFCFYAMSCAPEWRNAYLSMIGSF-GLA
Leishmania_braziliensis5520 HTLSAHHCEQVHNVALAIDYFGITSMIVGSFYPPVFYLFSCLTVVRSVYLITITLL-GIL
Leishmania_panamensis5520 HTLSAHHCEQVHNVALAIDYFGITSMIVGSFYPPVFYLFSCLTVVRSVYLITITLL-GIL
LmjF365520        HTLSAHHSEEVHNIALAIDYFGITSMIVGSFYPPVFYLFSCLTVVRAVYLISITLL-GIL
Leishmania_infantum5520   HTLSAHHSEQVHNIALAIDYFGITSMIVGSFYPPVFYLFSCLTVVRAVYLISITLL-GIL
Leishmania_mexicana5520   HTLSAHHSEQVHNIALAIDYFGITSMIVGSFYPPVFYLFSCLAVVRAVYLISITLL-GIL
Lbraziliensis5510   HLFNGHCSYRVITAMGRLDYIGITVLI VSSFLPPLYVMFHCPVARTVYITAILVL-GTV
Lpanamensis5510   HLFNSHCSCRVTAMGRLDYIGITVLI VSSFLPPLYVMFHCPVARTVYITAILVL-GTV
Lmexicana5510     HLFNSHCNCRVMAAMGRLDYIGITVLI VSSFLPPLYVMFHCPVARTVYITAILVL-STA
LmjF365510        HLFNSHCSCRVTAMGRLDYIGITVLI VSSFLPPLYVMFHCPVARTVYITAILLL-STA
Linfantum5510     HLFNSHCSCRVTAMGRLDYIGITVLI VSSFLPPLYVMFHCPVARTMYITAILLL-STA
Ldonovani5510     HLFNSHCSCRVTAMGRLDYIGITVLI VSSFLPPLYVMFHCPVARTMYITAILLL-STA

```

B)

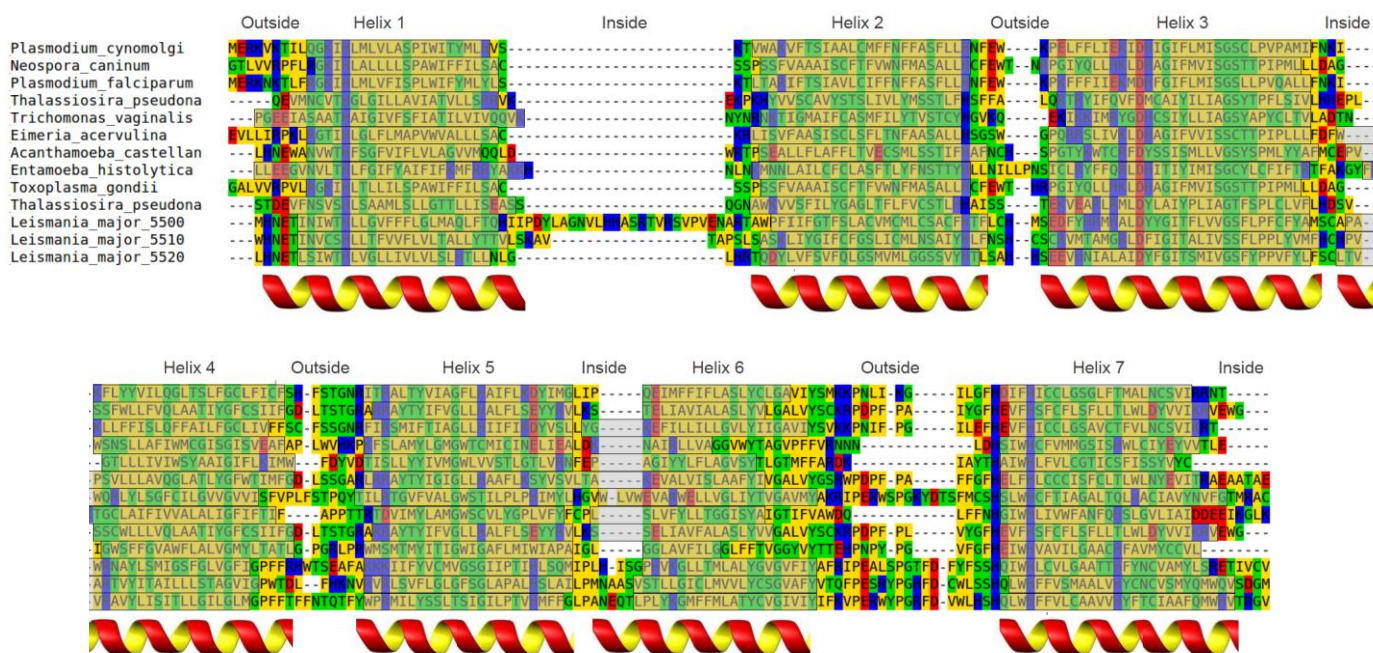


Figura 3 – Detalhes das hemolisinas do tipo III e seus ortólogos: 3A – Detalhes do motivo DxxxlxxxixG, que caracteriza as hemolisinas III formadoras de poros, em Lm5500, Lm5510 e Lm5520 e em seus respectivos ortólogos. 3B – Comparação do domínio de HlyIII entre Lm5500, Lm5510 e Lm5520 e seus ortólogos em outros tripanossomatídeos.

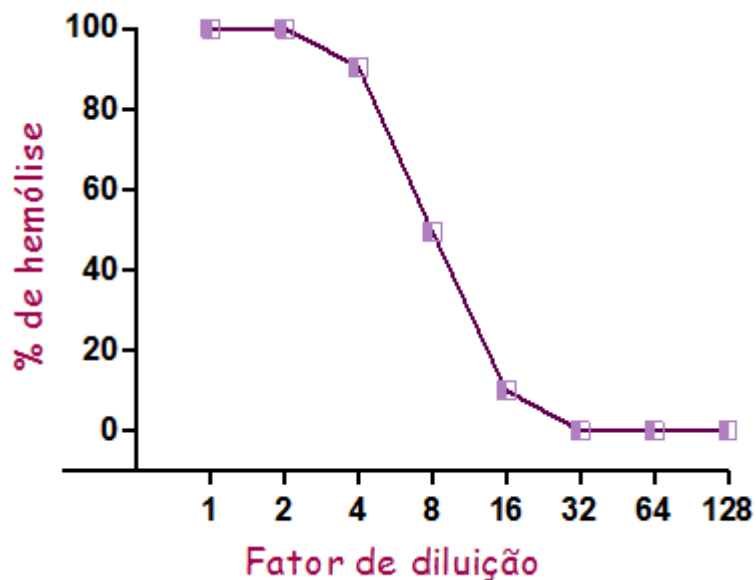


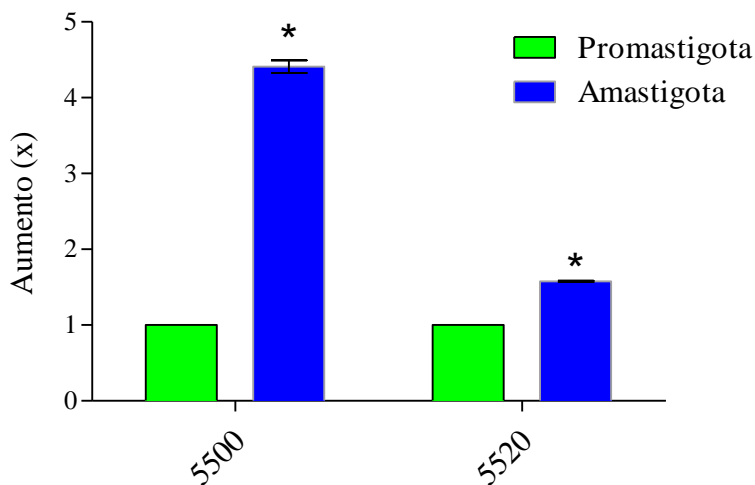
Figura 4- Atividade hemolítica de extrato de membranas (Ext-ms) de promastigotas de *L. major*. Ext-ms diluídos em série foram incubados com 5×10^6 hemácias humanas em 200 μ l de tampão de lise durante 30 minutos a 37 °C. As hemácias foram sedimentadas e o sobrenadante lido a 414nm para a determinação da hemoglobina liberada. A atividade hemolítica está expressa em percentagem de hemólise, calculada em relação à lise total obtida pela adição de Triton X-100 à mesma quantidade de hemácias. Este é o resultado de um experimento representativo.

5.4. Expressão dos mRNAs dos genes anotados como hemolisinas III de *L. major*

Com o objetivo de verificar se esses genes eram expressos nas formas promastigota e amastigota do parasito, extraímos o RNA total de promastigotas em início de fase estacionária (período que, em *L. amazonensis*, a atividade hemolítica é máxima) e de amastigotas produzidas de forma axênica, produzimos cDNAs por transcrição reversa e os utilizamos em uma PCR em tempo real. Utilizamos iniciadores específicos para cada um dos genes estudados e para o controle endógeno iniciadores para GAPDH. Por esta técnica As curvas de dissociação indicaram que, como desejado, somente as sequências alvo foram amplificadas, pois apenas um pico, correspondente a uma temperatura de dissociação, foi obtido para cada sequência, não sendo detectados amplicons correspondentes a ampliações espúrias (dados não mostrados). Assim, verificamos que, o mRNA dos genes Lm5500 e Lm5520 eram expressos em *L. major* (**Figura 5**). No entanto, a expressão do mRNA do gene Lm5510 não foi detectada em nenhuma das formas do parasito, indicando que este gene não é expresso ou é pouco expresso. Quando comparamos a expressão relativa de cada mRNA entre as formas promastigota e amastigota por qRT-PCR (**Figura 5A**), verificamos que os dois genes Lm5500 e Lm5520 parecem ser mais expressos na forma amastigota, sendo que o primeiro é cerca de 4 vezes mais expresso, ao passo que o segundo é apenas 1,5 vez.

Para confirmar a expressão relativa dos mRNAs em promastigotas e amastigotas, bem como avaliar o tamanho dos transcritos dos genes Lm5500, Lm5510 e Lm5520, realizamos um *Northern blot* utilizando sondas específicas para cada mRNA (**Figura 5B**). O tamanho dos transcritos, calculado pela distância de migração no gel de agarose 1,2% e tendo como referência o tamanho das bandas do rRNA, é de cerca de 1500 pb para os dois transcritos. O rRNA 18S foi marcado como referência da quantidade de RNA adicionada no gel. Não foi observado nenhuma banda correspondente ao gene Lm5510, indicando que ele é realmente pouco ou não expresso, o que corrobora com os dados da PCR em tempo real. Por *Northern blot*, a diferença de expressão do gene Lm5520 não correspondeu à diferença observada pela técnica de qRT-PCR.

A



B

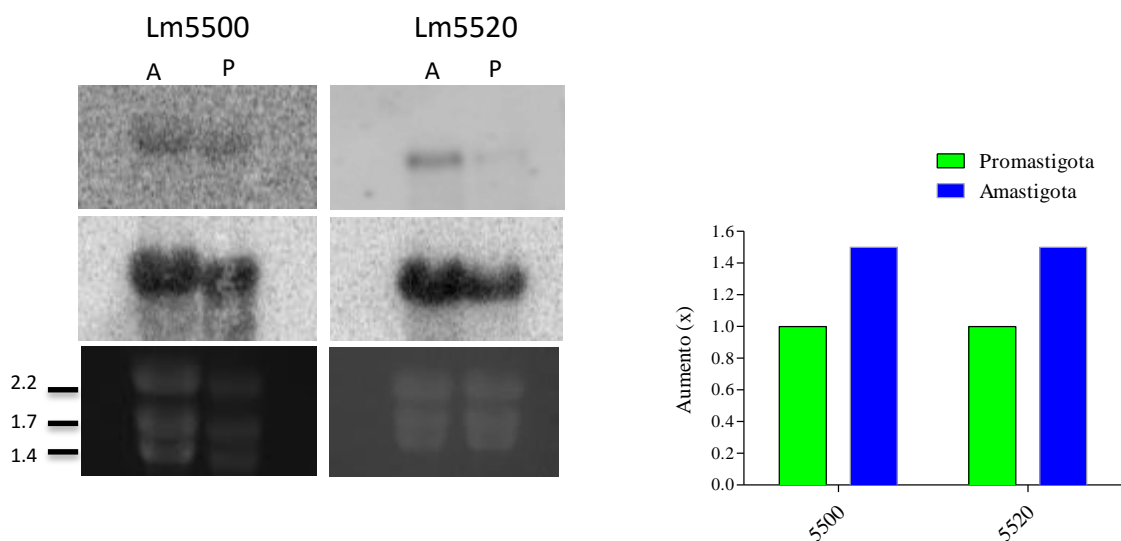


Figura 5 – Níveis de expressão dos genes de Lm5500 e Lm5520 em promastigotas e amastigotas de *L. major*. **A) PCR em tempo real** – A expressão relativa dos mRNAs dos genes Lm5500 e Lm5520 foi avaliada por PCR quantitativa do cDNA de parasitos. O gene da gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (GAPDH) usado como normalizador e os valores representam a média de 2 experimentos independentes. Valores estatisticamente significativos em relação à promastigota estão marcados com um asterisco. **B) Northern blot** – RNA total de promastigota e amastigota de *L. major* foi extraído e hidridizado com sondas específicas pra os mRNAs dos genes Lm5500 e Lm5520. A quantidade de RNA utilizado é mostrada pela marcação com a sonda do rRNA 18S e pela coloração do gel de agarose com brometo de etídio. A= amastigota, P= promastigota. O gráfico ao lado da figura representa a densitometria das bandas de amastigotas em relação à banda de promastigotas.

5.5. Comparação da atividade hemolítica entre amastigotas e promastigotas de *L. major*

Uma vez determinado que estes genes são mais expressos na forma amastigota, investigamos se esta forma do parasito também apresentaria uma atividade lítica maior do que as promastigotas. A **Figura 6** mostra um resultado representativo dos ensaios hemolíticos realizados com as duas formas do parasito. Foi possível observar em todos os experimentos uma maior atividade lítica em amastigotas quando comparamos uma mesma diluição do extrato. Assim, parece existir uma associação entre uma maior atividade hemolítica e a maior expressão dos genes Lm5500 e Lm5520.

5.6. Localização das proteínas codificadas pelos genes Lm5500, Lm5510 e Lm5520 em promastigotas de *L. major*

5.6.1. Obtenção de anticorpos contra as proteínas codificadas pelos genes de hemolisina III de *L. major*

Para verificarmos a localização dessas proteínas no parasito, foi necessária a obtenção de anticorpos específicos para cada uma delas. Para isto, os genes Lm5500, Lm5510 e Lm5520 amplificados foram expressos em bactérias, e as proteínas correspondentes foram purificadas e utilizadas como imunógenos em camundongos.

5.6.1.1. Amplificação dos genes Lm5500, Lm5510 e Lm5520 por PCR e clonagem no vetor LIC

Inicialmente, selecionamos, em cada gene, regiões livres de hélices transmembrana ou regiões hidrofóbicas (dados não mostrados) para serem amplificadas e clonadas no vetor LIC (*ligation independente cloning*) (Novagen). Iniciadores específicos foram desenhados para cada região escolhida e as sequências foram amplificadas por PCR a partir de DNA genômico do parasito. A **Figura 7A** mostra o resultado da amplificação das 3 sequências, onde foram obtidos fragmentos de aproximadamente 300pb, 700pb e 300pb, tamanhos esperados para os amplicons dos genes Lm5500, Lm5510 e Lm5520, respectivamente. Estes fragmentos foram purificados do gel de agarose, clonados no vetor LIC e amplificados em bactérias *E. coli* BL21. Para confirmar a clonagem, isolamos o DNA plasmidial de 2 clones de cada gene

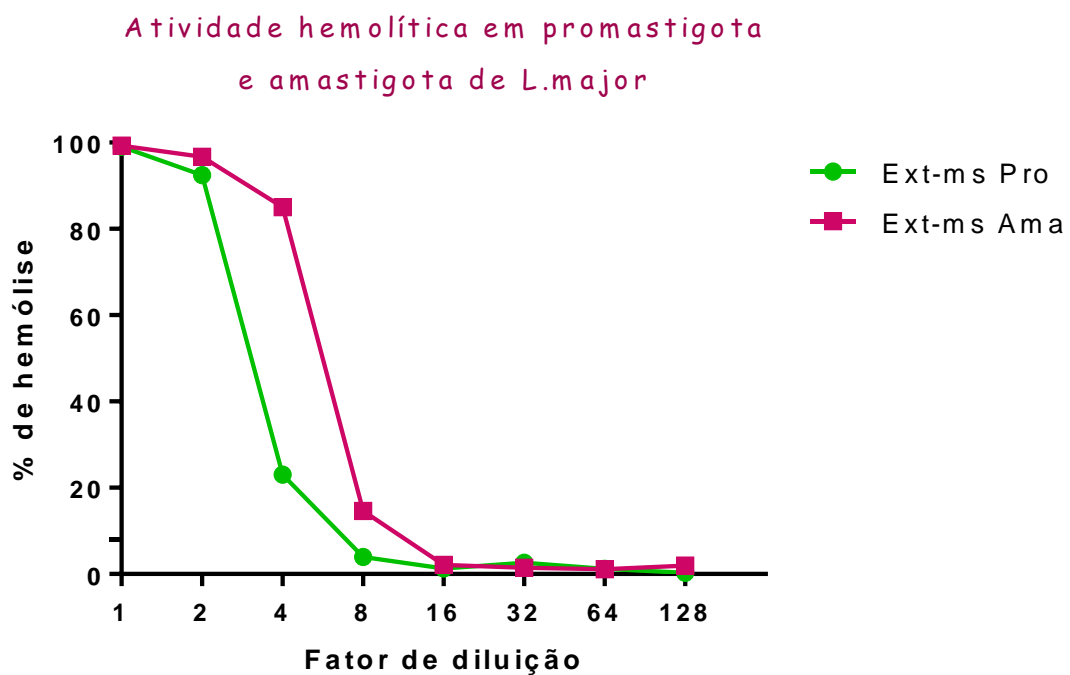


Figura 6- Comparação da atividade hemolítica do extrato de membranas (Ext-ms) entre promastigotas e amastigota de *L. major*. Ext-ms diluídos em série foram incubados com 5×10^6 hemácias humanas em 200 μ l de tampão de lise durante 30 minutos a 37 °C. As hemácias foram sedimentadas e o sobrenadante lido a 414nm para a determinação da hemoglobina liberada. A atividade hemolítica está expressa em percentagem de hemólise, calculada em relação à lise total obtida pela adição de Triton X-100 à mesma quantidade de hemácias.

de interesse e os utilizamos em uma reação de PCR com os respectivos iniciadores. Em todos os clones analisados, foram amplificados fragmentos do tamanho esperado, como mostra a **Figura 7B**. Em seguida, esses mesmos clones foram sequenciados com o iniciador T7 term, que se anela no final da região codificadora, e com um iniciador que se anela na região codificadora da porção C-terminal da proteína MBP. Nossos resultados confirmaram que, para todos os genes, os fragmentos clonados possuem a sequência correta (dados não mostrados).

5.6.1.2. Indução da expressão das proteínas recombinantes

Para verificar se os genes clonados (conjugados à cauda de 6xHis) estavam sendo expressos, os clones positivos foram utilizados para um teste de expressão em pequena escala. Amostras da cultura de bactérias foram coletadas nos tempos de 0 e 4 horas após indução por 1mM de IPTG, a 37°C. A **Figura 8** mostra o resultado da SDS-PAGE, onde podemos observar as bandas correspondentes às proteínas codificadas pelos fragmentos dos genes, Lm5500, Lm5510 e Lm5520, em fusão com a cauda de histidina, com os tamanhos esperados de aproximadamente 14kDa, 29kDa e 14kDa, respectivamente, embora neste gel, o aspecto tenha sido de PMs pouco maiores do que os teóricos. Em todos os casos, foi possível visualizar a banda que corresponde à expressão da proteína MBP (42kDa).

As proteínas de interesse mostraram-se insolúveis, estando presentes no *pellet* do extrato bacteriano. Após o tratamento dos extratos bacterianos com 1% de sarcosyl, as proteínas foram totalmente liberadas para a fração solúvel do extrato (dados não mostrados).

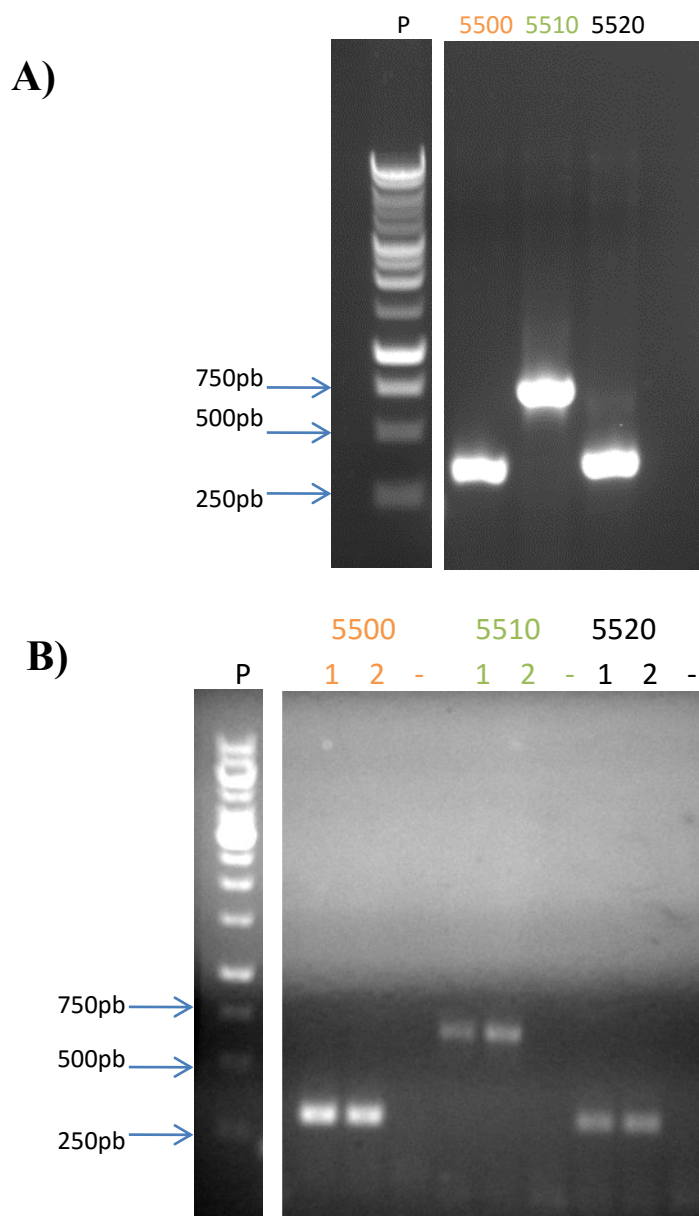


Figura 7: Amplificação dos fragmentos de interesse das sequências Lm5500, Lm5510 e Lm5520 e confirmação da clonagem no vetor LIC. Géis de agarose 1%, corados com Brometo de etídio. **A** - PCR do DNA genômico do parasito utilizando iniciadores específicos para os fragmentos dos genes Lm5500, Lm5510 e Lm5520. **B** – PCR do vetor LIC purificado após a clonagem dos fragmentos. Foram utilizados os mesmos iniciadores específicos. Peso Molecular 1kb *ladder* (Invitrogen). (-) equivale à PCR com o plasmídeo vazio, utilizado como controle.

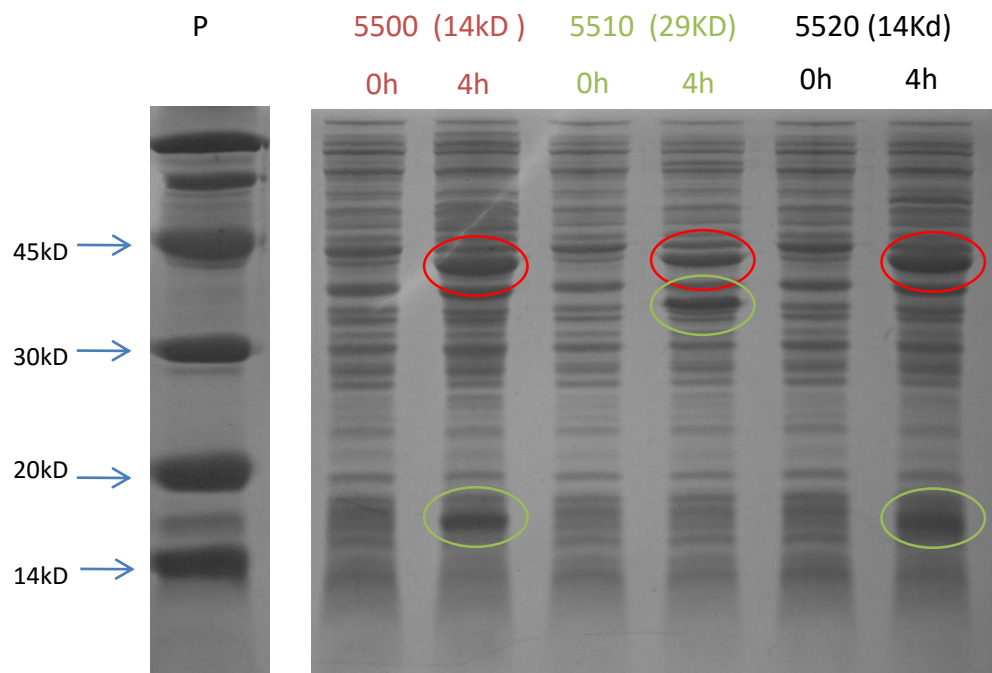


Figura 8: Indução da expressão das proteínas recombinantes Lm5500, Lm5510 e Lm5520. Amostras das culturas induzidas foram coletadas antes da adição de IPTG (0h) e após 4 horas de indução (4h), mantendo-se sempre o mesmo número de células. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE variando a concentração de acrilamida de 12,5% à 17,5% e o gel foi corado por azul de Coomassie Blue. Em vermelho estão as bandas correspondentes à proteína MBP e em verde as bandas correspondentes às proteínas recombinantes.

5.6.1.3. Purificação das proteínas recombinantes

As colônias positivas foram então utilizadas para a expressão das proteínas em larga escala. A purificação das proteínas recombinantes foi feita por cromatografia de afinidade utilizando coluna de Ni, como descrito em Materiais e Métodos. A **Figura 9A** mostra um SDS PAGE ilustrativo das frações purificadas da proteína Lm5500, onde foi possível visualizar a banda de 14kDa, correspondentes à proteína recombinante nas frações 23 a 29. Outras bandas mais fracas foram observadas e provavelmente correspondem a proteínas de origem bacteriana que eventualmente ficaram retidas na coluna de Ni. As outras 2 proteínas recombinantes também foram purificadas e analisadas por SDS-PAGE. Após *Western blot* com o anticorpo anti-His foi confirmado que as proteínas purificadas correspondem às proteínas de interesse em fusão com a cauda de histidina (**Figura 9B**). As proteínas purificadas foram utilizadas para a imunização de camundongos como descrito em Materiais e Métodos.

5.6.1.4. Reatividade dos soros imunes com as proteínas codificadas pelos genes Lm5500, Lm5510 e Lm5520

Realizamos *Western blot* das proteínas recombinantes utilizando os respectivos soros dos animais imunizados. Pela observação da **Figura 10**, fica nítido que os soros contêm anticorpos para as proteínas recombinantes Lm5500, Lm5510 e Lm5520, pois reconhecem as bandas correspondentes às proteínas purificadas, assim como as bandas correspondentes às proteínas recombinantes de 14kD, 29kD e 14kD, respectivamente, no extrato da bactéria após 4hs de indução. Outras bandas reativas correspondem a contaminações com proteínas bacterianas.

5.6.2. Localização das proteínas em promastigota de *L. major*

O soro dos animais imunizados foi utilizado para a um ensaio preliminar de localização das proteínas *in situ*. A **Figura 11** mostra o resultado da marcação da proteína Lm5520 em promastigota de *L. major*, da marcação nuclear com DAPI, bem como a sobreposição das duas imagens, respectivamente. O soro anti-Lm5520 parece marcar uma estrutura alongada única, com morfologia compatível com a do compartimento lisossômico de parasitos do gênero *Leishmania*, denominado tubo multivesicular (MVT).

Esta organela se estende do bolso flagelar até a região posterior do parasito e faz parte de sua via endocítica (McConville, Mullin *et al.*, 2002, Waller and McConville 2002). A **Figura 12** mostra a marcação da proteína Lm5500 em promastigotas de *L. major*, a marcação nuclear com DAPI, bem como a sobreposição das duas imagens, respectivamente. O soro anti-Lm5500 parece marcar vesículas arredondadas no citoplasma, parecendo acompanhar a membrana plasmática do parasito, podendo corresponder aos acidocalcissomas. Confirmando os resultados qRT PCR, não detectamos fluorescência para a proteína codificada pelo gene Lm.5510.

Com o intuito de comparar a marcação da proteína Lm5520 com uma marcação de endossomos e do MVT, fizemos uma marcação com o corante FM1-43. Na **Figura 13A** mostramos a marcação do endossomo primário e do MVT com o marcador de endossomos FM1-43 (amarelo), coloração do núcleo e cinetoplasto por DAPI (azul) e o campo claro, respectivamente (2 exemplares).

A **Figura 13B** mostra um exemplar de *L. major* com suas organelas internas ilustradas. Podemos ver a disposição dos acidocalcissomas e do MVT alongado ocupando a região posterior do parasito.

5.7. Análise funcional das proteínas Lm5500 e Lm5520 por sua superexpressão em promastigota de *L. major*.

Inicialmente, iniciadores específicos que amplificam as sequências correspondentes à região codificadora dos genes de interesse foram desenhados e as sequências foram amplificadas a partir do DNA genômico de *L. major* por PCR. A **Figura 14A** mostra o resultado da amplificação da qual foram obtidos fragmentos de aproximadamente 1000pb, como esperado para os genes Lm5500 e Lm5520, respectivamente. Esses fragmentos foram purificados do gel de agarose e clonados no vetor pGEM-Teasy, que foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* termocompetentes. Para a confirmação da clonagem, os plasmídeos foram amplificados e isolados por minipreparação e digeridos com *Xba*I e *Hind*III. O resultado mostrado na **Figura 14B** confirma a presença de bandas específicas de aproximadamente 1 kb, como esperado. Os genes clonados foram sequenciados e o resultado obtido foi comparado com o genoma de referência de *L. major*, disponível em www.tritrypdb.org. Os resultados confirmaram que os fragmentos clonados possuem a sequência correta para os dois genes (dados não mostrados).

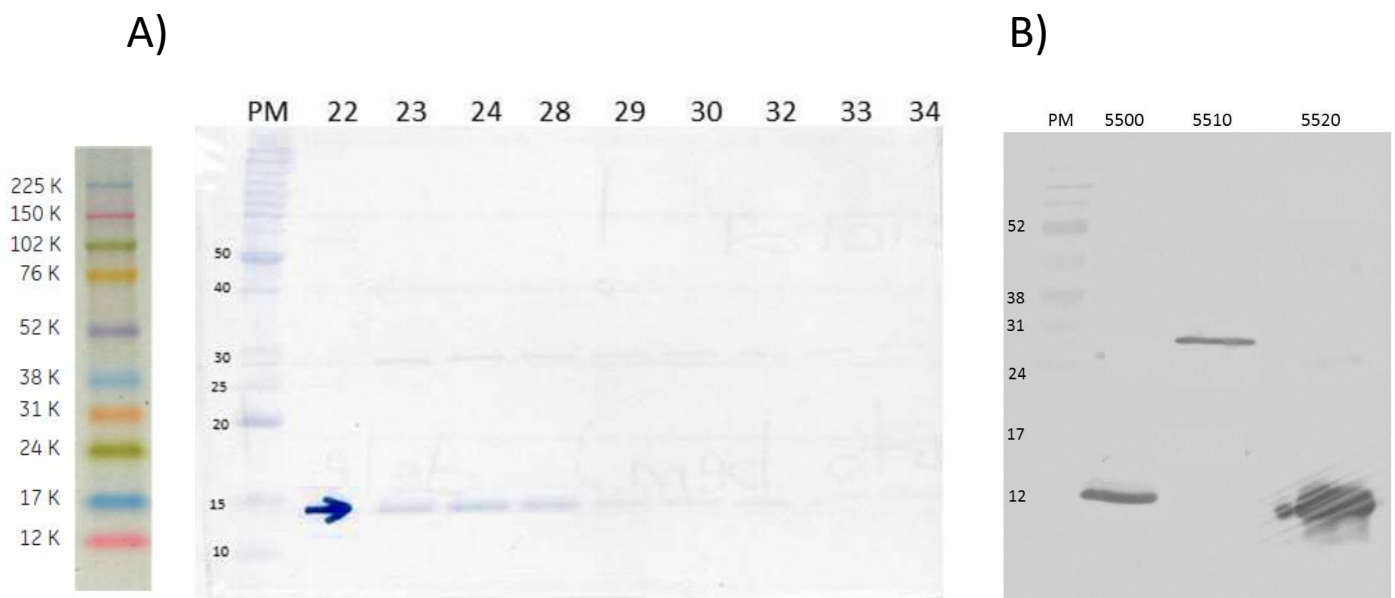


Figura 9: Purificação das proteínas recombinantes A) SDS PAGE das frações purificadas da proteína Lm5500 (14kD) e B) *Western blot* das frações protéicas purificadas das proteínas recombinantes Lm5500 (14kDa), Lm5510 (29kDa) e Lm5520 (14kDa). A) as frações proteicas purificadas após cromatografia de afinidade foram diluídas em tampão de amostra, fervidas por 5 min e aplicadas no gel SDS PAGE 12,5%. Após a eletroforese, o gel foi corado por azul de Coomassie. B) *Western blot* das 3 proteínas de interesse após a purificação utilizando o anticorpo anti- histidinas. P = padrão de peso molecular (*precision plus protein standard*)(Biorad)

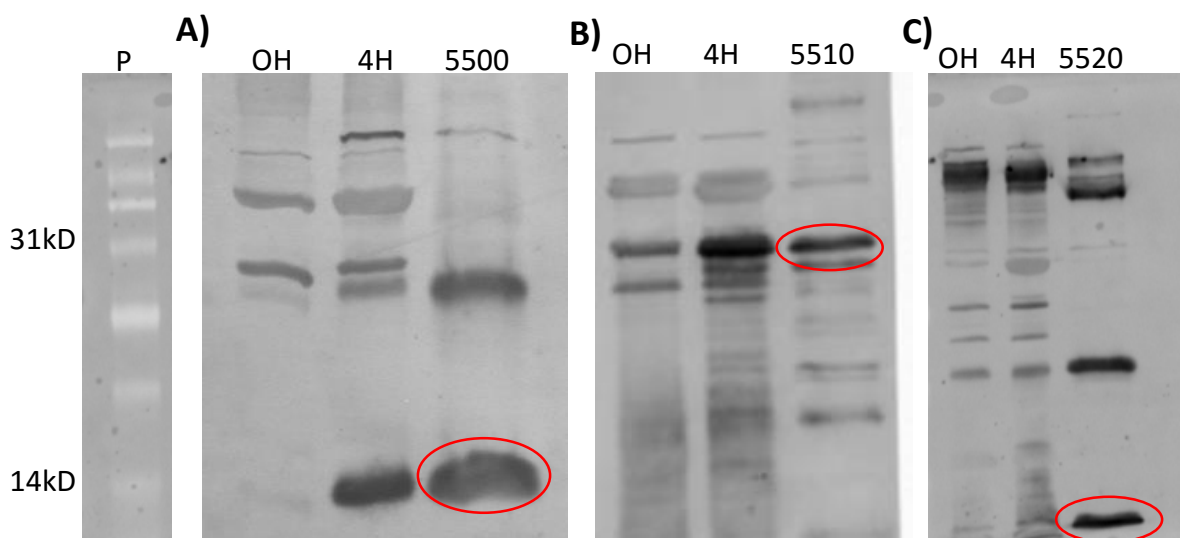


Figura 10: Western blot com o soro dos animais imunizados. A, B e C – soros de animais imunizados com as proteínas Lm5500, Lm5510 e Lm5520, respectivamente. Os soros dos animais foram diluídos 1:1000. 0H e 4H → extrato da bactéria após 0 e 4 horas de indução das respectivas proteínas recombinantes. 5500, 5510 e 5520 correspondem as frações proteicas purificadas após cromatografia de afinidade. P = padrão de peso molecular (*precision plus protein standard*) (Biorad)

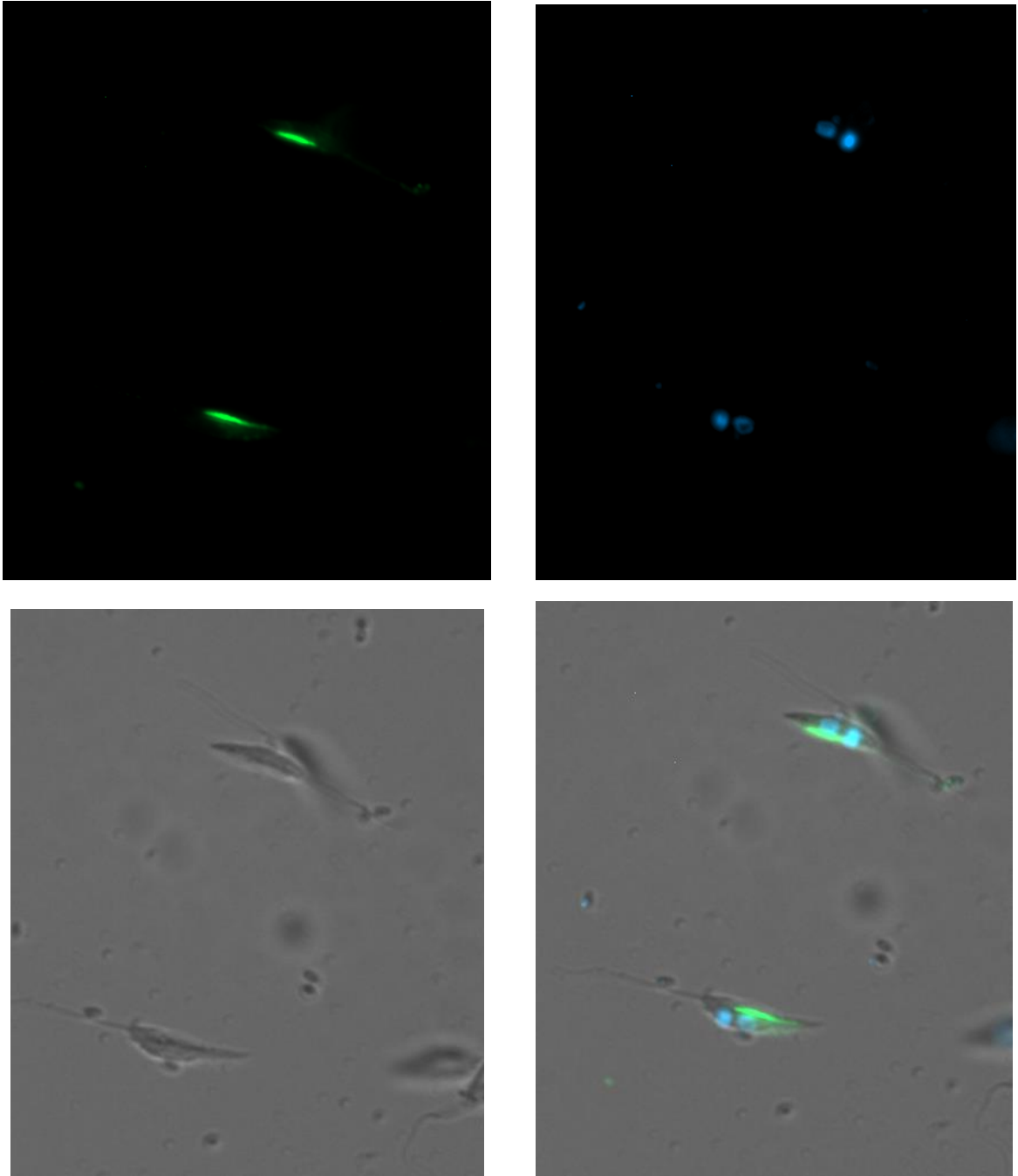


Figura 11: Imunofluorescência com os anticorpos gerados para as proteínas Lm5520 em promastigotas – A figura mostra 2 exemplares de promastigota de *L. major* marcados com o anticorpo anti-Lm5520 conjugado com ALEXA 488 (verde), a coloração do núcleo e cinetoplasto por DAPI (azul), o campo claro e a sobreposição das imagens, respectivamente.

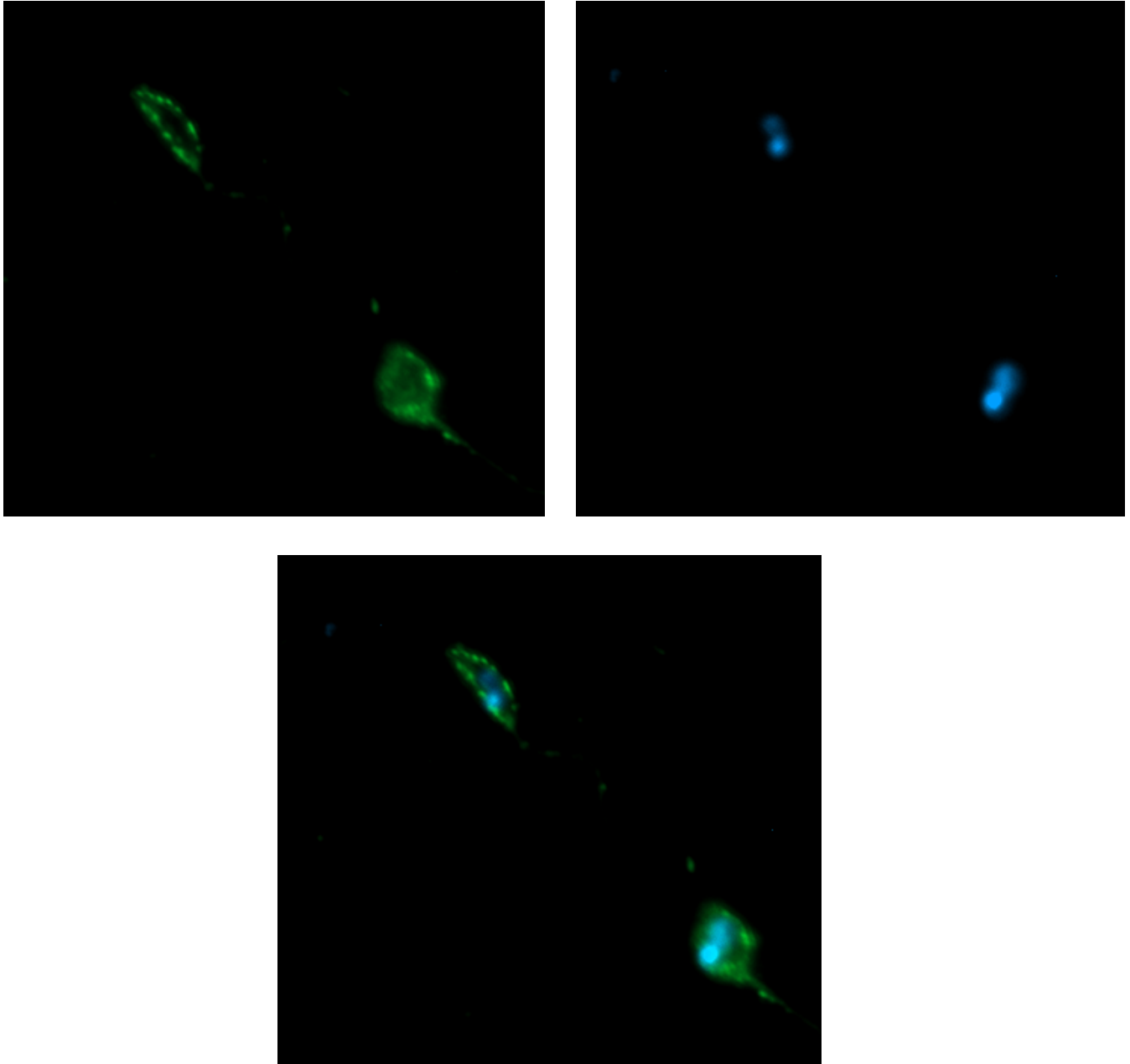
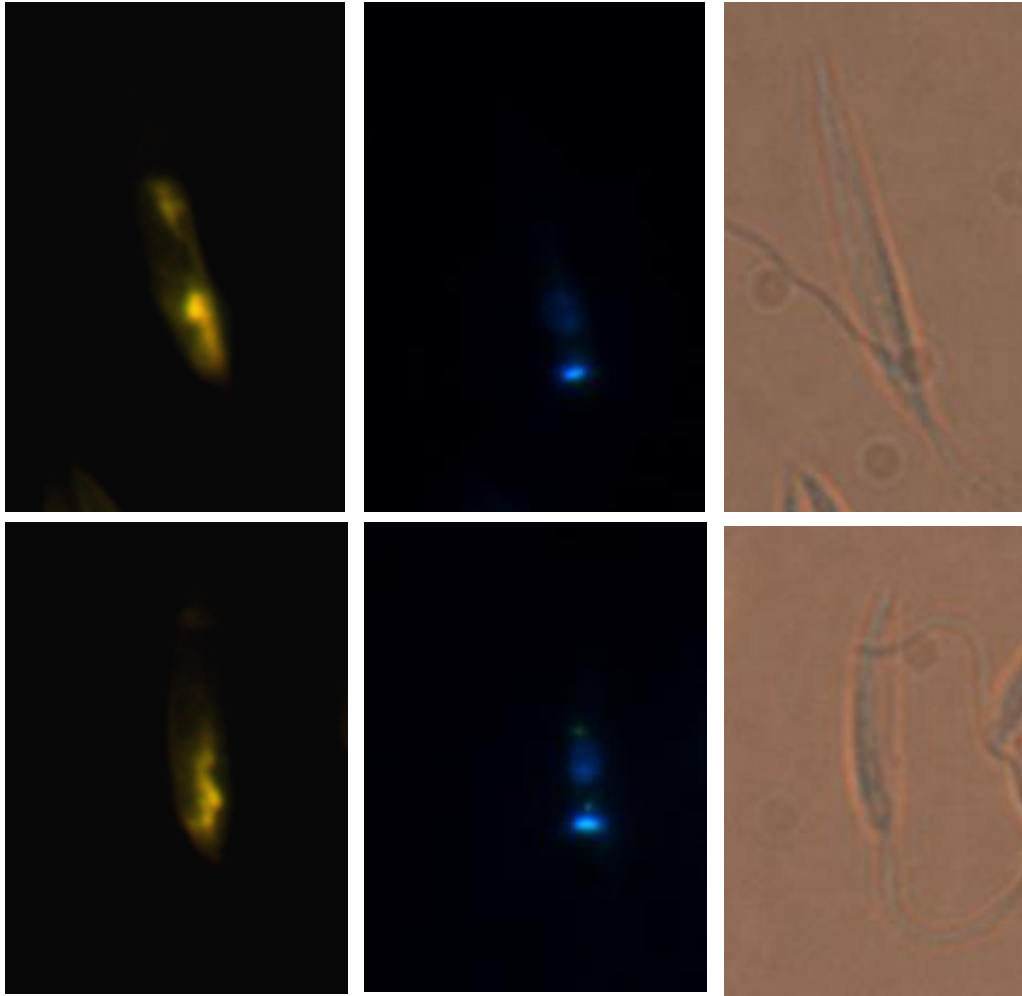
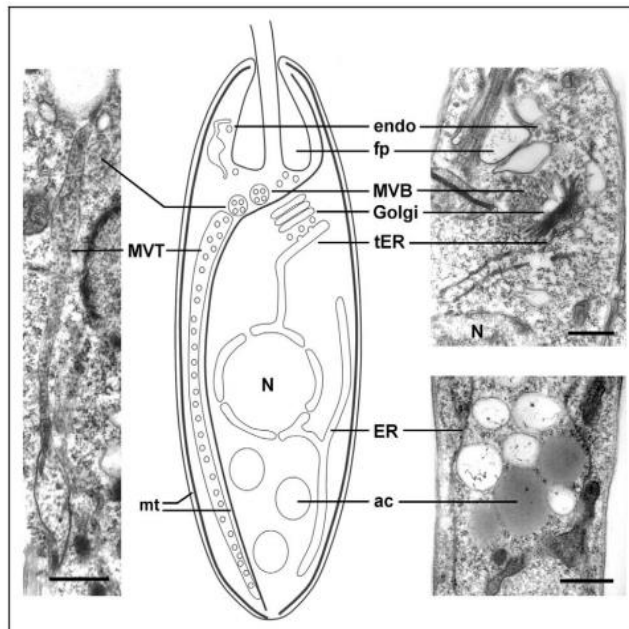


Figura 12: Imunofluorescência com os anticorpos gerados para a proteína Lm5500 em promastigotas – A figura mostra 2 exemplares de promastigota de *L. major* marcados com o anticorpo anti-Lm5500 conjugado com ALEXA 488 (verde), a coloração do núcleo e cinetoplasto por DAPI (azul) e sobreposição das imagens, respectivamente.

A)



B)



Fonte: R.F. Waller,
M.J. McConville.
International Journal
for Parasitology (2002)

Figura 13) Endossomo inicial de *L.major* marcado por FM 143-FX - A) Endossomo inicial e MVT de *L. major* marcada com o FM 143-FX (amarelo), coloração do núcleo e cinetoplasto por DAPI (azul) e o campo claro, respectivamente (2 exemplares). **B)** Exemplar de *L. major* com suas organelas internas ilustradas. Ac= acidocalcisomos, MVT = tubo multivesicular, ER= reticulo endoplasmático, N = núcleo.

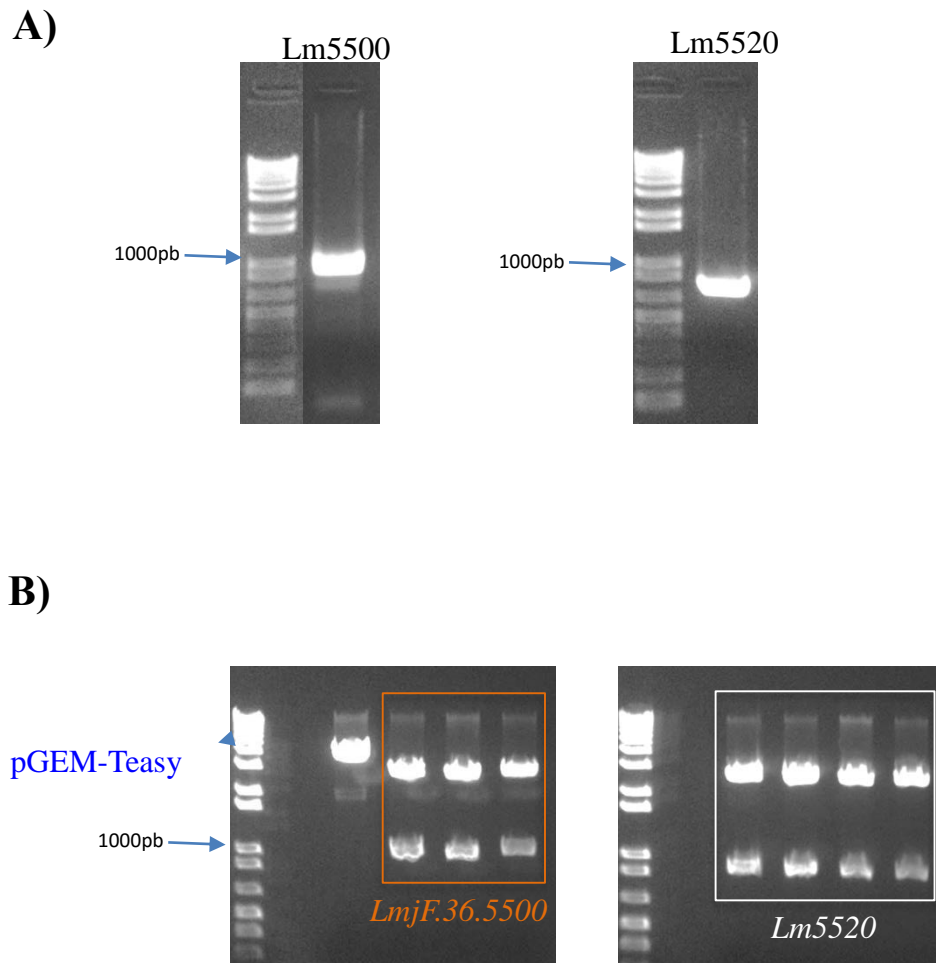


Figura 14: Amplificação dos fragmentos de interesse das sequências Lm5500, Lm5520 e confirmação da clonagem no vetor pGEM-Teasy. Géis de agarose 1%, corados com Brometo de etídio. **A** - PCR do DNA genômico utilizando iniciadores específicos para cada fragmento. **B** - Digestão do vetor pGEM-Teasy com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III por 3 hrs. Peso Molecular 1kb *ladder* (Invitrogen).

Em seguida, ambos os fragmentos foram clonados nos sítios de restrição das enzimas *Xba*I e *Hind*III no vetor de superexpressão pSP72 α HYG α (**Figura 15A**) contendo o gene marcador de seleção que codifica a proteína higromicina fosfotransferase (HYG), o qual confere resistência ao antibiótico higromicina. Para a confirmação da clonagem, os plasmídeos foram novamente amplificados, isolados por minipreparação e digeridos com *Xba*I e *Hind*III. Os resultados da eletroforese em agarose confirmam a presença de fragmentos de 1kb, conforme esperado (**Figura 15B**).

Os parasitos superexpressores de *Lm5500* e *Lm5520* foram obtidos pela eletroporação de *L. major* com as construções pSP72 α HYG α ::*Lm5500* e pSP72 α HYG α ::*Lm5520*. O vetor vazio (sem o gene de interesse) também foi transfectado, como controle do experimento. O protocolo de transfecção foi baseado no método descrito por Beverley e Clayton (1993). As células recém transfectadas foram selecionadas na presença de 30 μ /mL de higromicina. Para cada experimento foram transfectadas células na ausência do vetor como controle negativo de seleção (WT) ou transfectadas com o vetor vazio (sem o gene de interesse) (*mock*).

5.7.1 Análise da expressão dos mRNAs

Com o objetivo de verificar os níveis de expressão dos mRNAs dos genes de interesse nos clones transfectados em relação ao WT e ao Mock, extraímos o RNA total de promastigotas em início de fase logarítmica, produzimos cDNAs por transcrição reversa e os utilizamos em uma PCR em tempo real. Utilizamos iniciadores específicos para cada um dos genes estudados e para o controle endógeno GAPDH. Utilizamos o SYBR Green como fluoróforo.

Quando comparamos a expressão relativa dos mRNAs dos clones *Lm5500* e *Lm5520* (**Figura 16**), verificamos que são aproximadamente 40x e 50x, respectivamente, mais expressos do que os mRNAs do WT e do *mock*. Como desejado, as curvas de dissociação indicaram que somente as sequências alvo foram amplificadas, pois apenas um pico, correspondente a uma temperatura de dissociação, foi obtido para cada sequência, não sendo detectados amplicons correspondentes a amplificações espúrias (dados não mostrados).

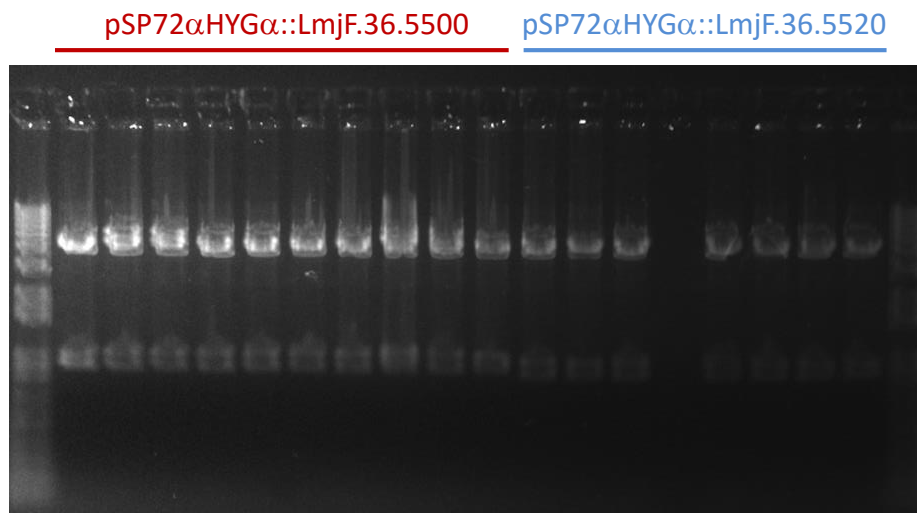


Figura 15: Confirmação da clonagem dos amplicons Lm5500, Lm5520 no vetor de superexpressão pSP72 α HYG α . Digestão do vetor pSP72 α HYG α ::Lm5500 e pSP72 α HYG α ::Lm5520 com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III por 3 hrs. Gel de agarose 1%, corado com Brometo de etídio. Peso Molecular 1kb *ladder* (Invitrogen).

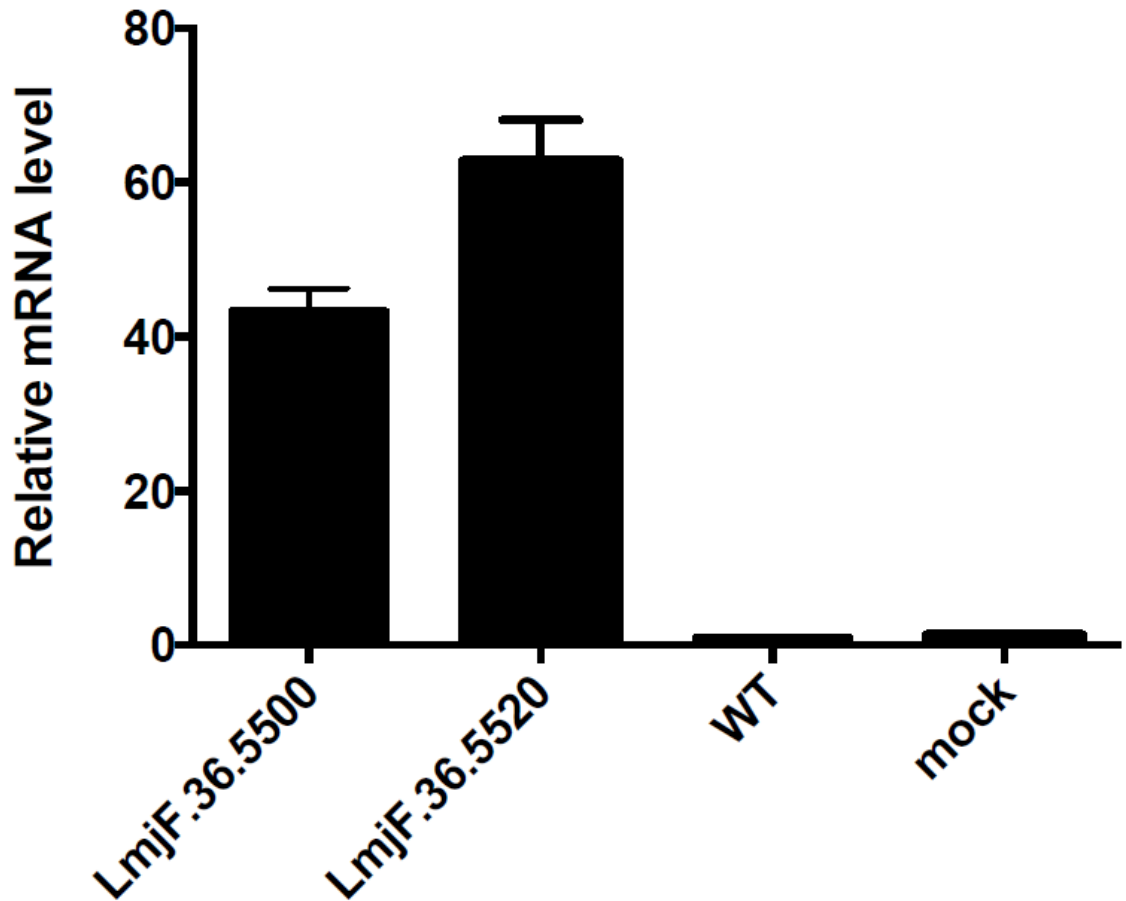


Figura 16 – Níveis relativos de expressão dos mRNAs nos clones superexpressores Lm5500 e Lm5520 em relação ao WT e Mock. Os experimentos foram realizados em triplicata e o gene da gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (GAPDH) usado como normalizador. O método $\Delta\Delta CT$ foi utilizado para calcular as quantidades de mRNA relativas para cada amostra.

5.7.2 – Análise da expressão das proteínas

Para analisar a expressão das proteínas nos clones transfectados, realizamos um SDS-PAGE com os extratos totais dos clones superexpressores. Observamos que os clones Lm5500 II e Lm5520 V apresentavam uma banda proeminente entre 37 e 50kDa, conforme esperado para as proteínas Lm5500 (41kDa) e Lm5520 (38kDa) (**Figura 17**).

5.7.3 – Ensaio funcional

Para verificar se o fenótipo dos clones superexpressores de Lm5500 e Lm5520 eram mais hemolíticos do que os *mock* transfectados, realizamos um ensaio hemolítico com os extratos totais de clones superexpressando a proteína Lm5520, clones superexpressando a proteína Lm5500 e com extratos totais dos parasitos expressando o vetor vazio (*mock*). Conforme observado na **Figura 18**, os clones Lm5500 e Lm5520 apresentaram uma atividade lítica superior ao *mock* transfectado, indicando que estes genes são importantes para a atividade lítica do parasita, sendo portanto, potenciais candidatos à codificarem a leishporina ou proteínas importantes para a atividade lítica da leishporina.

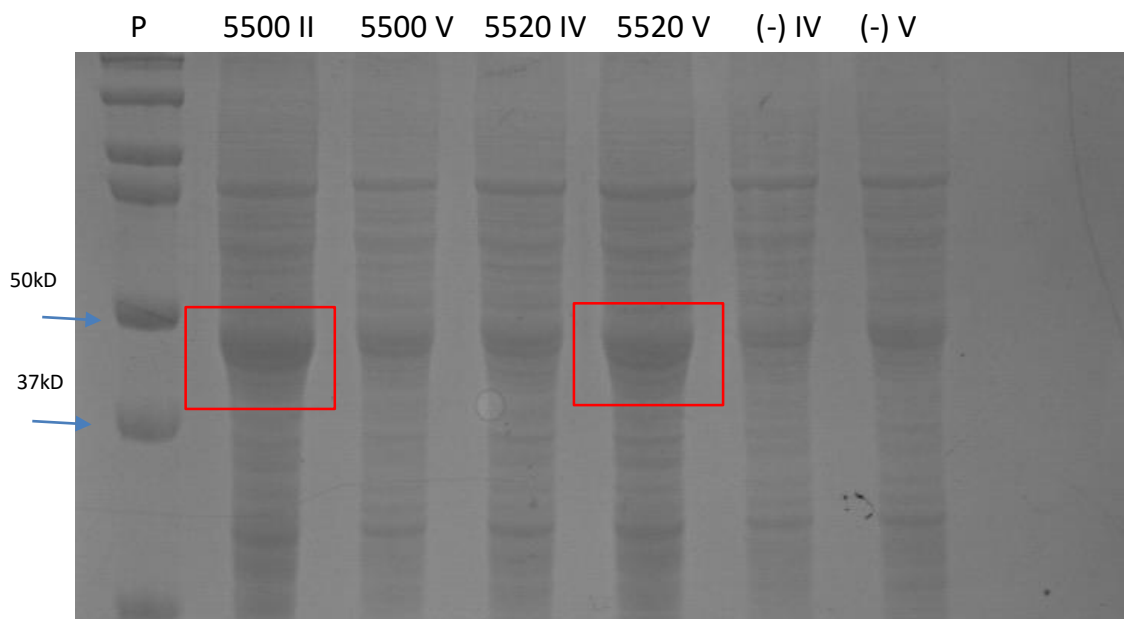


Figura 17: Perfil eletroforético do extrato proteico dos clones superexpressores das proteínas Lm5500 e Lm5520. SDS-PAGE dos extratos totais dos clones 5500 II, 5500 V, 5520 IV, 5520 V e dos controles (-) IV e (-) V, correspondentes ao vetor vazio. Concentração de acrilamida: 12,5% . gel corado por azul de Coomassie. Em vermelho estão as bandas correspondentes às proteínas Lm5500 e Lm5520 superexpressas.

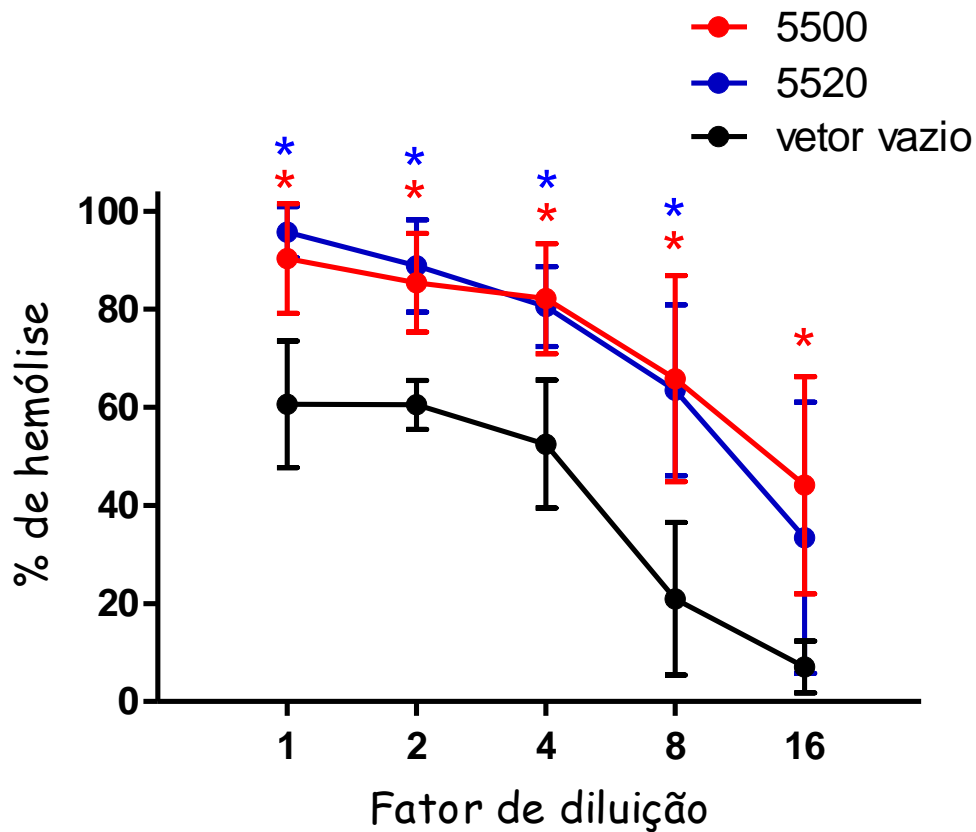


Figura 18- Atividade hemolítica dos extratos totais dos clones superexpressores e Mock. Ext-T diluídos em série foram incubados com 5×10^6 hemácias humanas em 200 μ l de tampão de lise durante 30 minutos a 37 °C. As hemácias foram sedimentadas e o sobrenadante lido a 414nm para a determinação da hemoglobina liberada. A atividade hemolítica está expressa em porcentagem de hemólise, calculada em relação à lise total obtida pela adição de Triton X-100 à mesma quantidade de hemácias. Cada ponto representa o resultado de 2 a 4 experimentos independentes. O asterisco representa que a diferença no ponto é estatisticamente significativa em relação ao transfectado com o vetor vazio.

6. DISCUSSÃO

Proteínas formadoras de poros (PFPs) já foram descritas em vários microrganismos patogênicos, incluindo protozoários, sendo que várias delas já foram implicadas na patogênese das doenças causadas pelos mesmos (Horta 1997, Almeida-Campos, Noronha *et al.*, 2002, Ishino, Chinzei *et al.*, 2005, Kafsack, Pena *et al.*, 2009, Moonah, Sanders *et al.*, 2014) (**Tabela 1**).

A caracterização da leishporina como uma citolisina formadora de poros de *L. amazonensis* nos leva a indagar sobre a sua função, tanto no ciclo de vida do parasito quanto na patogênese da leishmaniose. O fato de a leishporina ter atividade lítica ótima em pH 5,5 e a 37°C (Noronha, Ramalho-Pinto *et al.*, 1996, Noronha, Cruz *et al.*, 2000), condições encontradas dentro do fagolisossomo, sugere que ela possa agir dentro desta organela e fez o nosso grupo propor o seu envolvimento com o rompimento do fagolisossomo - como já demonstrado para *Listeria monocytogenes* (Bielecki *et al.*, 1990), *Shigella flexneri* (Hybiske and Stephens, 2008) e sugerido para *T. cruzi* (Andrews, 1994) - e, posteriormente, da membrana plasmática do macrófago infectado (Horta 1997, Almeida-Campos, Noronha *et al.*, 2002) como já demonstrado para *T. gondii* (Kafsack, Pena *et al.*, 2009). Assim, é objetivo do nosso grupo investigar a(s) função(ões) da leishporina, tarefa que depende da caracterização molecular desta citolisina.

A abordagem utilizada neste trabalho para tentar identificar a leishporina valeu-se do fato de o genoma da *L. major* ter sido completamente sequenciado (Ivens *et al.*, 2005). O projeto genoma da *L. major* revelou a sequência de 36 cromossomos do genoma haplóide do parasito com aproximadamente 32,8 megabases. Foram preditos 8272 genes codificadores de proteínas, 911 genes de RNA e 39 pseudogenes (Ivens *et al.*, 2005). A identificação na lista de Pfam do banco de dados GeneDB de 3 sequências anotadas como supostas hemolisinas do tipo III (baseada em sua similaridade com hemolisina III de *B. cereus*) nos levou a supor que esses genes pudessem codificar proteínas citolíticas, possivelmente responsáveis pela atividade da leishporina. Similarmente ao encontrado para a leishporina (Noronha *et al.*, 2000), a hemólise causada pela hemolisina do tipo III de *B. cereus* ocorre em pelo menos 3 etapas: ligação dos monômeros na membrana do eritrócito, formação do poro oligomérico transmembrana e lise do eritrócito (Baida and Kuzmin, 1996).

Em *V. vulnificus*, uma bactéria marinha altamente virulenta, agente causador de septicemia fatal em várias partes do mundo, a hemolisina do tipo III com 48% de identidade com a hemolisina do tipo III de *B. cereus* é um fator de virulência deste patógeno (Chen, Chang *et al.*, 2004). Também em *P. falciparum*, a hemolisina do tipo III, recentemente caracterizada (Moonah, Sanders *et al.*, 2014), também pode ter um papel importante na anemia em pacientes com malária, o que está sendo investigado pelo grupo. Esses estudos corroboram a nossa hipótese de que as hemolisinas III de *L. major* poderiam codificar a citolisina que denominamos leishporina.

Ressaltamos, contudo, que uma vez que estas proteínas foram anotadas automaticamente, com base em similaridade de sequência, estas poderiam não apresentar a mesma função desempenhada pelas proteínas da família a qual pertencem. Alguns genes de *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, possuem o domínio PF03006 e codificam uma proteína que tem um papel no metabolismo de lipídeos (Karpichev *et al.*, 2002). Assim, embora cientes que o produto gênico codificado por estas sequências poderia não apresentar função de hemólise, esta era uma abordagem que não poderia ser desconsiderada (como, de fato, mostrou-se relevante).

As 3 sequências de *L. major* anotadas como supostas hemolisinas III possuem a região codificadora completa e foram analisadas sob diversos aspectos. O resultado da busca de domínios conservados mostrou a presença do domínio característico da superfamília HlyIII (PSSMID 275797) na porção C-terminal das proteínas. A presença de hélices transmembrana é uma indicação de que são proteínas que interagem com a bicamada lipídica, uma característica das proteínas formadoras de poro. A busca pelo motivo que caracteriza as hemolisinas III como formadoras de poros descrito por Moonah e colaboradores (Moonah, Sanders *et al.*, 2014), mostrou que é um motivo bastante conservado entre as hemolisinas III de outras espécies de *Leishmania*. Analisamos as regiões intrinsecamente desordenadas na porção N-terminal (detectadas pelo Disopred), que parecem funcionar como uma região de ligação à proteínas ou outras moléculas que possam interagir com estas hemolisinas. Regiões intrinsecamente desordenadas são flexíveis, dinâmicas e podem ser parcial, ou completamente distendidas em solução. A função primária da desordem parece ser o reconhecimento molecular de proteínas e ácidos nucleicos. Mostramos ainda que as hemolisinas III de *L. major* possuem ortólogos em outros tripanossomatídeos como *Plasmodium sp.*, *T. gondii*, *Eimeria*, *E. histolytica*, dentre outros.

Após confirmarmos que extratos da fração rica em membranas de promastigotas de *L. major* possuem, como a *L. amazonensis*, atividade hemolítica (**Figura 5**), iniciamos a caracterização destas sequências avaliando se as mesmas corresponderiam a mRNAs expressos no parasito. O resultado obtido foi importante pois mostramos que apenas 2 sequências de *L. major* anotadas como hemolisina III eram expressas em promastigotas na fase estacionária (**Figura 6**), fase em que a expressão da atividade da leishporina é máxima (Noronha *et al.* 1996). Quando comparamos a expressão desses mRNAs entre promastigotas e amastigotas, vemos que são mais expressos em amastigotas, como foi demonstrado por PCR em tempo real. Por *Northern blot*, que não é um método quantitativo, pudemos verificar o tamanho de seus mRNA. Nenhuma dessas técnicas foram capazes de detectar um produto de expressão para o gene Lm5510, significando que o mesmo é pouco, ou não é expresso, o que foi também corroborado pela pesquisa da proteína no parasito, por imunofluorescência utilizando anticorpos produzidos contra as 3 proteínas.

A maior produção das hemolisinas III em amastigotas está compatível com o fato de que amastigotas parecem ter maior atividade hemolítica do que promastigotas de *L. major* (**Figura 7**). Esses dados corroboram a hipótese de que as hemolisinas III são importantes para a ruptura do fagolisossomo no interior da célula hospedeira como já demonstrado para o protozoário *T. gondii* (Kafsack, Pena *et al.*, 2009) e para as bactéria *L. monocytogenes* (Bielecki J. *et al.* 1990) e *Legionella pneumophila* (Alli O.A. *et al.* 2000). Pretendemos ainda analisar a cinética de expressão desses genes para verificar se há alguma correlação da cinética de expressão dos genes com a da atividade hemolítica no parasito.

Por ensaios de imunolocalização, a proteína Lm5520 parece estar localizada no Tubo Multivesicular (MVT) do parasito. O MVT é um lisossomo maduro, que possui um grande número de vesículas internas e se estende da bolsa flagelar até a região posterior do parasito. O MVT sofre um processo de maturação à medida que o parasito alcança a fase estacionária e se diferencia em promastigotas metacíclicas. O aumento da capacidade lítica do MVT em promastigotas metacíclicas pode ser reflexo de sua acidificação e da ativação de proteases lisossômicas residentes (Mullin *et al.*, 2001). Já a proteína Lm5500 parece estar localizada em vesículas que se assemelham aos acidocalcissomas. Os acidocalcissomas constituem uma segunda classe de vacúolos acidificados em protozoários e ocupam uma porção significativa do citoplasma. A função primária do acidocalcissoma é a reserva intracelular de cálcio. São claramente distintos dos

lisossomos e, ao contrário do MVT, não são marcados por marcadores de endocitose (McConville *et al.*, 2002). A marcação do MVT de *L. major* com o corante FM1-43 mostrou-se similar à marcação da proteína Lm5520. Entretanto, não foi possível ainda realizar a co-localização da proteína com este corante devido ao seu amplo espectro de emissão, que se confunde com a emissão do corante ALEXA 488. Já os acidocalcisomas poderiam ser co-localizados com marcadores de organelas ácidas como o *Lysotracker*, experimentos que deverão ainda serão realizados para conclusão deste resultado.

A caracterização funcional de um gene pode ser feita de várias maneiras e a que mostrou mais factível no momento foi a superexpressão desses genes em promastigotas de *L. major*. Para isto, utilizamos o vetor pSP72 α HYG α , selecionando os clones superexpressores com higromicina. A superexpressão mostrou-se bastante eficiente do ponto de vista da quantificação dos mRNAs dos genes Lm5500 e Lm5520 por PCR em tempo real, o que foi confirmado pelo perfil eletroforético do extrato proteico dos clones analisados (**Figuras 17 e 18**). O resultado obtido do ensaio funcional para atividade lítica mostrou claramente que ambos os genes Lm5500 e Lm5520 codificam proteínas que aumentam a atividade hemolítica das promastigotas, em relação às tranfectadas com o vetor vazio. A importância desses resultados é clara nos seguintes pontos: 1) mostramos, pela primeira vez, que as proteínas codificadas pelas hemolisinas III de *L. major* (Lm5500 e Lm5520) são proteínas envolvidas com a atividade hemolítica do parasita, confirmando a função predita quando da anotação desses genes; 2) essas proteínas podem revelar finalmente a identidade ou parte da identidade da leishporina; 3) esses gene/proteínas podem, assim, estar implicadas na virulência do parasito, na amplificação da infecção, ou até mesmo na sobrevivência do parasito no inseto vetor.

Com relação à citolisina que denominamos leishporina, responsável pela atividade formadora de poros em macrófagos e pela atividade hemolítica de amastigotas e promastigotas, já há vários anos trabalhamos em sua caracterização e tentativa de identificação. Nos últimos anos, vários trabalhos foram realizados em nosso laboratório na tentativa de purificar e identificar a(s) molécula(s) que co-purifica(m) com a atividade hemolítica de extratos de promastigotas. Assim, por cromatografia líquida conseguiu-se purificar uma proteína de 50-60 kDa que co-purificava com a atividade hemolítica do extrato de promastigotas (Noronha, 1996). No entanto, na época, pelo baixo rendimento, não foi possível identificar a proteína e estudar a sua função no parasito. Este tamanho

sugerido de proteína é compatível com o encontrado por nós neste trabalho que é de 44,8 kDa para a proteína codificada pelo gene Lm5500 e de 41 kDa para a proteína codificada pelo gene Lm5520. Além disso, mais recentemente, com os recursos atuais para a identificação molecular mais sensíveis, como a espectrometria de massa, e utilizando outras combinações cromatográficas, Castro-Gomes (2010) chegou a um resultado bastante inesperado: ele purificou e identificou dois lisofosfolídeos presentes no Extms promastigotas de *L. amazonensis* com atividade hemolítica em frações sem nenhum traço de proteína. Ele mostrou ainda que a inibição da fosfolipase responsável pela geração desses lipídeos aboliam totalmente a atividade hemolítica de promastigotas de *L. amazonensis* (resultados não publicados), sugerindo que a leishporina possa ser um lipídeo, ou que esse lipídeo seja importante para a atividade da leishporina. Por outro lado, a abordagem utilizada neste trabalho levou-nos a identificar proteínas com atividade hemolítica, o que também sugere que essas proteínas possam ser a leishporina ou que elas possam ser importantes para a atividade da leishporina. Em conjunto, esses achados podem significar que a atividade lítica, formadora de poros, que chamamos leishporina, seja mediada pelas proteínas Lm5500 e Lm5520 com a participação dos lisofosfolídeos ou mediada pelos lisofosfolídeos com a participação das duas proteínas. É possível também que a leishporina seja um complexo lipídeo-protéico, ou mesmo que cada uma destas citolisinas possa agir em momentos distintos do ciclo de vida do parasito. Serão necessários experimentos adicionais para validar essas hipóteses e saber, por experimentos de proteção osmótica e de *patch-clamp*, se ambas as espécies moleculares são capazes de formar poros. Além do fenótipo hemolítico, pretendemos analisar posteriormente os fenótipos de infectividade *in vitro* e *in vivo* com os clones superexpressores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida-Campos, F. R. and M. F. Horta (2000). "Proteolytic activation of leishporin: evidence that *Leishmania amazonensis* and *Leishmania guyanensis* have distinct inactive forms." Mol Biochem Parasitol **111**(2): 363-375.
- Almeida-Campos, F. R., F. S. Noronha and M. F. Horta (2002). "The multitalented pore-forming proteins of intracellular pathogens." Microbes Infect **4**(7): 741-750.
- Alli OA1, Gao LY, Pedersen LL, Zink S, Radulic M, Doric M, Abu Kwaik Y. "Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*". Infect Immun. 2000 Nov;68(11):6431-40
- Amino, R., R. M. Martins, J. Procopio, I. Y. Hirata, M. A. Juliano and S. Schenkman (2002). "Trialsin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis." J Biol Chem **277**(8): 6207-6213.
- Andra, J., O. Berninghausen and M. Leippe (2004). "Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins." FEBS Lett **564**(1-2): 109-115.
- Andreeva-Kovalevskaya Zh, I., A. S. Solonin, E. V. Sineva and V. I. Ternovsky (2008). "Pore-forming proteins and adaptation of living organisms to environmental conditions." Biochemistry (Mosc) **73**(13): 1473-1492.
- Andrews, N. W. (1990). "The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*." Exp Parasitol **71**(2): 241-244.
- Andrews, N. W. (1994). "From lysosomes into the cytosol: the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*." Braz J Med Biol Res **27**(2): 471-475.
- Ausubel FM. (1995). "Differential mRNA display". Methods Cell Biol. 1995;49:431-40
- Baida, G. E. and N. P. Kuzmin (1995). "Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*." Biochim Biophys Acta **1264**(2): 151-154.
- Baida, G. E. and N. P. Kuzmin (1996). "Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*." Biochim Biophys Acta **1284**(2): 122-124.
- Beverley SM, Clayton CE (1993). "Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation". Methods Mol Biol. 21:333-48.
- Bielecki J1, Youngman P, Connelly P, Portnoy DA (1990). "Bacillus subtilis expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells". Nature. May 10;345(6271):175-6
- Castro-Gomes, T., F. R. Almeida-Campos, C. E. Calzavara-Silva, R. A. da Silva, F. Frezard and M. F. Horta (2009). "Membrane binding requirements for the cytolytic activity of *Leishmania amazonensis* leishporin." FEBS Lett **583**(19): 3209-3214.

- Castro-Gomes, T. (2010). "Citólise mediada pela leishporina de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: requisitos da citolisina para a ligação à membrana, visualização de estruturas *pore-like* e estratégias para a sua identificação molecular" - Tese de Doutorado
- Chang, K-P., Fong, D. & Bray, R.S. (1985). "Biology of *Leishmania* and leishmaniasis." In: Chang, K.P. & Bray, R.S. (eds.), ***Human Parasitic Diseases***. Leishmaniasis. Elsevier Science Publishers, New York, NY, **1**: 1-30.
- Chen, Y. C., M. C. Chang, Y. C. Chuang and C. L. Jeang (2004). "Characterization and virulence of hemolysin III from *Vibrio vulnificus*." *Curr Microbiol* **49**(3): 175-179.
- Christine C. Wirtha, Sandra Benninka, Matthias Scheuermayerb, Rainer Fischerc, Gabriele Pradela, (2015). "Perforin-like protein PPLP4 is crucial for mosquito midgut infection by *Plasmodium falciparum*." *Molecular & Biochemical Parasitology* 201 - 90–99.
- de Almeida, M. C., V. Vilhena, A. Barral and M. Barral-Netto (2003). "Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**(7): 861-870.
- Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis." *Nat Rev Microbiol* **2**(9): 692.
- Dodge, M. A., R. F. Waller, L. M. Chow, M. M. Zaman, L. M. Cotton, M. J. McConville and D. F. Wirth (2004). "Localization and activity of multidrug resistance protein 1 in the secretory pathway of *Leishmania* parasites." *Mol Microbiol* **51**(6): 1563-1575.
- El Fadili, A., C. Kundig and M. Ouellette (2002). "Characterization of the folylpolyglutamate synthetase gene and polyglutamylated folates in the protozoan parasite *Leishmania*." *Mol Biochem Parasitol* **124**(1-2): 63-71.
- Grimaldi, G., Jr. and R. B. Tesh (1993). "Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research." *Clin Microbiol Rev* **6**(3): 230-250.
- Hecht, O., N. A. Van Nuland, K. Schleinkofer, A. J. Dingley, H. Bruhn, M. Leippe and J. Grotzinger (2004). "Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*." *J Biol Chem* **279**(17): 17834-17841.
- Herbst, R., F. Marciano-Cabral and M. Leippe (2004). "Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule." *J Biol Chem* **279**(25): 25955-25958.
- Horta, M. F. (1997). "Pore-forming proteins in pathogenic protozoan parasites." *Trends Microbiol* **5**(9): 363-366.
- Hybiske, K. and R. S. Stephens (2008). "Exit strategies of intracellular pathogens." *Nat Rev Microbiol* **6**(2): 99-110.
- Ishino, T., Y. Chinzei and M. Yuda (2005). "A *Plasmodium* sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection." *Cell Microbiol* **7**(2): 199-208.
- Kafsack, B. F., J. D. Pena, I. Coppens, S. Ravindran, J. C. Boothroyd and V. B. Carruthers (2009). "Rapid membrane disruption by a perforin-like protein facilitates parasite exit from host cells." *Science* **323**(5913): 530-533.

Kaiser, K., N. Camargo, I. Coppens, J. M. Morrisey, A. B. Vaidya and S. H. Kappe (2004). "A member of a conserved Plasmodium protein family with membrane-attack complex/perforin (MACPF)-like domains localizes to the micronemes of sporozoites." Mol Biochem Parasitol **133**(1): 15-26.

Kima, P.E. (2007). "The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist". Int J Parasitol **37** (10): 1087-1096.

Leippe, M. (1997). "Amoebapores." Parasitol Today **13**(5): 178-183.

Lundberg, U., U. Vinatzer, D. Berdnik, A. von Gabain and M. Baccharini (1999). "Growth phase-regulated induction of Salmonella-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes." J Bacteriol **181**(11): 3433-3437.

Manning-Cela, R., A. Cortes, E. Gonzalez-Rey, W. C. Van Voorhis, J. Swindle and A. Gonzalez (2001). "LYT1 protein is required for efficient in vitro infection by *Trypanosoma cruzi*." Infect Immun **69**(6): 3916-3923.

McConville, M. J., K. A. Mullin, S. C. Ilgoutz and R. D. Teasdale (2002). "Secretory pathway of trypanosomatid parasites." Microbiol Mol Biol Rev **66**(1): 122-154; table of contents.

Michael J Blackman Vern B Carruthers (2013). "Recent insights into apicomplexan parasite egress provide new views to a kill". 16:459–464

Moller, S., M. D. Croning and R. Apweiler (2001). "Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions." Bioinformatics **17**(7): 646-653.

Moonah, S., N. G. Sanders, J. K. Persichetti and D. J. Sullivan, Jr. (2014). "Erythrocyte lysis and *Xenopus laevis* oocyte rupture by recombinant Plasmodium falciparum hemolysin III." Eukaryot Cell **13**(10): 1337-1345.

Noronha, F. S., J. S. Cruz, P. S. Beirao and M. F. Horta (2000). "Macrophage damage by *Leishmania amazonensis* cytolysin: evidence of pore formation on cell membrane." Infect Immun **68**(8): 4578-4584.

Noronha, F. S., F. J. Ramalho-Pinto and M. F. Horta (1994). "Identification of a putative pore-forming hemolysin active at acid pH in *Leishmania amazonensis*." Braz J Med Biol Res **27**(2): 477-482.

Noronha, F. S., F. J. Ramalho-Pinto and M. F. Horta (1996). "Cytolytic activity in the genus *Leishmania*: involvement of a putative pore-forming protein." Infect Immun **64**(10): 3975-3982.

Pace, D. (2014). "Leishmaniasis." J Infect **69 Suppl 1**: S10-18.

Parker, M. W. and S. C. Feil (2005). "Pore-forming protein toxins: from structure to function." Prog Biophys Mol Biol **88**(1): 91-142.

Peacock, C. S., K. Seeger, D. Harris, L. Murphy, J. C. Ruiz, M. A. Quail, N. Peters, E. Adlem, A. Tivey, M. Aslett, A. Kerhornou, A. Ivens, A. Fraser, M. A. Rajandream, T. Carver, H. Norbertczak,

T. Chillingworth, Z. Hance, K. Jagels, S. Moule, D. Ormond, S. Rutter, R. Squares, S. Whitehead, E. Rabbinowitsch, C. Arrowsmith, B. White, S. Thurston, F. Bringaud, S. L. Baldauf, A. Faulconbridge, D. Jeffares, D. P. Depledge, S. O. Oyola, J. D. Hilley, L. O. Brito, L. R. Tosi, B. Barrell, A. K. Cruz, J. C. Mottram, D. F. Smith and M. Berriman (2007). "Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease." Nat Genet **39**(7): 839-847.

Ramarao, N. and V. Sanchis (2013). "The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review." Toxins (Basel) **5**(6): 1119-1139.

Richard, D., P. Leprohon, J. Drummelsmith and M. Ouellette (2004). "Growth phase regulation of the main folate transporter of *Leishmania infantum* and its role in methotrexate resistance." J Biol Chem **279**(52): 54494-54501.

Roiko, M. S. and V. B. Carruthers (2009). "New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress." Cell Microbiol **11**(10): 1444-1452.

Sacks, D.L. (1989) "Metacycolgenesis in *Leishmania* promastigotes." Exp Parasitol **69** (1): 100-103.

Sacks, D.L. and S. Kamhawi (2001). "Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis." Annu Rev Microbiol **55**: 453-483.

Schwartzman, J.D. & Pearson, R.D. (1985). " The interaction of *Leishmania donovani* promastigotes and human fibroblasts in vitro." Am J Trop Med Hyg **34**: 850-855.

Singh, N., S. Chikara and S. Sundar (2013). "SOLiD sequencing of genomes of clinical isolates of *Leishmania donovani* from India confirm *Leptomonas* co-infection and raise some key questions." PLoS One **8**(2): e55738.

Waller, R. F. and M. J. McConville (2002). "Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites." Int J Parasitol **32**(12): 1435-1445.

Wyler, D.J. (1982). " *In vitro* parasite-monocyte interactions in human Leishmaniasis. Evidence for an active role of parasite in attachment." J Clin Invest **70**: 80-82.

Young, J. D., T. M. Young, L. P. Lu, J. C. Unkeless and Z. A. Cohn (1982). "Characterization of a membrane pore-forming protein from *Entamoeba histolytica*." J Exp Med **156**(6): 1677-1690.

Yuldasheva, L. N., E. B. Carvalho, M. T. Catanho and O. V. Krasilnikov (2005). "Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves." Braz J Med Biol Res **38**(7): 1061-1070.

