

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**Efeito da hibridização na expressão de lipofosfoglicanos em
*Leishmania major***

por Karine Renata Dias Silveira

Belo Horizonte
Dezembro/2021

TESE

DCS – IRR

K. R. D. SILVEIRA

2021

Karine Renata Dias Silveira

**Efeito da hibridização na expressão de lipofosfoglicanos em
*Leishmania major***

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Rodrigo Pedro Pinto Soares
Coorientadora: Paula Monalisa Nogueira

Belo Horizonte
Dezembro/2021

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

S587e
2021

Silveira, Karine Renata Dias.

Efeito da hibridização na expressão de lipofosfoglicanos em *Leishmania major* / Karine Renata Dias Silveira. – Belo Horizonte, 2021.

X, 40 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: 37-39

Tese –Tese para obtenção do título Doutor(a) em Ciências pelo Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. *Leishmania*/genética 2 Glicoconjugados/uso terapêutico
3. Hibridização Genética/imunologia I. Título. II. Soares, Rodrigo Pedro Pinto (Orientação). III. Nogueira, Paula Monalisa (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.93

Karine Renata Dias Silveira

Efeito da hibridização na expressão de lipofosfoglicanos em *Leishmania major*

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares (IRR/FIOCRUZ MINAS) Presidente

Prof. Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (IRR/FIOCRUZ MINAS) Titular

Prof. Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo (IRR/FIOCRUZ MINAS) Titular

Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo (UFMG) Titular

Prof. Dra. Márcia Dalastra Laurenti (USP) Titular

Prof. Dra. Nágila Francinete Costa Secundino (IRR/FIOCRUZ MINAS) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 15/12/2021.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto René Rachou, pela estrutura física e suporte financeiro oferecidos para realização desse projeto;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos durante os 4 anos de doutorado;

Às demais agências financiadoras do projeto: FIOCRUZ, FAPEMIG e CNPq;

Ao meu orientador, Dr. Rodrigo Soares, pela oportunidade de realização desse projeto;

À minha coorientadora, Dra. Paula Nogueira, pelos ensinamentos, carinho, confiança e amizade;

Ao amigos do Grupo de Biotecnologia Aplicada à Patógenos por todos momentos e conhecimentos compartilhados;

Aos Professores, Colegiado e à Secretaria Acadêmica do programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do IRR, por todo o suporte durante os últimos anos;

Aos amigos do Comitê Estudantil, por abrirem meu caminho para outros olhares e possibilidades dentro e fora de nossa instituição e por todo crescimento profissional e pessoal que nossa convivência proporcionou;

À todos os amigos que fiz ao longo dos 8 anos que estive no René Rachou, por todo o apoio nessa jornada, pela ajuda durante os experimentos, e também por todas as conversas e risadas que facilitaram o caminho;

Aos meus pais, Cláudia e Arimatéia, por nunca terem medido esforços para que eu tivesse acesso à melhor educação possível e não me deixarem desistir nem por um segundo. Por serem meus maiores exemplos, meu porto seguro, e me lembrarem sempre que "I can Always come back home";

À minha irmã Kelly e meu cunhado Elias, por todo apoio e torcida e aos meus sobrinhos Eduardo e Laura, que mesmo ainda sendo crianças foram dois dos maiores incentivadores de minha carreira científica.

À minha psicóloga Camilla e meu médico Miguel, dois grandes profissionais que foram suporte e me mostraram vários caminhos e possibilidades tranquilizadoras ao longo do processo;

À Família Almeida Antoniazzi, que acompanharam de perto as alegrias e sofrimentos dessa formação e sempre me deram carinho, apoio e força para seguir;

Por fim, agradeço à todos meus amigos e familiares do ambiente extra acadêmico, que sempre souberam entender os momentos de ausência e me apoiaram na realização desse sonho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001.

RESUMO

A *Leishmania major* é um parasita endêmico em países do Velho Mundo, sendo uma das principais causas de leishmaniose cutânea. Além disso, é uma das espécies mais estudadas do gênero e também é considerada um importante modelo no estudo da imunologia de doenças. Os lipofosfoglicanos (LPGs) são considerados fatores de virulência multifuncionais da *Leishmania* e estão envolvidos na interação parasita-hospedeiro. Vários estudos indicam que seus polimorfismos podem estar envolvidos nos mecanismos de imunopatogênese das leishmanioses. A primeira demonstração de hibridização de *Leishmania* em laboratório foi demonstrada em 2009, e a caracterização de seus LPGs foi realizada neste estudo. Os LPGs foram extraídos, purificados e suas unidades repetidas analisadas. As cepas parentais Friedlin e Seidman têm perfis distintos na expressão de LPG, e um perfil misto de expressão de LPG foi observado nos híbridos FnSd3, FnSd6F, FnSD4A e FnSd4B. Expressão mista de LPG. Afeta a produção de NO em macrófagos e foi dependente de LPG derivado de FV1.

PALAVRAS CHAVE: *Leishmania*, Major, Híbridos, Lipofosfoglicanos, LPG

ABSTRACT

Leishmania major is an endemic parasite in Old World countries, being one of the main causes of cutaneous leishmaniasis. Furthermore, it is one of the most studied species of the genus and is also considered an important model in the study of disease immunology. Lipophosphoglycans (LPGs) are considered multifunctional virulence factors of *Leishmania* and are involved in the host-parasite interaction. Several studies indicate that their polymorphisms may be involved in the mechanisms of immunopathogenesis of leishmaniasis. The first demonstration of hybridization of *Leishmania* in the laboratory was demonstrated in 2009, and the characterization of its LPGs was carried out in this study. LPGs were extracted, purified and their repeat units analyzed. The parental Friedlin and Seidman strains have distinct profiles in LPG expression, and a mixed LPG expression profile was observed in FnSd3, FnSd6F, FnSD4A and FnSd4B hybrids. Mixed LPG expression. Affect NO production in macrophages and was dependent on FV1 derived LPG.

KEY WORDS: Leishmania, Major, Hibrids, Lipophosphoglycans, LGP

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Micrografia eletrônica de varredura. Amastigota e promastigota de *Leishmania amazonensis*. 12
- Figura 2:** Esquema representativo dos glicoconjugados de superfície da *Leishmania*.. 15
- Figura 3:** Esquema representativo da estrutura do lipofosfoglicano (LPG). 17
- Figura 4:** Esquema representativo da estrutura dos lipofosfoglicanos (LPGs) de *L. major*. 17
- Figura 5:** Esquema representativo da estrutura dos lipofosfoglicanos (LPGs) de *L. amazonensis*. 19
- Figura 6:** Resultado do perfil de digestão utilizando a enzima *HaeIII* do fragmento do gene *hsp70* amplificado a partir de amostras isoladas em cultura. 28
- Figura 7:** *Western Blot* de LPG purificado (10 µg) das cepas de *L. major* (FV1 e Sd) e *L. major* híbridas (FnSd4A, FnSd4B, FnSd4C, FnSd6F, FnSd1 e FnSd3) em presença do anticorpo WIC 79.3 (1:1000). 29
- Figura 8:** *Western Blot* de LPG purificado (10 µg) das cepas de *L. major* (FV1 e Sd) e *L. major* híbridas (FnSd4A, FnSd4B, FnSd4C, FnSd6F, FnSd1 e FnSd3) em presença do anticorpo CA7AE (1:1000)..... 30
- Figura 9:** Perfil eletroforético das unidades repetitivas 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cepas de <i>L. major</i> parentais e híbridas obtidas a partir de seu cruzamento.....	22
--	-----------

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Produção de nitrito por macrófagos murinos expostos aos LPGs (10mg/mL) das cepas parentais e híbridas..... **31**

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	11
1.1 – As Leishmanioses	11
1.2 - <i>Leishmania major</i> e <i>Leishmania major</i> -like	13
1.3 - Glicoconjugados e LPGs.....	14
1.3 - Hibridização em <i>Leishmania</i>	19
2- OBJETIVOS	21
3- MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1- Cultivo Celular.....	22
3.2- Tipagem molecular	23
3.3- Extração do LPG.....	23
3.4- Purificação e dosagem do LPG	24
3.5- Caracterização Preliminar dos LPGs	25
3.5.1- Análise por <i>Western Blot</i>	25
3.5.2- Despolimerização e eletroforese de carboidratos.....	25
(FACE – fluorophore-assisted-carbohydrat-electroforesis)	25
3.5.3- Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO).....	26
4- RESULTADOS	28
4.1- Tipagem molecular (PCR-RFLP do hsp70)	28
4.2- Análise por <i>Western Blot</i>	29
4.3- Análise do perfil eletroforético das unidades repetitivas (FACE)	31
5 – DISCUSSÃO	34
6 – CONCLUSÃO	34
7- REFERÊNCIAS	37
8- ANEXOS	40

1- INTRODUÇÃO

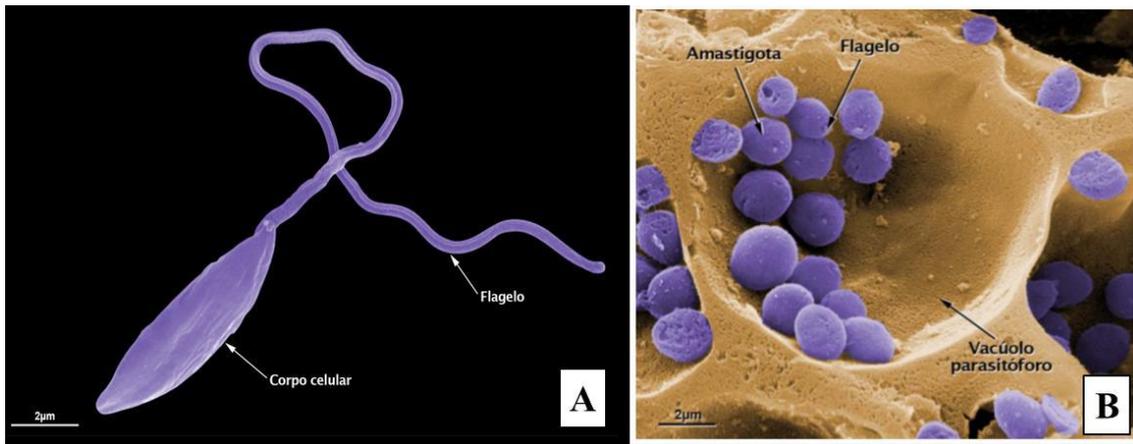
1.1 – As Leishmanioses

As leishmanioses são doenças negligenciadas de ampla distribuição mundial causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e transmitidas ao homem através da picada de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (DESJEUX, 2004).

No homem, as leishmanioses são causadas por aproximadamente 21 espécies responsáveis por um espectro de manifestações clínicas incluindo as formas cutânea (LC), muco-cutânea (LMC) e visceral (LV). A LC é a forma mais comum com mais de 1 milhão de casos reportados nos últimos 5 anos. Ela é caracterizada por lesões cutâneas ulceradas ou não, indolores, únicas ou múltiplas que podem curar-se espontaneamente. No Velho Mundo, a LC é causada principalmente por *Leishmania major* e *Leishmania (L.) tropica*. Estima-se que 1 bilhão de pessoas vivam em áreas de risco tanto no Novo quanto no Velho Mundo. A inexistência de vacinas para uso humano, a dificuldade de controle de reservatórios e vetores e a ineficácia dos tratamentos devido a cepas resistentes são alguns dos fatores que contribuem para expansão da doença (WHO, 2020).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são heteroxênicos e durante seu ciclo de vida, apresentam duas formas de desenvolvimento que se alternam entre os hospedeiros vertebrado e invertebrado. No intestino do inseto vetor, ocorrem formas promastigotas flageladas extremamente polimórficas enquanto que no hospedeiro vertebrado, ocorre a forma amastigota. Esta última é circular, imóvel e não apresentam flagelo desenvolvido e que se desenvolve no interior de células do sistema monocítico fagocitário (macrófagos e neutrófilos) (Figura 1) (Kaye & Scott, 2011).

Figura 1: Forma promastigota (A) e amastigotas (B) de *Leishmania* sp



Fonte: Teixeira et al., 2013.

A infecção do hospedeiro vertebrado se inicia quando uma fêmea de flebotomíneo infectada realiza o repasto sanguíneo e inocula as formas promastigotas metacíclicas na pele. Estas devem escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (DE ASSIS et al., 2012a; SACKS; KAMHAWI, 2001) para que sejam fagocitadas pelos macrófagos ou neutrófilos recrutados para o local de inoculação (PETERS et al., 2008). Dentro dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos as promastigotas diferenciam-se em formas amastigotas, multiplicando-se por divisão binária. Posteriormente, ocorre ruptura das células e as amastigotas são liberadas, fagocitadas por outras células ou ingeridas pelo vetor. Neste, o sangue juntamente com os parasitos é rapidamente direcionado ao intestino do inseto onde é envolvido pela matriz peritrófica (MP) (SECUNDINO et al. 2005). Neste bolo alimentar, as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas que se multiplicam e sofrem várias mudanças morfológicas (nectomonadas, haptomonadas, leptomônadas e metacíclicas). Após a ruptura da MP, as formas promastigotas que resistiram às enzimas digestivas devem se aderir ao epitélio evitando passagem com o bolo alimentar e perda da infecção. No caso de *L. major*, objeto de estudo de nosso trabalho, já é conhecido um receptor (PpGalec) para o seu lipofosfoglicano (LPG) no epitélio do intestino médio (KAMHAWI et al., 2004), uma vez que o receptor reconhece o LPG das promastigotas, essas se aderem ao intestino do flebótomo. Posteriormente passam pelo processo de diferenciação, denominado metaciclogênese e soltam-se do epitélio intestinal. Esta liberação depende também do LPG, cujas cadeias laterais de galactose são cobertas por resíduos de arabinose (MCCONVILLE et al., 1992; PIMENTA et al., 1992), fazendo com que se soltem do epitélio. Além das modificações bioquímicas, as formas

metacíclicas apresentam redução no tamanho de corpo celular e aumento do flagelo que ocupa cerca de 2/3 do tamanho do parasito. Estas formas metacíclicas infectantes juntamente com vários componentes incluindo o gel secretado por promastigotas (PSG), saliva, exossomos e microbiota serão novamente inoculadas no hospedeiro vertebrado pelo vetor (DEY et al., 2018). Anteriormente, acreditava-se que estas formas não teriam a capacidade de se multiplicar. Entretanto, recentemente foi observado que seguido a um novo repasto sanguíneo que elas podem novamente se diferenciar em retroleptomonadas e recolonizar o intestino (SERAFIM et al., 2018). Estes dois últimos artigos foram muito importantes para acrescentar informações inéditas ao ciclo de *Leishmania*.

1.2 - *Leishmania major* e *Leishmania major-like*

O nosso modelo de estudo neste trabalho será *L. major*. Este parasito é endêmico em países do Velho Mundo, sendo nessa região um dos principais causadores de leishmaniose cutânea. Sua ocorrência é relatada no Irã, Arábia Saudita, norte da África, Oriente Médio, Ásia Central e África Ocidental. Assim como as demais espécies de *Leishmania*, *L. major* é transmitida através picada de flebotomos, sendo que essa espécie tem como par natural *Phlebotomus duboscqi* e *Phlebotomus papatasi*. *Leishmania major* é uma espécie zoonótica e na natureza seu reservatório são pequenos mamíferos roedores conhecidos popularmente como Gerbil. A Organização Mundial de Saúde (WHO) estima que ocorram 0,7-1 milhão casos de leishmaniose cutânea por ano, desses, de 23 a 43 mil devem ser causados por *L. major*.

Como dito anteriormente, *L. major* é conhecida por ter uma distribuição em países do Velho Mundo. Entretanto, alguns isolados semelhantes a esta espécie foram encontrados na América Latina incluindo Equador, Paraguai, México, Venezuela e Peru (HASHIGUSHI et al., 1991; YAMASAKI et al., 1994; SHAW, 1994; LUYO-ACERO et al., 2004; CALVOPINA et al., 2004). Isto chamou atenção dos pesquisadores para uma possível introdução desta espécie no Novo Mundo (MOMEN et al., 1985). Com as técnicas moleculares disponíveis na época (RAPD) convencionou-se chamar estes isolados de *L. major-like* (SILVA et al., 2009).

Recentemente, alguns isolados de Minas Gerais (MG) e Goiás (GO) foram sequenciados e confirmou-se o seu status taxonômico como *L. major* (ALMEIDA, 2019, tese de doutorado). Porém estes resultados ainda não foram publicados. Este achado nos leva a levantar a hipótese de quem seria o vetor de *L. major* no Novo Mundo. Estudos de nosso grupo mostraram que estes isolados de MG e GO foram capazes de infectar *Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus papatasi* (GUIMARÃES et al., 2018). Entretanto, sabemos que em Caratinga, onde dois destes isolados foram obtidos na década de 70, que os estudos entomológicos encontraram *Lutzomyia migonei* em grande quantidade. Posteriormente, este vetor foi considerado permissivo (GUIMARÃES et al., 2016) o que nos estimula a investigar se ele não seria o provável transmissor de *L. major* no Brasil. Mais recentemente um estudo genômico mostrou que estas cepas são realmente *L. major* e em algum momento entraram nas Américas ou já estavam aqui anteriormente á separação dos continentes (ALMEIDA et al. 2021).

Nesse trabalho utilizamos as cepas parentais FV1 (MHOM/IL/80/Friedlin), originalmente isolada de um paciente com LC infectado no Vale do Jordão e Seidman (MHOM/SN/74/SD), originalmente isolada de um paciente com lesões cutâneas no Senegal.

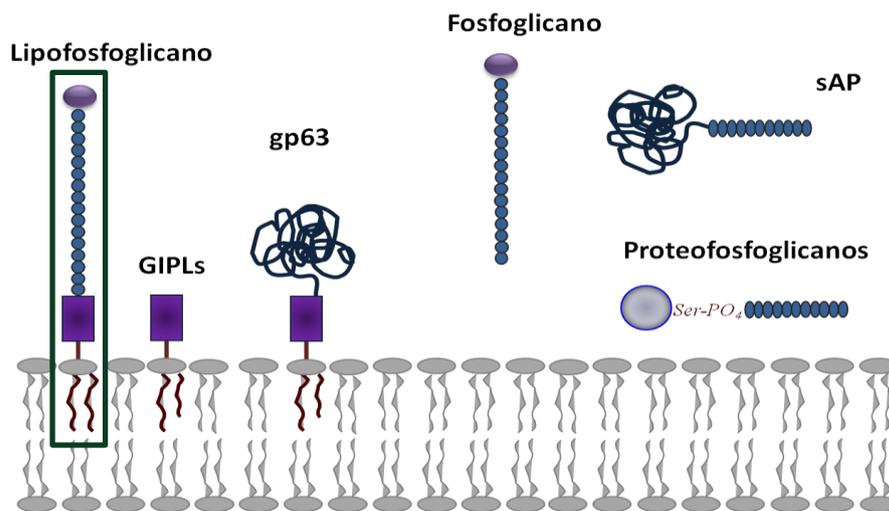
1.3 - Glicoconjugados e LPGs

Para que consigam sobreviver e multiplicar, os parasitos do gênero *Leishmania* devem ultrapassar as barreiras dos ambientes hostis encontrados no tubo digestório do vetor e nas células do hospedeiro vertebrado. Durante o ciclo, esses parasitos sofrem diversas adaptações fisiológicas e bioquímicas que possibilitam sua sobrevivência o que inclui dentre vários fatores a expressão de glicoconjugados (De Assis et al., 2012b). O termo glicoconjugado refere-se a qualquer molécula que possui algum motivo de carboidrato ligado covalentemente a outra classe de moléculas como lipídeos ou proteínas. O desenvolvimento de técnicas aprofundadas de glicobiologia permitiu o estudo destas estruturas em diferentes modelos celulares infecciosos ou não (VARKI et al., 2009).

Os glicoconjugados expressos na superfície de *Leishmania* desempenham um papel importante no estabelecimento da infecção (SACKS & KAMHAWI, 2001). Estes incluem os lipofosfoglicanos (LPGs), glicoinositolfosfolípides (GIPLs) e as proteases de superfície (gp63) que estão ancorados a superfície do parasito por

glicosilfosfatidilinositol (GPI). Além disso, os glicoconjugados podem ser secretados sob a forma de fosfatases ácidas (sAPs), fosfoglicanos (PGs) e proteofosfoglicanos (PPGs) (ASSIS ET AL., 2012a) (figura 2).

Figura 2: Esquema representativo dos glicoconjugados de superfície de *Leishmania*. As pequenas estruturas ovais representam as unidades repetitivas Gal-Man-PO₄. No PPG (proteofosfoglicano) e sAP (fosfatase ácida secretada) as unidades repetitivas estão ligadas ao polipeptídeo via Man-PO₄-Serina. GPI, glicosilfosfatidilinositol; PG, fosfoglicano; LPG, lipofosfoglicano; GIPL, glicoinositolfosfolípide.

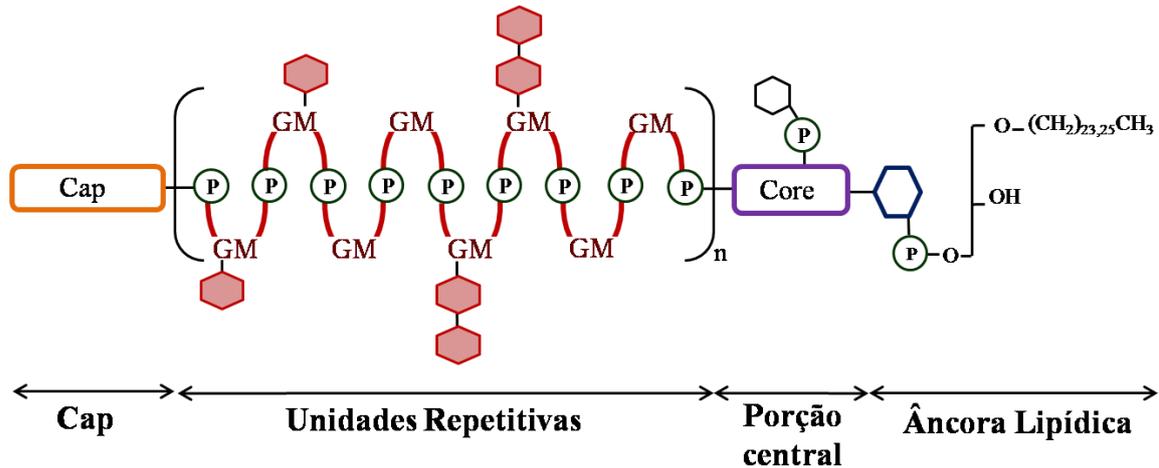


Fonte: adaptado de *Molecular Medical Parasitology*, Turco, 2003.

Dentre os glicoconjugados presentes na superfície de *Leishmania*, destaca-se o LPG. Considerado um fator de virulência multifuncional ele é importante tanto na interação parasito-hospedeiro no vertebrado quanto no invertebrado (KAMHAWI & SACKS, 2001). No vetor, suas funções incluem adesão e especificidade de ligação ao intestino médio (PIMENTA ET AL., 1992, 1994; KAMHAWI et al., 2004) e resistência a ação das enzimas digestivas (BOROVSKY & SCHLEIN, 1987). No hospedeiro vertebrado, existem muitas publicações envolvendo o papel do LPG na resistência ao complemento (BRITTINGHAM ET AL., 1996), inibição do processo de maturação dos fagossomos (DESJARDINS e DESCOTEAUX, 1997; VIEIRA et al., 2019a). No compartimento imune inato, o LPG também foi implicado em vários mecanismos incluído: modulação da produção de óxido nítrico (NO) e citocinas, modulação de MAPKs, agonista de TLR2/TLR4, indução de redes extracelulares de neutrófilos (NETs), indução da proteína quinase R (PKR), indução da heme-oxigenase I, indução de leucotrieno B4 e PGE₂(LTB4) (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009; VIVARINI et al., 2011; ASSIS et al., 2012b; LUZ et al., 2012; IBRAIM et al., 2013; PARANAÍBA et al.,

2015, NOGUEIRA et al., 2016; LIMA et al., 2017; VIEIRA et al., 2019b). No caso de *L. major*, os primeiros trabalhos identificaram que o LPG desta espécie seria agonista de TLR2 e induziria a produção de citocinas e NO via MyD88 (DE VEER et al., 2003; BECKER et al., 2003).

Figura 3: Esquema representativo da estrutura do lipofosfoglicano (LPG). O LPG é composto por quatro domínios: O Cap, as Unidades Repetitivas, a porção central e a âncora lipídica.



Fonte: Rodrigo Soares

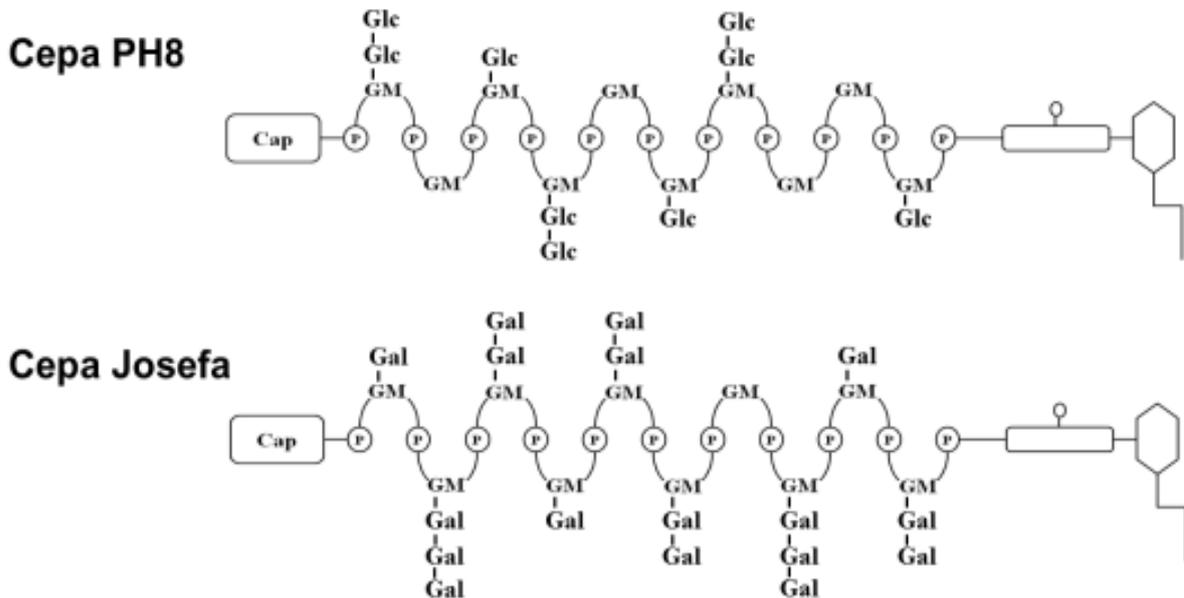
As análises preliminares do LPG começaram na década de 80 com a análise da estrutura da porção lipídica de *L. donovani* (ORLANDI & TURCO, 1987). O LPG é composto por quatro domínios (Figura 3): (I) uma âncora lipídica conservada representada por 1-O-álquil-2-lisofosfatidilinositol (PI) ligado a; (II) uma porção central composta por um heptassacarídeo, também conservado, representado por Gal(α 1-6)Gal(α 1-3)Galf(α 1-3)[Glc α 1-PO₄]Man(α 1-3)Man(α 1-4)-GlcN(α 1-); (III) uma região de repetições de dissacarídeos fosforilados Gal(α 1-4)Man(α 1-)PO₄ que podem possuir substituições de um ou mais açúcares e dar origem a polimorfismos intra e interespecíficos e (IV) uma região terminal que recebe o nome de *cap* formada por um oligossacarídeo neutro (DESCOTEAUX & TURCO, 1999). O primeiro LPG que foi descrito de forma completa foi o de *L. major* (cepa Friedlin V1), uma das cepas estudadas em nosso trabalho (MCCONVILLE et al., 1992). Neste artigo foi descrito que o LPG desta espécie possui cadeias laterais de galactose. Após a metaciclógênese seu LPG dobra de tamanho e é coberto por resíduos de arabinose (Figura 3). Conforme dito anteriormente estas modificações bioquímicas resultam no

glicose, galactose e arabinose (MCCONVILLE et al., 1995; SOARES et al., 2004). Já o LPG de *L. aethiopica*, geralmente apresenta substituições no carbono 2 (C₂) da manose por α -manose (MCCONVILLE et al., 1995).

A primeira cepa brasileira a ter seu LPG descrito foi *Leishmania infantum* (PP75), assim como *L. mexicana*, ela também apresentou uma glicose em suas unidades repetitivas (R. P. P. Soares et al., 2002a). Nessa espécie, após a metaciclogênese, o açúcar desaparece e o número de unidades repetitivas aumenta de aproximadamente 19 nas formas procíclicas para aproximadamente 34 nas formas metacíclicas (R. P. P. Soares et al., 2002b). Em *L. braziliensis* acontece o oposto do que ocorre em *L. infantum*. As formas procíclicas não possuem cadeias laterais e as metacíclicas possuem uma ou duas α -glicoses (R. P. P. Soares et al., 2005; Vieira et al., 2019). Em 2011, um estudo de nosso grupo caracterizou as unidades repetitivas de 16 cepas de *L. infantum*, e foi possível agrupá-los em três grupos: I) sem cadeias laterais; II) com adição de resíduos de uma a duas β -glicoses e III) com cadeias laterais de três ou mais glicoses. Esta variabilidade da conformação dos LPGs resultou numa maior ativação da produção de NO por macrófagos murinos, mas por sua vez não interferiu na infectividade para o vetor (COELHO-FINAMORE et al., 2011). Já os LPGs de *L. shawi* e *L. enrietti* são desprovidos de cadeias laterais em suas unidades repetitivas. (PASSERO et al., 2015; Paranaíba et al., 2015). Por sua vez, as estruturas dos LPGs de cepas de *L. major*-like do Brasil demonstram que as cepas BH49 e BH129 são mais galactosiladas que a cepa BH121 (GUIMARÃES et al., 2018).

O papel destas modificações bioquímicas resulta em diferentes padrões de adesão ao intestino médio de alguns vetores, como *Lu. longipalpis*, *Lu. intermedia* e *Lu. Whitmani* (R. P. Soares et al., 2010). Além das variações entre as fases do ciclo de *Leishmania*, as variações intraespecíficas englobam também os polimorfismos entre cepas. Por exemplo em *Leishmania amazonensis* enquanto a cepa PH8 apresenta cadeias laterais de glicose, a cepa Josefa apresenta cadeias laterais de galactose (Figura 4) (NOGUEIRA et al., 2017).

Figura 5: Esquema representativo da estrutura dos lipofosfoglicanos (LPGs) de *L. amazonenses*: A cepa PH8 apresenta cadeias laterais que variam de uma a duas ligações de glicose. A cepa Josefa apresenta cadeias laterais variando de uma a três ligações de galactoses.



Fonte: Nogueira et al., 2017.

O primeiro estudo a mostrar os polimorfismos intraespecíficos em *L. major* identificou que a cepa FV1 possui cadeias laterais de galactose e arabinose, já a cepa LV39 apresenta apenas cadeias laterais de galactose (DOBSON et al., 2003).

Sabe-se que na natureza existem várias descrições de cepas híbridas de *Leishmania* (Akopyants et al., 2009; Jenni et al., 1986; Schweizer et al., 1988). Entretanto, não sabemos o que ocorre na expressão dos LPGs nestes híbridos.

1.3 - Hibridização em *Leishmania*

A primeira demonstração da hibridização de *Leishmania* em laboratório foi realizada pelo grupo do Dr. David Sacks (AKOPYANTS et al., 2009). Este fenômeno ocorreu dentro do hospedeiro invertebrado no caso *P.papatasi*, onde cepas de *L. major* (FV1 e LV39) foram capazes de realizar ciclo sexual consistente com um processo meiótico, assim como descrito previamente para espécies de tripanossomatídeos africanos (JENNI L et al., 1986; GAUNT MW et al., 2003). Posteriormente o grupo demonstrou novamente a troca genética em quatro cepas de *L. major* em *P.duboscqi* (FV1, Sd, WR2885 e LV39). Neste estudo foram obtidos 96 híbridos dos quais seis foram escolhidos para análise no presente trabalho. Este vetor foi co-infectado com

cepas de *L.major* que expressavam marcadores de seleção de antibióticos distintos, sendo possível isolá-los posteriormente quando crescidos em ambos antibióticos (INBAR et al., 2011). Em ambos os estudos descritos acima, as análises genéticas mais aprofundadas mostraram que as cepas híbridas de *Leishmania* geradas apresentaram cromossomos completos de ambos os parentais, enquanto o kDNA pertencia apenas a um deles. Os híbridos foram obtidos em todas as combinações testadas entre as quatro cepas, sugerindo que as barreiras ao acasalamento entre as mesmas não existem. A proporção de flebótomos que produzem pelo menos um híbrido foi aproximadamente comparável entre os 4 pares de acasalamento testados e demonstraram uma frequência relativamente baixa de formação de híbridos. Tal fato demonstra que a hibridização deve ser considerada como uma parte não obrigatória do ciclo, uma vez que a maioria dos insetos co-infectados falhou em produzir um híbrido. Os resultados confirmam que, mesmo que a reprodução sexual não seja obrigatória e seja relativamente rara, o mecanismo de troca genética foi mantido entre as espécies. Além disso, o estudo demonstrou a capacidade do tubo digestivo de um vetor permissivo, o *Lu.longipalpis*, de funcionar como o microambiente onde ocorreria o intercâmbio genético de *Leishmania*. Até o momento, a hibridização não foi observada *in vitro*, sendo assim os resultados reforçam que o intestino médio do flebotomíneo fornece um ambiente único para a troca genética (INBAR et al., 2013). Porém, os fatores intrínsecos do parasita bem como os extrínsecos (pH, fatores do epitélio, nutricionais) que promoveriam a hibridização ainda não foram estabelecidos. Finalmente, os híbridos foram transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada (AKOPYANTS et al., 2009; INBAR et al., 2013).

A evidência da troca genética provavelmente contribui para a diversidade fenotípica em populações naturais, e a análise das progênies híbridas é útil para a compreensão de características como por exemplo virulência, tropismo tecidual e resistência a drogas. O presente estudo pretende elucidar qual o efeito da hibridização sobre a expressão dos lipofosfoglicanos em híbridos de *L.major* tendo em vista que esses não foram ainda descritos aliado ao fato de que o estudo da glicobiologia de parasitos do gênero *Leishmania* auxilia a compreensão do envolvimento dos glicoconjugados nos diversos processos imunopatológicos da interação parasito-hospedeiro.

2- OBJETIVOS

- Caracterizar a estrutura das unidades repetitivas e das âncoras lipídicas dos LPGs das cepas parentais e híbridas de *L. major*;
- Avaliar funcionalmente os LPGs das cepas parentais e híbridas de *L. major* em ensaios de macrófagos murinos.

3-MATERIAIS E METÓDOS

3.1- Cultivo Celular

As cepas de *L. major* utilizadas nesse estudo foram cedidas pelo laboratório do Dr. David Sacks (INBAR et al., 2013) e estão representadas na tabela 1. As formas promastigotas foram cultivadas em meio definido M199 (Sigma®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina/streptomicina (100x), hepes (40 mM), bicarbonato de sódio, biotina (1 mg/mL), hemina (0,0005%), solução de vitamina MEM (100x), hipoxantina, água de injeção (Sanobiol), pH 7,4 e mantidas em estufa BOD a 25°C (R. P. P. Soares et al., 2002a)

Tabela 1. Cepas de *L. major* parentais e híbridas obtidas por seu cruzamento. Legenda: Fn, Friedlin; Sd, Seidman. Os retângulos indicam os híbridos selecionados para esse trabalho.

Line name	Day of hybrid recovery	HYG marker Chr 24	SAT marker Chr 27	Chr 14	Chr 34	Chr 35	Chr 36	Maxi circle	Ploidy
Fn/Sat	-	HYG-	SAT+	Fn	Fn	Fn	Fn	Fn	2n
Sd/Hyg	-	HYG+	SAT-	Sd	Sd	Sd	Sd	Sd	2n
FNSD1	6	HYG+	SAT+	H	H	Fn	H	Fn	2n
FNSD2	10	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Sd	2n
FNSD2	10	HYG+	SAT+	H	H	H	H	ND	2n
FNSD4	8	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Fn	2n
FNSD4	14	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Fn	2n
FNSD4	14	HYG+	SAT+	H	H	ND	H	Fn	2n
FNSD4L	14	HYG+	SAT+	H	H	ND	H	Fn	2n
FNSD5	10	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Fn	3n
FNSD6a	8	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Sd	2n
FNSD6b	8	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Fn	2n
FNSD6c	8	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Fn	3n
FNSD6d	12	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Sd	2n
FNSD6e	12	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Fn	2n
FNSD6f	12	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Fn	2n
FNSD7a	5	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Fn	3n
FNSD7d	6	HYG+	SAT+	Sd	H	H	H	Fn	3n
FNSD7e	15	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Sd	4n
FNSD7f	15	HYG+	SAT+	H	H	H	H	Fn	3n

H, hybrid; ND, not determined.
doi:10.1371/journal.pgen.1003672.t003

Fonte: Inbar et al., 2013.

3.2- Tipagem molecular

Para confirmar o status taxonômico das cepas utilizadas, foi utilizada a técnica de PCR-RFLP do gene *hsp70* (GARCIA et al., 2003). Foram utilizadas culturas de promastigotas de *Leishmania* com concentração de aproximadamente 1×10^7 parasitos/mL. Primeiramente as culturas foram centrifugadas (3000 rpm, 10 minutos, à temperatura ambiente), o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1 mL de PBS 1x estéril. Em seguida, os parasitos foram submetidos à extração do DNA genômico utilizando o Kit de extração de tecido e células GentraPuregene® (QIAGEN), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado no Nanodrop®. As amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 20 ng/μL. A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 μL utilizando 1,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP mix (New England), 5,0% DMSO (Invitrogen), 2,5 unidades de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen), 0,4 pmol de iniciador senso *Hsp70*for - 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA3' e 0,4 pmol de iniciador anti-senso *Hsp70*rev 5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC 3' (Garcia et al., 2004). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 μL, contendo 1 μL de *Hae*III (New England) (10 U/μL), 1,5 μL de tampão da enzima 10x e 12,5 μL de produto de PCR. A mistura então foi incubada a 37°C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 4% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR de cepas referência de *L.amazonenses* (IFLA/BR/67/PH8), *L.braziliensis*(MHOM/BR/75/M2903), *L.infantum* (MHOM/BR/74/PP75), *L.guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e *L. major* (FV1 – cedida pela Dra. Célia Gontijo).

3.3- Extração do LPG

As culturas de *Leishmania* em fase exponencial ($>1 \times 10^7$ parasitos/mL) foram utilizadas para a extração de LPG. Os parasitos foram lavados em PBS 1x e centrifugados a temperatura ambiente por 10 minutos à 3000 rpm. Para delipidação das amostras foram adicionados ao *pellet* 2,5 mL de solução de CHCl₃/MeOH (Clorofórmio/Metanol – 3:2 v/v) e 0,5 mL de MgCl₂ (Cloreto de Magnésio – 4 mM). O material foi sonificado e centrifugado em temperatura ambiente por 10 minutos à 3000

rpm, resultando em uma fase sólida intermediária, o sobrenadante foi descartado. Para esta primeira etapa o procedimento foi repetido duas vezes. Ao pellet de parasitos obtidos na etapa anterior foram adicionados 2,5mL de MgCl₂ a 4 mM. O material foi novamente sonificado e centrifugado sob as mesmas condições para promover a extração de proteínas. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido mais uma vez. Em seguida, na terceira etapa, foram adicionados á fase sólida 3,0mL de CHCl₃/MeOH/H₂O (Clorofórmio/Metanol/Água – 10:10:3 v/v) e 0,5mL de CHCl₃/MeOH (1:1 v/v), este último adicionado apenas na primeira centrifugação. O material foi sonificado e centrifugado sob as mesmas condições e assim o sobrenadante contendo GIPLs foi obtido e armazenado. O procedimento desta terceira etapa foi repetido por três vezes. Para extração do LPG, foi adicionado solução ESOAK (água/etanol/etil/éter/ piridina/NH₄OH – 15:15:5:1:0,017 v/v) ao sedimento resultante, foi sonificado e centrifugado (temperatura ambiente, 10 minutos, 3000 rpm). O procedimento foi repetido três vezes e o sobrenadante contendo LPG foi evaporado utilizando-se nitrogênio gasoso a 45°C (SOARES et al., 2002).

3.4- Purificação e dosagem do LPG

Para purificação, os extratos obtidos acima contendo LPG foram solubilizados em 1 mL de solução ácido acético/cloreto de sódio (NaCl) (0,1N/0,1N), sonificados e submetidos à cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando a resina fenil-sefarose. Aproximadamente 1 mL de resina foi aplicada em uma coluna Bio-Rad (#731-1550). A coluna foi lavada com 6 mL (1 mL por vez) de solução de ácido acético/NaCl (0,1N/0,1N), para o empacotamento da resina. Após a adição do último mL desta solução, o extrato contendo LPG foi adicionado. Em seguida, o material contido na resina fenil-sefarose foi lavado com solução de 1 mL de ácido acético/NaCl (0,1N/0,1N), 1 mL de ácido acético (0,1N) e 1 mL de água destilada. Posteriormente, foram utilizados 4 mL de solução ESOAK (água/etanol/etil éter/piridina/NH₄OH; 15:15:5:1:0,017 v/v) para eluir o LPG. A amostra purificada foi novamente evaporada em nitrogênio, e em seguida, solubilizada em 200 µL de água de injeção (Sanobiol) e armazenada a 4° C (Mahoney et al., 1999). Os LPGs obtidos foram dosados pelo método de fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956).

3.5- Caracterização Preliminar dos LPGs

3.5.1- Análise por *Western Blot*

Para análise pela técnica de *Western Blot*, foram avaliados os anticorpos WIC79.3 e Ca7AE, os LPGs das cepas avaliadas foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%).

As amostras foram submetidas à eletroforese com diferença de potencial constante de 150V. Em seguida, o material foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (45 µm) sob uma diferença de potencial, por 1 hora, utilizando o aparelho de transferência Trans-Blot® SD semi-drytransfercell. Após transferência, a membrana foi bloqueada por 1 hora em uma solução de caseína 5% e posteriormente incubada com o anticorpo primário específico durante o mesmo intervalo de tempo. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com solução de PBS 1x em intervalos de 5 minutos entre cada lavagem e, depois, incubada por 1 hora com o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1:10000) (Soares et al., 2002). Após a última etapa de lavagem, a membrana foi revelada com as soluções SuperSignal® West Pico Luminol e visualizada pelo equipamento ImageQuant™ LAS 4000.

3.5.2- Despolimerização e eletroforese de carboidratos (FACE – fluorophore-assisted-carbohydrat-electroforesis)

O LPG purificado foi despolimerizado após hidrólise ácida branda (HCl a 0,02N, 100°C, 5 min) para obtenção dos oligossacarídeos. Em seguida a amostra foi submetida à partição butanol-água (2:1 v/v) e centrifugada (1600g, 6min). A fase superior (butanólica) contendo a porção central e a âncora lipídica do LPG foi separada e armazenada em freezer à -20°C. A fração aquosa contendo as unidades repetitivas e o cap foi evaporada em “*speed-vac*” (COELHO-FINAMORE *et al.*, 2011). As unidades repetitivas foram tratadas com fosfatase alcalina para remoção dos grupos fosfato (MAHONEY *et al.*, 1999).

Em uma coluna Bio-Rad (-1550) foram adicionados 2mL da resina AG1-X8 de modo que o volume final após o empacotamento com metanol/água (1:1) fosse de 0,6

mL. Em seguida foram adicionados 2 mL de resina AG50W-X12 submetida ao mesmo procedimento. A amostra foi aplicada à essa coluna e o sal foi retido permitindo a eluição das unidades repetitiva neutras em 5 mL de água mili-Q. Essa solução foi evaporada em “*speed-vac*” (MAHONEY *et al.*, 1999).

Após a obtenção das unidades repetitivas neutras, foi necessária a derivatização destes carboidratos. Neste processo foi utilizado o 8-aminoftaleno-1,3,6-trissulfato (ANTS), componente capaz de atribuir cargas negativas à amostra e absorver luz ultravioleta o que facilita, respectivamente, a separação eletroforética e a visualização da amostra. A marcação dos carboidratos com tal componente leva a formação de aminas cuja estabilidade depende da participação de agentes redutores como o cianoborohidreto.

Para tanto, as unidades repetitivas e o padrão de oligossacarídeos (G1-G7) foram marcados com 1 μ L de solução de ANTS (0,05 M em 15% de ácido acético) e 1 μ L de solução de cianoborohidreto de sódio (0,05 M). As amostras foram solubilizadas e incubadas por 16 horas a 37 °C.

Após a incubação, foram adicionados às amostras 2 μ L de Tampão de amostra 2X (“thorin” a 0,01% em 20% de glicerol). O material foi então submetido à eletroforese de carboidrato sem tampão 1X (glicina a 0,192 M; Tris-HCl 0,025 M, pH 8.3) sob corrente elétrica constante de 20 mA para cada gel no sistema por aproximadamente 50-60 minutos (4°C). O gel foi visualizado sob luz UV (SOARES *et al.*, 2004).

3.5.3- Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO)

Para se avaliar o perfil pró-inflamatório dos LPGs das diferentes cepas, camundongos da linhagem C57BL/6 foram inoculados intraperitonealmente com 2 mL de solução de tioglicolato 3%. Após 72 horas, os animais foram submetidos à eutanásia e os macrófagos recuperados por lavagem da cavidade peritoneal utilizando meio RPMI gelado. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Alíquotas de 200 μ L foram colocadas em uma placa de 96 poços de forma que a concentração final fosse de $3,5 \times 10^5$ células/poço. A placa foi incubada por 1 hora à 37°C em 5% de CO₂ para adesão das células. Em seguida, o meio foi trocado por meio RPMI suplementado (10% SFB) para retirada das células não aderentes. As

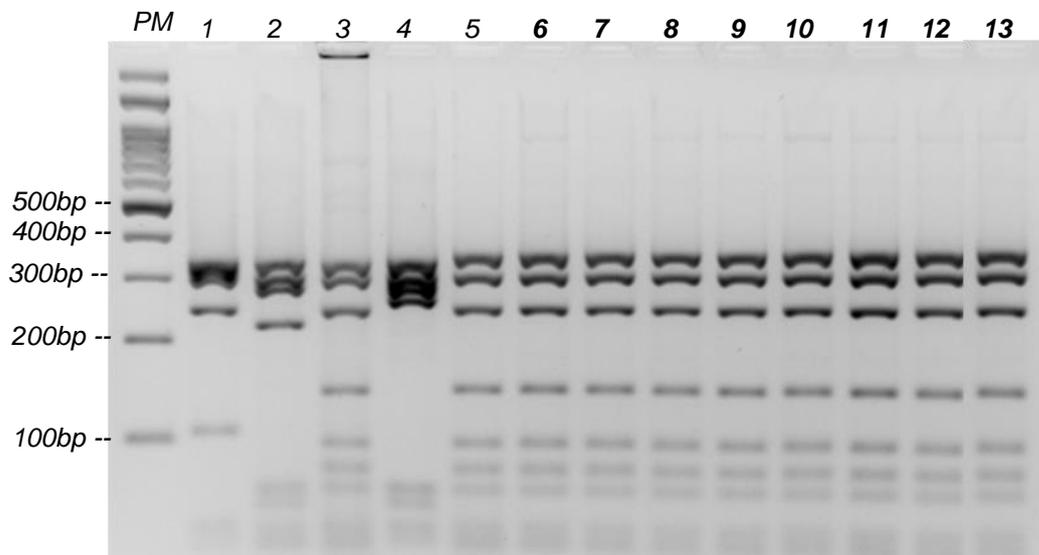
células foram primadas com IFN- γ (3UI/mL, 18 horas) e foram incubadas com os LPGs (10 μ g/mL) das 8 cepas estudadas e LPS (100ng/mL, controle positivo). O controle negativo foi representado pelo sobrenadante de macrófagos pré-incubados com IFN- γ . Cada amostra foi preparada em duplicata em dois experimentos independentes. A placa foi incubada à 37°C em 5% de CO₂ por um período de 48 horas. Foram utilizados 50 μ l do sobrenadante para dosagem de nitrito com inferência para produção de NO realizada pelo método de Griess (Griess Reagent System, 2009, absorvância de 490nm).

4-RESULTADOS

4.1- Tipagem molecular (PCR-RFLP do hsp70)

Após a tipagem molecular das cepas pela reação de PCR-RFLP do gene hsp70, os perfis de restrição das cepas parentais (canaletas 6 e 7) e dos híbridos (canaletas 8-13) foram idênticos aos de outra cepa de *L. major* (FV1) utilizada como controle e cedida pela Dra. Célia Gontijo. Os perfis foram completamente diferentes dos controles utilizados (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. infantum*) (Figura 6).

Figura 6: Perfil de restrição do fragmento do gene *hsp70* de diferentes espécies de *Leishmania*. M – marcador de peso molecular de 100bp; 1, *L. Amazonenses* (IFLA/BR/75/PH8); 2, *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/2903); 3, *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75); 4, *L. guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147); 5, *L. major* (FV1, controle MHOM/IL/80/Friedlin); 6, FV1 (parental); 7, Seidman (MHOM/SN/74/SD, parental); 8, híbrido FnSd1; 9, híbrido FnSd3; 10, híbrido FnSd4a; 11, híbrido FnSd4b; 12, híbrido FnSd4c e 13, híbrido FnSd6f.



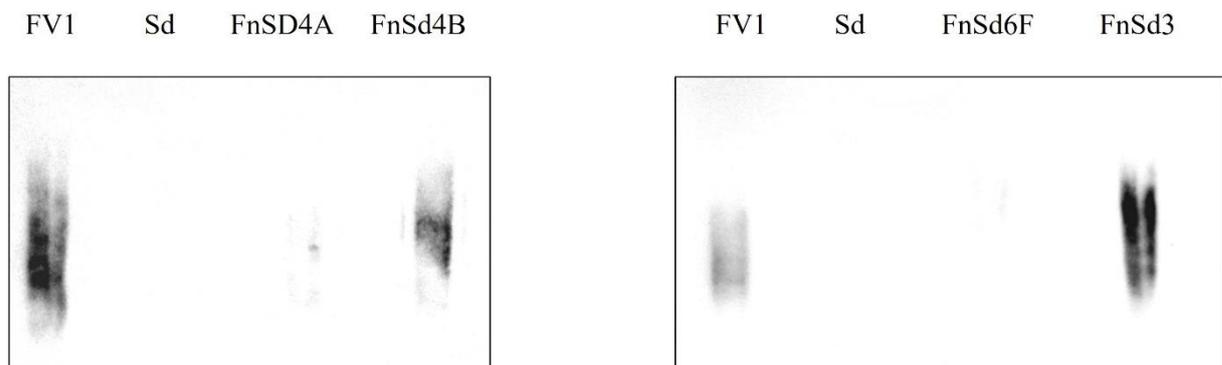
4.2- Análise por *Western Blot*

Para confirmar o sucesso da purificação e já ter uma ideia preliminar da estrutura, os LPG foram submetidos ao western-blot com diferentes anticorpos.

- WIC 79.3

Os LPGs purificados da cepa parental FV1 e das híbridas FnSd4A, FNSd4B e FnSd3 de *L. major* foram reconhecidos pelo anticorpo WIC 79.3, específico para Gal terminal (β 1,3) em diferentes níveis de galactosilação. Como já era esperado, este anticorpo reconheceu o LPG da cepa FV1 (controle). Este anticorpo também reconheceu os híbridos FnSd4B e FnSd3, porém reconheceu fracamente os LPGs das cepaFnSd4A e FnSd4F (Figura 7).

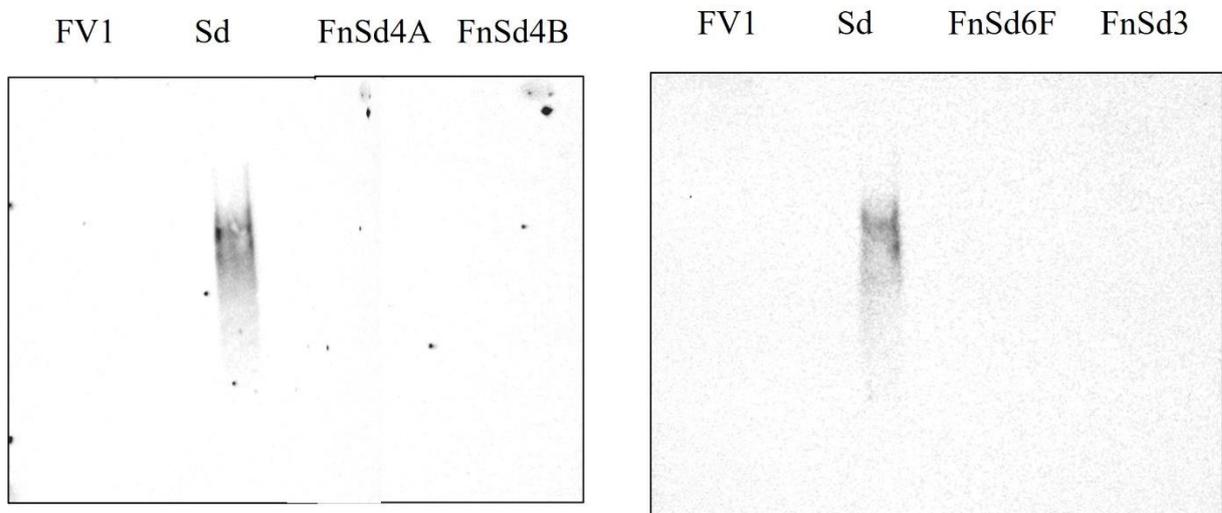
Figura 7: Reatividade dos LPGs (10 μ g) das cepas de *L. major* (FV1 e Sd) e híbridos (FnSd4A, FnSd4B, FnSd6F e FnSd3) ao anticorpo WIC 79.3 (1:1000).



- CA7AE

Somente o LPG da cepa parental Sd de *L. major* foi reconhecido pelo anticorpo CA7AE, que reconhece as unidades repetitivas de Gal(β 1,4)-Man(α 1)-PO₄ livres de cadeias laterais (Figura 8). Isto mostra que diferente da cepa FV1 que não possui unidades repetitivas livres, a cepa Sd possui estes epítomos livres para a ligação do anticorpo.

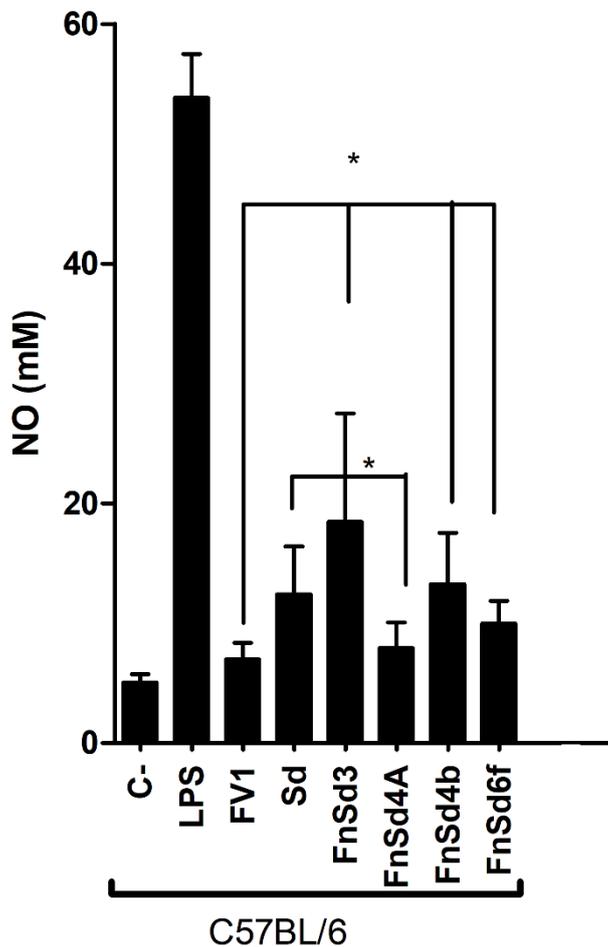
Figura 8: *Western Blot* de LPG purificado (10 μ g) das cepas de *L. major* (FV1 e Sd) e *L. major* híbridas (FnSd4A, FnSd4B, FnSd6F e FnSd3) em presença do anticorpo CA7AE (1:1000).



4.3- Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO)

Para avaliar funcionalmente os polimorfismos dos LPGs (parentais e híbridos), macrófagos murinos peritoneais das linhagens C57BL/6 foram estimulados. Os LPGs foram capazes de estimular diferencialmente a produção de óxido nítrico (NO). Os híbridos SD3, FnSd4B e FnSd6F estimularam uma maior produção de NO comparado ao Parental FV1 ($P < 0,05$). Por outro lado, os híbridos FnSd4A e FnSd4C estimularam uma produção menor que o parental SD ($P < 0,05$). Ao se observar a expressão de LPGs galactosilados (Figura 9), observa-se uma maior reatividade ao anticorpo WIC 79.3 nos híbridos Sd3 e FnSd4B e baixa no FnSd6F. Esses resultados sugerem que híbridos mais galactosilados induziriam uma maior produção de NO.

Gráfico 1: Produção de nitrito por macrófagos murinos expostos aos LPGs (10 µg/mL) das cepas parentais e híbridas. LPS foi utilizado como controles positivo. Asteriscos indicam diferença estatística ($P < 0.05$).



4.4- Análise do perfil eletroforético das unidades repetitivas (FACE)

A fim de se conhecer melhor a estrutura das unidades repetitivas, os LPGs foram hidrolisados e seus fragmentos purificados. Essas unidades foram marcadas e submetidas à eletroforese para visualização dos perfis de carboidratos. Para a identificação do número de açúcares foi utilizado um padrão de peso molecular de oligossacarídeos (G₂-G₅) cujas bandas indicam o perfil de migração de di a pentassacarídeo.

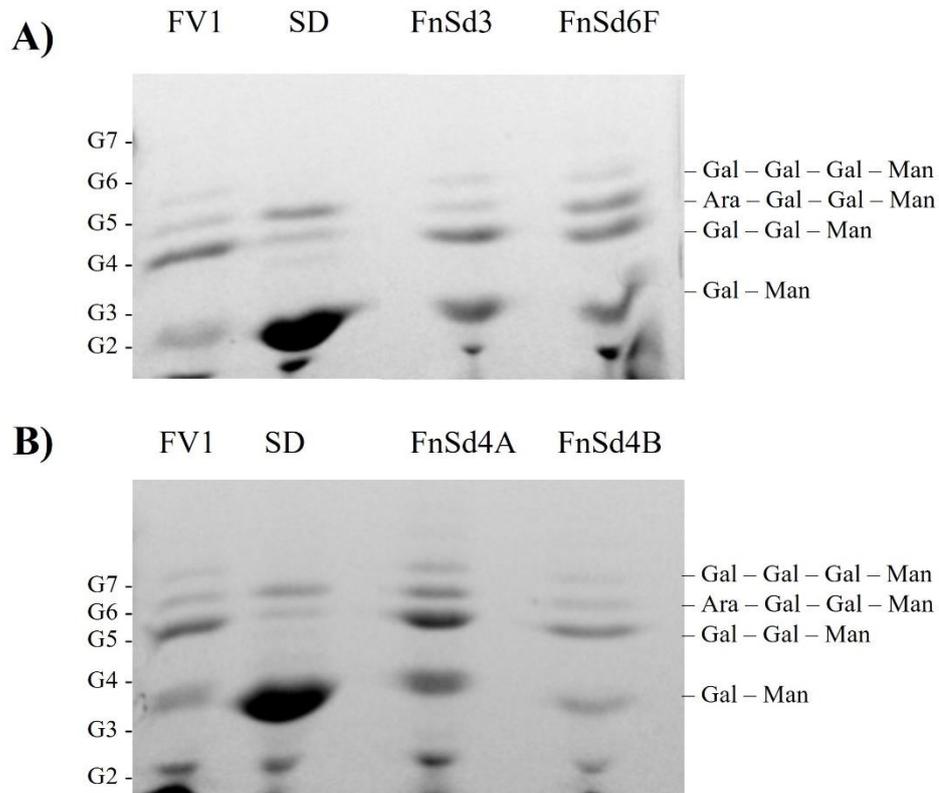
Desta forma foi possível identificar os perfis das unidades repetitivas das cepas do estudo, sendo que as cepas parentais apresentaram as seguintes características:

Perfil FV1- unidades repetitivas sem cadeias laterais que migraram na posição correspondente a um dissacarídeo (G2,); poucas unidades repetitivas com uma cadeia lateral que migraram na posição correspondente a um trissacarídeo (G3); unidades repetitivas ligadas a dois sacarídeos (G4); e poucas unidades repetitivas ligadas a três e quatro sacarídeos (G5 e G6, respectivamente).

Perfil SD- unidades repetitivas sem cadeias laterais que migraram na posição correspondente a um dissacarídeo (G2,); grande quantidade de unidades repetitivas com uma cadeia lateral que migraram na posição correspondente a um trissacarídeo (G3); poucas unidades repetitivas ligadas a dois sacarídeos (G4); e unidades repetitivas ligadas a três sacarídeos (G5).

Em relação ao perfil das cepas híbridas observamos que as cepas FnSd3, FnSd6F, FnSd4A e FnSd4B apresentaram perfil semelhante ao da cepa parental FV1 (Figura 8 A e B). Estes resultados confirmam os padrões de galactosilação observados nas cepas FnSD3, FnSd4B (Figura 5). A cepa FNSd6F embora seja muito galactosilada (banda G3), também é muito galactosilada (banda G4) e isso poderia justificar o seu não reconhecimento pelo anticorpo WIC 79.3. Entretanto, as cepas FnSd3, FnSd6F e FnSd4A apresentaram a banda em G2 mais intensa do que no parental FV1, sendo semelhante ao parental Sd. Isso indica fortemente que os híbridos possuem padrões de glicosilação das duas cepas parentais expressando ambos LPGs.

Figura 9: Perfil eletroforético das unidades repetitivas dos lipofosfoglicanos de *L. major* parentais e híbridos. (A): cepas FV1, Sd, FnSd3 e FnSd6F (B) FV1, Sd, FnSd4A e FnSd4B.). Legendas: Ara, arabinose; Gal, galactose. G2-G7, padrão de oligoglicoses.



5 – DISCUSSÃO

As trocas genéticas já foram registradas em vários tripanossomatídeos de relevância médica em humanos. Genótipos híbridos foram observados em moscas tsé-tsé durante a co-transmissão de duas cepas de *Trypanosoma brucei* (JENNI et al.,1983) e em células de mamíferos após coinfeção com dois clones de *Trypanosoma cruzi* diferindo em marcadores de resistência a medicamentos (GAUNT et al.,2003). Utilizando também a técnica de marcadores de resistência à medicamentos, Capul e colaboradores em 2007 demonstraram experimentalmente evidências de troca genética em *L. major* Mesmo não sendo altamente frequente as trocas genéticas já foram evidenciadas experimentalmente ou naturalmente em vários outros isolados de *Leishmania* de diferentes espécies (KELLY et at, 1991, DU JARDIM et at., 1995, RAVEL et al. 2006). Mais recentemente o grupo do Dr. David Sacks obteve com sucesso in vivo cepas híbridas de *L.major*, que foram utilizadas nesse estudo (AKOPYANTS et al., 2009).

Com base nos dados obtidos através da tipagem molecular do gene *hsp70* (GARCIA et al., 2003), confirmamos que todas as cepas recebidas para o estudo eram *L.major*, pois apresentavam perfil de restrição semelhantes à cepa referência utilizada em estudos anteriores por nosso grupo.

O Western Blot é uma técnica amplamente utilizada na análise de glicoconjugados em *Leishmania*. Em 2002 Soares e colaboradores utilizou a técnica com LPGs de *L. infantum*, utilizando o anticorpo CA7AE foi possível reconhecer as ligações Galactose-Manose livres de cadeias laterais, o mesmo observa-se nos trabalhos de Coelho-Finamore e Soares et al. 2005 para *L. braziliensis*. Para *L. major* os trabalhos de Wu et al.,2015., e Guimaraes et al., 2018., também utilizaram a técnica, por sua vez com o anticorpo WIC 79.3 para caracterizar os LPGs galactosilados das cepas utilizadas nesses estudos.

Em nosso trabalho podemos analisar que o anticorpo WIC 79.3 foi melhor na caracterização dos híbridos do que o CA7AE. Tal Fato nos indica que o LPG da cepa parental Friedlin tem maior expressão nas cepas híbridas do que Seidman.

Sabe-se que os LPGs de major são agonistas de TLR2 (DE VEER 2003, BECKER 2003). Nesse trabalho testamos pela primeira vez os LPGs de híbridos de *L. major* em macrófagos. Vimos que as cepas híbridas FnSD3, FnSd4B e FnSD6F estimularam a maior produção de óxido nítrico. Então funcionalmente parece que os LPGs mais galactosilados oriundos do parental FV1 são mais pró-inflamatórios.

A técnica da eletroforese de carboidratos tem sido empregada com sucesso no estudo do LPG de várias espécies de *Leishmania* incluindo *L. infantum* (SOARES et al. 2002), *L. tropica* (SOARES et al 2004), *L. braziliensis* (SOARES et al. 2005) e *L. amazonensis* (NOGUEIRA et al., 2017).

Finalmente, ao se analisar a estrutura das unidades repetitivas, confirmamos que houve hibridização em que os LPGs galactosilados parecem ser mais expressos, porém as unidades repetitivas na posição G2, indicam também a expressão de LPGs sem cadeias laterais do parental Sd.

Com base nos dados apresentados, observou-se que os híbridos possuem uma expressão mista de LPGs e que os híbridos exibindo maior galactosilação foram mais pró-inflamatórios.

Em conclusão, os eventos de hibridização genéticos também refletiram na expressão de glicoconjugados. Sendo estas moléculas fatores de virulência multifuncionais tanto com papel no vetor quanto no hospedeiro vertebrado (ASSIS et al., 2021), isto poderia resultar em diferentes padrões de virulência pelos parasitos. Estes eventos favoreceriam a adaptação dos parasitos aos seus diferentes hospedeiros e resultando também na ativação de eventos imunopatológicos durante a infecção.

6. CONCLUSÕES

- A hibridização resultou numa expressão mais galactosilada resultante do parental FV1;
- Estes LPGs mais galactosilados apresentaram maior reatividade ao anticorpo WIC 79.3 e ativaram maior produção de NO pelos macrófagos.

7- REFERÊNCIAS

- AKOPYANTS, N. S. et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. **Science**, v. 324, n. 5924, p. 265-268, 2009. doi: 10.1126/science.1169464..
- COELHO-FINAMORE, J. M. et al. *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. **Int J Parasitol.**, v. 41, n. 3-4, p. 333-342, 2011. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.10.004.
- DE ASSIS, R. R. et al. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochim Biophys Acta**, v. 1820, n. 9, p. 1354-1365, 2012. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.11.001., 2012a.
- DE ASSIS, R. R. et al. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1820, n. 9, p. 1354–1365, 2012b.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.004.
- DOBSON, D. E. et al. Identification of genes encoding arabinosyltransferases (SCA) mediating developmental modifications of lipophosphoglycan required for sand fly transmission of *Leishmania major*. **J Biol Chem.**, v. 278, n. 31, p. 28840-28848, 2003. doi: 10.1074/jbc.M302728200.
- GUIMARÃES, A. C. et al. Lower galactosylation levels of the lipophosphoglycan from *Leishmania (Leishmania) major*-like strains affect interaction with *Phlebotomus papatasi* and *Lutzomyia longipalpis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, e170333, 2018
- ILG, T. et al. Structure of *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 10, p. 6834–6840, 1992.
- INBAR, E. et al. The Mating Competence of Geographically Diverse *Leishmania major* Strains in Their Natural and Unnatural Sand Fly Vectors **PLoS Genet.**, v. 9, n. 7, e1003672, 2013. doi: 10.1371/journal.pgen.1003672.
- JENNI, L. et al. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. **Nature**, v. 322, n. 6075, p. 173-175. doi: 10.1038/322173a0.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol.**, v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011. doi: 10.1038/nrmicro2608.

- MCCONVILLE, M. J. et al. Structure of Leishmania lipophosphoglycan: Inter- and intra-specific polymorphism in Old World species. **Biochemical Journal**, v. 310, n. 3, p. 807–818, 1995.
- NOGUEIRA, P. M. et al. Lipophosphoglycan polymorphisms do not affect Leishmania amazonensis development in the permissive vectors Lutzomyia migonei and Lutzomyia longipalpis. **Parasit Vectors**, v. 10, n. 1, p. 608, 2017
- PARANAÍBA, L. F. et al. Leishmania enriettii: Biochemical characterisation of lipophosphoglycans (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPLs) and infectivity to Cavia porcellus. **Parasites Vectors**, v. 8, 31, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0633-8>
- PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008. doi: 10.1126/science.1159194
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol.**, v. 55, p. 453-483, 2001. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.453.
- SACKS, D. L. et al. Stage-specific binding of leishmania donovani to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 2, p. 685–697, 1995.
- SCHWEIZER, J.; TAIT, A.; JENNI, L. The timing and frequency of hybrid formation in African trypanosomes during cyclical transmission. **Parasitology research**, v. 75, n. 2, p. 98-101, 1988.
- SOARES, Rodrigo Pedro Pinto et al. Differential Midgut Attachment of Leishmania (Viannia) braziliensis in the Sand Flies Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani and Lutzomyia (Nyssomyia) intermédia. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, p. 1-7, 2010.
- SOARES, R. P. P. et al. Leishmania chagasi: Lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector Lutzomyia longipalpis. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 121, n. 2, p. 213-224, 2002. doi: 10.1016/s0166-6851(02)00033-6., 2002a.
- SOARES, R. P. P. et al. Leishmania chagasi: Lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector Lutzomyia longipalpis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 121, n. 2, p. 213–224, 2002b.
- SOARES, R. P. P. et al. Leishmania tropica: Intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different Phlebotomus species. **Experimental Parasitology**, v. 107, n. 1–2, p. 105–114, 2004.

SOARES, R. P. P. et al. Leishmania braziliensis: A novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 3, p. 245–253, 2005.

VIEIRA, T. DA S. et al. Intraspecies polymorphisms in the lipophosphoglycan of L. braziliensis differentially modulate macrophage activation via TLR4. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 1–9, 2019.

8- ANEXOS

- Termo de aceite para publicação do artigo.

Confirmation of submission: Manuscript ID CBIN.20211588 - Cell Biology International

21 de nov. de 2021 09:11 (há 2 dias)

Alpina Rawat <ombelalfo@manuscriptcentral.com>
 para: rodrigosoares28_min, pauliamn.bio, dsacks

21-Nov-2021

Dear Dr. Soares:

Your manuscript entitled "Effect of Hybridization on Lipophosphoglycan Expression in Leishmania major" by Silveira, Karine, Nogueira, Paula, Sacks, David, Soares, Rodrigo, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Cell Biology International.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is CBIN.20211588.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/cbin> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/cbin>.

Thank you for submitting your manuscript to Cell Biology International.

Sincerely,

Cell Biology International Editorial Office

[automatic email - ref: SE-6-a]