

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

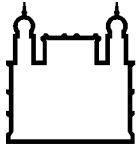
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

Papel biológico da tripanotona redutase na virulência de
Leishmania infantum

MYSLENE SOARES DA FONSECA

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e
Molecular

RIO DE JANEIRO
2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Myslene Soares da Fonseca

**PAPEL BIOLÓGICO DA TRIPANOTIONA REDUTASE NA VIRULÊNCIA DE
*LEISHMANIA INFANTUM***

Orientador: Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

RIO DE JANEIRO
2021

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT/ FIOCRUZ – RJ

Soares da Fonseca, Myslène.

Papel biológico da tripanotona redutase na virulência de *Leishmania infantum* / Myslène Soares da Fonseca. - Rio de Janeiro, 2021.

86 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: Elmo Eduardo de Almeida Amaral.

Bibliografia: f. 62-66

1. leishmaniose. 2. leishmania. 3. tripanotona redutase. 4. superexpressão. 5. virulência. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.

MYSLENE SOARES DA FONSECA

Papel biológico da tripanotona redutase na virulência de *Leishmania infantum*

**Orientador:
Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral**

Aprovada em: 30/04/2021

EXAMINADORES:

Dra. Ana Carolina Ramos Guimarães
FIOCRUZ

Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra
UERJ

Dra. Mariana Côrtes Boité
FIOCRUZ

SUPLENTE:

Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva
Dra. Tânia Zaverucha do Valle

Rio de Janeiro
2021

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a orientação do Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral.

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares,
orientador e amigos do
laboratório.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por estar sempre abençoando a mim e a minha família, sempre olhando por nós e nos protegendo.

Aos meus pais, Robson e Marta, por todo apoio e incentivo durante toda a minha vida. Obrigada por todo amor e carinho, que eu sempre recebi, e que foi demonstrado de diversas formas. Eu amo vocês, de todo o meu coração. Eu sou muito grata a vocês por tudo. Agradeço a Deus por ter me dado pais tão maravilhosos.

Ao meu irmão Michel, por me incentivar a fazer faculdade de Farmácia junto com ele e no final das contas, me deixar fazer a matrícula sozinha hahaha. Apesar de tudo, foi através desse curso que descobri o meu amor pela pesquisa e pela ciência. Então, muito obrigada irmão, também te amo.

À minha cunhada Dani, por estar sempre com a gente em todos os momentos, e por ser a parte cômica da família. Obrigada por tudo Dani, sou muito grata a Deus por ter você na nossa família.

Ao Rodrigo, por todo carinho e apoio que tem me dado. Muito obrigada por estar sempre comigo. Também agradeço a Deus por ter te colocado na minha vida.

A todos os meus familiares, por todo o apoio. Sou extremamente feliz por ter uma família tão unida e que está sempre pronta para ajudar em qualquer circunstância.

Ao meu orientador, Dr. Elmo. Muito obrigada pela oportunidade de entrar no laboratório. Sou muito grata por todos os ensinamentos, paciência, confiança e puxões de orelha. O senhor me ajudou muito no meu desenvolvimento e a minha admiração pelo senhor cresce cada vez mais.

Ao Jobim, Jôber, Jobinho, Job Inácio. Muito obrigada por tudo, por me entrevistar lá em 2014 para entrar no laboratório como IC, mesmo eu apresentando um currículo de técnico em informática hahaha. Também te agradeço muito pelos ensinamentos Jobinho, por toda paciência comigo e por estar sempre me ajudando em todos os momentos. Eu aprendi muito com você e sou muito grata.

Ao Clã do Elmo (Luiza, Gabizinha, Taiana, Nathy, Yago, Gabizona, Jobinho, aos antigos e novos membros), sou muito feliz por estar em um grupo tão unido. Vocês são como uma segunda família para mim e eu me diverti muito com vocês

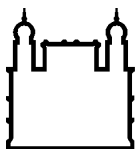
durante todos esses anos. Muito obrigada por todas as paródias que vocês fizeram, principalmente a Lu hahaha, e muito obrigada por todo o apoio.

Aos membros do LBqT, também agradeço por todo apoio. Sou muito grata por ter trabalhado em um ambiente tão agradável e com pessoas tão acolhedoras.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Aos órgãos financiadores do projeto: CAPES, CNPq e FAPERJ.

Aos membros da banca avaliadora.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

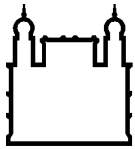
Papel biológico da tripanotiona redutase na virulência de *Leishmania infantum* **Dissertação de mestrado**

Myslene Soares da Fonseca

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada causada por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. Parte do ciclo biológico da *Leishmania* ocorre no interior dos vacúolos parasitóforos das células mononucleadas de defesa do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado. No interior desses vacúolos, os parasitos sobrevivem ao estresse oxidativo devido a um eficiente sistema de controle do balanço redox baseado principalmente na função da tripanotiona redutase (TR). Além do papel da TR no controle do balanço redox, estudos anteriores já demonstraram a importância desta enzima em processos relacionados a viabilidade celular e virulência em tripanossomatídeos. Porém, o papel da TR na virulência de espécies do Novo Mundo ainda não foi estudado. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar o papel da TR de *L. infantum* na virulência, comparando a atividade desta enzima com uma espécie de *Leishmania* não virulenta ao mamífero, *L. tarentolae*. Inicialmente, avaliamos a atividade da TR, através do método de Ellman, em parasitos patogênicos e não patogênicos a mamíferos, *L. infantum* e *L. tarentolae*, respectivamente. Nossos resultados revelaram que a atividade enzimática da TR de *L. infantum* foi superior a de *L. tarentolae*. Também, observamos diferenças nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos da TR de *L. infantum* e *L. tarentolae*. Adicionalmente, construímos um modelo tridimensional da TR de *L. tarentolae* por modelagem comparativa. Este modelo foi comparado com a estrutura cristalizada da TR de *L. infantum*, onde observou-se que as estruturas são altamente conservadas e possuem diferenças na superfície eletrostática, principalmente no sítio catalítico. Além disso, também foram observadas diferenças nas interações intermoleculares entre a tripanotiona redutase e a tripanotiona reduzida tanto de *L. infantum* quanto de *L. tarentolae*. Para avaliar o papel da TR na infectividade de *L. infantum*, realizamos a superexpressão dessa enzima através da transfecção dos parasitos de *L. infantum* com o vetor recombinante construído (pSP72 α NEO α + TR de *L. infantum*). A superexpressão foi caracterizada através do método de Ellman, onde foi constatado um aumento significativo da atividade da TR das promastigotas de *L. infantum* que superexpressam a TR em relação às promastigotas selvagens. Em seguida, analisamos a infectividade da cepa de *L. infantum* mutante e verificamos que os parasitos de *L. infantum* que superexpressam a TR tiveram um aumento significativo no índice de infecção em macrófagos murinos nos tempos de 24 e 48 horas quando comparados aos parasitos selvagens. A população de promastigotas metacíclicas e a atividade da TR dos parasitos metacíclicos da cepa mutante foi avaliada. Os parasitos de *L. infantum* que superexpressam a TR obtiveram um aumento da

população de promastigotas metacíclicas em relação aos parasitos selvagens. Ademais, os parasitos metacíclicos que superexpressam a TR mantiveram o aumento da atividade enzimática. Também expressamos a TR de *L. infantum* em *L. tarentolae*, onde constatou-se que os parasitos de *L. tarentolae* que expressam a TR de *L. infantum* tiveram um aumento significativo da atividade da TR. Por fim, a infectividade desses parasitos foi analisada e verificou-se um aumento no índice de infecção em macrófagos murinos em 24 horas em relação aos parasitos selvagens. Estes dados revelam que a enzima tripanotiona redutase, além de controlar o balanço redox em tripanossomatídeos, também pode ter um papel relevante na infectividade de *Leishmania*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

BIOLOGICAL ROLE OF TRYpanOTHIONE REDUCTASE IN *LEISHMANIA* *INFANTUM* VIRULENCE

MASTER'S DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Myslene Soares da Fonseca

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected tropical diseases caused by protozoan parasites of the *Leishmania* genus. Part of the *Leishmania*'s biological cycle occurs inside the parasitophorous vacuoles of the mononucleated cells of the vertebrate host's immune system. Inside these vacuoles, the parasites survive the oxidative stress due to an efficient redox balance control system, based mainly on the trypanothione reductase (TR) function. In addition to the role of TR in controlling the redox balance, previous studies have demonstrated the significance of this enzyme in processes related to cell viability and virulence in trypanosomatids. However, the role of TR in the virulence of New World *Leishmania* species have not yet been studied. In this context, the aim of this work was to investigate the role of *L. infantum* TR in virulence, comparing the activity of this enzyme with a species of mammal non-virulent *Leishmania*, *L. tarentolae*. We evaluated the activity of TR through Ellman's method in mammal's pathogenic and non-pathogenic parasites, *L. infantum* and *L. tarentolae*, respectively. Our results demonstrated that the TR activity observed in *L. infantum* was higher than observed in *L. tarentolae*. Furthermore, we observed differences in the nucleotide and amino acid sequences of the TR of *L. infantum* and *L. tarentolae*. Additionally, a three-dimensional model of the *L. tarentolae* TR has been constructed using comparative modeling. The *L. tarentolae* TR model was compared with a 3D structure of the *L. infantum* TR, where it was observed that the structures are highly conserved. However, differences in the electrostatic surface, mainly in the catalytic site were observed. In addition, differences in intermolecular interactions between trypanothione reductase and reduced trypanothione of both *L. infantum* and *L. tarentolae* were observed. In order to assess the role of TR in the infectivity of *L. infantum*, we overexpressed this enzyme by transfecting the parasites of *L. infantum* with the recombinant vector (pSP72 α NEO α + TR of *L. infantum*). The overexpression was confirmed using the Ellman's method, where it was verified a significant increase in the TR activity of *L. infantum* parasites that overexpress the TR in relation to wild-type parasites. Next, we analyzed the infectivity of *L. infantum* mutant strain, demonstrating that these parasites had a significative increase in the infection index in murine macrophages by 24 and 48 hours when compared with wild-type parasite strains. The metacyclic promastigote population and the TR activity of metacyclic parasites were evaluated. The *L. infantum* parasites that overexpress the TR obtained an increase in the population of metacyclic promastigotes in comparison to wild-type parasite strains. Additionally, metacyclic parasites that overexpress TR

maintained an increase in enzyme activity. We also expressed the TR of *L. infantum* in *L. tarentolae*, where it was noted that *L. tarentolae* parasites express the *L. infantum* TR, having a significant increase in TR activity. Lastly, the infectivity of these parasites was analyzed and there was an increase in the infection index in murine macrophages by 24 hours in comparison to wild-type parasite strains. These data reveal that the trypanothione reductase enzyme, that is responsible to the redox balance in trypanosomatids, may also be important in *Leishmania* infectivity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Doenças Tropicais Negligenciadas.....	1
1.2	Leishmanioses.....	2
1.2.1	Vetores da leishmaniose.....	4
1.2.2	Agente etiológico.....	5
1.2.3	Ciclo biológico.....	9
1.2.4	Manifestações clínicas da leishmaniose.....	12
1.2.4.1	Leishmaniose cutânea localizada.....	12
1.2.4.2	Leishmaniose recidiva cútis.....	13
1.2.4.3	Leishmaniose cutânea disseminada.....	13
1.2.4.4	Leishmaniose mucocutânea.....	14
1.2.4.5	Leishmaniose cutâneo-difusa.....	15
1.2.4.6	Leishmaniose dérmica pós-calazar.....	15
1.2.4.7	Leishmaniose visceral.....	16
1.2.5	Tripanotona redutase.....	18
2	OBJETIVOS/METAS.....	22
2.1	Objetivo geral.....	22
2.2	Objetivos específicos.....	22
3	METODOLOGIA.....	23
3.1	Considerações éticas.....	23
3.2	Manutenção do parasito.....	23
3.3	Modelagem comparativa e análise estrutural.....	23
3.4	Reação em cadeia da polimerase.....	24
3.5	Construção molecular de insertos para expressão das enzimas em estudo.....	24
3.6	Sequenciamento.....	25
3.7	Alinhamento das sequências nucleotídicas e de aminoácidos.....	25
3.8	Geração de linhagens geneticamente modificadas.....	25

3.9	Preparo da fração solúvel e atividade da enzima tripanotiona redutase	26
3.10	Comparação da infectividade dos parasitos selvagens e mutantes	26
3.11	Avaliação da metaciclogênese de parasitos selvagens e mutantes	27
4	Resultados	28
4.1	Atividade da tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i>	28
4.2	Alinhamento do gene da tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i>	29
4.3	Alinhamento das sequências de aminoácidos da tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i>	30
4.4	Análise comparativa da estrutura 3D da tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i>	32
4.5	Análise comparativa da superfície eletrostática da tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i>	34
4.6	Comparação entre o mapa de interação intermolecular entre a tripanotiona e tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i>	38
4.7	Amplificação do gene tripanotiona redutase	40
4.8	Construção molecular de insertos para expressão das enzimas em estudo	40
4.9	Clonagem do gene tripanotiona redutase	41
4.10	Sequenciamento da tripanotiona redutase	42
4.11	Geração de linhagens geneticamente modificadas	44
4.12	Atividade da enzima tripanotiona redutase em parasitos selvagens e mutantes	45
4.13	Avaliação do papel da tripanotiona redutase na infectividade <i>in vitro</i>	45
4.14	Avaliação da metaciclogênese de parasitos selvagens e mutantes de <i>Leishmania infantum</i> e atividade da TR	47
4.15	Geração de linhagens geneticamente modificadas	48
4.16	Atividade da enzima tripanotiona redutase em parasitos selvagens e mutantes	49
4.17	Avaliação do papel da tripanotiona redutase na infectividade <i>in vitro</i>	50

4.18	Amplificação do gene tripanotona redutase de <i>Leishmania tarentolae</i>	50
4.19	Construção molecular de insertos para expressão das enzimas em estudo	51
5	DISCUSSÃO.....	53
6	Considerações finais.....	61
7	Referências bibliográficas.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da leishmaniose cutânea ao redor do mundo.....	2
Figura 2 - Distribuição da leishmaniose visceral ao redor do mundo.	2
Figura 3 - Casos de leishmaniose visceral no Brasil e Américas, 2001-2017.	3
Figura 4 - Fêmea de flebotomíneo <i>Lutzomyia longipalpis</i>	4
Figura 5 - Taxonomia da família Trypanosomatidae.	6
Figura 6 - Morfologia das formas evolutivas de <i>Leishmania</i>	7
Figura 7 - Desenho esquemático de formas promastigotas procíclicas, nectonomas, leptomonas e metacíclicas.	8
Figura 8 - Representação do intestino de um flebotomíneo.	9
Figura 9 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	10
Figura 9.1 - Ciclo biológico sugerido de <i>Leishmania tarentolae</i>	11
Figura 10 - Leishmaniose cutânea localizada.	12
Figura 11 - Leishmaniose recidiva cútis.	13
Figura 12 - Leishmaniose cutânea disseminada.	14
Figura 13 - Leishmaniose mucocutânea.	14
Figura 14 - Leishmaniose cutâneo-difusa.	15
Figura 15 - Leishmaniose dérmica pós-calazar.	16
Figura 16 - Leishmaniose visceral.	16
Figura 17 - Representação esquemática do processo de fagocitose.	19
Figura 18 - Estrutura tridimensional da tripanotiona redutase.	20
Figura 19 - Reação da tripanotiona redutase.	20
Figura 20 - Atividade da TR em <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i> :	28
Figura 21 - Alinhamento da tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i>	30
Figura 22 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i>	31
Figura 23 - Análise comparativa da estrutura 3D da tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i>	33
Figura 24 - Superfície de potencial eletrostático da tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i>	35
Figura 25 - Superfície de potencial eletrostático da tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i>	36
Figura 26 - Alinhamento sequencial entre a tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i> colorido de acordo com o potencial eletrostático.	37

Figura 27 - Comparação entre o mapa de interação intermolecular entre a tripanotiona e tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania tarentolae</i> .	39
Figura 28 - Eletroforese dos produtos de amplificação em gel de agarose (1%).	40
Figura 29 - Eletroforese dos fragmentos de DNA gerados.	41
Figura 30 - Produtos de digestão dos clones obtidos a partir de eletroforese em gel de agarose 1%.	42
Figura 31 - Sequenciamento da tripanotiona redutase de <i>Leishmania infantum</i> .	43
Figura 32 - Confirmação da inserção do vetor recombinante em <i>Leishmania infantum</i> .	44
Figura 33 - Atividade da TR em promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> selvagens e mutantes.	45
Figura 34 - Avaliação do efeito da superexpressão da TR na infectividade de <i>Leishmania infantum</i> .	46
Figura 35 - Metaciclogênese de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> selvagens e mutantes.	48
Figura 36 - Atividade da TR em promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> selvagens e mutantes metacíclicas.	48
Figura 37 - Confirmação da inserção do vetor recombinante em <i>Leishmania tarentolae</i> .	49
Figura 38 - Atividade da TR em promastigotas de <i>Leishmania tarentolae</i> selvagens e mutantes.	49
Figura 39 - Avaliação do papel da TR de <i>Leishmania infantum</i> na infectividade de <i>Leishmania tarentolae</i> .	50
Figura 40 - Eletroforese dos produtos de amplificação em gel de agarose (1%).	51
Figura 41 - Eletroforese dos fragmentos de DNA gerados.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas das principais espécies de <i>Leishmania</i>	17
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2TNB ⁻	2-nitro-5-ácido tiobenzóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPE	<i>Discrete optimized protein energy</i>
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GR	Glutaciona redutase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IBICT	Instituto Brasileiro de Informação em Ciencia e Tecnologia
IF	Índice de infecção
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose cutânea disseminada
LDPC	Leishmaniose dérmica pós-calazar
LM	Leishmaniose mucocutânea
LRC	Leishmaniose recidiva cútis
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
T(S) ₂	Tripanotiona oxidada
T(SH) ₂	Tripanotiona reduzida
TR	Tripanotiona redutase

VTFM

Variable target function method

WHO

World Health Organization

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças que não recebem apoio de indústrias farmacêuticas em relação à pesquisa e desenvolvimento de estratégias para o controle, prevenção e tratamento. Esse fato se justifica pelo baixo potencial de retorno lucrativo para a indústria farmacêutica, pois as DTNs acometem a população de baixa renda que reside, em grande parte, nos países em desenvolvimento (MACKEY *et al.*, 2014; TROUILLER *et al.*, 2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, há 20 doenças tropicais negligenciadas: dengue, raiva, tracoma, úlcera de buruli, treponematoses endêmicas, hanseníase, doença de Chagas, tripanossomíase humana africana, leishmanioses, teníase/cisticercose, dracunculíase, equinococose, trematodíases de origem alimentar, filariose linfática, oncocercose, esquistossomose, helmintíases transmitidas pelo solo, escabiose, envenenamento por picada de cobra, além de micetoma, cromoblastomicose e outras micoses profundas. As DTNs são compostas principalmente por infecções causadas por vírus, protozoários, helmintos e bactérias (MACKEY *et al.*, 2014; WHO, c2021a).

As DTNs prevalecem em 149 países em condições tropicais e subtropicais, afetando mais de um bilhão de pessoas e custando anualmente, bilhões de dólares às economias dos países em desenvolvimento. As pessoas mais afetadas vivem em condições de extrema pobreza, sem saneamento básico adequado e próximas a vetores destas doenças, animais domésticos e gado (OPAS, 2019a).

A Organização Mundial da Saúde coordena e apoia estratégias para ajudar na prevenção, controle, eliminação e erradicação de doenças tropicais negligenciadas. Dentre essas estratégias está um roteiro para doenças tropicais negligenciadas intitulado “*Acabando com a negligência para atingir os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável: Um roteiro para doenças tropicais negligenciadas 2021–2030*”, que tem como objetivo fortalecer a resposta programática às doenças tropicais negligenciadas através de objetivos compartilhados e metas específicas de doenças apoiadas por investimentos mais inteligentes. Os alvos abrangentes desse roteiro são: reduzir em 90% a porcentagem de pessoas que requerem intervenções contra doenças tropicais negligenciadas, redução percentual de 75% em anos de vida ajustados por incapacidade relacionada a doenças tropicais negligenciadas,

eliminar pelo menos 1 doença tropical negligenciada em 100 países e erradicar 2 doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2020a).

1.2 Leishmanioses

As leishmanioses estão classificadas no grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas e afetam as pessoas que vivem em condições de extrema pobreza. É uma doença que está relacionada com o deslocamento da população, desnutrição, moradias precárias, sistema imunológico debilitado e ausência de recursos financeiros (WHO, 2020b).

As leishmanioses estão distribuídas em 98 países ou territórios (Figura 1 e 2), onde 350 milhões de pessoas vivem em local de risco de infecção. É responsável por aproximadamente 1,6 milhão de novos casos por ano, podendo levar a aproximadamente 30 mil óbitos (OPAS, 2017, WHO, c2021b).

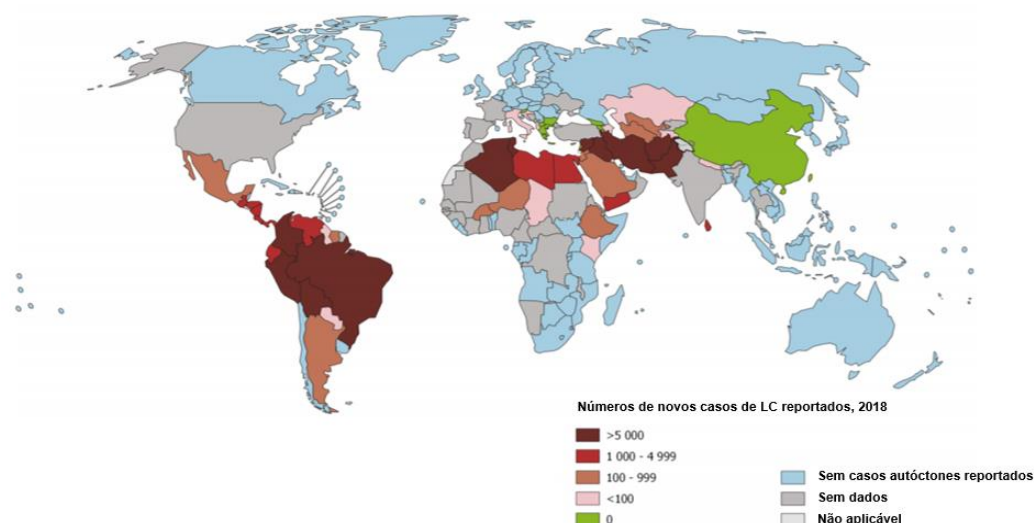


Figura 2 - Distribuição da leishmaniose cutânea ao redor do mundo. Fonte: Adaptado de WHO (2018).

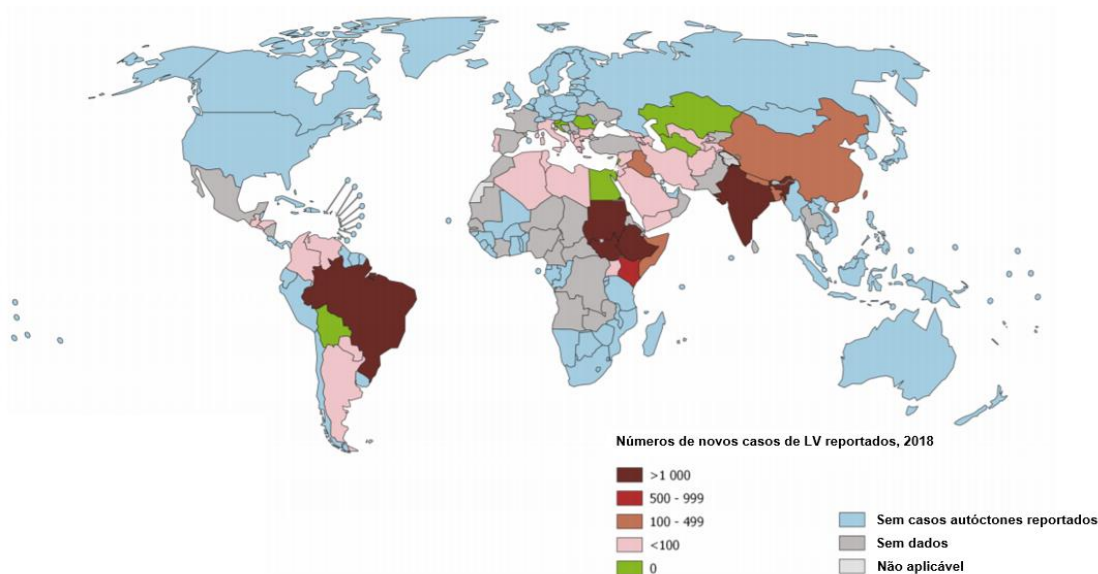


Figura 1 - Distribuição da leishmaniose visceral ao redor do mundo. Fonte: Adaptado de WHO (2018).

É uma doença que possui ampla distribuição pelo mundo e é causada por espécies de protozoários parasitos intracelulares da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania* (PACE, 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde, a leishmaniose possui uma diversidade de manifestações clínicas que podem ser divididas em 2 formas principais da doença. A leishmaniose tegumentar ou cutânea, manifestação clínica mais comum da doença, é caracterizada pela presença de lesões que acometem a pele e as mucosas. A leishmaniose visceral ou calazar, manifestação clínica mais grave, afeta órgãos internos como baço, fígado e medula óssea, podendo ser fatal se não tratada ou se não houver diagnóstico adequado (PACE, 2014; WHO, 2020b).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, em 2019, mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral foram relatados em 8 países: Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Além disso, 12 países reportaram mais de 5000 casos de leishmaniose tegumentar: Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Iraque, Líbia, Marrocos, Paquistão, Peru, República Árabe Síria e Tunísia (WHO, c2021b).

Os dados epidemiológicos das leishmanioses no Brasil são alarmantes. A leishmaniose tegumentar é endêmica em 1488 municípios com 97 milhões de pessoas em risco de infecção e, dentre os países da América do Sul, o Brasil relata o maior número de casos de leishmaniose tegumentar. Devido à grande extensão geográfica, o Brasil é responsável por 96% dos casos de leishmaniose visceral nas Américas, no entanto, outros países da América do Sul, como Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela também estão entre os países com maiores números de casos registrados (Figura 3) (OPAS, 2019b; WHO, 2016).

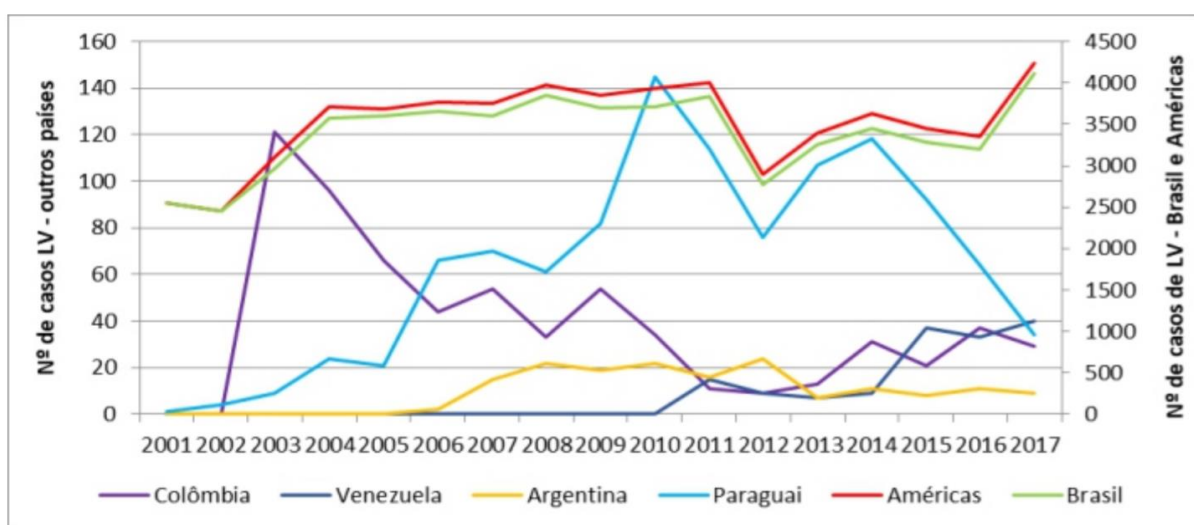


Figura 3 - Casos de leishmaniose visceral no Brasil e Américas, 2001-2017. Fonte: OPAS (2019b).

1.2.1 Vetores da leishmaniose

Os responsáveis pela transmissão das leishmanioses são os flebotomíneos (ordem Diptera, família Psychodidea, subfamília Phlebotominae), insetos de pequeno porte que medem de 2 a 3 mm (Figura 4). Aproximadamente 166 espécies de flebotomíneos foram relatadas como vetores potenciais ou comprovados de diversas espécies de *Leishmania* no Novo e no Velho Mundo. Dentre essas espécies, 78 são vetores comprovados de *Leishmania*. No Velho Mundo, os flebotomíneos transmissores de *Leishmania* pertencem ao gênero *Phlebotomus*, que é constituído de 49 espécies, sendo 31 relatadas como transmissores comprovados. No Novo Mundo, as espécies de *Leishmania*, *Viannia* e *Endotrypanum* são transmitidas por flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, que é constituído de 118 espécies, sendo 47 relatadas como transmissores comprovados. No Velho Mundo, a totalidade das transmissões de *Leishmania* ocorre peridomesticamente em áreas semiáridas modificadas por humanos. A transmissão dos parasitos do Novo Mundo ocorre frequentemente em habitats silvestres, no entanto, há espécies que possuem transmissão predominantemente peridoméstica (AKHOUNDI *et al.*, 2016; PACE, 2014).



Figura 4 - Fêmea de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006).

Somente as fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas, pois precisam de sangue para o desenvolvimento dos seus ovos. As fêmeas desses insetos depositam seus ovos em locais que disponibilizem calor, umidade e matéria orgânica para o desenvolvimento das larvas, como: tocas de roedores, cascas de

árvores velhas, rachaduras de paredes, lixo doméstico, dentre outros (WHO, c2021c).

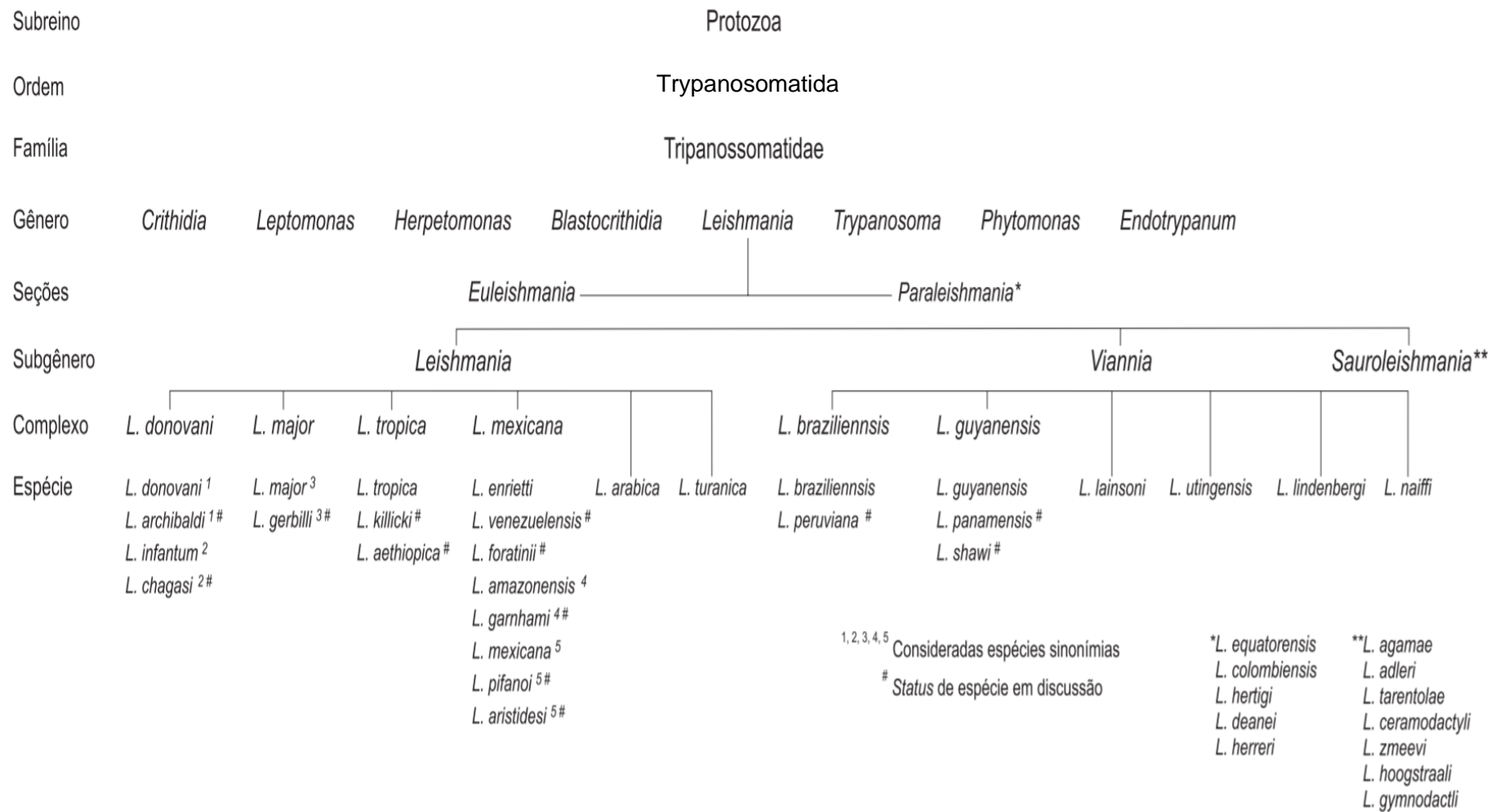
Geralmente, estes insetos fazem o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado ao anoitecer, quando se infectam com os parasitos do gênero *Leishmania*. Durante um período entre 4 e 25 dias, os parasitos desenvolvem-se no flebotomíneo (OPAS, 2017; WHO, c2021c).

1.2.2 Agente etiológico

A família Trypanosomatidae é constituída de uma diversidade de protozoários parasitos que são predominantemente monoxênicos (ciclo de vida apenas em um hospedeiro), como *Strigomonas*, *Wallaceina* e *Zelonia*. No entanto, alguns parasitos possuem um ciclo heteroxênico (ciclo de vida em vertebrados ou plantas e invertebrados) e são divididos em três gêneros - *Trypanosoma*, *Phytomonas* e *Leishmania* (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Os agentes etiológicos da leishmaniose são protozoários parasitos pertencentes ao reino Protista, classe Kinetoplastea, subclasse Metakinetoplastina, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, subfamília Leishmaniinae e gênero *Leishmania* (Figura 5). Parasitos flagelados de *Leishmania* evoluíram de uma vida monoxênica ancestral em insetos para um ciclo de vida heteroxênico, necessitando assim de dois hospedeiros: um vertebrado, representado por cães, roedores e humanos, e um invertebrado, representado pelo inseto vetor. Há, aproximadamente, 53 espécies de *Leishmania* descritas, destas, 31 espécies são conhecidas por ser parasitas de mamíferos e 20 espécies são patogênicas para humanos, como *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis* (AKHOUNDI *et al.*, 2016; DE PABLOS; FERREIRA; WALRAD, 2016; PACE, 2014).

Além das espécies de *Leishmania* patogênicas para humanos, também existem espécies que não são infectivas ao homem, como *Leishmania tarentolae*, protozoário parasito de lagarto que nunca foi associado a nenhuma manifestação clínica de leishmaniose em humanos, sendo considerado não patogênico para humanos (AZIZI *et al.*, 2009). Essas espécies são pertencentes ao subgênero *Sauroleishmania* (Figura 5) e transmitidas através da picada de flebotomíneos do gênero *Sergentomyia* (KLATT *et al.*, 2019).



Números sobrescritos identificam as espécies em que há discussão quanto à validade taxonômica (possíveis sinónimas).

**Espécie questionada quanto à sua validade taxonômica dentro do gênero.

Figura 5 - Taxonomia da família Trypanosomatidae. Fonte: CONCEIÇÃO-SILVA e ALVES (2017).

No interior da *Leishmania*, estão presentes o núcleo e diversas organelas, como a mitocôndria e o aparelho de Golgi. A mitocôndria é única e contém uma região conhecida como cinetoplasto, que é localizada na posição anterior ao núcleo e que abriga o DNA mitocondrial. Na base do flagelo existe uma invaginação de membrana celular denominada bolsa flagelar, estrutura de suma importância, pois é o único local onde ocorre a endocitose e a exocitose (SUNTER; GULL, 2017).

A *Leishmania* transita por diferentes ambientes intra e extracelulares, sendo expostas a diversas condições ambientais, como: variação na disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio. Devido a necessidade desses parasitos sobreviverem nessas diferentes condições, eles desenvolveram diferentes formas morfológicas, altamente especializadas e adaptadas (BESTEIRO *et al.*, 2007).

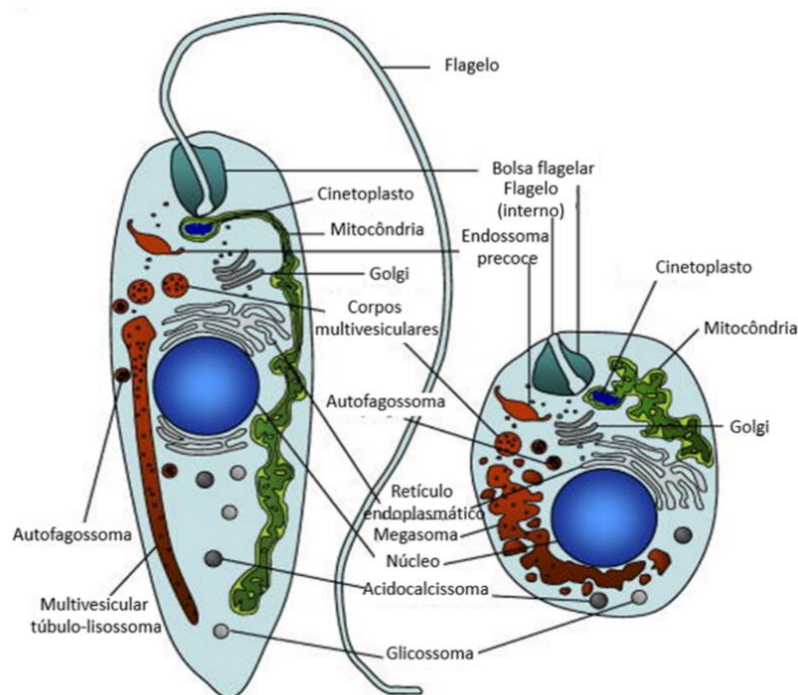


Figura 6 - Morfologia das formas evolutivas de *Leishmania*. Figura esquemática mostrando as organelas da forma promastigota e amastigota. Fonte: Adaptado de BESTEIRO *et al.* (2007).

Os parasitos possuem duas formas evolutivas bem definidas durante o seu ciclo biológico: a forma promastigota e a forma amastigota, entretanto, a arquitetura celular básica é conservada entre as duas formas evolutivas e é definida por uma rede de microtúbulos subpeliculares rígida (SUNTER; GULL, 2017). As formas promastigotas são encontradas no tubo digestivo dos flebotomíneos, são caracterizadas por um corpo celular ovóide alongado e possuem um flagelo móvel longo que se estende para fora da bolsa flagelar, fornecendo força propulsora que

facilita a motilidade do parasito. As formas amastigotas são encontradas nas células do sistema fagocítico mononuclear, dentro de vacúolos parasitóforos. Como são formas adaptadas para sobreviverem em ambientes intracelulares, não são móveis, apresentam-se tipicamente ovóides ou esféricas e não possuem flagelo livre, apenas um rudimento que está presente na bolsa flagelar (Figura 6) (BESTEIRO *et al.*, 2007; PACE, 2014; SUNTER; GULL, 2017).

As formas promastigotas podem ser divididas em quatro formas principais (Figura 7). As promastigotas procíclicas, presentes no intestino médio do vetor (na figura 8 estão representadas as regiões anatômicas de um flebotomíneo), possuem altas taxas de multiplicação, no entanto, não são infectivas para o hospedeiro vertebrado. Possuem como características um corpo celular pequeno e volumoso com comprimento entre 6,5 e 11,5 μm , e um flagelo mais curto que o corpo celular. As promastigotas nectomonas são observadas no inseto vetor à medida que a matriz peritrófica (película que reveste o intestino médio do inseto) se rompe e se movem em direção ao intestino anterior. Possuem como característica um corpo celular maior que 12 μm .

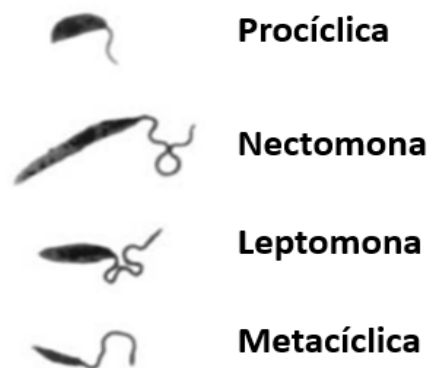


Figura 7 - Desenho esquemático de formas promastigotas procíclicas, nectomonas, leptomonas e metacíclicas. Fonte: Adaptado de SUNTER, GULL (2017)

As promastigotas leptomonas podem ser encontradas no intestino anterior do inseto vetor. Se caracterizam por ter um corpo celular com comprimento entre 6,5 e 11,5 μm com o flagelo mais longo que o corpo celular. As promastigotas metacíclicas, habitantes do intestino anterior e na probóscide do vetor, não se multiplicam, possuem uma alta mobilidade e são extremamente infectivas para o hospedeiro vertebrado. Apresentam como características um corpo celular com

menos de 8 μm de comprimento e 1 μm de largura, e um grande flagelo com, aproximadamente, duas vezes o tamanho do seu corpo celular (DE PABLOS; FERREIRA; WALRAD, 2016; SUNTER; GULL, 2017).

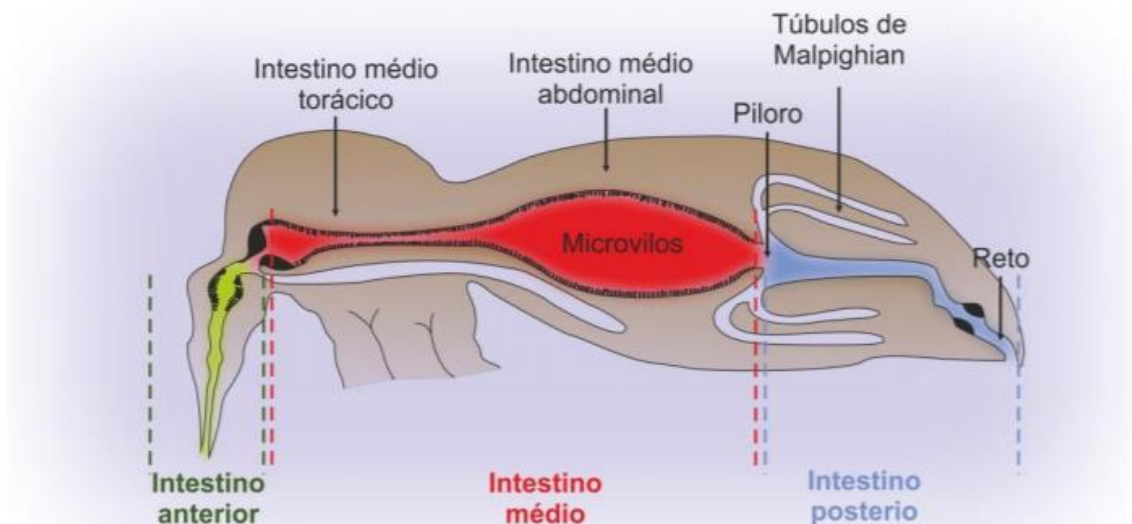


Figura 8 - Representação do intestino de um flebotomíneo. Fonte: (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

1.2.3 Ciclo biológico

Parasitas do gênero *Leishmania* alternam entre hospedeiros vertebrados e invertebrados no decorrer dos seus ciclos de vida (Figura 9). Esses protozoários passam por diferentes estágios de desenvolvimento tanto no hospedeiro vertebrado como no inseto vetor (SANTOS, 2014).

O ciclo biológico de espécies de *Leishmania* patogênicas ao homem é bem estabelecido. Quando os flebotomíneos fazem o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, ingerem formas amastigotas presentes nos macrófagos teciduais, no fluido intersticial ou no sangue. No intestino do vetor, as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas, que se multiplicam rapidamente para entrar em um processo de diferenciação denominado metaciclogênese. Nesse processo, as promastigotas se transformam de um morfotipo não infectivo (promastigotas procíclicas) a um infectivo (promastigotas metacíclicas). Dessa forma, as promastigotas passam por alterações morfológicas, como mudanças no seu tamanho, forma e comprimento do flagelo. Além disso, essas mudanças na

morfologia são acompanhadas pelo aumento da expressão de moléculas de superfície, como a protease gp63 e o LPG (lipofosfoglicano) (BATES, 2018; MUSKUS; MARÍN VILLA, 2002; NEUBER, 2008; SANTOS, 2014).

Quando o vetor infectado faz um novo repasto sanguíneo, ele inocula formas promastigotas metacíclicas a um hospedeiro vertebrado suscetível. As promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células fagocíticas mononucleares e se diferenciam em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária dentro do fagolisossoma da célula infectada. Esta célula se rompe e libera as amastigotas que podem infectar novas células. Dependendo da espécie de *Leishmania* ou do estado imunológico do hospedeiro, o parasito pode permanecer no local de inoculação ou se disseminar para as vísceras. Isto produz a forma tegumentar ou visceral da manifestação clínica (CDC, 2020; NEUBER, 2008; PACE, 2014).

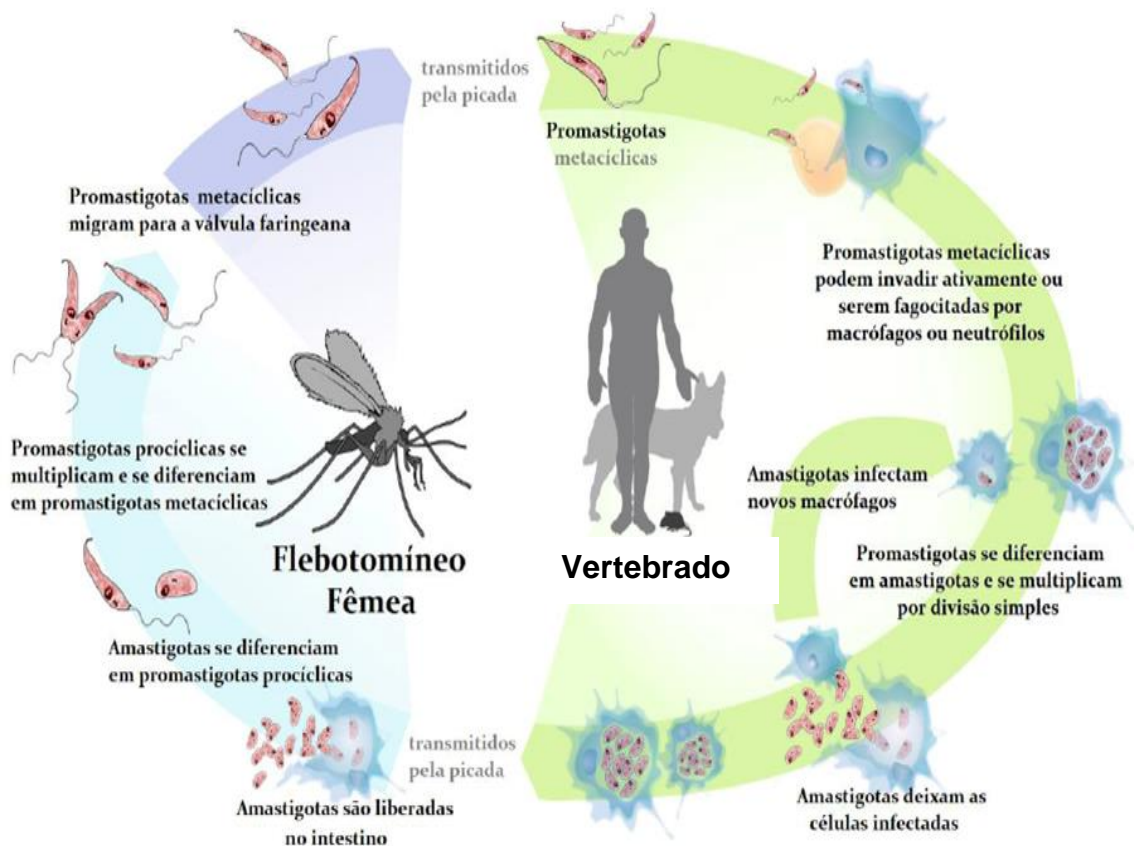


Figura 9 - Ciclo biológico da *Leishmania*. Fonte: Adaptado de IBICT (2015).

O ciclo biológico de espécies de *Leishmania* não patogênicas ao homem, como *Leishmania tarentolae* (*Sauroleishmania*), ainda não é bem estabelecido. No entanto, sabe-se que esses parasitos alternam entre o hospedeiro vertebrado (lagarto) e o invertebrado (flebotomíneos do gênero *Sergentomyia*) (KLATT *et al.*, 2019; RAYMOND *et al.*, 2012).

Em lagartos, parasitos de *Leishmania tarentolae* habitam predominantemente como promastigotas na corrente sanguínea ou no lúmen da cloaca e intestino. A presença de amastigotas livres ou dentro de monócitos ou eritrócitos é rara. Acredita-se que a transmissão de *Leishmania tarentolae* ao seu vetor ocorra por meio de um mecanismo de alimentação semelhante para vetores de mamíferos (KLATT *et al.*, 2019).

Os flebotomíneos (*Sergentomyia*) se alimentam do sangue de um lagarto infectado, ingerindo formas promastigotas e algumas amastigotas de *Leishmania tarentolae*. No intestino do flebotomíneo, as células do sistema imunológico se rompem e os parasitos fagocitados são liberados. É possível que promastigotas e amastigotas de *L. tarentolae* sofram várias transformações dentro do flebotomíneo, com estágios de procíclicos, nectomonas, leptomonas, haptomonas e promastigotas metacíclicas. As promastigotas metacíclicas seriam o estágio infeccioso e transferidas de volta para um lagarto durante um novo repasto sanguíneo. No lagarto, as promastigotas vivem principalmente livres na corrente sanguínea. Uma pequena parte provavelmente é fagocitada por células do sistema imunológico (monócitos e macrófagos). As promastigotas fagocitadas podem voltar a se transformar em amastigotas e o ciclo de vida se repete (Figura 9.1) (KLATT *et al.*, 2019).

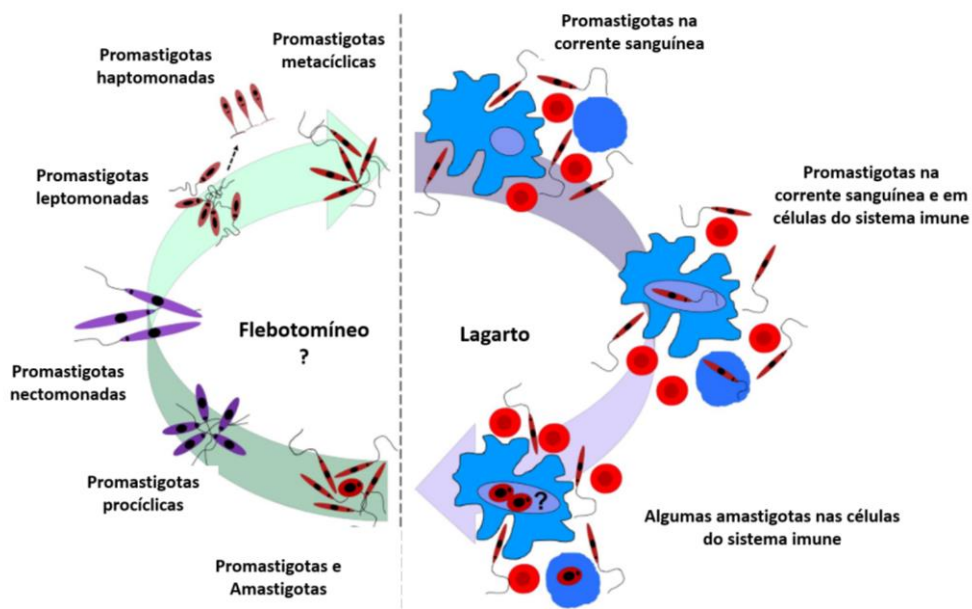


Figura 9.1 - Ciclo biológico sugerido de *Leishmania tarentolae*. Fonte: Adaptado de KLATT *et al.* (2019).

1.2.4 Manifestações clínicas da leishmaniose

A leishmaniose apresenta diversas manifestações clínicas associadas que vão desde o acometimento da pele e mucosas, até a forma clínica mais grave que é a leishmaniose visceral. Isso ocorre devido à grande variedade de espécies de *Leishmania* que provocam a doença e depende do estado imunológico do hospedeiro vertebrado (PACE, 2014).

Aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* são transmitidas para os humanos através do repasto sanguíneo de flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*. Essas espécies de *Leishmania* são divididas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* e são responsáveis por diferentes manifestações clínicas (AKHOUNDI *et al.*, 2016; SANTOS, 2014).

Portanto, a leishmaniose pode ser classificada em: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). A leishmaniose tegumentar pode ser subdividida em: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose recidiva cútis (LRC), leishmaniose cutânea disseminada (LD), leishmaniose mucocutânea (LM), leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) e leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; NEUBER, 2008)

1.2.4.1 Leishmaniose cutânea localizada

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é caracterizada pelo acometimento primário da pele e é a manifestação clínica mais comum da doença. Após o período de incubação da LCL, que pode variar de uma a quatro semanas ou até anos, uma lesão ulcerada, indolor e com borda delimitada (Figura 10) aparece no sítio de infecção. As lesões da LCL predominam em segmentos corporais como: orelhas, nariz, lábio superior, bochechas, pernas, mãos, antebraços e tornozelos.



Figura 10 - Leishmaniose cutânea localizada. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2017).

Essas lesões possuem tendência à uma cura espontânea, que pode levar de três meses a anos para ser alcançada. As lesões podem ser únicas ou múltiplas, com até vinte lesões no mesmo segmento corporal. Essa forma clínica pode ser acompanhada de linfadenopatia regional e linfangite nodular (ARENAS *et al.*, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

1.2.4.2 Leishmaniose recidiva cútis

A leishmaniose recidiva cútis (LRC) é caracterizada pela ativação da lesão, nas bordas, provocada pela leishmaniose cutânea localizada e pode ser confundida com tuberculose cutânea. Lesões, que podem expandir progressivamente, aparecem nas bordas da lesão original cicatrizada, mantendo o fundo com aspecto cicatricial (Figura 11). Se não tratada, a leishmaniose recidiva cútis pode ser destrutiva e desfigurante (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).



Figura 11 - Leishmaniose recidiva cútis. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2017).

1.2.4.3 Leishmaniose cutânea disseminada

A leishmaniose cutânea disseminada (LCD) é uma manifestação clínica rara que pode ser observada em até 2% dos casos. Tem como característica o aparecimento de lesões papulares com aspecto acneiforme (Figura 12) em várias partes do corpo, inclusive na face e no tronco (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A disseminação das lesões ocorre após o desenvolvimento de lesões primárias, possivelmente por disseminação dos parasitos por via linfática ou hemática. As lesões dessa forma clínica podem chegar as centenas. Os pacientes podem apresentar sintomas, como: emagrecimento, anorexia, febre, dores musculares, mal-estar, dentre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).



Figura 12 - Leishmaniose cutânea disseminada. Fonte: MACHADO (2004).

1.2.4.4 Leishmaniose mucocutânea

A leishmaniose mucocutânea (LM) provoca lesões desfigurantes e é caracterizada por destruição das mucosas das vias aéreas superiores (Figura 13), provocando sangramentos nasais e prejudicando a ventilação nasal. A mucosa nasal é frequentemente afetada pela doença, mas podem aparecer lesões nos lábios, língua, palato, orofaringe e, com menos frequência, na traqueia. Essa manifestação clínica pode se desenvolver por conta da evolução crônica da leishmaniose cutânea que foi curada com tratamento inadequado ou sem tratamento. As lesões da LM podem se desenvolver em meses ou até anos após o surgimento das lesões de leishmaniose cutânea (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; NEUBER, 2008).



Figura 13 - Leishmaniose mucocutânea. Fonte: ELFAITURI *et al.* (2015).

1.2.4.5 Leishmaniose cutâneo-difusa

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) é uma manifestação clínica grave e rara que acomete pacientes com anergia e deficiência na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Isso permite a disseminação pelas vias teciduais, linfáticas e sanguíneas, provocando o aparecimento de múltiplas lesões que podem se unir e formar placas em grandes segmentos corporais (Figura 14). As lesões são nodulares ou papulares e podem se manifestar primeiro na face e acometer de forma progressiva as extremidades, nádegas e mucosas, podendo envolver toda a superfície da pele. Os pacientes com LCD podem apresentar linfadenopatia, mal-estar geral e febre (ARENAS *et al.*, 2017; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).



Figura 14 - Leishmaniose cutâneo-difusa. Fonte: ARENAS *et al.* (2017).

1.2.4.6 Leishmaniose dérmica pós-calazar

A leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) é uma manifestação clínica que ocorre meses ou anos após o tratamento da leishmaniose visceral. Os pacientes com LDPC desenvolvem uma proliferação fulminante e exacerbada de parasitos na pele que provoca máculas cutâneas, pápulas, úlceras, nódulos ou placas espalhadas pela face, tronco e membros (Figura 15) (KORDOFANI *et al.*, 2001; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

As lesões geralmente começam ao redor da boca, de onde se espalham para outros segmentos corporais. A patogênese dessa manifestação clínica ainda não é totalmente compreendida, mas acredita-se que ela está relacionada com uma

resposta imunológica agressiva do hospedeiro gerada contra parasitos dérmicos persistentes (KORDOFANI *et al.*, 2001; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).



Figura 15 - Leishmaniose dérmica pós-calazar. Fonte: TRIPATHY *et al.* (2010).

1.2.4.7 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é a forma clínica mais grave das leishmanioses e pode levar a morte se não tratada. A proliferação de parasitos em macrófagos do baço, fígado e medula óssea provoca hepatoesplenomegalia progressiva (Figura 16) e supressão da medula óssea. Caso não haja o tratamento dessa manifestação clínica, os pacientes podem desenvolver pancitopenia e imunossupressão, o que pode permitir infecções por outros patógenos. A leishmaniose visceral tem como principais sintomas clínicos: febre irregular persistente; desnutrição aguda, principalmente em crianças pequenas; hepatoesplenomegalia e pancitopenia (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; WILHELM, 2019).



Figura 16 - Leishmaniose visceral. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006).

Tabela 1 - Características clínicas das principais espécies de *Leishmania*. Fonte: Traduzido e adaptado de BURZA; CROFT; BOELAERT (2018).

Espécies	Manifestações clínicas	Principais características clínicas
<i>Leishmania donovani</i>	Leishmaniose visceral e leishmaniose dérmica pós-calazar	Febre persistente, esplenomegalia, perda de peso e anemia na LV; múltiplas lesões maculares, papulares ou nodulares indolores na LDPC
<i>Leishmania tropica</i>	Leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose recidiva cútis e, raramente, leishmaniose visceral	Lesões secas ulcerativas, indolores e frequentemente múltiplas
<i>Leishmania aethiopica</i>	Leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutâneo-difusa e leishmaniose cutânea disseminada	Lesões nodulares cutâneas localizadas; ocasionalmente oronasal; raramente ulceradas
<i>Leishmania major</i>	Leishmaniose cutânea	Necrose rápida, múltiplas feridas úmidas e inflamação grave
<i>Leishmania infantum</i>	Leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea localizada	Febre persistente e esplenomegalia na LV; nódulos únicos e inflamação mínima na LC
<i>Leishmania mexicana</i>	Leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutâneo-difusa e leishmaniose cutânea disseminada	Lesões ulcerativas, únicas ou múltiplas
<i>Leishmania amazonensis</i>	Leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutâneo-difusa e leishmaniose cutânea disseminada	Lesões ulcerativas, únicas ou múltiplas
<i>Leishmania braziliensis</i>	Leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose mucocutânea, leishmaniose cutâneo-difusa e leishmaniose recidiva cútis	Lesões ulcerativas podem progredir para a forma mucocutânea; os nódulos linfáticos locais são palpáveis antes e no início das lesões

As leishmanioses possuem uma diversidade de manifestações clínicas associadas (Tabela 1). As diferentes formas e a gravidade da doença são provocadas pela espécie de *Leishmania* infectante juntamente com a genética do hospedeiro e as consequentes respostas inflamatórias e imunológicas. Uma característica marcante de parasitos do gênero *Leishmania* é a diversidade de tropismo e das doenças provocadas por esse protozoário (COLMENARES *et al.*, 2002).

Desde o sequenciamento do genoma de parasitos do gênero *Leishmania* nas últimas décadas, estudos vêm sendo desenvolvidos no âmbito de buscar um melhor entendimento de fatores que possam ser determinantes nos processos biológicos do parasito, incluindo os mecanismos envolvidos na patogenicidade e na virulência desses microrganismos (IVENS *et al.*, 2005; OLIVIER *et al.*, 2012; PEACOCK *et al.*, 2007).

A *Leishmania* possui diversos fatores de virulência que são extremamente importantes para a infectividade dos parasitos, pois ajudam tanto na interação do parasito com o vetor como com as células fagocíticas mononucleares do hospedeiro vertebrado. Alguns exemplos de fatores de virulência de *Leishmania* são: as moléculas de superfície LPG, a protease gp63 e a proteína A2 (AZIZI *et al.*, 2009; CHANG; CHAUDHURI, 1990; MUSKUS; MARÍN VILLA, 2002; SCHLEIN; SCHNUR; JACOBSON, 1990).

Além dos fatores mencionados acima, já foi demonstrado que a tripanotiona redutase (TR) é essencial para a sobrevivência no interior da célula hospedeira, sendo considerada um importante fator de viabilidade e virulência em *Trypanosoma brucei*, *Leishmania donovani* e *Leishmania major* (DUMAS *et al.*, 1997; JAEGER; FLOHÉ, 2006; KRIEGER *et al.*, 2000; TOVAR *et al.*, 1998a). Entretanto, a literatura não relata o papel da tripanotiona redutase na virulência de *Leishmania infantum*, espécie do Novo Mundo.

1.2.5 Tripanotiona redutase

No hospedeiro vertebrado, as amastigotas sobrevivem em um ambiente completamente hostil, uma vez que as células do sistema imune utilizam diversos mecanismos na tentativa de eliminar esses parasitos (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

O estresse oxidativo representa um papel importante nessa batalha do sistema imunológico contra a infecção. No processo de fagocitose de microrganismos ocorre a ativação da NADPH oxidase, um complexo enzimático que converte oxigênio em radical ânion superóxido (O_2^-). A partir daí, a superóxido dismutase converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e ocorrem outras séries de reações que geram outros oxidantes antimicrobianos, como o ácido hipocloroso (HOCl) (Figura 17) (BLOS *et al.*, 2003; KALYANARAMAN, 2013).

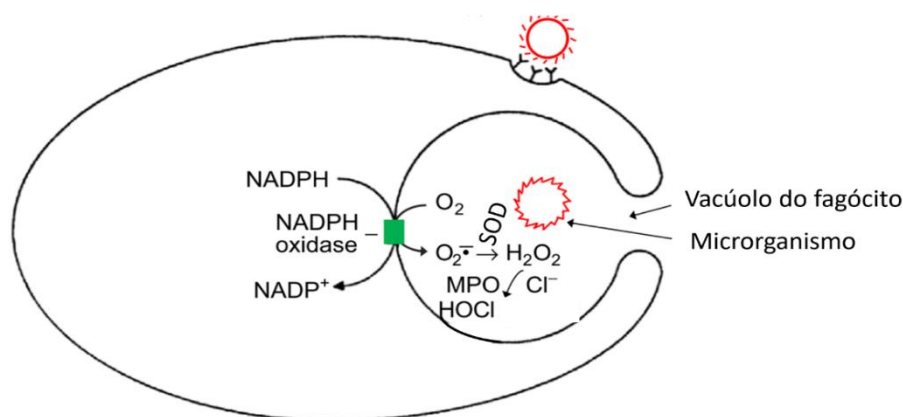


Figura 17 - Representação esquemática do processo de fagocitose. Representação esquemática de um fagócito envolvendo um microrganismo em um vacúolo do fagócito. A NADPH oxidase é ativada na parede do vacúolo e converte oxigênio em radical ânion superóxido (O_2^-). A superóxido dismutase converte o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. A mieloperoxidase oxida o ânion cloreto na presença de H_2O_2 , formando o ácido hipocloroso (HOCl). Traduzido e adaptado de KALYANARAMAN (2013).

Um dos mecanismos de sobrevivência dos parasitos no interior das células fagocíticas depende da capacidade deles de resistir ao estresse oxidativo provocado por essas células. Os tripanossomatídeos não possuem catalase ou outros mecanismos convencionais para a homeostase redox, baseando a sua defesa na tripanotiona redutase (BATTISTA *et al.*, 2020).

A tripanotiona redutase é um homodímero e cada subunidade dessa enzima possui 491 aminoácidos compreendendo 3 diferentes domínios: um domínio de ligação FAD (resíduos 1-160; 289-360), um domínio de ligação NADPH (resíduos 161-288) e um domínio de interface (resíduos 361-488) (Figura 18) (BATTISTA *et al.*, 2020).

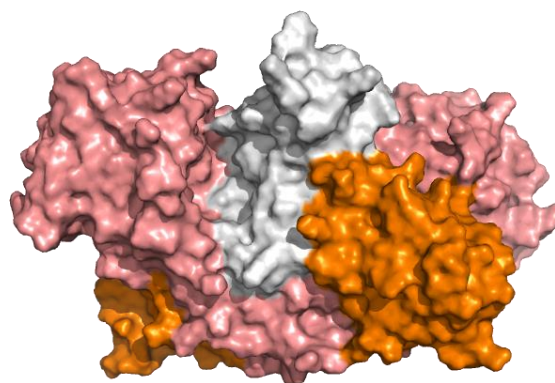


Figura 18 - Estrutura tridimensional da tripanotiona redutase. A estrutura da TR utilizada foi a pdb 2JK6. Cada domínio da enzima está representado pelas cores salmão (domínio de ligação FAD), cinza (domínio de interface) e laranja (domínio de ligação NADPH). A imagem foi gerada no programa PyMOL versão 2.4.1.

A tripanotiona redutase é a principal enzima do sistema de defesa contra o estresse oxidativo em tripanossomatídeos e encontra-se ausente em células de mamíferos. Esse sistema se baseia na redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para a manutenção de um ambiente intracelular redutor. A homeostase redox é mantida através da conversão da tripanotiona oxidada ($T(S)_2$) em tripanotiona reduzida ($T(SH)_2$) pela enzima tripanotiona redutase, tendo como cofator o NADPH (Figura 19) (FAIRLAMB; CERAMI, 1992; RICHARDSON *et al.*, 2009). O mecanismo de reação se baseia na transferência de dois elétrons do NADPH para duas cisteínas catalíticas (Cys52 e Cys57), via FAD. Uma vez que as cisteínas são reduzidas, a tripanotiona oxidada liga-se à tripanotiona redutase e a Cys52, desprotonada pelo par His461'-Glu466', ataca a ponte dissulfeto da tripanotiona oxidada, resultando na formação de um dissulfeto misto. Por fim, o ataque de Cys57 em Cys52 possibilita a liberação da $T(SH)_2$ (BATTISTA *et al.*, 2020).

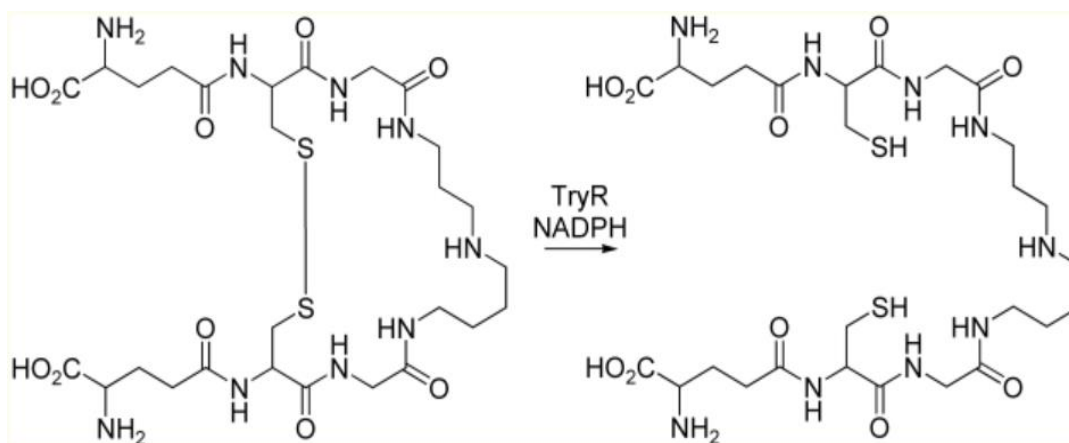


Figura 19 - Reação da tripanotiona redutase. TryR: tripanotiona redutase. Fonte: RICHARDSON *et al.* (2009).

No hospedeiro mamífero também há a manutenção de um ambiente intracelular redutor nas células, no entanto, a tripanotiona redutase está ausente, e esse controle da homeostase de espécies reativas de oxigênio é realizado pela glutatona redutase (GR). Vale ressaltar que a TR e a GR são proteínas muito semelhantes, apresentando aproximadamente 40% de similaridade estrutural, no entanto, cada proteína é altamente específica para seu respectivo substrato. Essa especificidade é justificada pela diferença na superfície eletrostática de cada enzima. Enquanto o sítio ativo da TR é carregado negativamente, o sítio ativo da GR é carregado positivamente (HENDERSON, Graeme B *et al.*, 1987; RICHARDSON *et al.*, 2009).

Além do papel da TR no controle do balanço redox em tripanossomatídeos, já foi demonstrado que essa enzima pode ser um importante fator de viabilidade e virulência em *Leishmania donovani*. Dumas e colaboradores demonstraram que o *knockout* da tripanotiona redutase de *Leishmania donovani* diminuiu, significativamente, a infectividade desses parasitos e a capacidade deles sobreviverem no interior de macrófagos (DUMAS *et al.*, 1997).

Da mesma forma, Tovar e colaboradores demonstraram que a substituição da sequência codificante da tripanotiona redutase afetou, drasticamente, a capacidade dos parasitos de *Leishmania donovani* sobreviverem dentro de macrófagos ativado por citocinas, mostrando que a TR é uma enzima essencial para a sobrevivência desses parasitos (TOVAR *et al.*, 1998b).

Similarmente, Krieger e colaboradores observaram que parasitos mutantes de *Trypanosoma brucei* com baixa atividade da tripanotiona redutase não foram capazes de sobreviver em meio de cultura, foram mais sensíveis ao peróxido de hidrogênio e incapazes de causar uma infecção em camundongos, mostrando assim a importância dessa enzima para a viabilidade e infectividade de *Trypanosoma brucei* (KRIEGER *et al.*, 2000).

Nesse contexto, a hipótese desse trabalho é que a enzima tripanotiona redutase não participa somente no processo de manutenção do balanço redox, mas também atua na virulência da *Leishmania infantum*.

2 OBJETIVOS/METAS

2.1 Objetivo geral

Investigar o papel da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* no processo de virulência, comparando a atividade, sequências nucleotídicas e de aminoácidos, e a estrutura terciária desta enzima com uma espécie de *Leishmania* não virulenta ao mamífero, *Leishmania tarentolae*.

2.2 Objetivos específicos

1. Comparar a atividade, sequências nucleotídicas e de aminoácidos, e a estrutura terciária da enzima tripanotona redutase (TR) presente em *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*.
2. Realizar a superexpressão da TR em promastigotas de *Leishmania infantum*;
3. Expressar a TR de *Leishmania infantum* em *Leishmania tarentolae*.
4. Comparar a atividade da TR em promastigotas de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* selvagens e mutantes;
5. Avaliar a infectividade dos parasitos de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* selvagens e mutantes em macrófagos murinos;
6. Avaliar a metaciclogênese de promastigotas de *L. infantum* selvagens e mutantes.

3 METODOLOGIA

3.1 Considerações éticas

A utilização de animais nesse estudo foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/IOC) através da licença (CEUA L-011/2017).

3.2 Manutenção do parasito

Promastigotas de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* foram cultivadas em meio Schneider pH 6.9, acrescido de 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina e 20% ou 10% de soro fetal bovino (SFB) para *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, respectivamente. As células utilizadas neste trabalho foram cultivadas no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos e crescidas em estufa BOD a 26°C. As células transfectadas foram crescidas na presença de 30 µg/mL do antibiótico Geneticina.

3.3 Modelagem comparativa e análise estrutural

A sequência-alvo da tripanotiona redutase de *Leishmania tarentolae* (LtaP05.0360) foi usada na busca de moldes estruturais utilizando-se a ferramenta BLASTP (ALTSCHUL *et al.*, 1997), definindo o Protein Data Bank (PDB) como um conjunto de pesquisa. A estrutura da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* em complexo com NADPH, FAD e tripanotiona (PDB ID: 4ADW (BAIOCCO *et al.*, 2013)) foi selecionada como molde da sequência-alvo.

As sequências do molde e do alvo foram alinhadas usando o modo PSI-Coffee do programa T-Coffee (TOMMASO *et al.*, 2011). Quinhentos modelos foram criados usando a rotina padrão '*auto model*' do Modeller versão 9.23 (WEBB; SALI, 2014), com heteroátomos. Cada modelo foi otimizado por '*Variable Target Function Method*' (VTFM) até que 300 iterações fossem alcançadas. A otimização por dinâmica molecular foi conduzida no modo '*slow-level*'. O ciclo completo foi repetido duas vezes para produzir uma conformação otimizada do modelo. As estruturas modeladas resultantes foram selecionadas de acordo com o valor mínimo da função '*Discrete Optimized Protein Energy*' (DOPE), um potencial estatístico que busca representar a estrutura tridimensional mais provável (nativa) de uma proteína. Os modelos foram avaliados segundo os critérios das ferramentas QMEAN (BENKERT *et al.*, 2009) e MolProbity (CHEN *et al.*, 2010), acessadas na página *Structural Assessment* da plataforma *online* SWISS-MODEL.

Os mapas de interação 2D entre a tripanotona e a tripanotona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* foram gerados usando o Discovery Studio Visualizer 2017 (Dassault Systèmes BIOVIA 2017). A figura do alinhamento de sequência foi gerada através do software ALINE (BOND; SCHÜTTELKOPF, 2009). As figuras tridimensionais foram geradas através do UCSF Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004) e ChimeraX software (GODDARD *et al.*, 2018). A análise do potencial eletrostático foi conduzida com o programa APBS (BAKER *et al.*, 2001). A carga AmberFF e os parâmetros de raio foram atribuídos usando o servidor PDB2PQR (DOLINSKY *et al.*, 2004) considerando o pH de 7,0.

3.4 Reação em cadeia da polimerase

Parasitas de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* foram crescidos durante três dias em meio de cultura. No terceiro dia foram centrifugados a 1200g à 4° C por 10 minutos. A extração de DNA desses parasitos foi realizada com o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega). O DNA obtido foi dissolvido em H₂O livre de RNase e estocado a 20°C. A pureza e a concentração do DNA extraído foram determinadas através de leitura em aparelho Nanodrop. A PCR foi realizada com o kit TaqDNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e primers específicos para tripanotona redutase contendo sítios de restrição no início da sequência para as enzimas *Bam*HI (ggatcc) e *Hind*III (aagctt) ou primers específicos para o gene de resistência ao antibiótico Neomicina. A observação do resultante foi através de eletroforese em gel de agarose 1% em cuba horizontal a 80V por 90 minutos.

PRIMER	SEQUÊNCIA	
	FORWARD (5' – 3')	REVERSE (5' – 3')
TRIPANOTONA REDUTASE- <i>Bam</i> HI	CCGGATCCATGTCCCGCGCGT ACGACCT	
TRIPANOTONA REDUTASE- <i>Hind</i> III		CCAAGCTTTCAGAGGTTGCTGCTG AGCT
NEOMICINA	ATGATTGAACAAGATGGATTG	TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAG

3.5 Construção molecular de insertos para expressão das enzimas em estudo

Clones da tripanotona redutase foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase com primers específicos para tripanotona redutase contendo

sítios de restrição no início da sequência para as enzimas *Bam*HI (ggatcc) e *Hind*III (aagctt).

Os fragmentos de DNA amplificados foram cortados do gel de agarose e purificados com o kit Pure Link Quick Gel Extraction (Invitrogen). Os fragmentos de DNA purificado e o vetor pSP72αNEOα foram digeridos, separadamente, por enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) *overnight* à 37°C. Os produtos da digestão foram purificados com o kit Pure Link Quick Gel Extraction (Invitrogen) e, em seguida, incubados com T4 DNA ligase, com a reação de ligação obedecendo a proporção de 3:1 de inserto para vetor com volume final de 10μL, *overnight* à 16° C. Após a reação de ligação, bactérias competentes *E. coli* (DH5α) foram transformadas com o vetor recombinante (tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* + pSP72αNEOα) por choque térmico. Após a transformação, as colônias foram selecionadas com 100μg/mL do antibiótico ampicilina e o vetor recombinante foi purificado com o kit Plasmid Miniprep Purification (Sigma-Aldrich, EUA).

A inserção do gene da tripanotiona redutase no vetor foi confirmada por digestão com as enzimas endonucleases de restrição *Bam*HI e *Hind*III.

3.6 Sequenciamento

Para confirmar a clonagem do gene da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* no vetor pSP72αNEOα foi realizado o sequenciamento pelo método de Sanger na plataforma de sequenciamento de DNA da Fiocruz (RPT01A/FIOCRUZ). A sequência obtida foi comparada com a sequência depositada no banco de dados TriTrypDB (LINF_050008500) através do programa de alinhamento de sequências Clustal.

3.7 Alinhamento das sequências nucleotídicas e de aminoácidos

As sequências nucleotídicas e de aminoácidos da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* (LINF_050008500) e *Leishmania tarentolae* (LtaP05.0360) foram obtidas através do banco de dados TriTrypDB e foi realizado um alinhamento através do programa de alinhamento de sequências Clustal ou através do servidor web PROMALS3D.

3.8 Geração de linhagens geneticamente modificadas

Para a geração dos parasitos modificados geneticamente foi feita transformação por eletroporação. Promastigotas selvagens de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* na fase logarítmica foram centrifugadas, lavadas e

ressuspendidas em tampão de eletroporação (21 mM HEPES, 137 mM NaCl) juntamente com 5µg do vetor recombinante (tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* + pSP72αNEOα) ou somente o vetor de expressão (pSP72αNEOα) em cubetas (cuvette) contendo o tampão de eletroporação. Os parasitos foram então submetidos a eletroporação à 450V e 550µF de capacitância por 10 segundos, originando as cepas LiTR (promastigotas de *Leishmania infantum* com o gene da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* + pSP72αNEOα), LiPSP (promastigotas de *Leishmania infantum* somente com o vetor pSP72αNEOα) e LtTRinf (promastigotas de *Leishmania tarentolae* com o gene da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* + pSP72αNEOα). Em seguida, as células foram diluídas em 5mL de meio Schneider acrescido de 20% de soro fetal bovino. O antibiótico Geneticina foi adicionado ao meio para seleção dos clones depois de 48 horas (12,5µg/mL), e após 96h (25µg/mL). As células sobreviventes foram mantidas em meio de cultura com 30µg/mL do antibiótico Geneticina.

3.9 Preparo da fração solúvel e atividade da enzima tripanotiona redutase

Para a obtenção da fração solúvel, promastigotas de *Leishmania infantum* e *tarentolae* selvagens e mutantes com quatro dias de cultura, foram centrifugadas a 1.000g por 10 minutos, logo após o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em coquetel inibidor de proteases contendo Tampão Tris-Hepes 40 mM pH 7,5, EDTA 1mM pH 8, sacarose 250mM, KCl 10mM, PMSF 1mM e E-64 10µM. Após a ressuspensão, a solução foi submetida a choque térmico com nitrogênio líquido, centrifugada a 17.500g e o sobrenadante foi considerado como a fração solúvel. A concentração de proteína foi quantificada usando o espectrofotômetro NanoDrop 1000. A atividade da tripanotiona redutase (TR) foi avaliada pela reação de Ellman (HAMILTON *et al.*, 2003). O meio de reação para avaliar a atividade enzimática foi composto por: Tampão Tris-Hepes 40 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; NADPH 0,1mM; tripanotiona oxidada (T[S]₂) 1µM e DTNB 0,1mM. A reação foi iniciada com a adição da fração solúvel na concentração final de 0,4mg/mL e a atividade da TR (formação do 2TNB-) foi avaliada colorimetricamente com comprimento de onda de 410nm (Spectra Max GENINI XPS – Molecular Devices, Silicon Valley, EUA) no tempo de 25 minutos de reação.

3.10 Comparação da infectividade dos parasitos selvagens e mutantes

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram coletados em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de glutamina e 1% piruvato,

plaqueados em câmara Lab-Tek de 16 poços e incubados em estufa de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 1 hora. Após esse tempo, macrófagos não aderentes foram retirados através de lavagem com meio RPMI aquecido a 37°C. Os macrófagos aderidos foram infectados com promastigotas de *Leishmania infantum* selvagens ou mutantes com uma proporção de 3:1 parasitos/macrófago por 5 horas. Após esse período, os poços foram lavados com meio RPMI para a remoção dos parasitos não aderentes e foi adicionado 7% de soro equino inativado. As placas foram incubadas em estufa de 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 e 48 horas. Em seguida, as lâminas foram coradas com o corante hematológico InstantProv (Newprov, Curitiba, Brasil) e analisadas através da contagem de pelo menos 150 macrófagos por amostra em microscópio óptico. A porcentagem de macrófagos infectados foi utilizada para a determinação do índice de infecção (IF) através da fórmula:

$$\text{IF} = \% \text{macrófagos infectados} \times \text{número de amastigotas/macrófagos totais.}$$

3.11 Avaliação da metaciclogênese de parasitos selvagens e mutantes

Para avaliar a metaciclogênese, promastigotas de *Leishmania infantum* foram cultivadas em meio Schneider, pH 6.9, suplementadas com 20% de SFB. A separação das promastigotas metacíclicas foi realizada através de gradiente de ficoll (SPÄTH; BEVERLEY, 2001).

4 Resultados

4.1 Atividade da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*

Estudos comparativos entre espécies de *Leishmania* não patogênicas e patogênicas para mamíferos podem ser de importância crítica para o entendimento da patogenicidade desses parasitos e suas relações com o hospedeiro (AZIZI *et al.*, 2009). Nesse contexto, a fim de investigar a possível participação da tripanotona redutase na virulência de parasitos do gênero *Leishmania*, o primeiro passo do trabalho foi avaliar a atividade enzimática da tripanotona redutase através do método de Ellman em parasitos patogênicos e não patogênicos para mamíferos. A atividade dessa enzima foi analisada em *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*. É possível observar na figura 20 que a atividade da tripanotona redutase em parasitos de *Leishmania infantum* é 6 vezes maior que em parasitos de *Leishmania tarentolae* (1,8 nmol 2TNB x min⁻¹ x mg⁻¹ e 0,3 nmol 2TNB x min⁻¹ x mg⁻¹, respectivamente).

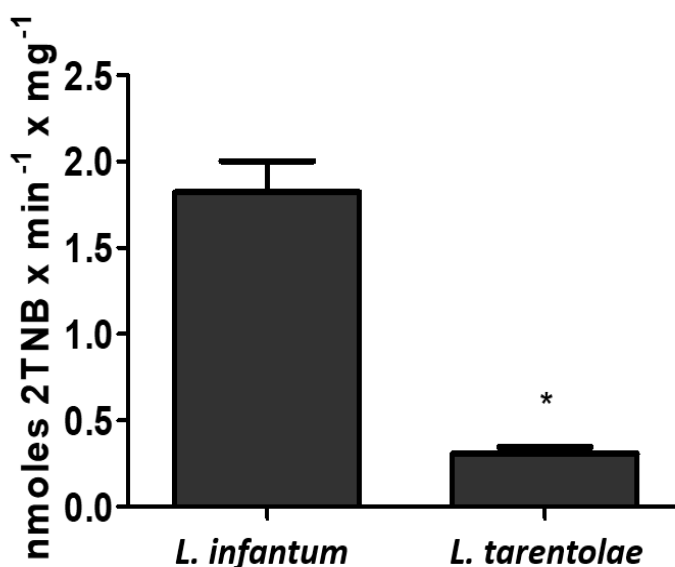


Figura 20 - Atividade da Tripanotona Redutase (TR) em *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*: A atividade da TR foi analisada pela reação de Ellman na fração solúvel de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*. Dados expressos através da média \pm erro padrão da taxa de formação de 2TNB expresso na forma de nmoles 2TNB x min⁻¹ x mg⁻¹ de 3 experimentos independentes (n=3). (teste t >0,0001). * Diferença significativa em relação a fração solúvel de *Leishmania infantum*.

4.2 Alinhamento do gene da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*

Uma vez que foi observada diferença da atividade enzimática da tripanotona redutase de parasitos patogênicos e não patogênicos a mamíferos, o próximo passo foi comparar as sequências nucleotídicas da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* (LINF_050008500) e *Leishmania tarentolae* (LtaP05.0360). As sequências nucleotídicas das duas espécies de *Leishmania* foram obtidas através do banco de dados TriTrypDB e foi realizado um alinhamento através do programa de alinhamento de sequências Clustal. Na figura 21, observamos o alinhamento obtido, demonstrando uma porcentagem de similaridade de 87,26%. Dessa forma, verifica-se que há uma diferença na atividade da TR e nas sequências nucleotídicas da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*.

```

TRLinfantum      ATGTCCCGCGCGTACGACCTCGTGGTGCTTGGCGCCGGATCTGGAGGTCTGGAGGCGGGA 60
TRLtarentolae    ATGTCCCGCGCGTACGACCTCGTGGTGCTTGGCGCCGGATCTGGAGGTCTGGAGGCGGGC 60
*****

TRLinfantum      TGGAACGCGGCCGTACGCACAAGAAGAAGGTGGCCGTCGTCGATGTGCAGGCGACGCAC 120
TRLtarentolae    TGGAACGCAGCTGCCACGTACAAGAAGAAGGTGGCCGTCGTCGATGTGCAGAAGACACAT 120
***** ** * **** *****

TRLinfantum      GGTCCGCGCTCTTCGCTGCGCTCGGCGGCACGTGCGTGAACGTCGGCTGCGTGCCAAAG 180
TRLtarentolae    GGCCCGCGTCTTCGCTGCGCTCGGCGGCACGTGCGTGAACGTTGGCTGCGTTCCTAAG 180
** ***** ***** ** ***

TRLinfantum      AACTCATGGTGACAGGTGCCAGTACATGGACCTGATCCGTGAGTCTGGCGGCTTCGGA 240
TRLtarentolae    AACTCATGGTGACAGGTGCCAGTACATGGACCTGATTCGTGAGTCTCGCGGCTTCGGA 240
***** *****

TRLinfantum      TGGGAGATGGACCGAATCGCTCGCCCAACTGGAAGACGCTCATCGCCGCGAAGAAC 300
TRLtarentolae    TGGGAGGTGAACCGAATCGGTCGCCCAACTGGAAGACGCTGATCGCGCGAAGAAT 300
***** ** ***** * *****

TRLinfantum      AAGGTGGTGAACAGCATCAACGAGAGCTACAAGAGCATGTTGCTGATACGGAGGGCCTC 360
TRLtarentolae    AAAGCAGTGGGCGACATCAACGAGAGCTACACGAACATGTTGCTGAAACGGAGGGCCTC 360
** * *** * ***** ** *****

TRLinfantum      AGCTTTCACATGGGCTTCGGTGCCCTTCAAGACGCTCACACGGTGGTGGTGCGCAAGTCG 420
TRLtarentolae    AGCTTTCACATGGGGTTTGCCGCTCTTCAGGACGCACACACAGTGGTGGTGCGCAAGTCG 420
***** ** * ** ***** *****

TRLinfantum      GAAGACCCACACAGCGACGTGCTGGAGACCCCTCGACACGGAGTACATCCTCATTGCCACC 480
TRLtarentolae    GAGGACCCAACAGCGATGTACTGGAGACACTCGACACCGAGTACATCCTGATCGCCACC 480
** ***** ***** ** ***** *****

TRLinfantum      GGCTCCTGGCCGACGCGCCTCGGAGTCCCGGGCGACGAGTTCTGCATCACGAGCAACGAG 540
TRLtarentolae    GGCTCCTGGCCGACACGCGCCTCGGAATCCCGGGCGACGAGTTTGCATTACAAGCAACGAG 540
***** ***** ***** * ***** ** *****

TRLinfantum      GCCTTCTACCTCGAGGATGCCCAAGCGGATGCTGTGCGTCGGCGGGCTACATCGCC 600
TRLtarentolae    GCCTTCTACCTGGAAGATGTCCCAAGCGGACGCTGTGCGTTGGCGGGCTACATCGCT 600
***** ** ***** ** ***** *****

TRLinfantum      GTTGAGTTTGCCGGCATCTTCAACGGCTACAAGCCCTGCGGTGGCTATGTGACCTGTGC 660
TRLtarentolae    GTGGAGTTTGCCGGGATCTTCAACGGGTACAAGCCCTGCAGTGGTCAGGTGACCTGTGC 660
** ***** ***** ***** ***** ** * *****

TRLinfantum      TACCGGGCGATCTTATTTGCGCGGCTTCGATACAGAGGTGCGCAAGAGCCTGACGAAG 720
TRLtarentolae    TACCGAGGCGATCTTATCTGCGCGGCTTTCGACACGAGGTGCGGACAGAGCCTGACGCAG 720
***** ***** ***** ** * ***** *****

TRLinfantum      CAGCTGGGGGCGAACGGAATAAGAGTGCCTACAACTGAACCCGACGAAGATCACGAAG 780
TRLtarentolae    CAACTGGAAGCGAACGGAATACGAATCCTCACAAAGCTGAACCTGTCAAGCATCACGAAG 780
** ***** ***** ** * ***** *****

```

```

TRLinfantum      AATGAGGACGGCTCGAATCACGTTCACTTCAACGATGGCACGGAGGAGGACTACGATCAG 840
TRLtarentolae   AACGAAGACGGCTCGAAGCACGTTTGCTTTGACAACGGCACAGCGGCCGACTACGATGAA 840
                ** ** ***** ***** ** * * ***** * ** ***** *
TRLinfantum      GTCATGCTCGCGATCGGTTCGCGTGCCGCGCTCGCAGGCACTACAGCTCGACAAGGCCGGC 900
TRLtarentolae   GTCATGCTGGCGATTGGTTCGCGTGCCGCGCTCGCAGACGCTGCAGCTCGACACGGTCCGC 900
                ***** ***** ***** ***** * ** ***** ** ****
TRLinfantum      GTCCGAACAGGAAAGAACGGTGCCGTGCAGGTCGACGCGTATTTCGAAGACATCGGTGGAC 960
TRLtarentolae   ATCAAACCAGGAAAGACGGTCCGTGGAGGTGGACGCGTACTCGAAGACGTCAGTGGAC 960
                ** *** * ** ***** ***** ** * ***** ***** ** *****
TRLinfantum      AACATCTACGCCATCGGCGACGTGACGAACCGCGTGATGTTGACGCCGGTGGCCATCAAC 1020
TRLtarentolae   AACATCTACGCCATTGGCGACGTGACGAACCGCGTGATGTTGACACCAGTGGCCATCAAC 1020
                ***** ***** ***** ***** ** ***** *****
TRLinfantum      GAAGGCGCCGCTTCGTTGAAACCGTCTTCGGTGGCAAGCCCCGCGCCACCGACCACACG 1080
TRLtarentolae   GAAGGTGCCGCTTCGCCGACACCGTCTTTGGTGGAAAGCCCCGCGCCACCGACCACACG 1080
                ***** ***** * ** * ***** ***** ***** *****
TRLinfantum      AAGGTTCGCGTGCGCCGTGTTCTCCATACCGCCGATCGGCACGTGCGGCATGACGGAGGAG 1140
TRLtarentolae   AAGGTTCGCGTGTGCCGTGTTCTCAATACCGCCGATCGGCACGTGTGGCGTGACAGAGGAG 1140
                ***** ***** ***** ***** ** * ** *****
TRLinfantum      GAGGCGGCGAAGAATAACAGCAACCGTTCGCGGTGTACGCGAGCTCCTTCACGCCCTTATG 1200
TRLtarentolae   GAGGCGGCGAAGAATTACAGCACTGTTCGCGGTGTACGAGAGCTCCTTCACCCCTCATG 1200
                ***** ***** ** * ***** ***** ***** ***** **
TRLinfantum      CACAACATCAGCGGCAGCAAGCACAAGGAATTCATGATCCGCATCATCACGAACGAATCC 1260
TRLtarentolae   CACAACATCAGTGGCAGCACGTACAAGAAGTTTATGATTTCGCATCGTCACGGATCATTCG 1260
                ***** ***** * ***** * ** ***** ***** ***** * * **
TRLinfantum      AACGGCGAGGTTCTGGGTGTTTACATGCTCGGCGACAGTGCCTGAGATCATCCAGAGC 1320
TRLtarentolae   AGTGGGGAGGTGCTTGGTGTTCACATGCTGGGCGACAGTGCCTGAGATCATCCAGAGC 1320
                * ** ***** ** ***** ***** ***** ***** *****
TRLinfantum      GTCGGCATTTCATGAAGATGGGTGCCAAGATCAGCGACTTCCACAGCACCATCGGAGTC 1380
TRLtarentolae   GTCGGCATTTCATGAAGATGGGCGCCAAGATCAGCGACTTCCACGACTATTTGGAGTC 1380
                ***** ***** ***** ***** ** * ** *****
TRLinfantum      CACCCGACGAGCGCCGAGGAGCTCTGCTCCATGCGCACCAGCGTACTTCTACGAGAGT 1440
TRLtarentolae   CACCCGACGAGCGCCGAGGAGCTCTGCTCCATGCGCACCAGCGTACTTCTACGAGAAC 1440
                ***** ***** ***** *****
TRLinfantum      GGCAAGCGCGTCGAAAAGCTCAGCAGCAACCTCTGA 1476
TRLtarentolae   GGAAGCGCGTCGATAAGCTAAGCAGCAACCTCTGA 1476
                ** ***** ***** *****

```

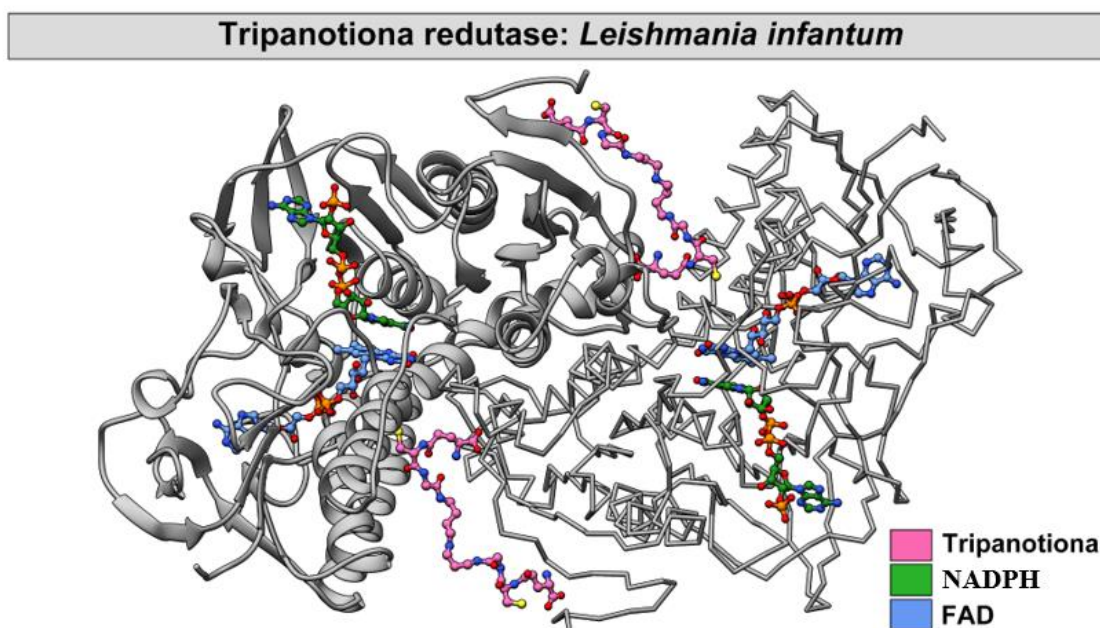
Figura 21 - Alinhamento da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*. O alinhamento obtido demonstrou diferença entre as bases nucleotídicas de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, com porcentagem de similaridade de 87,26% e discrepância de 12,74%. Os asteriscos representam similaridades encontradas. TRLinfantum: sequência depositada da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* no banco de dados TriTrypDB (LINF_050008500). TRLtarentolae: sequência depositada da tripanotona redutase de *Leishmania tarentolae* no banco de dados TriTrypDB (LtaP05.0360).

4.3 Alinhamento das sequências de aminoácidos da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*

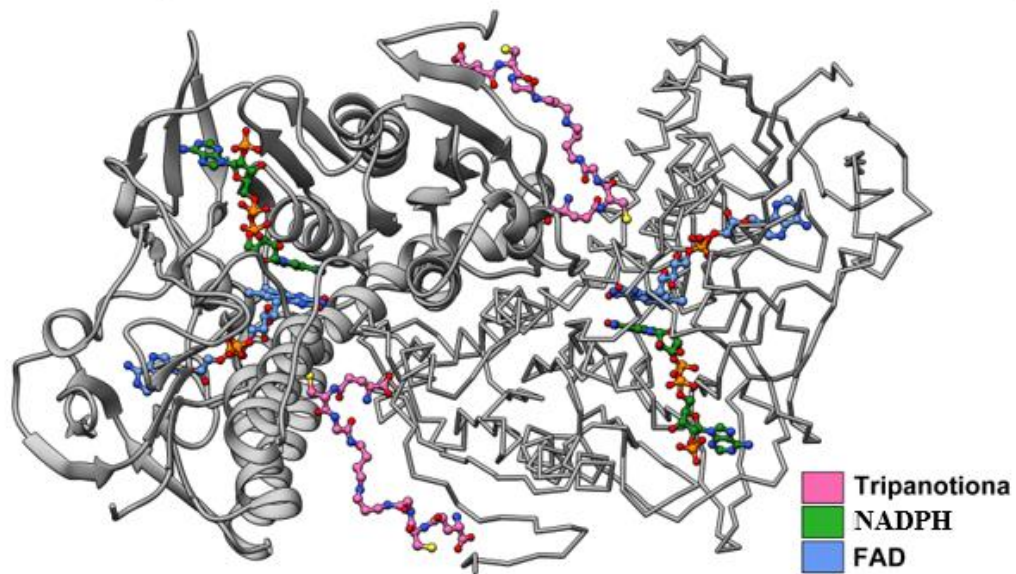
A estrutura primária de uma proteína determina como será seu enovelamento em sua estrutura tridimensional, e isso, por sua vez, pode definir a atividade desta. Nesse contexto, realizamos o alinhamento das sequências de aminoácidos da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* (LINF_050008500) e *Leishmania tarentolae* (LtaP05.0360). As sequências de aminoácidos das duas espécies de *Leishmania* foram obtidas através do banco de dados TriTrypDB e foi realizado um alinhamento através do servidor web PROMALS3D. Assim como observado no resultado anterior, o alinhamento obtido demonstrou uma porcentagem de

4.4 Análise comparativa da estrutura 3D da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*

No resultado anterior, observou-se que há diferenças nas sequências de aminoácidos entre a TR de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*. O próximo passo foi verificar se haveria diferenças na estrutura tridimensional entre a TR dos parasitos patogênicos e não patogênicos a mamíferos, *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, respectivamente. Não há um modelo tridimensional da TR de *Leishmania tarentolae*, então a estrutura 3D da TR de *Leishmania tarentolae* foi construída através de modelagem comparativa, onde utilizou-se a estrutura tridimensional da TR de *Leishmania infantum* (PDB ID: 4ADW) como molde. As estruturas da TR de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* são altamente conservadas, com um valor de RMSD de raiz do desvio quadrático médio (RMSD) de 0,25 Å. Na figura 23, as estruturas da TR estão representadas em *cartoon* e *ribbon*, e complexadas com a tripanotiona (rosa), NADPH (verde) e FAD (azul). Além disso, o alinhamento da TR de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* foi realizado, onde é possível observar o alto grau de conservação da enzima entre as duas espécies de *Leishmania* (Figura 23).



Tripanotiona redutase: *Leishmania tarentolae*



Tripanotiona redutase: *Alinhamento*

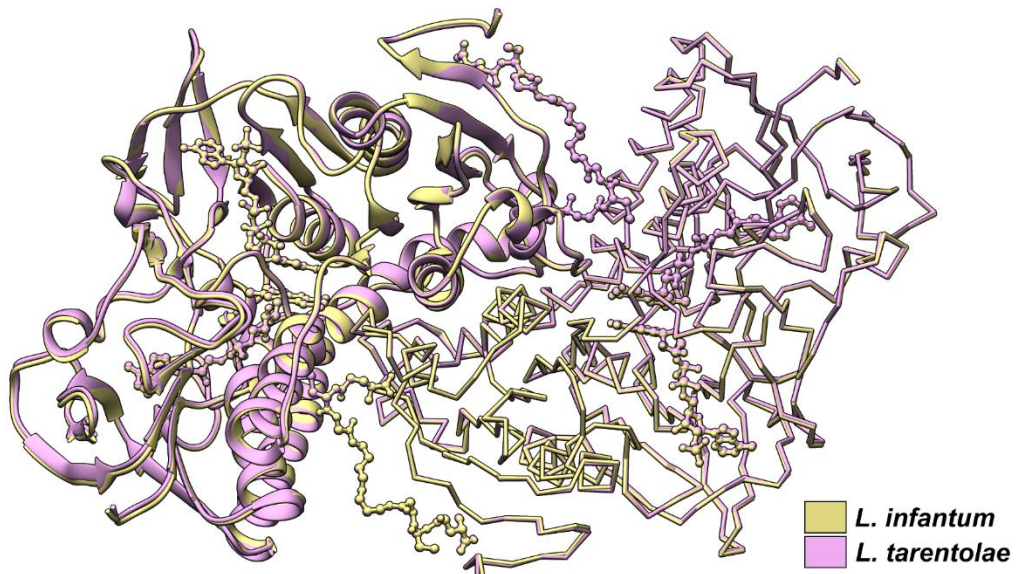
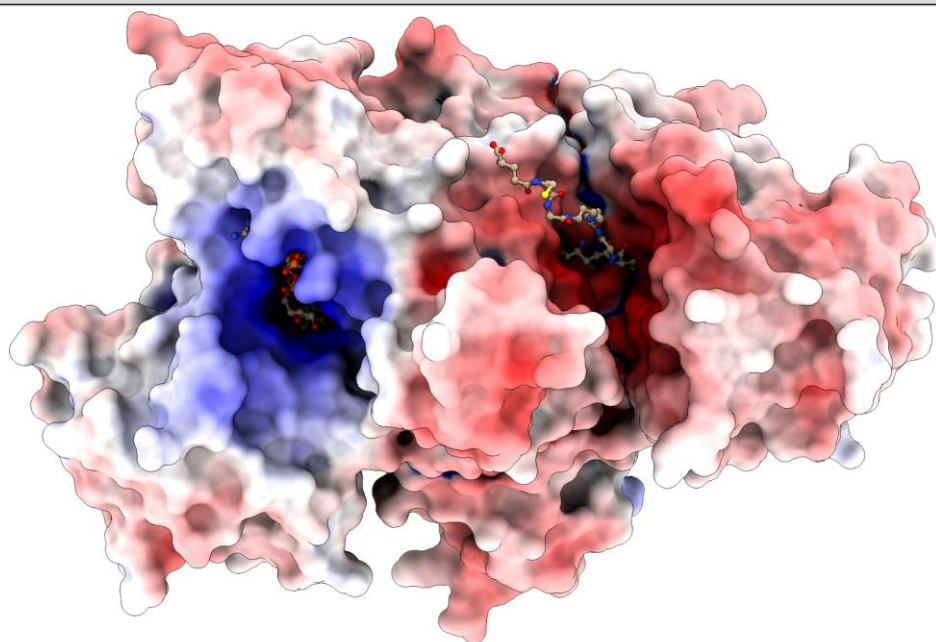


Figura 23 - Análise comparativa da estrutura 3D da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*. Comparação do modelo tridimensional da tripanotiona redutase (TR) de *Leishmania tarentolae* construída por modelagem comparativa e seu molde tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* (PDB ID: 4ADW). As estruturas apresentam alta conservação estrutural com raiz do desvio quadrático médio (RMSD) de 0,25 Å. A qualidade estrutural do modelo e do molde foi avaliada de acordo com as pontuações do MolProbity (3,3 e 2,9 para TR de *Leishmania tarentolae* e *Leishmania infantum*, respectivamente) e QMean (-2,0 e -2,3 para TR de *Leishmania tarentolae* e *Leishmania infantum*, respectivamente).

4.5 Análise comparativa da superfície eletrostática da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*

Com o intuito de verificar se haveria diferenças na superfície eletrostática da estrutura tridimensional da TR de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, foi realizada uma análise do potencial eletrostático da enzima através do programa APBS (BAKER *et al.* 2001), observada na figura 24. Foram visualizadas diferenças na superfície de potencial eletrostático da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* em um raio de 15 Å da tripanotiona (Figura 25), onde a superfície eletrostática do sítio catalítico da TR de *Leishmania tarentolae* apresenta-se mais positiva quando comparada com a superfície eletrostática do sítio catalítico da TR de *Leishmania infantum*. Além disso os aminoácidos pertencentes ao sítio catalítico da tripanotiona redutase das duas espécies de *Leishmania* foram analisados e foi constatado que alguns resíduos em um raio de 15 Å da tripanotiona são diferentes entre as enzimas (Figura 25). Em *Leishmania infantum*, é possível observar a presença do aminoácido ASP-116 e LYS-240, já em *L. tarentolae*, eles não estão presentes. Em *Leishmania tarentolae*, o aminoácido ALA-102 está presente, já em *Leishmania infantum*, ele não está interagindo (Figura 25).

Tripanotiona redutase: *Leishmania infantum*



Tripanotiona redutase: *Leishmania tarentolae*

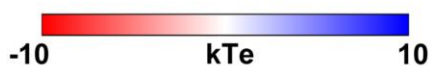
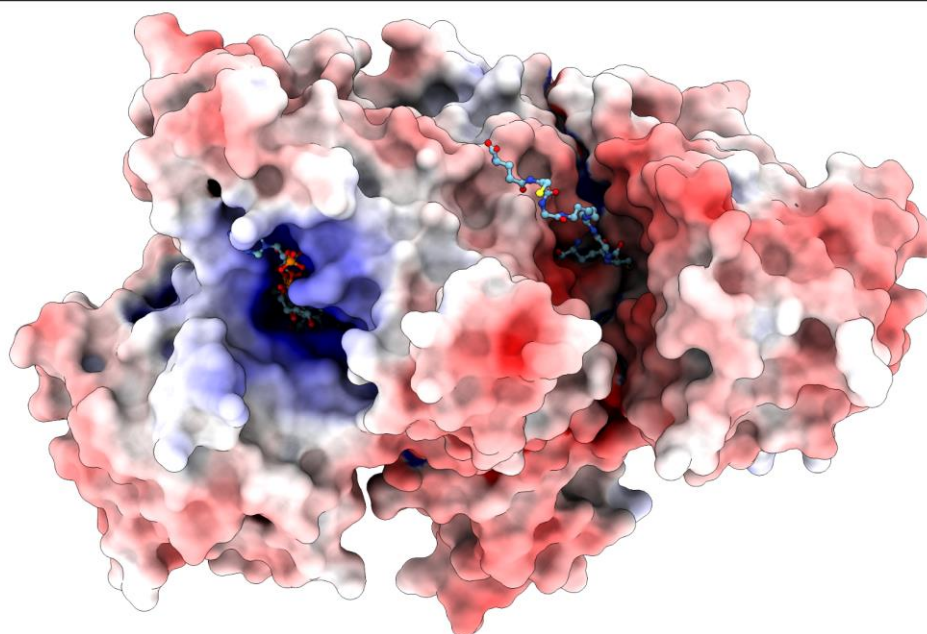
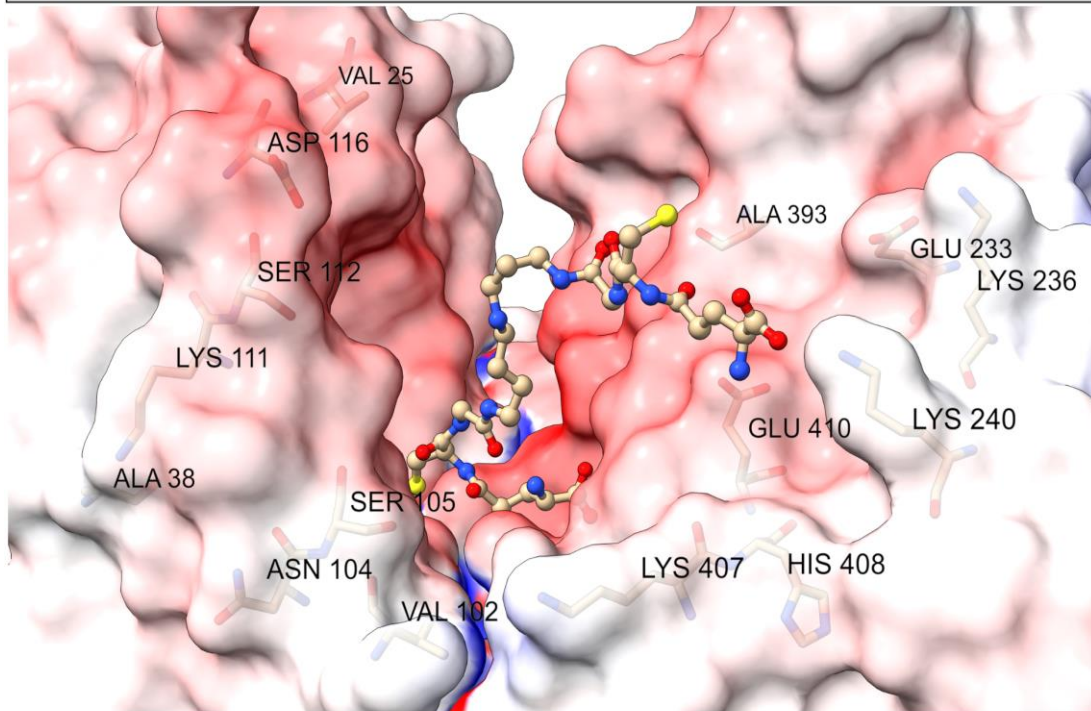


Figura 24 - Superfície de potencial eletrostático da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*. Comparação da superfície eletrostática da estrutura tridimensional da tripanotiona redutase (TR) de *Leishmania tarentolae* e tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* (PDB ID: 4ADW). A análise do potencial eletrostático foi realizada através do programa APBS. A superfície eletrostática do sítio catalítico da TR de *Leishmania tarentolae* apresenta-se mais positiva quando comparada com a superfície eletrostática do sítio catalítico da TR de *Leishmania infantum*.

Tripanotiona redutase: *Leishmania infantum*



Tripanotiona redutase: *Leishmania tarentolae*

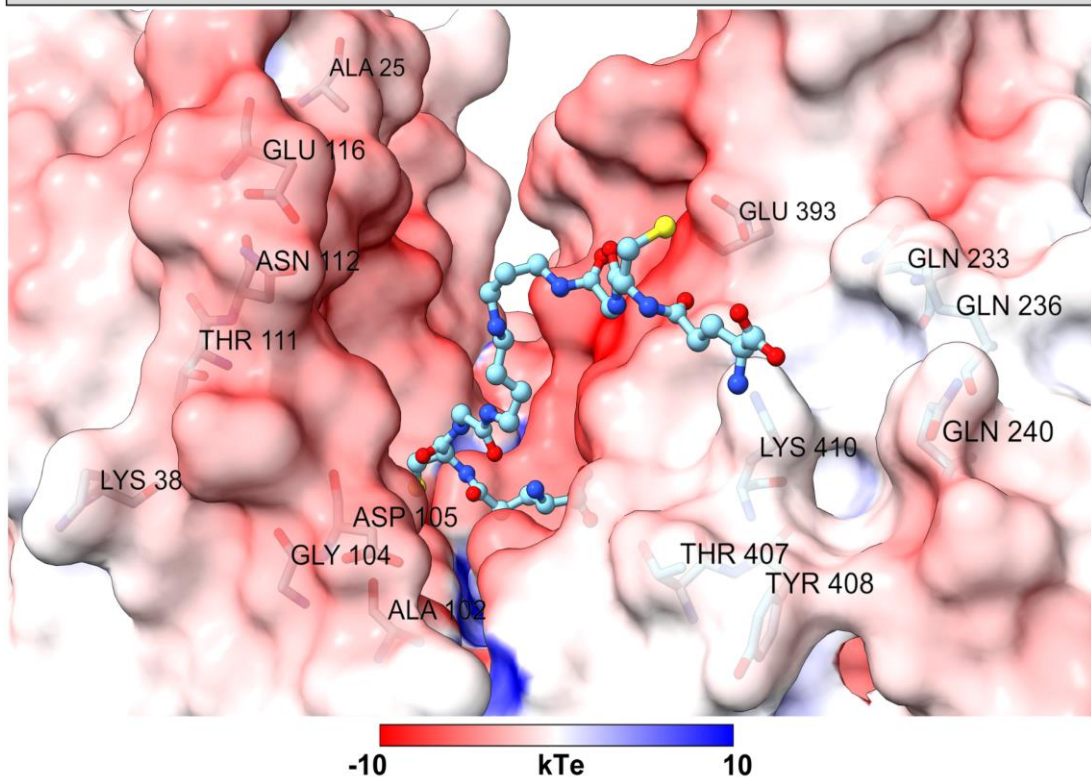


Figura 25 - Superfície de potencial eletrostático da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*. Destaque na diferença da superfície de potencial eletrostático da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* em um raio de 15 Å da tripanotiona. Apenas estão destacados os resíduos que são diferentes entre as espécies de *Leishmania*.

Além da análise da superfície eletrostática na estrutura tridimensional da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, também foi realizado um alinhamento entre as sequências de aminoácidos da TR das duas espécies de *Leishmania* colorido de acordo com o potencial eletrostático. Na figura 26, é possível observar os resíduos que são diferentes entre as espécies de *Leishmania* e que estão em um raio de 15 Å da tripanotona destacados pelos triângulos pretos. Além disso, os aminoácidos representados em vermelho, branco e azul correspondem aos potenciais ácido, neutro e básico, respectivamente.

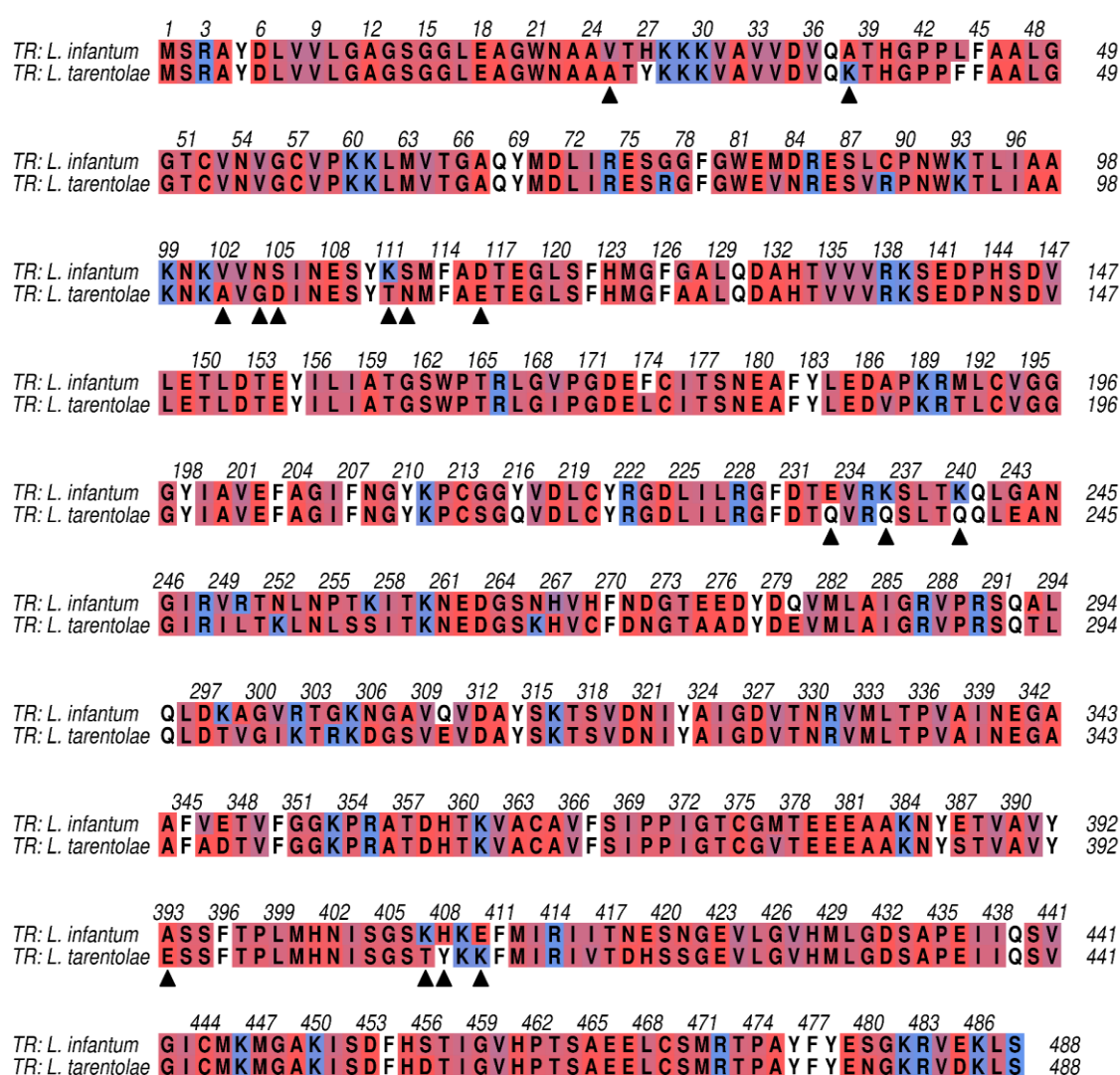


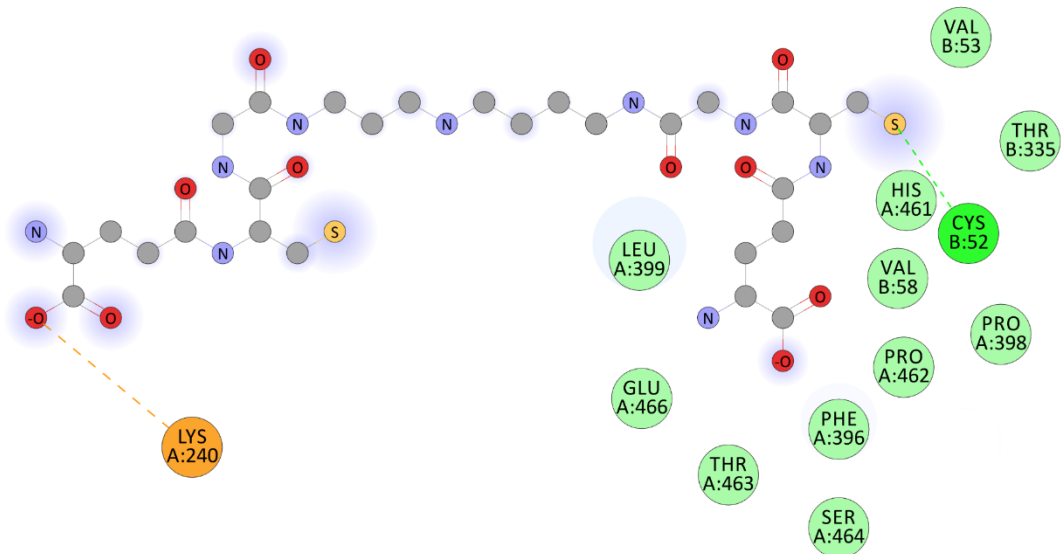
Figura 26 - Alinhamento sequencial entre a tripanotona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* colorido de acordo com o potencial eletrostático. Vermelho, branco e azul correspondem aos potenciais ácido, neutro e básico, respectivamente. Triângulos pretos representam os resíduos que são diferentes entre as espécies de *Leishmania* e que estão em um raio de 15 Å da tripanotona.

4.6 Comparação entre o mapa de interação intermolecular entre a tripanotiona e tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*

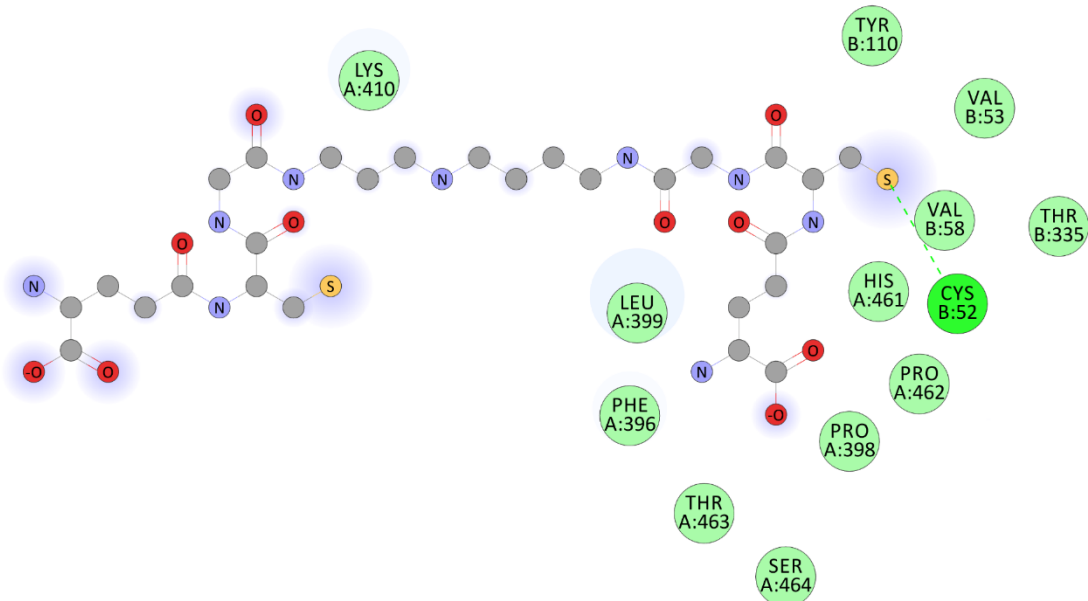
Nos resultados anteriores, constatou-se que há diferenças na superfície eletrostática da TR de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, principalmente no sítio catalítico. Além disso, foi observado que alguns aminoácidos em um raio de 15 Å da tripanotiona são diferentes. Dessa forma, o próximo passo foi verificar as interações intermoleculares entre a tripanotiona e a tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, que podem ser observadas na figura 27. Na interação entre a tripanotiona redutase e a tripanotiona de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, é possível observar que alguns aminoácidos são diferentes. Em *Leishmania infantum*, verifica-se a presença dos aminoácidos GLU-466 e LYS-240, já em *L. tarentolae*, eles não estão presentes. Em *Leishmania tarentolae*, os aminoácidos LYS-410 e TYR-110 estão presentes, já em *Leishmania infantum*, eles não estão interagindo.

Além disso, a Lys-240 de *Leishmania infantum* possui uma interação do tipo carga atrativa pela tripanotiona, contudo, esta interação não foi observada na tripanotiona redutase de *Leishmania tarentolae*.

Tripanotona redutase: *Leishmania infantum*



Tripanotona redutase: *Leishmania tarentolae*



Van der Waals Conventional Hydrogen Bond Attractive Charge

Figura 27 - Comparação entre o mapa de interação intermolecular entre a tripanotona e tripanotona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*. Os mapas de interação 2D foram gerados usando o Discovery Studio Visualizer 2017. Destaque para Lys-240 de *Leishmania infantum* que possui uma interação do tipo carga atrativa pela tripanotona. Em *Leishmania tarentolae* o resíduo na posição 240 é uma glutamina.

4.7 Amplificação do gene tripanotiona redutase

A fim de determinar a possível participação da tripanotiona redutase na infectividade de parasitos de *Leishmania* infectivos ao homem, uma vez que houve uma diferença na sua atividade enzimática, nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos e na estrutura tridimensional da TR de parasitos patogênicos e não patogênicos a mamíferos, o próximo passo do trabalho foi superexpressar esta enzima em *Leishmania infantum*. Foi realizada a amplificação do gene da tripanotiona redutase (TR) de *Leishmania infantum* através da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction; PCR).

Os iniciadores desenhados apresentaram o produto da amplificação com uma banda em gel de agarose com tamanho próximo ao descrito na literatura para a tripanotiona redutase, 1476 pb. Os produtos da amplificação estão demonstrados na figura 28. A expressão da tripanotiona redutase foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1%, em cuba horizontal a 80V por 90 minutos.

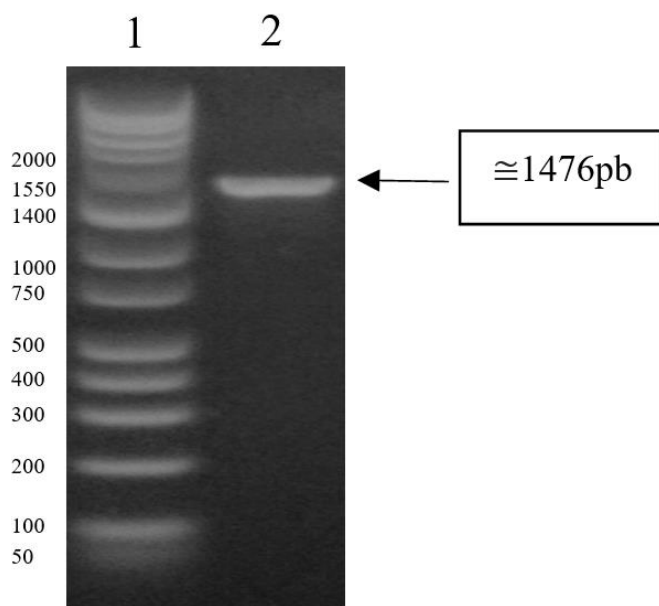


Figura 28 - Eletroforese dos produtos de amplificação em gel de agarose. Eletroforese em gel de agarose 1% revelando os produtos de amplificação do gene da TR obtidos por PCR. 1: Marcador de peso molecular (50-10000pb). 2: Produto de amplificação do gene da TR de *Leishmania infantum*.

4.8 Construção molecular de insertos para expressão das enzimas em estudo

Os clones do gene alvo (triptanotiona redutase) de *Leishmania infantum* gerados através de amplificação por reação em cadeia da polimerase e o vetor pSP72 α NEO α foram incubados com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III overnight à 37°C.

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, em cuba horizontal a 80V por 90 minutos para análise dos fragmentos da digestão. O fragmento de DNA gerado pode ser observado na figura 29. Os fragmentos de DNA referentes a tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e ao vetor pSP72 α NEO α apresentam tamanhos de 1476pb e 5021pb, respectivamente.

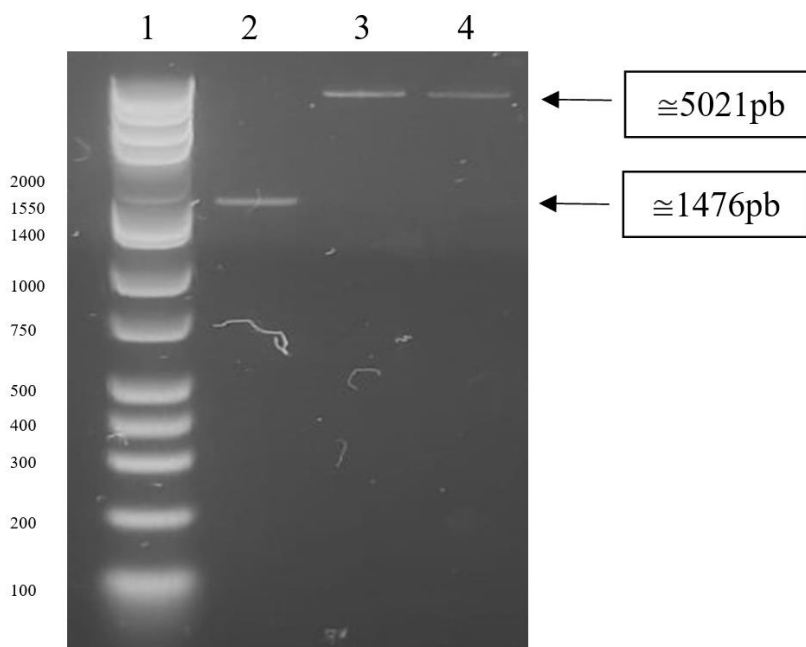


Figura 29 - Eletroforese dos fragmentos de DNA gerados após digestão enzimática. Eletroforese em gel de agarose 1% revelando os fragmentos gerados após digestão com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. 1: Marcador de peso molecular (50-10000pb). 2: digestão da TR de *Leishmania infantum*. 3 e 4: digestão do vetor pSP72 α NEO α .

4.9 Clonagem do gene tripanotiona redutase

Após a digestão com o uso das enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, o fragmento gerado referente a tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* foi cortado do gel de agarose, purificado com o kit Pure Link Quick Gel Extraction (Invitrogen) e, posteriormente, clonado no vetor pSP72 α NEO α .

Em seguida, bactérias competentes DH5 α (*E. coli*) foram transformadas com o vetor recombinante (pSP72 α NEO α + TR de *Leishmania infantum*) por choque térmico. Logo depois da transformação, foi realizada a seleção das colônias com 100 μ g/mL do antibiótico ampicilina e purificação do plasmídeo recombinante com o kit Plasmid Miniprep Purification (Sigma-Aldrich, EUA).

A inserção do gene de interesse no vetor foi verificada através de análise por restrição, que é uma análise a nível macroscópico para verificar se houve sucesso na construção do vetor recombinante. O vetor recombinante foi incubado com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III *overnight* a 37°C.

Com os produtos da digestão, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose, onde observou-se, na figura 30, dois fragmentos de DNA referentes ao vetor pSP72 α NEO α (5021pb) e ao inserto tripanotiona redutase (1476pb), confirmando o sucesso na construção do vetor recombinante.

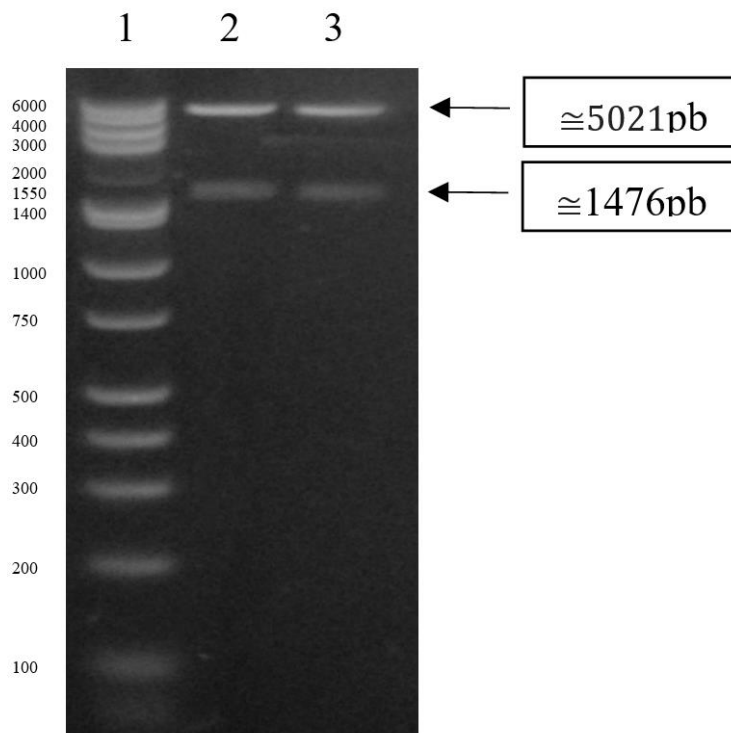


Figura 30 - Produtos de digestão dos clones obtidos a partir de eletroforese em gel de agarose 1%. 1: Marcador de peso molecular (50-10000pb). 2 e 3: Produto da digestão enzimática do vetor recombinante pSP72 α NEO α + TR de *Leishmania infantum*.

4.10 Sequenciamento da tripanotiona redutase

Para verificar se a sequência nucleotídica da tripanotiona redutase foi clonada corretamente no vetor pSP72 α NEO α , o próximo passo foi analisar essa sequência através do método de Sanger para confirmação da clonagem do gene em estudo.

O sequenciamento do gene da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* clonado no vetor pSP72 α NEO α foi realizado com primers específicos e a sequência obtida foi comparada com a sequência da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* depositada no banco de dados TritypDB através de alinhamento com o programa de alinhamento de sequências Clustal.

A figura 31 demonstra o alinhamento obtido com elevado grau de conservação da enzima, demonstrando que a clonagem do gene foi eficiente. Após análise, encontrou-se 97% de similaridade entre a sequência clonada no plasmídeo e a anotada no banco de dados TriTrypDB.

TR_LINFANTUM_TRITRYP	TGGGAGATGGACCGCAATCGCTCTGCCCAACTGGAAGACGCTCATCGCCGCGAAGAAC	300
TR_INFANTUM_VETOR	TCCGAGTGAGGACGC-GATCGCTCTGCCCAACTGGAAGACGCTCATCGCCGCGAAGAAC * ***, . * . . ***, . *****	66
TR_LINFANTUM_TRITRYP	AAGGTGGTGAACAGCATCAACGAGAGCTACAAGAGCATGTTCTGCTGATACGGAGGCGCTC	360
TR_INFANTUM_VETOR	AAGGTGGCGTATACCATCAACGAGAGCTACAAGAGCATGTTCTGCTGATACGGAGGCGCTC ***** * : * *****	126
TR_LINFANTUM_TRITRYP	AGCTTTCACATGGGCTTCGGTGCCCTTCAAGACGCTCACACGGTGGTGGTGCGAAGTCG	420
TR_INFANTUM_VETOR	AGCTTTCACATGGGCTTCGGTGCCCTTCAAGACGCTCACACGGTGGTGGTGCGAAGTCG *****	186
TR_LINFANTUM_TRITRYP	GAAGACCCACACAGCGAGCTGCTGGAGACCCTCGACACGGAGTACATCCTCATTGCCACC	480
TR_INFANTUM_VETOR	GAAGACCCACACAGCGAGCTGCTGGAGACCCTCGACACGGAGTACATCCTCATTGCCACC *****	246
TR_LINFANTUM_TRITRYP	GGCTCCTGGCCGACGCGCTCGGAGTCCCCGGCGACGAGTTCGCATCACGAGCAACGAG	540
TR_INFANTUM_VETOR	GGCTCCTGGCCGACGCGCTCGGAGTCCCCGGCGACGAGTTCGCATCACGAGCAACGAG *****	306
TR_LINFANTUM_TRITRYP	GCCTTCTACCTCGAGGATGCCCCAAGCGGATGCTGTGCGTGGCGGCGGCTACATCGCC	600
TR_INFANTUM_VETOR	GCCTTCTACCTCGAGGATGCCCCAAGCGGATGCTGTGCGTGGCGGCGGCTACATCGCC *****	366
TR_LINFANTUM_TRITRYP	GTTGAGTTTGCCGGCATCTTCAACGGCTACAAGCCCTGCGGTGGCTATGTGACCTGTGC	660
TR_INFANTUM_VETOR	GTTGAGTTTGCCGGCATCTTCAACGGCTACAAGCCCTGCGGTGGCTATGTGACCTGTGC *****	426
TR_LINFANTUM_TRITRYP	TACCGCGGCGATCTTATTTTGC GCGGCTTCGATACAGAGGTGCGCAAGAGCCTGACGAAG	720
TR_INFANTUM_VETOR	TACCGCGGCGATCTTATTTTGC GCGGCTTCGATACAGAGGTGCGCAAGAGCCTGACGAAG *****	486
TR_LINFANTUM_TRITRYP	CAGCTGGGGGCGAAGCGAATAAGAGTGCCTACAAACTTGAACCCGACGAAGTACAGGAAG	780
TR_INFANTUM_VETOR	CAGCTGGGGGCGAAGCGAATAAGAGTGCCTACAAACTTGAACCCGACGAAGTACAGGAAG *****	546
TR_LINFANTUM_TRITRYP	AATGAGGACGGCTCGAATCACGTTCACTTCAACGATGGCAGGAGGAGGACTACGATCAG	840
TR_INFANTUM_VETOR	AATGAGGACGGCTCGAATCACGTTCACTTCAACGATGGCAGGAGGAGGACTACGATCAG *****	606
TR_LINFANTUM_TRITRYP	GTCATGCTCGCGATCGGTGCGGTGCCGCGCTCGCAGGCACTACAGCTCGACAAGGCCGGC	900
TR_INFANTUM_VETOR	GTCATGCTCGCGATCGGTGCGGTGCCGCGCTCGCAGGCACTACAGCTCGACAAGGCCGGC *****	666
TR_LINFANTUM_TRITRYP	GTCCGAACAGGAAAGAACGGTGCCTGCGAGTGCAGCGTATTGCAAGACATCGGTGGAC	960
TR_INFANTUM_VETOR	GTCCGAACAGGAAAGAACGGTGCCTGCGAGTGCAGCGTATTGCAAGACATCGGTGGAC *****	726
TR_LINFANTUM_TRITRYP	AACATCTACGCCATCGGCGACGTGACGAACCGCGTGATGTTGACGCCGGTGGCCATCAAC	1020
TR_INFANTUM_VETOR	AACATCTACGCCATCGGCGACGTGACGAACCGCGTGATGTTGACGCCGGTGGCCATCAAC *****	786
TR_LINFANTUM_TRITRYP	GA-AGGCGCCGCTTTCGTTGAAACCGTCTTCGGTGGCAAGCCCGCGCCACCGACACAC	1079
TR_INFANTUM_VETOR	GAAAGGCGCCGCTTTCGTTGAAACCGTCTTCGGTGGCAAGCCCGCGCCACCGACACAC * * *****	846
TR_LINFANTUM_TRITRYP	GA-AGGTGCGGTGCGCGGTGTTCTCCATACCGCCGATCGGCACGTGCGGCATGACGGAGG	1138
TR_INFANTUM_VETOR	GAAAGGTCGCGTGC GCGGTGTTCTCCATACCGCCGATCGGCACGTGCGGCATGACGGAGG * * *****	906
TR_LINFANTUM_TRITRYP	AGGAGGCGGCGAAGAATACGAAACCGTGCCTGCGGTGACGCGAGCTCCTTACGCCCTTA	1198
TR_INFANTUM_VETOR	AGGAGGCGGCGAAGAATACGAAACCGTGCCTGCGGTGACGCGAGCTCCTTACGCCCTTA *****	966
TR_LINFANTUM_TRITRYP	TGCACAACATCAGCGCGAGCAAGCACAAGGAATTCATGATCCGCATCATCACGAACGAAT	1258
TR_INFANTUM_VETOR	TGCACA-CATCAGCGCGAGCAAGCACA-GGAATTCATGATCCGCATCATCACGAACGAT- ***** ***** ;	1023
TR_LINFANTUM_TRITRYP	CCAACGGCGAGGTTCTGGGTGTTACATGCTCGGCGACAGTGGCGCTGAGATCATCCAGA	1318
TR_INFANTUM_VETOR	-CCACGGCGAGGTTCTGGGTGTTACATGCTCGGCGACAGTGGCGCTGAGATCATCCAGA * . *****	1082
TR_LINFANTUM_TRITRYP	GCGTCCGCATTTGCATGAAGATGGGTGCCAAGAT-CA-GCGACTTCCACAGCACCATCGG	1376
TR_INFANTUM_VETOR	GCGTCCGCATTTGCATGA-GATGGGTGCCAAGAATCAGCGACCTCCACAGCACATTCGG ***** ***** ; * * ***** . *****	1141
TR_LINFANTUM_TRITRYP	AGT---CCACCC--GACGAGCGCCGAGGAGCTCTGCTCCATGCGCACCCAGCGTACTTC	1431
TR_INFANTUM_VETOR	GAGTTCCACCCGGACCGAGCGCCGAGGAGCTTGGTTCCATGCA-ACCCAGGCGTACTTC .. ***** . ***** * ***** . *****	1200
TR_LINFANTUM_TRITRYP	TACGAGAGTGGCAAGCGCG---TCGAAA-AGCTCAGCAGCAACCTCTGA	1476
TR_INFANTUM_VETOR	TACGAGAGTGGCAAGCGCGTTCGAAAAGACTA----- ***** *****	1234

Figura 31 - Sequenciamento da tripanotona redutase de *Leishmania infantum*. O alinhamento obtido através do programa Clustal demonstrou elevado grau de conservação da TR, apresentando 97% de similaridade. TR_L_INFANTUM_TRITRYP: sequência depositada da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* no banco de dados TriTrypDB. TR_INFANTUM_VETOR: sequência da tripanotona redutase clonada no vetor pSP72αNEOα.

4.11 Geração de linhagens geneticamente modificadas

Uma vez que a clonagem da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* no vetor foi confirmada e o sequenciamento demonstrou elevado grau de conservação do gene de interesse, promastigotas de *Leishmania infantum* foram transfectadas por eletroporação, recebendo 5µg do vetor recombinante (pSP72αNEOα + TR de *Leishmania infantum*) ou somente o vetor (pSP72αNEOα).

A confirmação da inserção do vetor recombinante nas promastigotas de *Leishmania infantum* foi realizada por reação em cadeia da polimerase, utilizando o primer *forward* específico para neomicina (gene de resistência do vetor) e *reverse* específico para tripanotona redutase de *Leishmania infantum*.

Na figura 32, observa-se a confirmação da inserção do vetor recombinante em *Leishmania infantum*. No poço 1, podemos observar o produto de amplificação do vetor recombinante (pSP72αNEOα + TR de *Leishmania infantum*) e no poço 2 o produto de amplificação do DNA extraído de promastigotas de *Leishmania infantum* transfectadas com o vetor recombinante.

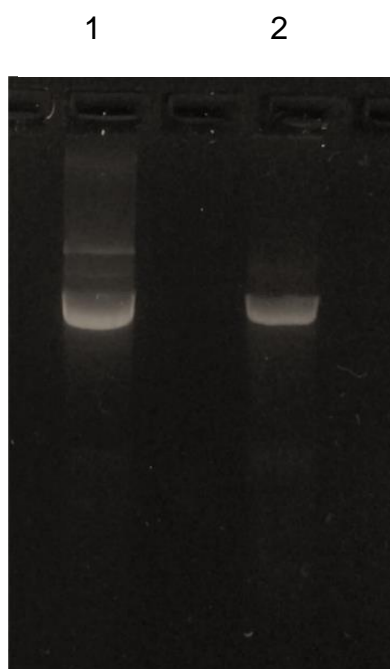


Figura 32 - Confirmação da inserção do vetor recombinante em *Leishmania infantum*. Eletroforese em gel de agarose 1% revelando os produtos de amplificação da PCR. 1: Produto de amplificação do vetor recombinante (controle positivo). 2: Produto de amplificação do vetor recombinante inserido em promastigotas de *Leishmania infantum*.

4.12 Atividade da enzima tripanotona redutase em parasitos selvagens e mutantes

A superexpressão da TR em promastigotas de *Leishmania infantum* foi confirmada através do método de Ellman, onde foi possível observar a atividade da TR de promastigotas de *Leishmania infantum* selvagens (LiWT), transfectadas com o plasmídeo pSP72 α NEO α vazio (LiPSP) e transfectadas com o vetor recombinante pSP72 α NEO α + TR de *Leishmania infantum* (LiTR).

Conforme demonstrado na figura 33, houve um aumento significativo da atividade da TR nas células que superexpressam o gene da TR, 6 vezes maior em relação aos parasitos LiWT e 13 vezes maior em relação ao grupo LiPSP. Os grupos LiWT e LiPSP não apresentaram diferença significativa na atividade da TR.

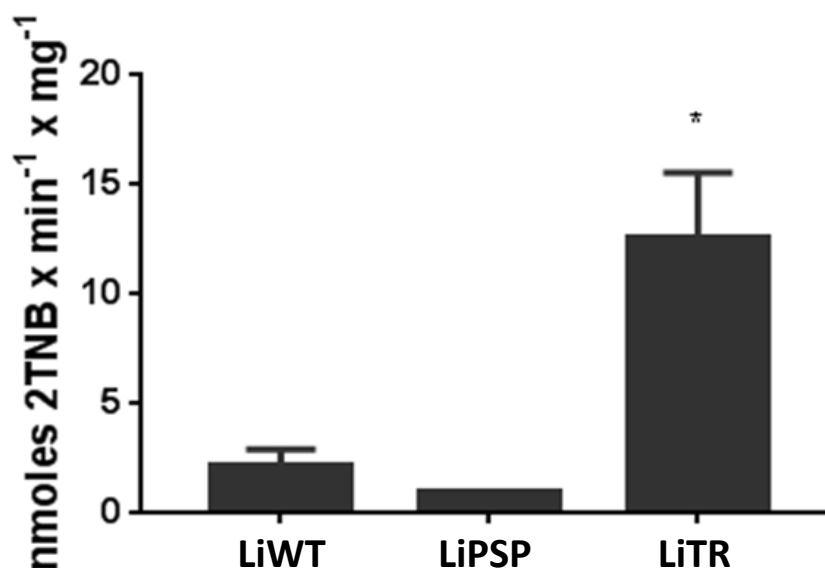


Figura 33 - Atividade da TR em promastigotas de *Leishmania infantum* selvagens e mutantes. A atividade da TR foi avaliada pelo método de Ellman. Frações solúveis foram obtidas dos diferentes grupos. Dados expressos através da média \pm erro padrão da taxa de formação de 2TNB expresso na forma de nmoles 2TNB x min⁻¹ x mg⁻¹ de 2 experimentos independentes (n=2). Diferença significativa em relação aos demais grupos * p<0,005. LiWT = promastigotas de *Leishmania infantum* selvagens. LiPSP = transfectadas com o plasmídeo pSP72 α NEO α vazio. LiTR = transfectadas com o vetor recombinante.

4.13 Avaliação do papel da tripanotona redutase na infectividade *in vitro*.

O papel biológico da tripanotona redutase foi investigado analisando a infectividade das promastigotas transfectadas com o vetor recombinante da TR (LiTR) e comparando com os demais grupos (LiWT = promastigotas de *Leishmania infantum* selvagens, LiPSP = transfectadas com o plasmídeo pSP72 α NEO α vazio). Macrófagos peritoneais murinos foram plaqueados e infectados com promastigotas de LiWT, LiPSP ou LiTR por 24 ou 48 horas. Em seguida, o índice de infecção foi

determinado pela contagem de pelo menos 150 macrófagos em cada grupo. Em 24 horas (Figura 34A) notou-se entre os grupos LiWT e LiTR um aumento de 5 vezes e, em 48 horas (Figura 34B), um aumento de 6 vezes no índice de infecção. É importante ressaltar que essa diferença foi mantida em relação aos grupos LiTR e LiPSP e não houve diferença estatística entre os grupos LiWT e LiPSP.

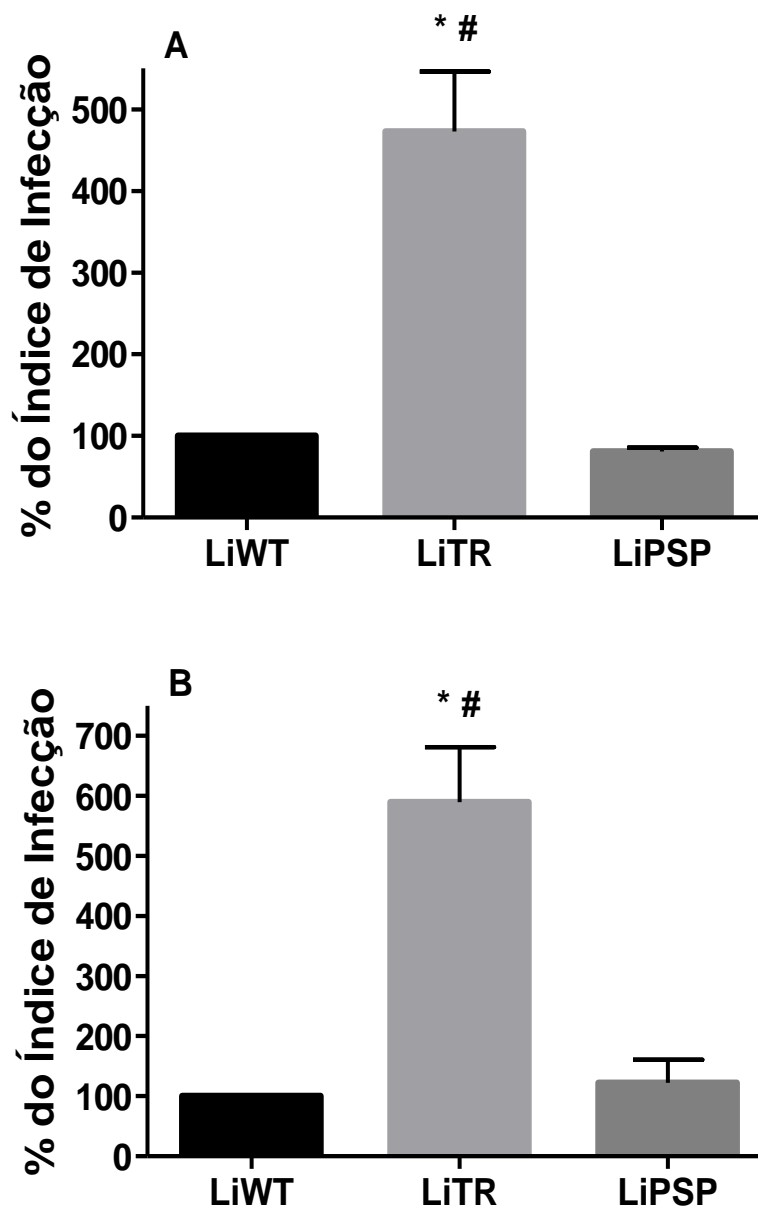


Figura 34 - Avaliação do efeito da superexpressão da TR na infectividade de *Leishmania infantum*. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de LiWT, LiTR ou LiPSP por 5 horas (3:1 promastigota:macrófago) e em seguida incubados por 24 (A) e 48 horas (B) a 37°C e 5% CO₂. Os dados expressam os valores normalizados para o índice de infecção de 2 experimentos independentes (n=2). ANOVA <0,0001. * diferença significativa em relação ao grupo LiWT. # diferença significativa em relação ao grupo LiPSP. LiWT = promastigotas de *Leishmania infantum* selvagens. LiPSP = transfectadas com o plasmídeo pSP72αNEOα vazio. LiTR = transfectadas com o vetor recombinante.

4.14 Avaliação da metaciclo gênese de parasitos selvagens e mutantes de *Leishmania infantum* e atividade da TR

Para avaliar se o aumento na infectividade (Figura 34) poderia ter sido proporcionado por um aumento na população de promastigotas metacíclicas de *Leishmania infantum*, a porcentagem de promastigotas metacíclicas foi avaliada nos grupos selvagens ou mutantes.

Parasitos de *Leishmania infantum* selvagens ou mutantes foram cultivados por um período de 96 horas. Após esse tempo, parasitos procíclicos e metacíclicos foram separados através do gradiente de Ficoll e foi observado que os parasitos superexpressos com a tripanotona redutase obtiveram um aumento de 2,7 vezes de promastigotas metacíclicas comparado com os parasitos selvagens LiWT e 3,6 vezes em relação aos parasitos LiPSP (Figura 35). Além disso, também avaliamos a atividade da tripanotona redutase dos parasitos selvagens e mutantes metacíclicos. Foi observado que os parasitos LiTR metacíclicos obtiveram um aumento da atividade enzimática de aproximadamente 5,7 vezes em relação aos parasitos LiWT metacíclicos e 10 vezes em relação aos parasitos LiPSP metacíclicos (Figura 36).

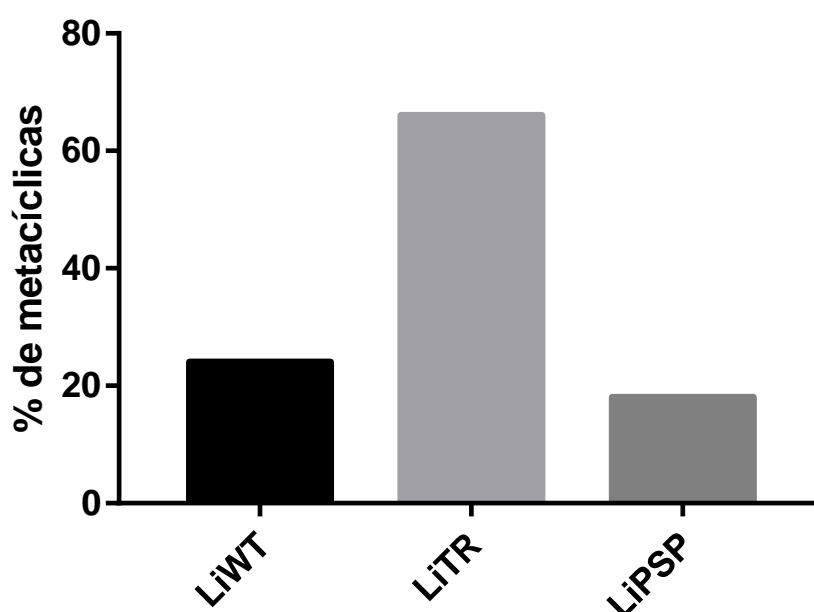


Figura 35 – Metaciclo gênese de promastigotas de *Leishmania infantum* selvagens e mutantes. Promastigotas de *Leishmania infantum* selvagens ou mutantes foram cultivadas em meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino por 96 horas em estufa BOD a 26°C. Os parasitos foram separados por gradiente de Ficoll e as promastigotas metacíclicas foram contadas em câmara de Neubauer. Os dados expressam os valores de 1 experimento independente (n=1). LiWT = promastigotas de *Leishmania infantum* selvagens. LiTR = promastigotas de *Leishmania infantum* transfectadas com o vetor recombinante. LiPSP = promastigotas de *Leishmania infantum* transfectadas com o plasmídeo pSP72aNEOα vazio.

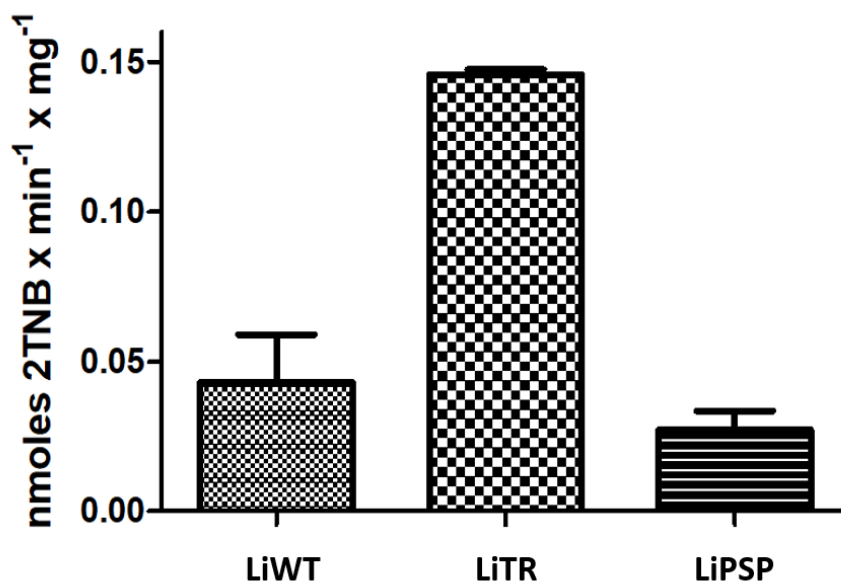


Figura 36 - Atividade da TR em promastigotas de *Leishmania infantum* selvagens e mutantes metacíclicas. A atividade da TR foi analisada pelo método de Ellman. Para isso, foi obtido a fração solúvel dos diferentes grupos. Dados expressos através da média \pm desvio padrão da taxa de formação de 2TNB expresso na forma de nmoles 2TNB x min⁻¹ x mg⁻¹ de 1 experimento independente (n=1). LiWT = promastigotas de *Leishmania infantum* selvagens. LiTR = promastigotas de *Leishmania infantum* transfectadas com o vetor recombinante. LiPSP = promastigotas de *Leishmania infantum* transfectadas com o plasmídeo pSP72 α NEO α vazio.

4.15 Geração de linhagens geneticamente modificadas

Para explorar a participação da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* na infectividade, o próximo passo do trabalho foi expressar a tripanotona redutase de *Leishmania infantum*, um parasito patogênico a mamíferos, em *Leishmania tarentolae*, um parasito não patogênico a mamíferos a fim de verificar se os parasitos transfectados de *Leishmania tarentolae* se tornarão capazes de infectar células de mamíferos. Promastigotas de *Leishmania tarentolae* foram transfectadas por eletroporação com 5 μ g do vetor recombinante construído com a tripanotona redutase de *Leishmania infantum* (pSP72 α NEO α + TR de *Leishmania infantum*) ou somente com o vetor (pSP72 α NEO α). A confirmação da inserção do vetor recombinante nas promastigotas de *Leishmania tarentolae* foi realizada por reação em cadeia da polimerase, utilizando o primer *forward* específico para neomicina (gene de resistência do vetor) e *reverse* específico para tripanotona redutase de *Leishmania infantum*. Na figura 37, observa-se a confirmação da inserção do vetor recombinante em *Leishmania tarentolae*.

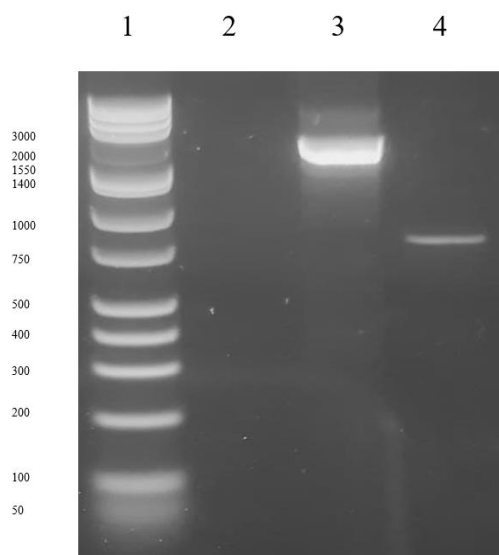


Figura 37 - Confirmação da inserção do vetor recombinante em *Leishmania tarentolae*. Eletroforese em gel de agarose 1% revelando os produtos de amplificação da PCR. 1: Marcador de peso molecular (50-10000pb). 2: Produto de amplificação de promastigotas de *Leishmania tarentolae* selvagens (controle negativo). 3: Produto de amplificação do vetor inserido em promastigotas de *Leishmania tarentolae*. 4: Produto de amplificação do gene de resistência a neomicina de promastigotas de *Leishmania tarentolae* transfectadas apenas com o vetor pSP72 α NEO α .

4.16 Atividade da enzima tripanotiona redutase em parasitos selvagens e mutantes

A expressão da TR de *Leishmania infantum* em promastigotas de *Leishmania tarentolae* foi confirmada pela atividade da TR de promastigotas de *Leishmania tarentolae* selvagens (LtWT) e transfectadas com o vetor recombinante pSP72 α NEO α + TR de *Leishmania infantum* (LtTRinf).

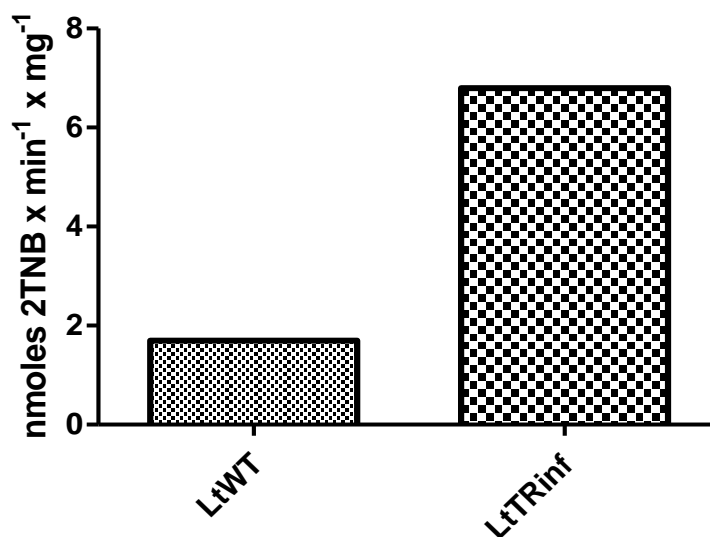


Figura 38 - Atividade da TR em promastigotas de *Leishmania tarentolae* selvagens e mutantes. A atividade da TR foi avaliada pelo método de Ellman. Para isso, foi obtido a fração solúvel dos diferentes grupos. Dados expressos através da média \pm erro padrão da taxa de formação de 2TNB expresso na forma de nmoles 2TNB x min⁻¹ x mg⁻¹ de 1 experimento independente (n=1). LtWT = promastigotas de *Leishmania tarentolae* selvagens. LtTRinf = promastigotas de *Leishmania tarentolae* transfectadas com o vetor recombinante.

Foi possível observar um aumento significativo da atividade da TR nos parasitos de *Leishmania tarentolae* que expressam a TR de *Leishmania infantum* de aproximadamente 4 vezes em relação aos parasitos LtWT (Figura 38).

4.17 Avaliação do papel da tripanotiona redutase na infectividade *in vitro*.

O papel biológico da tripanotiona redutase foi investigado analisando a infectividade dos parasitos LtTRinf e comparando com os parasitos LtWT. Macrófagos peritoneais murinos foram plaqueados e infectados com promastigotas de LtWT e LtTRinf na proporção de 3:1 parasitos por macrófago, por 24 horas. Em seguida, o índice de infecção foi determinado pela contagem de pelo menos 150 macrófagos em cada grupo. Notamos que houve um aumento de aproximadamente 7 vezes no índice de infecção dos parasitos LtTRinf quando comparados com os parasitos LtWT (Figura 39). O aumento na infectividade desses parasitos pode ser em função do aumento da atividade da TR de *Leishmania infantum* (Figura 38).

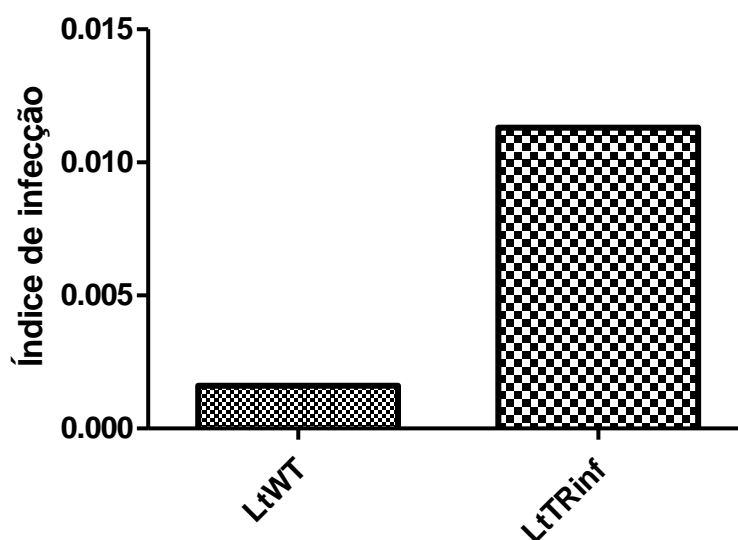


Figura 39 - Avaliação do papel da TR de *Leishmania infantum* na infectividade de *Leishmania tarentolae*. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de LtWT e LtTRinf por 5 horas (3:1 promastigota:macrófago) e em seguida incubados por 24 horas a 37°C e 5% CO₂. Os dados expressam os valores do índice de infecção de 1 experimento independente (n=1). LtWT = promastigotas de *Leishmania tarentolae* selvagens. LtTRinf = promastigotas de *Leishmania tarentolae* transfectadas com o vetor recombinante.

4.18 Amplificação do gene tripanotiona redutase de *Leishmania tarentolae*

Já foi demonstrado que superexpressar a TR de parasitos de *Leishmania infantum* os torna mais infectivos (Figura 34). Dessa forma, a etapa em andamento do trabalho está sendo superexpressar a TR de *Leishmania tarentolae*, a fim de verificar se o aumento da atividade da enzima de um parasito não patogênico a mamíferos também poderia torná-lo infectivo. Foi realizada a amplificação do gene

da tripanotona redutase (TR) de *Leishmania tarentolae* através da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction; PCR). Os iniciadores desenhados apresentaram o produto da amplificação com uma banda em gel de agarose com tamanho próximo ao descrito na literatura para a tripanotona redutase, 1476 pb. Os produtos da amplificação estão demonstrados na figura 40. A expressão da tripanotona redutase foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1%, em cuba horizontal a 80V por 90 minutos.

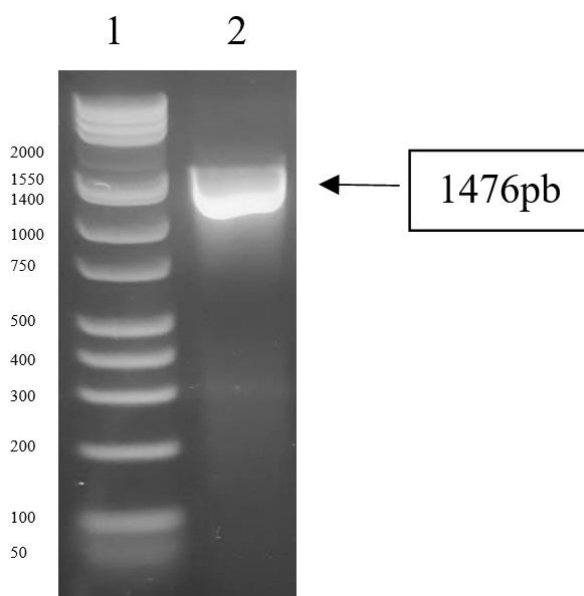


Figura 40 - Eletroforese dos produtos de amplificação em gel de agarose (1%). Eletroforese em gel de agarose 1% revelando os produtos de amplificação do gene da TR obtidos por PCR. 1: Marcador de peso molecular (50-10000pb). 2: Produto de amplificação do gene da TR de *Leishmania tarentolae*.

4.19 Construção molecular de insertos para expressão das enzimas em estudo

Os clones do gene alvo (tripanotona redutase) de *Leishmania tarentolae* foram gerados através de amplificação por reação em cadeia da polimerase e flanqueados por enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III.

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, em cuba horizontal a 80V por 90 minutos para análise dos fragmentos da digestão. O fragmento de DNA gerado pode ser observado na figura 41.

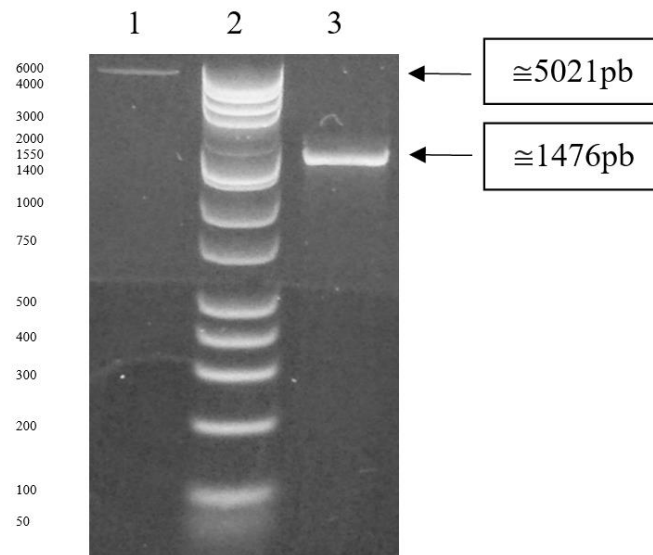


Figura 41 - Eletroforese dos fragmentos de DNA gerados. Eletroforese em gel de agarose 1% revelando os fragmentos gerados após digestão com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. 1: digestão do vetor pSP72αNEOα. 2: Marcador de peso molecular (50-10000pb). 3: digestão da TR de *Leishmania tarentolae*.

5 DISCUSSÃO

Protozoários parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo heteroxênico, ou seja, alternam seu ciclo de vida entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. No hospedeiro vertebrado, esses parasitos sobrevivem em células fagocíticas mononucleares, principalmente em macrófagos. Na tentativa de debelar a infecção, os fagócitos infectados com *Leishmania* produzem intermediários de oxigênio tóxicos, como: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^-). Para sobreviver nesse ambiente intracelular completamente hostil, os parasitos dependem de um sistema de defesa antioxidante que é constituído de um tiol, a tripanotiona redutase (CASTRO-PINTO; FABRINO; LEON, 2014; FAIRLAMB; CERAMI, 1992).

A tripanotiona redutase (TR) é uma enzima essencial para a sobrevivência de tripanossomatídeos, que mantém a tripanotiona oxidada em sua forma reduzida, levando a redução dos níveis de radicais livres de oxigênio (ROS) e contribuindo para a manutenção de um ambiente intracelular redutor. A tripanotiona redutase é o principal mecanismo de defesa dos tripanossomatídeos contra o estresse oxidativo e encontra-se ausente em células de mamíferos (FAIRLAMB; CERAMI, 1992).

Já foi elucidado que a atividade da tripanotiona redutase pode ser associada com a capacidade infectiva de *Leishmania amazonensis*. A atividade da tripanotiona redutase foi avaliada na fração solúvel de promastigotas infectantes, não infectantes e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. A atividade da TR de promastigotas não infectantes foi significativamente menor quando comparada com promastigotas infectantes e amastigotas (CASTRO-PINTO *et al.*, 2004).

Também já foi demonstrado que a tripanotiona redutase é um importante fator de viabilidade e virulência em *Leishmania donovani*. Promastigotas mutantes de *Leishmania donovani knockout* para tripanotiona redutase foram incubadas em macrófagos de humanos, por diferentes tempos e demonstraram uma infectividade reduzida, com uma diminuição da capacidade de sobreviver ao estresse oxidativo no interior de macrófagos (DUMAS *et al.*, 1997).

Em *Trypanosoma brucei*, parasitos mutantes contendo apenas um alelo da TR e com menos de 10 por cento da atividade da enzima foram incapazes de crescer em meio de cultura e se mostraram sensíveis ao peróxido de hidrogênio. Camundongos foram infectados com esses parasitos mutantes e a parasitemia foi

completamente suprimida. Esses dados revelam que a tripanotiona redutase é essencial para infectividade de *Trypanosoma brucei* (KRIEGER *et al.*, 2000).

Em *Leishmania donovani*, parasitos mutantes com a sequência codificante da tripanotiona redutase substituída tiveram capacidade prejudicada de sobreviverem no interior de macrófagos ativado por citocinas, mostrando a importância da tripanotiona redutase para a sobrevivência desses parasitos (TOVAR *et al.*, 1998b).

Além do papel da tripanotiona redutase no controle do balanço redox em tripanossomatídeos, já foi demonstrado que esta enzima possui uma função *moonlighting*, ou seja, participa de outros processos celulares que não sejam relacionados com a sua função principal. Angiulli e colaboradores (2015) demonstraram que a tripanotiona redutase, na ausência do seu substrato fisiológico, pode catalisar a reação de transferência de elétrons do NADPH ao oxigênio molecular, levando a formação de água.

Já foi demonstrado que outras enzimas que participam do sistema antioxidante também podem ter um papel na infectividade de *Leishmania donovani*. Parasitos de *Leishmania donovani* superexpressos com triparedoxina peroxidase tiveram uma capacidade melhorada de resistir a exposição de peróxido de hidrogênio combinado com óxido nítrico. Além disso, demonstraram um aumento da virulência, provocando uma carga parasitária mais elevada em macrófagos em comparação com *Leishmania donovani* transfectada apenas com o vetor (IYER *et al.*, 2008).

Em *Trypanosoma brucei*, já foi demonstrado que o duplo *knockout* condicional dependente de tetraciclina da tripanotiona sintetase-amidase (enzima responsável pela síntese e degradação da tripanotiona reduzida) torna os parasitos incapazes de infectar camundongos na ausência do indutor tetraciclina, mostrando que essa enzima é essencial para a virulência *in vivo* de *Trypanosoma brucei* (WYLLIE *et al.*, 2009).

Nesse contexto, para pesquisar o possível papel da tripanotiona redutase na infectividade de *Leishmania infantum*, o primeiro passo do trabalho foi avaliar a atividade da tripanotiona redutase de parasitos patogênicos e não patogênicos a mamíferos. Na análise da atividade da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum*, espécie patogênica a mamíferos, foi observado que esta enzima possui uma atividade enzimática superior à *Leishmania tarentolae*, espécie não patogênica a mamíferos (Figura 20). A atividade reduzida da enzima nos parasitos não patogênicos a mamíferos pode ser um indício do possível papel da tripanotiona

reduz-se na virulência de parasitos do gênero *Leishmania*. Estudos anteriores já demonstraram que promastigotas de *Leishmania tarentolae* possuem maior sensibilidade ao peróxido de hidrogênio em comparação com parasitos patogênicos para mamíferos, *Leishmania infantum* e *Leishmania major* (RAYMOND *et al.*, 2012). Esta sensibilidade ao peróxido de hidrogênio e a atividade da tripanotona reduzida (Figura 20) podem ser uma justificativa para a incapacidade de parasitos de *Leishmania tarentolae* estabelecerem uma infecção em macrófagos de humanos, uma vez que não seriam capazes sobreviver ao estresse oxidativo provocado pelas células do sistema imune do hospedeiro para debelar a infecção.

Visto que houve uma diferença na atividade enzimática da tripanotona reduzida entre *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, o próximo passo foi verificar se haveria uma diferença das sequências nucleotídicas da tripanotona reduzida desses parasitos. No alinhamento obtido (Figura 21), foi possível observar uma discrepância de 12,74%, onde os polimorfismos foram visualizados ao longo dos 1476 pares de bases da tripanotona reduzida de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*. A diversidade genética observada na tripanotona reduzida das espécies de *Leishmania* em estudo pode justificar as diferenças na atividade enzimática observadas (Figura 20), contudo falta analisar a expressão de mRNA da tripanotona reduzida destes parasitos.

Uma vez que foram observadas diferenças nas sequências nucleotídicas da tripanotona reduzida de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, também verificamos se haveria diferença nas sequências de aminoácidos e na estrutura secundária dessas duas espécies de *Leishmania* (Figura 22). As sequências apresentaram uma porcentagem de similaridade de 87%. Os aminoácidos pertencentes a tríade catalítica cisteína 52 (Cys52), cisteína 57 (Cys57) e histidina 461 (His461) são conservados entre as duas espécies de *Leishmania* e não foram observadas alterações na estrutura secundária, com as alfa-hélices e folhas-beta conservadas.

A estrutura primária de uma proteína determinará como será seu enovelamento em sua estrutura tridimensional (NELSON; COX, 2014). Dessa forma, visto que foram observadas diferenças nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos da tripanotona reduzida de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, o próximo passo do trabalho foi verificar possíveis diferenças na estrutura tridimensional de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*.

Para isto, construímos um modelo tridimensional da tripanotiona redutase de *Leishmania tarentolae* (Figura 23) através de modelagem comparativa, onde foi utilizado a tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* (PDB ID: 4ADW) como molde. A estrutura tridimensional (estrutura 3D) da tripanotiona redutase de *Leishmania tarentolae* obtida demonstrou elevado grau de conservação quando comparada com *Leishmania infantum*, com um valor de RMSD de raiz do desvio quadrático médio (RMSD) de 0,25 Å. Quando as duas proteínas são sobrepostas, é possível calcular o valor do rmsd, que indica diferenças na estrutura tridimensional das proteínas através da distância média entre os átomos das proteínas sobrepostas. O valor do rmsd é 0 Å para estruturas iguais e aumenta ao passo que as diferenças das duas estruturas se elevam (CARUGO; PONGOR, 2008).

Após a análise estrutural da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* (Figura 23), verificamos a superfície eletrostática da TR das duas espécies de *Leishmania*. Analisar o potencial eletrostático de uma proteína é de suma importância para a visualização da distribuição das cargas na sua superfície e para o entendimento das suas interações. Outrossim, as interações eletrostáticas são importantes no enovelamento, estabilidade, flexibilidade e função de proteínas (KUMAR; NUSSINOV, 2002; ZHOU; PANG, 2019). Deste modo, o potencial eletrostático da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae* foi verificado (Figura 24) através do programa APBS, onde observamos diferenças na superfície de potencial eletrostático da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*. Ademais, constatou-se que a superfície eletrostática do sítio catalítico da TR de *Leishmania tarentolae* apresenta-se mais positiva quando comparada com a superfície eletrostática do sítio catalítico da TR de *Leishmania infantum*. Também foram observadas diferenças nos resíduos de aminoácidos, entre a tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, que estão em um raio de 15 Å da tripanotiona (Figura 25). Vale ressaltar a presença do resíduo ASP-116 e LYS-240 em *Leishmania infantum*, que podem ser importantes para o reconhecimento do substrato pela TR. Segundo Henderson e colaboradores (1991), o aminoácido ASP-116 pode contribuir para o reconhecimento do substrato T(S)₂ pela TR em *Trypanosoma congolense* (HENDERSON, G. B. *et al.*, 1991). Também foi realizado um alinhamento dos aminoácidos da tripanotiona redutase das duas espécies de *Leishmania*, que foi colorido de acordo com o potencial eletrostático, onde é possível visualizar os

resíduos que são diferentes entre as espécies de *Leishmania* e que estão em um raio de 15 Å da tripanotiona (Figura 26).

Nos resultados anteriores verificamos as diferenças na estrutura tridimensional e na superfície de potencial eletrostático da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*. Além disso, também estudou-se as interações intermoleculares entre a tripanotiona e a tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, onde observou-se que a tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* possui uma Lys-240 que possui uma interação do tipo carga atrativa pela tripanotiona. Vale destacar que a tripanotiona redutase de *Leishmania tarentolae* não possui essa interação (Figura 27). Baiocco e colaboradores (2013), demonstraram a presença da Lys-240 na entrada da fenda catalítica da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum*, formando uma interação eletrostática com a tripanotiona, podendo desempenhar um papel na condução da tripanotiona aos dois resíduos de cisteína do sítio catalítico (BAIOCCO *et al.*, 2013). A ausência dessa Lys-240 na tripanotiona redutase de *Leishmania tarentolae*, além das outras diferenças na estrutura vistas anteriormente podem ser uma justificativa para baixa atividade enzimática da TR desse parasito.

Além da importância da tripanotiona redutase no controle do balanço redox, fomos investigar o papel desta enzima na virulência de *Leishmania*. Dessa forma, superexpressamos essa enzima em *Leishmania infantum*. Para realizar a superexpressão da enzima, o primeiro passo foi construir o vetor recombinante com o gene de interesse. Logo, realizamos a clonagem da tripanotiona redutase através da construção do vetor pSP72αNEOα com o gene da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum*. Para avaliar se houve sucesso na construção do vetor recombinante, foi realizada digestão por enzimas de restrição e sequenciamento (Figura 30 e 31). Na figura 30, observamos dois fragmentos de DNA referentes ao vetor pSP72αNEOα (5021pb) e ao inserto tripanotiona redutase (1476pb), mostrando que a ligação do inserto com o vetor foi efetiva. Na figura 31, o alinhamento da sequência da tripanotiona redutase clonada no vetor pSP72αNEOα com a sequência da tripanotiona redutase depositada no banco de dados TriTrypDB demonstrou elevado grau de conservação da enzima, mostrando que a sequência da TR clonada no vetor está correta.

A superexpressão foi realizada através da transfecção do vetor recombinante (pSP72αNEOα + TR de *Leishmania infantum*) em promastigotas de *Leishmania infantum*. O sucesso da transfecção dos parasitos de *Leishmania infantum* foi

confirmada por gel de agarose revelando os produtos de amplificação do gene da neomicina e da TR obtidos por PCR (Figura 32). Também analisamos a atividade da TR em *Leishmania infantum* com a superexpressão da TR e observamos um aumento da atividade em 6 vezes quando comparados com os parasitos LiWT e um aumento de 13 vezes em relação aos parasitos LiPSP (Figura 33).

O papel biológico da tripanotona redutase de *Leishmania infantum* na infectividade foi investigado e observamos que os parasitos de *Leishmania infantum* que superexpressam a TR tiveram um aumento significativo no índice de infecção quando estes parasitos foram infectados em macrófagos murinos. Em 24 horas de infecção (Figura 34A), observamos um aumento no índice de infecção de aproximadamente 5 vezes entre os grupos LiWT e LiTR. Em 48 horas de infecção (Figura 34B), foi observado um aumento de aproximadamente 6 vezes no índice de infecção entre os grupos LiWT e LiTR. Esta diferença foi mantida em relação aos grupos LiTR e LiPSP e não houve diferença estatística entre os grupos LiWT e LiPSP. Vale evidenciar que os parasitos superexpressos com a tripanotona redutase quando comparados com o grupo LiWT tiveram um aumento de 6 vezes na atividade da TR (Figura 33) e um aumento de 6 vezes no índice de infecção em 48 horas (Figura 34B), mostrando que o aumento da atividade da TR é proporcional ao aumento da infectividade desses parasitos.

A progressão de promastigotas da fase logarítmica, que são predominantemente procíclicas, para a fase estacionária, que são predominantemente metacíclicas, é acompanhada por um aumento na resistência ao estresse oxidativo provocado pela exposição ao peróxido de hidrogênio (MITTRA; ANDREWS, 2013). Dessa forma, para avaliar se o aumento na infectividade (Figura 34) poderia ter sido proporcionado por um aumento na população de promastigotas metacíclicas de *L. infantum*, uma vez que os parasitos superexpressos com a tripanotona redutase podem ter um possível aumento na resistência ao estresse oxidativo em comparação com os parasitos selvagens, a porcentagem de promastigotas metacíclicas foi avaliada nos grupos selvagens ou mutantes, e observamos que houve um aumento de 2,7 vezes de promastigotas metacíclicas comparado com os parasitos selvagens LiWT e 3,6 vezes em relação aos parasitos LiPSP (Figura 35). Além disso, a atividade da TR dessas promastigotas metacíclicas foi mensurada e foi visto que os parasitos metacíclicos LiTR tiveram um aumento da atividade enzimática de 5,7 vezes em relação aos parasitos LiWT e 10 vezes em relação aos parasitos LiPSP (Figura 36). Tomados em conjunto, os resultados

sugerem que a enzima tripanotona redutase pode ter um papel importante na virulência de parasitos de *L. infantum*.

Já foi demonstrado que parasitos de *Leishmania tarentolae* tem a expressão diminuída ou ausência de genes reportados por desempenhar um papel na defesa antioxidante, além de serem mais sensíveis ao peróxido de hidrogênio comparados com parasitos patogênicos a mamíferos, como *Leishmania infantum* e *Leishmania major* (RAYMOND *et al.*, 2011), o que pode justificar a incapacidade desses parasitos de sobreviverem no interior de macrófagos de mamíferos. Dessa forma, avaliamos a infectividade de parasitos de *L. tarentolae* expressos com a TR de *L. infantum* para verificar se estes se tornam capazes de manter uma infecção em células de mamíferos. Os parasitos mutantes de *L. tarentolae* que expressam a TR de *L. infantum* foram gerados (Figura 37) e a expressão desta enzima foi confirmada através da reação de Ellman, onde foi observado um aumento na atividade da TR de 4 vezes nos parasitos LtTRinf em relação aos parasitos LtWT (Figura 38). Além disso, observamos que os parasitos de *Leishmania tarentolae* que expressam a TR de *Leishmania infantum* tiveram um aumento no índice de infecção quando estes parasitos foram infectados em macrófagos murinos. Observamos que houve um aumento de aproximadamente 7 vezes no índice de infecção dos parasitos LtTRinf quando comparados com os parasitos LtWT (Figura 39). O aumento na infectividade observado pode ser em função do aumento da proteção antioxidante desses parasitos desencadeado pela expressão da TR de *Leishmania infantum* em *Leishmania tarentolae*.

O aumento da infectividade dos parasitos superexpressos com a tripanotona redutase corroboram com os dados demonstrados anteriormente da possível participação da tripanotona redutase na infectividade de tripanossomatídeos (DUMAS *et al.*, 1997; KRIEGER *et al.*, 2000; TOVAR *et al.*, 1998b).

Para investigar se o aumento na infectividade é devido ao aumento da atividade enzimática da TR de parasitos de *L. infantum* ou se é por conta do aumento da atividade da enzima, seja ela de parasitos patogênicos ou não patogênicos a mamíferos, o passo em andamento do trabalho está sendo superexpressar a TR dos parasitos não patogênicos a mamíferos (*L. tarentolae*) em promastigotas de *L. tarentolae*. O vetor recombinante (pSP72 α NEO α + TR de *L. tarentolae*) está sendo construído. O gene da TR de *L. tarentolae* foi amplificado (Figura 40) e a digestão do gene e do vetor pSP72 α NEO α foi realizada (Figura 41)

para posterior ligação do inserto com o vetor e transfecção do vetor recombinante em parasitos de *L. tarentolae*.

Tomados em conjunto, estes dados revelam que a enzima tripanotona redutase, além de controlar o balanço redox em tripanossomatídeos, também pode ter um papel importante na infectividade dos parasitos de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*, contudo, alguns experimentos só foram realizados 1 vez devido a necessidade de quarentena provocada pela pandemia da COVID-19 .

6 Considerações finais

O objetivo do trabalho foi investigar o papel da TR na infectividade de *Leishmania infantum*, comparando a atividade desta enzima com uma espécie de *Leishmania* não patogênica a mamíferos, *Leishmania tarentolae*.

Foram observadas pequenas diferenças na atividade, nas sequências nucleotídicas e de aminoácidos e na estrutura tridimensional da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* e *Leishmania tarentolae*. Além disso, os parasitos de *Leishmania infantum* superexpressos com a tripanotiona redutase obtiveram um aumento significativo no índice de infecção em macrófagos murinos em 24 e 48 horas, mostrando a possível participação da TR na infectividade desses parasitos.

Alguns experimentos foram realizados apenas uma vez, entretanto, tivemos indícios da participação da tripanotiona redutase de *Leishmania infantum* no aumento da população de promastigotas metacíclicas de *Leishmania infantum* superexpressas com a TR e na infectividade de *Leishmania tarentolae*.

Tomados em conjunto, esses dados sugerem que a tripanotiona redutase, além de controlar a homeostase redox, pode ter um papel importante na infectividade de parasitos do gênero *Leishmania*.

7 Referências bibliográficas

- AKHOUNDI, Mohammad *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- ARENAS, Roberto *et al.* Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, [s. l.], v. 6, p. 750, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
- AZIZI, H. *et al.* Searching for virulence factors in the non-pathogenic parasite to humans Leishmania tarentolae. **Parasitology**, [s. l.], v. 136, n. 7, p. 723–735, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182009005873>
- BAIOCCO, Paola *et al.* Inhibition of Leishmania infantum Trypanothione Reductase by Azole-Based Compounds: a Comparative Analysis with Its Physiological Substrate by X-ray Crystallography. **ChemMedChem.**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1175–1183, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300176>
- BATES, Paul A. Revising Leishmania's life cycle. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 3, n. 5, p. 529–530, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0154-2>
- BATTISTA, Theo *et al.* Targeting trypanothione reductase, a key enzyme in the redox trypanosomatid metabolism, to develop new drugs against leishmaniasis and trypanosomiasis. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 1924, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25081924>
- BESTEIRO, Sébastien *et al.* Protein turnover and differentiation in Leishmania. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 1063–1075, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.03.008>
- BLOS, Martin *et al.* Organ-specific and stage-dependent control of Leishmania major infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 1224–1234, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eji.200323825>
- BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- CARUGO, Oliviero; PONGOR, Sándor. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. **Protein Science**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1470–1473, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1110/ps.690101>

CASTRO-PINTO, Denise B. *et al.* Trypanothione reductase activity prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Evaluation of its potential as a therapeutic target. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 57–63, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14756360310001624966>

CASTRO-PINTO, Denise Barçante; FABRINO, Daniela Leite; LEON, Leonor. A Importância de Radicais Livres Durante a Infecção por Protozoários do Gênero *Leishmania*. *In*: LEISHMANIOSES DO CONTINENTE AMERICANO. [S. l.: s. n.], 2014. p. 121–136.

COLMENARES, Maria *et al.* Mechanisms of pathogenesis: Differences amongst *Leishmania* species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 96, n. SUPPL. 1, p. S3, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90044-1](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90044-1)

DE PABLOS, L. M.; FERREIRA, T. R.; WALRAD, P. B. Developmental differentiation in *Leishmania* lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 34, p. 82–89, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.08.004>

DUMAS, Carole *et al.* Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. **EMBO Journal**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 2590–2598, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2590>

FAIRLAMB, Alan H.; CERAMI, Anthony. METABOLISM AND FUNCTIONS OF TRYpanOTHIONE IN THE KINETOPLASTIDA. **Medicina**, [s. l.], v. 59, n. SUPPL. 2, p. 179–187, 1992.

HAMILTON, Chris J. *et al.* Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: Substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 369, n. 3, p. 529–537, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BJ20021298>

HENDERSON, G. B. *et al.* Engineering the substrate specificity of glutathione reductase toward that of trypanothione reduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 88, n. 19, p. 8769–8773, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.19.8769>

HENDERSON, Graeme B *et al.* Substrate Specificity of the Flavoprotein Trypanothione Disulfide Reductase from *Crithidia fasciculata*. **Biochemistry**, [s. l.], v.

26, n. 11, p. 3023–3027, 1987.

IVENS, Alasdair C *et al.* The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, [s. l.], v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

IYER, Jitesh P. *et al.* Crucial role of cytosolic trypanothione peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 372–391, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06154.x>

JAEGER, Timo; FLOHÉ, Leopold. The thiol-based redox networks of pathogens: Unexploited targets in the search for new drugs. **BioFactors**, [s. l.], v. 27, n. 1–4, p. 109–120, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/biof.5520270110>

KALYANARAMAN, Balaraman. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 244–257, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.01.014>

KLATT, Stephan *et al.* *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 1–29, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007424>

KORDOFANI, Y. M. *et al.* Post kala azar dermal leishmaniasis in Sudan. **Eastern Mediterranean health journal = La revue de santé de la Méditerranée orientale = al-Majallah al-ihhiyah li-sharq al-mutawassi**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 1061–1064, 2001.

KRIEGER, S. *et al.* Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 542–552, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01721.x>

KUMAR, Sandeep; NUSSINOV, Ruth. Close Range Electrostatic Interactions in Proteins Close-Range Electrostatic Interactions in Proteins. **ChemBiochem.**, [s. l.], v. 3, p. 604–617, 2002.

MACKEY, Tim K. *et al.* Emerging and reemerging neglected tropical diseases: A review of key characteristics, Risk factors, And the policy and innovation environment. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 949–979, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00045-14>

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014. Disponível em:

<https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>

MUSKUS, Carlos E.; MARÍN VILLA, Marcel. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. **Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 167–177, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1156>

NEUBER, Hubertus. Leishmaniasen. **JDDG - Journal of the German Society of Dermatology**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 754–765, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2008.06809.x>

OLIVIER, Martin *et al.* *Leishmania* virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 14, n. 15, p. 1377–1389, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.014>

PACE, David. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, [s. l.], v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>

PEACOCK, Christopher S. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ng2053>

PIMENTA, Paulo Filemon Paolucci; FREITAS, Vanessa Cabreira de; SECUNDINO, Nágila Francinete Costa. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. *In: TÓPICOS AVANÇADOS EM ENTOMOLOGIA MOLECULAR*. [S. l.: s. n.], 2012. p. 1–45.

PODINOVSKAIA, Maria; DESCOTEAUX, Albert. *Leishmania* and the macrophage: A multifaceted interaction. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.14.103>

RAYMOND, Frédéric *et al.* Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 1131–1147, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr834>

RICHARDSON, John L. *et al.* Improved tricyclic inhibitors of trypanothione reductase by screening and chemical synthesis. **ChemMedChem**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 1333–1340, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900097>

SANTOS, Andre L. S. **Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma***. [S. l.: s. n.], 2014. v. 74 Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9>

SCORZA, Breanna M.; CARVALHO, Edgar M.; WILSON, Mary E. Cutaneous

manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18061296>

SPÄTH, Gerald F.; BEVERLEY, Stephen M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 97–103, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4656>

SUNTER, Jack; GULL, Keith. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 170165, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>

TOVAR, Jorge *et al.* Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: Effect on parasite intracellular survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 95, n. 9, p. 5311–5316, 1998a. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5311>

TOVAR, Jorge *et al.* Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA gene locus. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 653–660, 1998b. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00968.x>

TROUILLER, Patrice *et al.* Drug development for neglected diseases: A deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, [s. l.], v. 359, n. 9324, p. 2188–2194, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09096-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09096-7)

WILHELM, T. J. Visceral leishmaniasis. **Chirurg**, [s. l.], v. 90, n. 10, p. 833–837, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00104-019-0994-1>

WYLLIE, Susan *et al.* Dissecting the essentiality of the bifunctional trypanothione synthetase-amidase in *Trypanosoma brucei* using chemical and genetic methods. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 529–540, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06761.x>

ZHOU, Huan-xiang; PANG, Xiaodong. Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding, and Condensation. **Chem Rev.**, [s. l.], v. 118, n. 4, p. 1691–1741, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00305>.Electrostatic