



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES

Mestrado Stricto Sensu em Saúde Pública

Rodrigo Menezes de Campos

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ANTÍGENOS DE *Leishmania (Leishmania) chagasi*
POTENCIALMENTE ÚTEIS NO CONTROLE DA
LEISHMANIOSE VISCERAL**

RECIFE
2007

Rodrigo Menezes de Campos

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ANTÍGENOS DE *Leishmania (Leishmania) chagasi*
POTENCIALMENTE ÚTEIS NO CONTROLE DA
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, na área de concentração: Controle de Endemias e Métodos Diagnósticos.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto, MSc, PhD.

RECIFE
2007

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

C198c Campos, Rodrigo Menezes de.

Caracterização molecular de antígenos de *Leishmania (Leishmania) chagasi* potencialmente úteis no controle da leishmaniose visceral / Rodrigo Menezes de Campos. — Recife: R. M. de Campos, 2007.

114 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2007.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.

1. Leishmaniose Visceral – prevenção & controle. 2. *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 3. Antígenos. 4. Proteínas de Choque Térmico HSP70. 5. Mitocôndria. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. II. Título.

CDU 616.993.161

Rodrigo Menezes de Campos

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ANTÍGENOS DE *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi* POTENCIALMENTE ÚTEIS NO CONTROLE DA
LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, na área de concentração: Controle de Endemias e Métodos Diagnósticos.

Aprovação em: 08/05/2007

BANCA EXAMINADORA

PhD Osvaldo Pompílio de Melo Neto
CPqAM

PhD Nilma Cintra Leal
CPqAM

PhD Cássia Docena
CPqAM

Dedico este trabalho aos meus amigos que com muita atenção e carinho me incentivaram, nos momentos mais necessários, a continuar este trabalho.

Ao meu pai, Antonio Carlos Leal de Campos, o qual me espelho como exemplo de homem que se baseia na honestidade e na luta pelo bem coletivo.

À minha mãe, Sonia Maria de Menezes, por todo amor, carinho, estímulo e respaldo para a realização e conclusão deste curso de pós-graduação.

Ao meu avó, Antonio Florêncio de Menezes, homem trabalhador que pertenceu ao quadro de funcionários do CPqAM e que ficou muito feliz em saber do meu desenvolvimento científico nesse Centro de Pesquisas renomado e de grande importância para o Estado.

AGRADECIMENTOS

Ao corpo docente dessa instituição que influenciou na minha concepção sobre toda a importância deste trabalho para mim, para o Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) e para a saúde pública do país.

Aos meus colegas de laboratório por todo o apoio e sugestões durante a execução de todas as etapas desta dissertação. Sem citar nomes, agradeço a todos os companheiros.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Clínica e Molecular pela prestação de seus valorosos serviços que ajudaram neste trabalho. Novamente, sem citar nomes, agradeço a todos os componentes desse laboratório.

Ao pessoal da biblioteca do CPqAM por toda a assistência prestada, que auxiliou no desenvolvimento deste trabalho e na minha evolução intelectual. Novamente, sem citar nomes, agradeço a todos os componentes dessa parte da instituição.

A todo o pessoal da Secretaria do NESC (Núcleo de Estudos em Saúde Coletiva – CPqAM) pela ajuda em todas as etapas burocráticas necessárias para o correto cumprimento deste trabalho.

À Comissão de Pós – graduação do CPqAM por todos os créditos depositados neste trabalho desde o projeto inicial até a sua conclusão.

Ao saudoso Professor PhD. Frederico Guilherme Coutinho Abath, Pesquisador Titular do departamento de Imunologia do CPqAM, pelas críticas e sugestões emitidas ao projeto, enriquecendo-o de forma brilhante e inesquecível. Uma perda inestimável (março de 2007).

Ao orientador, PhD. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, por ter me convidado a prestar seleção para o curso *Strictu Senso* de Mestrado em Saúde Pública dessa instituição.

Agradeço ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelo apoio financeiro.

RESUMO

As leishmanioses são doenças antigas prevalentes em vários países, inclusive no Brasil. Dentre estas se destaca a leishmaniose visceral (LV), por se tratar da forma com maior potencial de letalidade. Visando facilitar o controle e o diagnóstico da LV, inúmeros antígenos isolados de diferentes espécies de *Leishmania* são estudados. As proteínas de choque térmico (HSPs), particularmente as de 70 kDa (HSPs70) e suas homólogas mitocondriais (HSP70mts), são abundantes proteínas intracelulares com homólogos presentes em procariotos e eucariotos. A síntese das HSPs, bem como das HSP70mts, está aumentada em situações de estresse, como quando as *Leishmania spp.* estão no interior do hospedeiro vertebrado, tornando as HSP70mts proeminentes indutores de resposta imunológica. A triagem em uma biblioteca de DNA complementar (cDNA) de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, identificou dois clones, denominados de Lc2.1 e Lc2.2, cujos cDNAs são semelhantes aos genes *hsp70mts* já descritos em *L. (L.) major* e *Trypanosoma cruzi*, mas que codificam HSP70mts em *L. (L.) chagasi*. No presente trabalho se analisou a organização cromossômica dos genes *hsp70mts* em *L. (L.) infantum/L. (L.) chagasi* e *L. (L.) major*. Verificou-se também a existência de homólogos em diferentes protozoários da família *Trypanosomatidae*. Em espécies do gênero *Leishmania*, identificaram-se vários genes semelhantes ao clone Lc2.2, enquanto se encontrou apenas um gene semelhante ao clone Lc2.1. Não se encontrou gene semelhante ao clone Lc2.1 no gênero *Trypanosoma*, o que pode indicar uma evolução recente deste tipo de proteína em *Leishmania spp.* Um fragmento do clone Lc2.2, denominado FP2, foi subclonado, e a proteína codificada foi produzida e purificada. Purificaram-se anticorpos anti-proteína FP2, e se analisou a expressão das HSP70mts nativas em extratos de espécies de *Leishmania*, de *Trypanosoma* e em formas representativas do ciclo de vida de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*. Apenas na espécie *L. (L.) amazonensis* observaram-se duas bandas, sendo a menor delas mais expressa nas formas amastigotas. Por fim, examinou-se a distribuição das HSP70mts nativas em células de *L. (L.) chagasi* e se ratificou a distribuição ao longo de toda a mitocôndria.

Palavras-chave: *Leishmania (Leishmania) chagasi*, Proteínas de Choque Térmico, HSP70mt, mitocôndria.

ABSTRACT

The Leishmaniasis are a group of relevant human diseases prevalent in many countries, including Brazil. Within these diseases, the visceral leishmaniasis (VL), or Kala-azar, is the form with the greatest potential for lethality. To facilitate the control and diagnosis of VL, innumerable isolated antigens of different *Leishmania* species have been studied at the molecular level. The heat shock proteins of 70 kDa (HSP70s), and their mitochondrial homologues (mtHSP70s), are abundant intracellular proteins present in prokaryotes and eukaryotes. Their synthesis is increased in stress situations, such as during exposure of *Leishmania* to new thermal conditions inside their vertebrate host, become also prominent inducers of immune response. In previous works, two clones that codify mtHSP70s (Lc2.1 and Lc2.2) from *L. chagasi* have been identified. Here, using genomic sequence database from several species of trypanosomatids, the chromosomic organization of *mthsp70s* genes were analyzed as well as the sequence of their respective proteins. In *L. (L.) infantum/L. (L.) chagasi* multiple genes for the Lc2.2 clone were identified, while only one gene was found to encode Lc2.1 clone. The latter is absent in species of the *Trypanosoma* genus, which may indicate a recent evolution within the *Leishmania* genus. One fragment of the Lc2.2 clone, called FP2, was subcloned, and its protein produced and purified. Anti-FP2 protein antibodies were affinity purified from serum against the Lc2.1 protein previously obtained, and these antibodies recognized both mtHSP70 proteins (Lc2.1 and Lc2.2). These were then used to analyze the expression of mtHSP70s in total protein extracts of *Leishmania* and *Trypanosoma* species and in representative forms of the *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) chagasi* life cycle. Only in *L. (L.) amazonensis* two bands were observed, where the lower band seemed to be the more expressed in amastigote forms. Furthermore, these proteins were analyzed in *L. (L.) chagasi* cells by confocal microscopy, which ratified a distribution throughout the mitochondrial matrix of the parasitic cells.

Key-words: *Leishmania chagasi*, Heat Shock Proteins, mtHSP70s, mitochondria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS	Páginas
Figura 1. Cerâmica pré – Inca indicando lesões causadoras de deformações cutâneas da face em caso de leishmaniose	11
Figura 2. Mapa das áreas endêmicas onde ocorrem as leishmanioses	12
Figura 3. População rural, família de baixa renda, desnutrição	14
Figura 4. Formas da leishmania observados no microscópio	18
Figura 5. Ciclo biológico e modo de transmissão das <i>Leishmania spp.</i>	19
Figura 6. Células imunológicas e citocinas envolvidas na resolução ou na progressão das leishmanioses	21
Figura 7. Os vários tipos de manifestações das leishmanioses	26
Figura 8. Distribuição geográfica mundial da leishmaniose visceral	27
Figura 9. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos componentes das proteínas identificadas em tripanosomatídeos	51
Figura 10. Organização gênica das HSP70mts nas espécies <i>L. (L.) infantum</i> e <i>L. (L.) major</i>	52
Figura 11. Análise filogenética agrupando os supostos homólogos mitocondriais (HSP70mts)	53
Figura 12. Desenho esquemático da estratégia de subclonagem do fragmento FP2	55
Figura 13. Gel agarose 1% com amostras de extrações de DNA	56
Figura 14. Expressão da proteína recombinante FP2	56

Figura 15. Purificação da proteína recombinante FP2	57
Figura 16. Análise das proteínas recombinantes e reatividade dos soros por “western blot”	58
Figura 17. Filme de ECL revelado com anticorpos anti-proteína FP2	59
Figura 18. Filmes de ECL com padrão de reconhecimento da proteína recombinante FP2 e das HSPs70mt nativas em <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) chagasi</i>	60
Figura 19. Imunolocalização das HSP70mts no interior de células de <i>L. (L.) chagasi</i> através de microscopia confocal	61

LISTA DE QUADROS

Páginas

Quadro 1. Posição sistemática do protozoário <i>Leishmania spp.</i>	16
Quadro 2. Espécies conhecidas do gênero <i>Leishmania</i> , do subgênero <i>Leishmania</i> , achadas no Novo Mundo	16
Quadro 3. Espécies conhecidas do gênero <i>Leishmania</i> , do subgênero <i>Viannia</i> , achadas no Novo Mundo	17
Quadro 4. Espécies conhecidas do gênero <i>Leishmania</i> , do subgênero <i>Leishmania</i> , achadas no Velho Mundo	17

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Epidemiologia das Leishmanioses	11
1.1.1 Histórico	11
1.1.2 Quadro atual	12
1.1.3 Características	13
1.1.4 Abrangência	14
1.2 Etiologia das Leishmanioses	15
1.2.1 Agentes	15
1.2.1.1 <i>Ciclo biológico</i>	17
1.2.2 Modo de transmissão das doenças	19
1.2.3 Interações do hospedeiro vertebrado com os parasitas	20
1.2.3.1 <i>Principais células imunológicas envolvidas na resposta às leishmanioses</i> ...	21
1.2.3.2 <i>Algumas moléculas originadas durante infecção por Leishmania spp.</i>	22
1.2.3.3 <i>Mecanismos de escape dos parasitas aos componentes do sistema imune</i>	23
1.2.3.4 <i>Conseqüências patológicas das reações contra Leishmania spp.</i>	24
1.3 O problema da leishmaniose visceral	26
1.3.1 Leishmaniose visceral no Brasil	28
1.3.2 Métodos clássicos de controle da leishmaniose visceral	29
1.4 Os métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral	30
1.5 A imunoprophilaxia contra a leishmaniose visceral	32
1.6 Moléculas antigênicas	34
1.7 Proteínas de choque térmico (HSPs)	35
1.7.1. Família HSP70	36

1.7.1.1 <i>HSP70</i> mitocondriais (<i>HSP70mts</i>)	37
1.8 Alguns resultados anteriores	38
1.8.1 <i>HSP70mts</i> de <i>L. (L.) chagasi</i>	38
2 JUSTIFICATIVA	40
3 PERGUNTA-CONDUTORA	41
4 OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo Geral	41
4.2 Objetivos Específicos	41
5 MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1 Cultura de parasitas	42
5.2 Análises de homólogos às <i>HSP70mts</i> de <i>L. (L.) chagasi</i>	42
5.3 Subclonagem de fragmento do gene <i>hsp70mt</i> de <i>L. (L.) chagasi</i>	43
5.4 Produção e purificação da proteína recombinante FP2	44
5.5 Produção de soros policlonais	45
5.6 Immunoblots e purificação de anticorpos anti-proteína FP2	46
5.7 Localização subcelular das <i>HSP70mts</i> em <i>L. (L.) chagasi</i>	47
6 RESULTADOS	49
6.1 Análises de seqüências genômicas	49
6.2 Estratégias de subclonagem	53
6.3 Expressão em <i>E. coli</i> e purificação da proteína recombinante	56
6.4 Exame das <i>HSP70mts</i> em tripanosomatídeos	57
6.5 Localização protéica	60
7 DISCUSSÃO	62
8 CONCLUSÕES	65
9 PERSPECTIVAS	66
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
11 APÊNDICE	81
APÊNDICE A – Artigo proposto: revista Molecular and Biochemical Parasitology	81
12 ANEXOS	107
ANEXO A – Normas para publicação na revista Molecular and Biochemical Parasitology	107
ANEXO B – Plasmídio pTZ18R. Esquema de sua forma circular e a seqüência linear da região dos sítios de clonagem	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das Leishmanioses

1.1.1 Histórico

Cerâmicas das civilizações pré-Incas do Peru e Equador, datados do início do primeiro século antes de Cristo, já ilustravam representações de lesões da pele e de deformidades faciais humanas possivelmente causadoras de enorme sofrimento para os indivíduos afetados (Figura 1). Da mesma forma, textos documentados do período Inca nos séculos XV e XVI, e durante a colonização espanhola nas Américas, mencionam o risco que corriam os trabalhadores sazonais da agricultura de desenvolver lesões bastante debilitantes, quando retornavam dos Andes, naquela época denominadas de “doenças dos Andes” (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2004?]b).

Essas obras revelam os primeiros indícios de um conjunto de doenças que afetam a humanidade há centenas de anos, sendo recentemente denominadas de leishmanioses. As leishmanioses são, então, doenças bastante antigas, endêmicas e potencialmente letais, que afetam o homem e causam grandes transtornos para os indivíduos acometidos.



Figura 1. Cerâmica pré – Inca indicando lesões causadoras de deformações cutâneas da face em caso de leishmaniose. Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007c.

1.1.2 Quadro atual

A Organização Mundial de Saúde (OMS) informa que as leishmanioses são um grupo de doenças endêmicas com altos índices de morbidade e mortalidade, prevalentes em países tropicais e subtropicais em quatro continentes (Figura 2). As leishmanioses são responsáveis por doze milhões de casos em todo o mundo, com aproximadamente dois milhões de casos novos anuais. Elas colocam em risco mais de trezentos e cinquenta milhões de pessoas (adultos e crianças) em diferentes pontos do mundo, e se estima que cerca de 60.000 mortes por ano sejam devido às leishmanioses (DESJEUX, 2004a; DESJEUX, 2004b; HANDMAN, 2001; ROBERTS; HANDMAN; FOOTE, 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2004?]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2005?]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

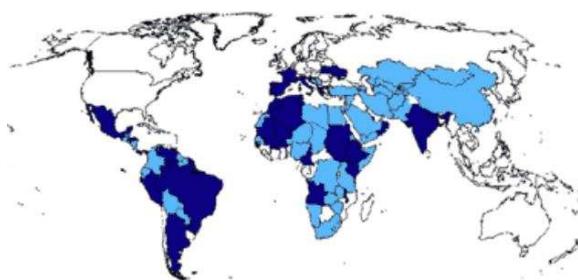


Figura 2. Mapa das áreas endêmicas onde ocorrem as leishmanioses. Em azul claro áreas onde ocorre leishmaniose cutânea e em azul escuro áreas onde ocorre leishmaniose visceral. Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007a.

Diversos trabalhos de pesquisadores vinculados a OMS reconhecem que as leishmanioses têm maior impacto em 88 países, dos quais 66 são do Velho Mundo e 22 do Novo Mundo. Nestes países as leishmanioses estão em intensa atividade dificultando a produtividade e o progresso sócio-econômico. Muitos deles são países em desenvolvimento (países pobres), que de antemão sofrem com sérios problemas econômicos, sociais e de saúde pública, como por exemplo, Afeganistão, África, Iran, Arábia Saudita, Síria, Índia, Bangladesh, Sudão, Brasil, Bolívia e Peru. Nessas nações essas enfermidades vêm ganhando, anualmente, grandes proporções devido a fatores de risco tanto ambientais quanto a fatores culturais/comportamentais (DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004a; HOMEDES, 1995; MURRAY et al., 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2005?]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

De uma forma geral, tem havido ao longo dos anos uma intensa subestimação das leishmanioses como reais problemas de saúde, agravada pelas dificuldades enfrentadas por países que possuem escassos recursos para controlar doenças infecciosas, proporcionando o avanço destas enfermidades (WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2005?]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Por esse motivo, as leishmanioses constituem, atualmente, o segundo grupo mais comum de doenças infecciosas depois da malária, e estão entre as mais importantes doenças infecciosas tropicais combatidas pela Organização Mundial de Saúde. Os encargos que essas doenças trazem persistem devido à existência de grandes obstáculos técnicos, gerenciais, financeiros e políticos ao controle das mesmas, permitindo que as leishmanioses se mantenham como grave problema da saúde pública, sendo bastante onerosas para o desenvolvimento social e para a economia de vários países (ABATH, 2000; DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004a; DESJEUX, 2004b; HOMEDES, 1995; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002a).

1.1.3 Características

Os primeiros estudos sobre a epidemiologia das leishmanioses caracterizaram-nas como doenças exclusivamente rurais, compreendendo lesões que afetam a pele e os órgãos (ou vísceras) (Figura 3). Estas doenças, que eram restritas a comunidades com baixo grau de instrução, com o passar do tempo, também se tornaram comuns em áreas suburbanas e urbanas (GAMA et al., 1998; GONTIJO, C.; MELO, 2004). Essa nova distribuição aconteceu como resultado de problemas que envolvem aspectos ambientais, sociais e econômicos, possivelmente associados aos processos de fluxos populacionais em massa das áreas rurais para os centros urbanos, gerando um potente fator de risco para a disseminação da doença: a urbanização descontrolada (DESJEUX, 2004a; DESJEUX, 2004b; GONTIJO, C.; MELO, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999, 2002a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2005?]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Um fato importante que se destaca dentro destes grupos sociais menos instruídos é a ocorrência de uma susceptibilidade especialmente aumentada para contrair as leishmanioses na faixa etária infantil (GONTIJO, C.; MELO, 2004). Isso ocorre porque dentro destes grupos de baixa renda existem problemas de má condição sanitária e subnutrição, que incrementam a

chance de infecção, o desenvolvimento da doença e acarretam a alta taxa de mortalidade entre os menores de 5 (cinco) anos de idade (ARIAS et al., 1996; CAMPOS JR, 1995; DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004a; DESJEUX, 2004b; DYE; WILLIAMSON, 1993; REY et al., 2005) (Figura 3).



Figura 3. População rural, família de baixa renda, desnutrição. Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999; VISCERAL LEISHMANIASIS, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007b.

Recentemente como resultado de mudanças epidemiológicas, devido a grande disseminação das leishmanioses e com o acontecimento paralelo da epidemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês “human immunodeficiency vírus”), surgiu repentinamente uma superposição entre o aparecimento de indivíduos com leishmanioses e a ocorrência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA – proveniente do inglês “Acquired Immunodeficiency Syndrome” – AIDS), especialmente entre os usuários de drogas intravenosas. Em alguns países, isso tornou ainda mais difícil o controle desse importante problema de saúde pública (ARIAS et al., 1996; DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004a; DESJEUX, 2004b; HANDMAN, 2001; HERWALDT, 1999; ROBERTS; HANDMAN; FOOTE, 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2005?]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

1.1.4 Abrangência

Além dessa componente eco-epidemiológica, dita antroponótica, que versa apenas sobre as doenças no homem, as leishmanioses também têm um caráter zoonótico pelo fato de atingirem uma grande quantidade de mamíferos. São acometidos animais silvestres como a

raposa e diversos roedores, além dos animais domésticos como o cão, os quais podem servir como reservatórios para manutenção do ciclo epidemiológico da doença (ARIAS et al., 1996; DESJEUX, 2001; EL-SAYED et al., 2005; ROBERTS; HANDMAN; FOOTE, 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2005?]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Nesse contexto, vale ressaltar que as leishmanioses são importantes causas de sérias doenças infecciosas em cães. Por isso, vários grupos de pesquisa se esforçam para desenvolver sistemas diagnósticos eficazes para a detectar essas doenças entre os animais caninos e, dessa forma, buscar o seu controle (NEVES, 2005d; RIBEIRO; MICHALICK, 2001; ROSATI et al., 2003; SCALONE et al., 2002).

Desse modo, essas informações constituem e demonstram a complexa rede epidemiológica das leishmanioses. Isso é relevante, principalmente, nos países em desenvolvimento detentores de um baixo nível tecnológico para controlar, de forma independente e efetiva, estas enfermidades nos seus mais variados aspectos (YAMEY, 2002; MOREL et al., 2005).

1.2 Etiologia das Leishmanioses

1.2.1 Agentes

As leishmanioses têm como agentes causadores microorganismos que são parasitas intracelulares obrigatórios capazes de infectar diferentes espécies de mamíferos e nestes se multiplicar. Esses microorganismos foram sistematicamente alocados no grupo dos chamados eucariotos protozoários e são taxonomicamente classificados na Ordem *Kinetoplastida*, Família *Trypanosomatidae*, Gênero *Leishmania*, divididos nos Subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (GONTIJO, B.; CARVALHO, 2003; NEVES, 2005a; REY, 2002; SHAW, 1994) (Quadro 1).

REINO	Protista
FILO	Sarcomastigophora
CLASSE	Zoomastigophorea
ORDEM	Kinetoplastida
FAMÍLIA	Trypanosomatidae
GÊNERO	Leishmania
Subgêneros	Leishmania e Viannia

Quadro 1. Posição sistemática do protozoário *Leishmania spp.* (Adaptado).
Fonte: BEDOR, 2003.

Os membros desta ordem são caracterizados pela presença de uma mitocôndria modificada, distribuída por toda a célula de *Leishmania spp.*, com a presença de uma estrutura chamada cinetoplasto (do inglês “kinetoplast”), de onde provém o nome da ordem. O cinetoplasto é uma região especializada dentro desta mitocôndria, localizado na base do flagelo do parasita, rico em uma rede de DNA circular característica desses microorganismos (GRIMALDI JR; TESH, 1993).

Existem cerca de 30 espécies conhecidas de *Leishmania*, das quais 10 estão presentes no Velho Mundo e as outras 20 no Novo Mundo. Dentre todas estas espécies, especula-se que aproximadamente 20 infectam o homem podendo ocasionar doenças (ROBERTS; JANOVY-JR, 1996; SHAW, 1994) (Quadro 2, Quadro 3 e Quadro 4).

Espécies	Pesquisador(es), Ano
Novo Mundo (Américas)	
Subgênero <i>Leishmania</i>	Safjanova, 1982
<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i> *	Cunha e Chagas, 1937
<i>L. (L.) enriettii</i>	Muniz e Medina, 1948
<i>L. (L.) mexicana</i> *	Biagi, 1953
<i>L. (L.) pifanoi</i> *	Medina e Romero, 1959
<i>L. (L.) hertigi</i>	Herrer, 1971
<i>L. (L.) amazonensis</i> *	Lainson e Shaw, 1972
<i>L. (L.) deanei</i>	Lainson e Shaw, 1977
<i>L. (L.) aristidesi</i>	Lainson e Shaw, 1979
<i>L. (L.) garnhami</i> *	Scorza e cols., 1979
<i>L. (L.) venezuelensis</i> *	Bonfante-Garrido, 1980
<i>L. (L.) fortinii</i>	Yoshida e cols., 1993

Quadro 2. Espécies conhecidas do gênero *Leishmania*, do subgênero *Leishmania*, achadas no Novo Mundo por pesquisadores nos anos indicados. * = espécies que foram encontradas infectando seres humanos (Adaptado).
Fonte: apud FERRAZ JR, 1998.

Espécies	Pesquisador(es), Ano
Novo Mundo (Américas)	
Subgênero <i>Viannia</i>	Lainson e Shaw, 1987
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> *	Viannia, 1911
<i>L. (V.) peruviana</i> *	Vélez, 1913
<i>L. (V.) guyanensis</i> *	Floch, 1954
<i>L. (V.) panamensis</i> *	Lainson e Shaw, 1972
<i>L. (V.) lainsoni</i> *	Silveira e cols., 1987
<i>L. (V.) shawi</i> *	Lainson e cols., 1989
<i>L. (V.) naiffi</i> *	Lainson e Shaw, 1989
<i>L. (V.) colombiensis</i>	Kreutzer e cols., 1991
<i>L. (V.) equatoriensis</i>	Grimaldi e cols., 1992

Quadro 3. Espécies conhecidas do gênero *Leishmania*, do subgênero *Viannia*, achadas no Novo Mundo por pesquisadores nos anos indicados. * = espécies que foram encontradas infectando seres humanos (Adaptado).
Fonte: apud FERRAZ JR, 1998.

Espécies	Pesquisador(es), Ano
Velho Mundo (Europa, África e Ásia)	
Subgênero <i>Leishmania</i>	Saf'janova, 1982
<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i> *	Laveran e Mesnil, 1903 e Ross, 1903
<i>L. (L.) tropica</i> *	Wright, 1903
<i>L. (L.) infantum</i> *	Nicolle, 1954
<i>L. (L.) major</i> *	1914
<i>L. (L.) archibaldi</i> *	1919
<i>L. (L.) gerbilli</i>	1964
<i>L. (L.) aethiopica</i> *	1973
<i>L. (L.) killicki</i> *	1986
<i>L. (L.) arábica</i>	1987
<i>L. (L.) turanica</i>	1990

Quadro 4. Espécies conhecidas do gênero *Leishmania*, do subgênero *Leishmania*, achadas no Velho Mundo por pesquisadores nos anos indicados. * = espécies que foram encontradas infectando seres humanos (Adaptado).
Fonte: apud FERRAZ JR, 1998.

1.2.1.1 Ciclo biológico

O ciclo de vida dos protozoários causadores das leishmanioses é complexo e compreende o desenvolvimento em dois hospedeiros diferentes, um invertebrado e outro vertebrado. Assim, denominou-se que estes protozoários possuem um ciclo evolutivo do tipo heteroxeno. As espécies do gênero *Leishmania* possuem características biológicas que permitem, então, que estas se apresentem essencialmente sob duas formas quando presentes

em seus diferentes hospedeiros. Desse modo, quando são observadas no microscópio óptico, podem se apresentar sob as formas:

- **Amastigotas** – formas arredondadas, e sem flagelo (ou com um curto flagelo), observadas dentro de macrófagos do hospedeiro vertebrado (homem ou cão) infectado; reproduzem-se assexuadamente através de divisão binária longitudinal (NEVES, 2005a; ROBERTS; JANOYVY-JR, 1996) (Figura 4 e Figura 5);
- **Promastigotas** – formas extracelulares alongadas e flageladas observadas no sistema digestivo do hospedeiro invertebrado (mosquito plasmídio), no sangue periférico do hospedeiro vertebrado e nos meios de cultivo (NEVES, 2005a) (Figura 4 e Figura 5).

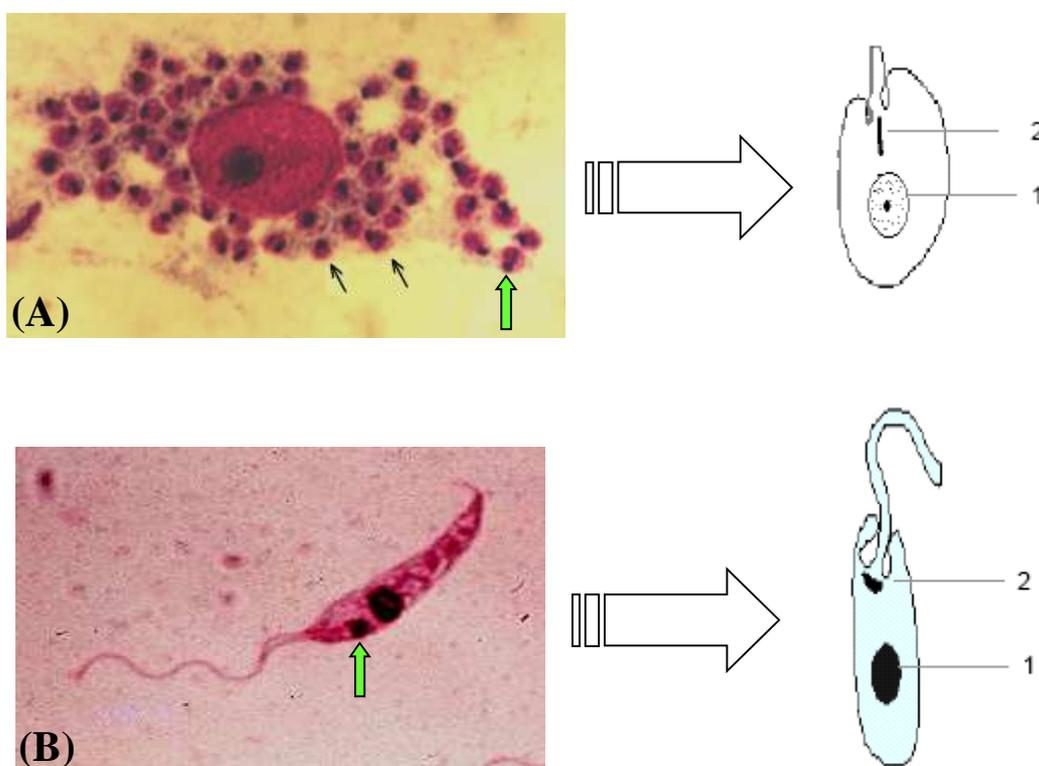


Figura 4. Formas da leishmania observados no microscópio. (A) formas amastigotas dentro de macrófago, indicadas pelas setas pretas. (B) forma promastigota. As setas verdes indicam a estrutura chamada cinetoplasto. Na figura esquemática ao lado o n.º 1 indica o núcleo e o n.º 2 indica o cinetoplasto.

Fontes: (A) amastigotas – <http://www.ufrgs.br/para-site/Imagensatlas/Protozoa/Leishmania.html>; (B) promastigota – LEISHMANIA FACTS, 2006.

Além destas formas fundamentais, evidências apontam para a existência de outros tipos bem definidos de formas evolutivas, dentre as quais se destaca a forma promastigota metacíclica. Esta forma possui características biológicas específicas que a diferenciam da

forma amastigota e da promastigota, como a falta da capacidade de replicação. Ademais, ela é o produto final do desenvolvimento no interior do mosquito plasmídeo e a forma infectiva adaptada para a transmissão aos hospedeiros mamíferos. (AKOPYANTS et al., 2004; COURRET et al., 2002; GOUSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; NEVES, 2005a; RAMOS et al., 2004).

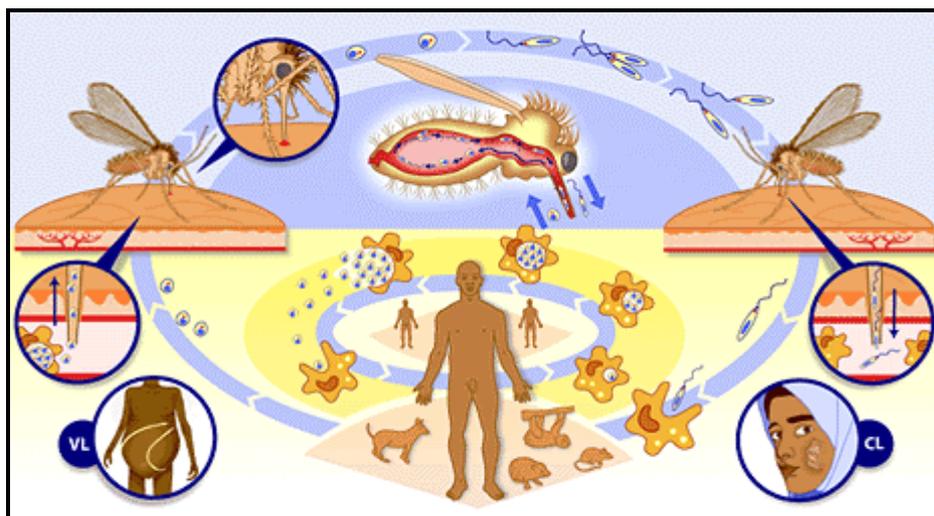


Figura 5. Ciclo biológico e modo de transmissão das *Leishmania spp.* A figura mostra o repasto sanguíneo dos flebotomíneos e a aspiração de células de *Leishmania spp.* no sangue do indivíduo infectado (humano ou animal). As células de *Leishmania spp.* se desenvolvem dentro do trato digestivo do mosquito até atingirem a forma infectante. Esta forma é injetada em outros indivíduos quando o mesmo mosquito exercer novamente o repasto sanguíneo, causando várias formas das leishmanioses nos humanos.

Fonte: LEISHMANIA FACTS, 2006.

1.2.2 Modo de transmissão das doenças

As leishmanioses são basicamente resultantes da transmissão das formas infectantes – promastigotas metacíclicas – para hospedeiros mamíferos, quando o inseto vetor fêmea infectado vai exercer seu hematofagismo (Figura 5). Os hospedeiros invertebrados das espécies de *Leishmania* são dípteros flebotomíneos (subfamília *Phlebotominae*) do gênero *Phlebotomus* (distribuído no Velho Mundo) e do gênero *Lutzomyia* (distribuído no Novo Mundo).

Duas espécies bastante estudadas e que podem ser encontradas no Brasil transmitindo os parasitas são: *Lutzomyia longipalpis* e *L. whitmani*, as quais possuem a

denominação popular de “mosquito palha” (AZEVEDO et al., 1996; BRANDÃO-FILHO et al., 1994; MUTEBI et al., 1999; URIBE, 1999).

1.2.3 Interações do hospedeiro vertebrado com os parasitas

A evolução da doença infecciosa em um indivíduo envolve interações complexas de muitas moléculas (CHAKRABARTY, 1996; HICKS et al., 2000; ILG, 2000), bem como de tipos celulares distintos, entre os parasitas e o hospedeiro (WRIGHT; EL AMIN, 1989).

Dito isso, destaca-se a importância da função fisiológica de um sistema especializado do hospedeiro vertebrado conhecido geralmente como sistema imune, que tem como principal função proteger o hospedeiro vertebrado contra esses parasitas. Não obstante, visto que o sistema imune é capaz de responder de modos distintos e especializados a diferentes parasitas, não é surpreendente que a magnitude e o tipo da resposta imune contra os parasitas seja freqüentemente o determinante da evolução e do prognóstico da infecção (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000, p. 350).

Dessa forma, mesmo se sabendo muito sobre as características dos agentes causadores das leishmanioses, e o modo como esses infectam um hospedeiro vertebrado, entende-se hoje que a resposta imune do hospedeiro mamífero também está envolvida nos acontecimentos que se sucedem após a infecção pelo parasita. Estes eventos, em conjunto, podem ocasionar o desenvolvimento para a cura espontânea ou para a progressão dessas doenças (GRIMALDI JR; TESH, 1993; RIVAS et al., 2004), devendo-se salientar que a atuação dos fatores genéticos do hospedeiro vertebrado infectado, como o envolvimento dos genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC – do inglês “Major Histocompatibility Complex”), é extremamente importante durante o desenvolvimento das patologias resultantes da infecção com *Leishmania spp.* (RITTER et al., 2004; ROBERTS; HANDMAN; FOOTE, 2000; MURRAY et al., 2005; CABRERA et al. 1995; GRAB et al. 2004).

1.2.3.1. Principais células imunológicas envolvidas na resposta às leishmanioses

Sabe-se que o tipo de resposta imune protetora eficaz contra a leishmaniose é celular, abrangendo os macrófagos, além de outras células do sistema imunes como os linfócitos do tipo T. Um subtipo específico de linfócito T, denominado linfócito T auxiliar (Ta ou Th, do inglês T “helper”), estaria diretamente comprometido com a resposta imune desenvolvida contra esses parasitas. Este subtipo de linfócito T, caracteristicamente chamado de célula T $CD4^+$, pode ser subdividido em duas subpopulações celulares, a Th1 e a Th2, sendo a subpopulação Th1 capaz de eliminar os parasitas e conferir imunidade, prevenindo uma possível infecção posterior com estes parasitas. Adicionalmente a essas, outras células especificamente envolvidas, após ativação via moléculas secretadas pelas células Th1, são as células T citotóxicas ou $CD8^+$ e as “Natural Killers” (NK), as quais também estão envolvidas na imunidade contra as diferentes espécies de *Leishmania* (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p. 250) (Figura 6).

De maneira contrária, a subpopulação Th2 proporciona susceptibilidade à infecção e a progressão das doenças (Figura 6) (AHMED et al., 2003; GAMA et al. 2004; GRIMALDI JR; TESH, 1993; MURRAY et al., 2005; ROBERTS; HANDMAN; FOOTE, 2000; SOUSSI et al., 2000).

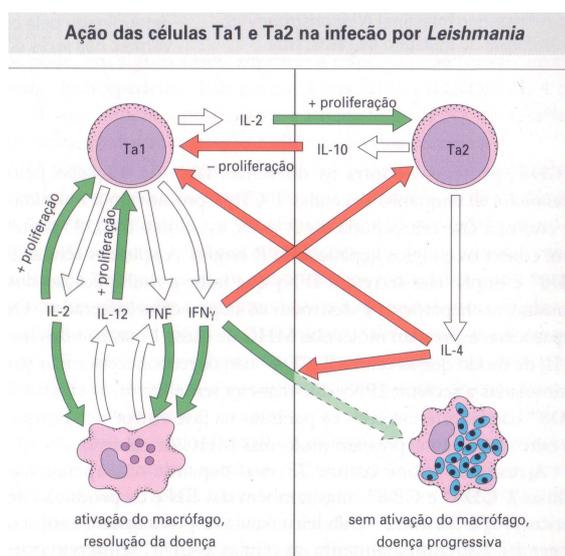


Figura 6. Células imunológicas e citocinas envolvidas na resolução ou na progressão das leishmanioses.

Fonte: ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p. 250.

1.2.3.2 Algumas moléculas originadas durante infecção por *Leishmania* spp.

Um outro componente importante do sistema imune são moléculas solúveis denominadas citocinas, que são secretadas pelas diversas células desse sistema e que funcionam na regulação da resposta imune contra patógenos e substâncias estranhas. Uma vez que as citocinas secretadas pelas células Th1 e Th2 são mutuamente antagonistas, a subpopulação predominante determina o resultado da infecção.

Como exemplo no caso das leishmanioses, o interferon-gama (INF- γ), um tipo de citocina produzida pela célula Th1, induz a destruição de protozoários como *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) donovani*, *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, que parasitam os macrófagos, conferindo resistência à infecção, conforme demonstrado por estudos com *Leishmania* spp. em linhagens murinas e também em humanos (Figura 6) (CAMPOS-NETO et al. 1995; COSTA et al., 1999; GAMA et al., 2004; MACHADO-PINTO et al., 2002; MURRAY et al., 2005; RITTER et al., 2004; ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p.249). Por outro lado, em estudos com camundongos susceptíveis, as células Th2 predominam a medida da progressão da doença com a secreção de Interleucina-4 (IL-4), que inibe a ação do INF- γ (Figura 6) (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p.249; SOUSSI et al., 2000). Já a citocina IL-12 (produzida pelos macrófagos) promove o crescimento de células Th1, a síntese de outras citocinas, como IFN- γ , e suprime o desenvolvimento de células Th2. Segundo relato de Ritter e colaboradores (2004), a IL-12 pode resolver a doença se ministrada a camundongos susceptíveis nas fases iniciais da infecção (Figura 6).

Em humanos as leishmanioses que afetam a pele e as vísceras se caracterizam por uma inibição na síntese de IFN- γ , conseqüente da expressão aumentada de IL-10, a citocina associada às células Th2 que suprime a proliferação e a função das células Th1 (COSTA et al., 1999; GAMA et al., 2004; ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p.250; SEREZANI et al., 2002) (Figura 6). Alguns trabalhos relatam que a susceptibilidade para contrair as leishmanioses está relacionada com a ativação da resposta celular do tipo Th2, com produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; COSTA et al., 1999), e ativação dos linfócitos tipo B para a produção de anticorpos, os quais, neste caso, não atuam eficazmente na indução de imunidade protetora (MURRAY et al., 2005).

Outros produtos moleculares que são gerados pelos macrófagos após a fagocitose são os reativos intermediários do oxigênio e uma potente toxina independente de oxigênio

resultante do metabolismo da L-arginina, o óxido nítrico (NO). As citocinas IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) induzem a síntese do NO pelos macrófagos contribuindo para a resistência do hospedeiro durante a leishmaniose, o que todavia depende da cepa do parasita em questão (RITTER et al., 2004). Especificamente, este TNF- α que é secretado pelos macrófagos, é necessário no hospedeiro vertebrado para protegê-lo contra várias espécies de *Leishmania*, através da ativação de outros macrófagos que eliminam as células macrofágicas parasitadas (LIEW et al., 1990a,b; LIEW; LI; MILLOTT, 1990a,b).

1.2.3.3 Mecanismos de escape dos parasitas aos componentes do sistema imune

A progressão das leishmanioses acontece devido à capacidade adquirida pelos protozoários de sobreviver nos seus hospedeiros vertebrados. Isto reflete as adaptações evolutivas que permitem a estes microorganismos se evadirem dos mecanismos imunes do hospedeiro ou a eles resistir.

Um exemplo disto ocorre durante infecção com promastigotas de *L. (L.) major*, que induzem uma rápida degradação de várias moléculas iniciais da defesa imunológica, inibindo ativamente diversos outros tipos de respostas imunes do hospedeiro vertebrado (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000, p. 364; CHANG et al., 2003). As espécies de *Leishmania* até utilizam as células e moléculas do sistema imune em seu próprio benefício, servindo-se de receptores encontrados nos macrófagos para neles penetrar, evitar a sua conseqüente exposição e destruição, e levar a alterações na produção de citocinas por estas células (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; HICKS et al., 2000; ILG, 2000; ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p. 254).

A título de exemplo, existem moléculas do sistema imune de mamíferos envolvidas na proteção contra a *Leishmania spp.*, que são conhecidas como as proteínas do sistema complemento, capazes de destruir células deste protozoário através da lise celular. Entretanto, dependendo da virulência da espécie em questão, níveis diferentes de resistência ao complemento podem ser observados. Como exemplo, a *L. (L.) tropica* é facilmente destruída pelo complemento, causando uma infecção localizada e autocicatrizante na pele, enquanto a *L. (L.) donovani* é 10 (dez) vezes mais resistente ao sistema complemento, disseminando-se para as vísceras e causando uma doença freqüentemente fatal (ROITT; BROSTOFF; MALE,

1999, p. 254–255). Há vários mecanismos através dos quais os parasitas podem resistir aos efeitos do complemento. Exemplos desses são: i) a secreção de moléculas de superfície das células dos parasitas, como o lipofosfoglicano (LPG – do inglês “Lipophosphoglycan”) de *L. (L.) major*, que ativa o complemento após ser liberado das células do parasita, evitando a lise celular (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p. 254–255; WRIGHT; EL AMIN, 1989), e ii) o proteofosfoglicano (PPG – do inglês “Proteophosphoglycan”) em *L. mexicana*, que se liga às proteínas do sistema complemento e consome essas moléculas, podendo diminuir a habilidade do sistema imunológico do hospedeiro em destruir as células do parasita infectante (HICKS et al., 2000).

Outros mecanismos de sobrevivência dos agentes causadores das leishmanioses atuam após a sua penetração nas células macrofágicas. Dentro destas, as células dos parasitas evitam sofrer a ação de reativos do oxigênio através da produção de enzimas neutralizantes como a superóxido dismutase (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p. 256). O vacúolo no qual as espécies de *Leishmania* sobrevivem dentro das células macrofágicas é de natureza lisossômica, contudo os parasitas desenvolveram mecanismos de proteção contra o ataque enzimático dos lisossomos com o auxílio da glicoproteína de 63 kDa – a GP63 (uma molécula da superfície dos parasitas) (WRIGHT; EL AMIN, 1989). As várias espécies de *Leishmania* também podem regular a expressão de outras moléculas, como as moléculas de classe II do MHC, nos macrófagos parasitados, reduzindo a capacidade destes em estimular os linfócitos T (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; ROBERTS; HANDMAN; FOOTE, 2000).

1.2.3.4 Conseqüências patológicas das reações contra *Leishmania* spp.

Classicamente as leishmanioses se distinguem, nos humanos, em dois tipos: leishmaniose tegumentar (LT) ou cutânea (LC), quando afeta a pele, e leishmaniose visceral (LV) ou Calazar, que provem da expressão indiana “Kala-azar”, e afeta os órgãos ou visceras (GRIMALDI JR, 1995; GRIMALDI JR; TESH, 1993). As distintas lesões na pele podem subdividir a leishmaniose cutânea em três formas: a leishmaniose cutânea localizada (LC), que causa lesões ulcerosas em nível de pele, no local da picada do mosquito, e leva à incapacidade no momento em que as lesões são múltiplas; a leishmaniose cutânea disseminada ou difusa (LCD), a qual provoca erupções disseminadas pelo corpo precipitando uma doença muito debilitante; e a leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), que afeta as mucosas

e a pele, principalmente, do nariz e da boca causando mutilações faciais e, conseqüentemente, desconfortos físicos e psicológicos. Por sua vez, as lesões que afetam os órgãos internos, causando a leishmaniose visceral, aumentam os volumes do fígado e do baço, e podem levar ao óbito, especialmente naquelas crianças com menos de 5 anos, devido à gravidade das lesões (NEVES, 2005b,c,d; REY, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002a) (Figura 7).

Adicionalmente às lesões descritas alguns pesquisadores destacam a existência de uma importante e nova forma de lesão imunologicamente mediada, que pode configurar uma complicação da leishmaniose visceral. Esta nova forma de lesão, denominada de leishmaniose dermal pós – calazar (do inglês “Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis” – PKDL), é caracterizada por erupções maculares, maculopapulares e nodulares na pele de pacientes tratados e supostamente curados da leishmaniose visceral (HANDMAN, 2001; NEVES, 2005d; ZIJLSTRA et al., 2003) (Figura 7).

Como já indicado, as diversas formas patológicas que as leishmanioses expressam em humanos, e em cães, são dependentes da espécie do parasita com o qual foi infectado. Entretanto, além disso, é preciso lembrar que as lesões teciduais, e a doença conseqüente, podem ser causadas pela resposta imunológica do hospedeiro vertebrado gerada contra o parasita e contra seus produtos metabólicos (HANDMAN, 2001; ROBERTS; HANDMAN; FOOTE, 2000). Desse modo, a produção excessiva do TNF- α pode ter efeitos prejudiciais no hospedeiro infectado, contribuindo com algumas das manifestações das doenças, como a febre e a anemia encontradas na leishmaniose visceral. Do mesmo modo, a hepatomegalia e a esplenomegalia encontradas nessa forma de leishmaniose, provavelmente são decorrentes do aumento no número e na atividade dos macrófagos e linfócitos nestes órgãos (Figura 7) (BLACKWELL, 1999; CABRERA et al., 1995; ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999, p. 260).

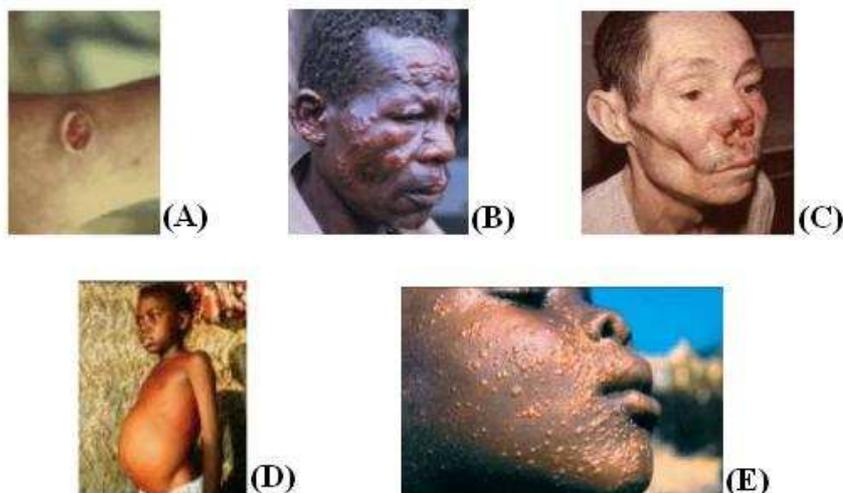


Figura 7. Os vários tipos de manifestações das leishmanioses registrados em humanos. Na imagem (A) lesão ulcerosa na pele da perna em caso de LC, na imagem (B) erupções cutâneas na face em caso de LCD, na imagem (C) lesão nasal em caso de LCM, na imagem (D) hepato-esplenomegalia em caso de LV e na imagem (E) lesões papulares faciais em caso de PKDL.

Fonte: (A) LC – WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2004?]a; (B) LCD – WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007c; (C) LCM – LEISHMANIOSES, [2007?]; (D) LV – TDR news, 2002; (E) PKDL – ZIJLSTRA et al., 2003.

1.3 O problema da leishmaniose visceral

Dentre os diversos tipos de leishmanioses descritas, a leishmaniose do tipo visceral, sozinha, promove o aparecimento de aproximadamente 500.000 novos indivíduos doentes por ano em todo o mundo. Ela está presente principalmente nos países da América do Sul, em especial no Brasil, mas também em países da América Central, do continente africano, do Mediterrâneo e do continente asiático (Figura 8). Nestes países fatores ambientais e comportamentais fazem com que a leishmaniose visceral represente um crescente problema de saúde pública. Especificamente dentro desse contexto, a migração tem atuado como a principal causa da disseminação da leishmaniose visceral, e na ocorrência de sérias epidemias que afetam principalmente crianças. Outros fatores de risco que ampliam o problema são a desnutrição, as péssimas condições sanitárias e os inadequados serviços de saúde a disposição de indivíduos pobres. Particularmente se sabe que a desnutrição, conseqüente a pobreza, enfraquece a resposta imune dos indivíduos e contribui para um incremento na severidade da doença (DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002a; ZERPA et al., 2003).

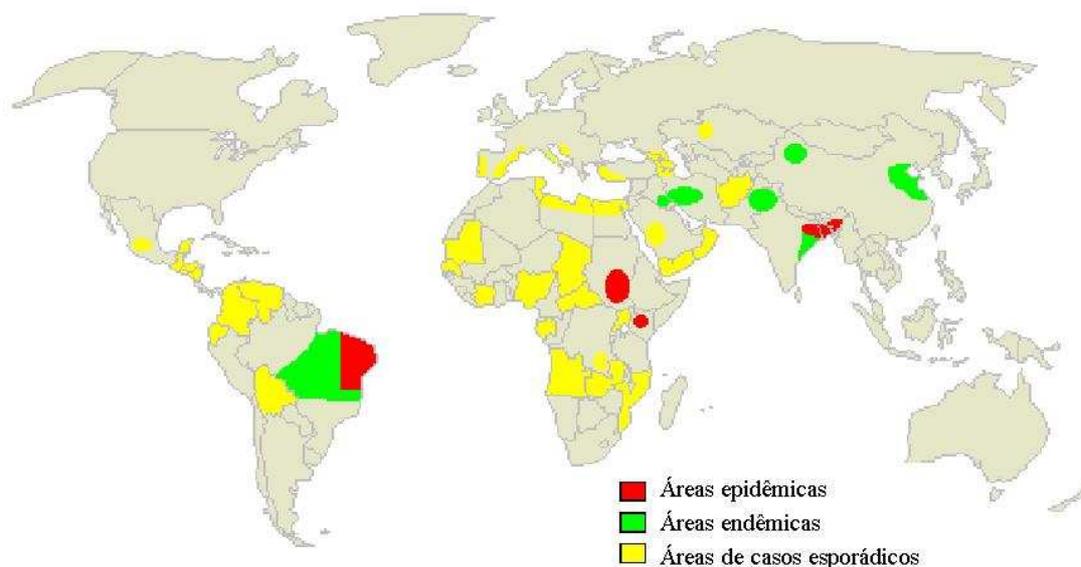


Figura 8. Distribuição geográfica mundial da leishmaniose visceral. As áreas em vermelho representam as notificações de epidemias, as áreas em verde representam as notificações endêmicas e as áreas em amarelo representam as notificações de casos esporádicos.
Fonte: LEISHMANIASIS, [2004?].

Várias espécies de *Leishmania*, como *L. (L.) donovani* (encontrada principalmente na Índia e África), *L. (L.) infantum* (encontrada na região do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia) e *L. (L.) chagasi* (encontrada na América do Sul) parecem se orientar para as vísceras da cavidade abdominal dos indivíduos humanos, ocasionando alterações marcantes nas funções do baço, fígado e medula óssea. Por esse motivo, a leishmaniose visceral é caracterizada pelos seguintes sinais e sintomas clínicos: surtos intermitentes de febre, tosse, perda de peso, letargia, aumento do baço e do fígado, anemia, trombocitopenia e ativação policlonal de linfócitos B com hipergamaglobulinemia, sendo a última pouco importante no controle da doença (HANDMAN, 2001; MURRAY et al., 2005; NEVES, 2005d; WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2004?]a).

Uma nova e grave manifestação da leishmaniose visceral é o aparecimento de reativação da doença em indivíduos anteriormente curados, mas que desenvolveram imunossupressão após contraírem o HIV. Esta manifestação também pode ser especulada para aqueles casos nos quais indivíduos são infectados, não demonstram sintomas clínicos evidentes, mas sofrem de doença ativa quando se encontram portadores da AIDS (HANDMAN, 2001) ou quando enfrentam quadros de imunossupressão por qualquer motivo.

Na sua componente zoonótica, os cães são os principais animais domésticos reservatórios dos parasitas causadores da leishmaniose visceral. De acordo com Cunha e

colaboradores (1995) há uma possível associação entre os casos de infecções humanas e a presença de cães no interior ou ao redor de domicílios humanos.

1.3.1 Leishmaniose visceral no Brasil

No Brasil a leishmaniose visceral é causada pelas espécies *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis* e *L.(L.) donovani*, sendo essa doença uma importante causa de morbidade e mortalidade em áreas endêmicas particularmente na região Nordeste (GONTIJO, C.; MELO, 2004). Nessa região, a manifestação visceral é amplamente disseminada e está em franca expansão, provavelmente por causa das condições epidemiológicas favoráveis associadas com a redução dos espaços ecológicos naturais dessa zoonose. Os períodos de seca, a falta de terras cultiváveis disponíveis e a fome têm levado a uma grande migração da população para as periferias dos subúrbios das grandes cidades dessa região, criando assentamentos densamente povoados com mínima infraestrutura de saneamento (ARIAS et al., 1996; DESJEUX, 2001; GRIMALDI JR; TESH, 1993; SHERLOCK, 1996).

Muitos indivíduos que migram são jovens e trazem consigo crianças, permitindo assim que a doença encontre um vasto número de hospedeiros não – imunes. Essa população que é composta por indivíduos mal nutridos, devido as pobres condições de vida, promovem a subnutrição como o principal dos fatores de risco para infecção por *L. (L.) chagasi* e para o desenvolvimento da leishmaniose visceral. Por isso, um grave problema que acontece no Brasil é que a maioria dos casos da doença ocorre entre as crianças pobres e desnutridas originárias das regiões semi-áridas (ARIAS et al., 1996; CAMPOS JR, 1995; DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004a; REY et al., 2005). Outro fator agravante é o hábito de se criar animais domésticos como cães, galinhas e porcos, que por um lado proporcionam uma abundância de sangue disponível para os mosquitos vetores hematófagos e aumentam dramaticamente a densidade de população vetorial, e por outro lado fornecem hospedeiros mamíferos que servirão como reservatórios para os parasitas (ARIAS et al., 1996; DESJEUX, 2001; GRIMALDI JR; TESH, 1993).

Relatos da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e do Ministério da Saúde mostraram que o número de casos notificados de leishmaniose visceral no Brasil mais que duplicou entre os anos de 1998 e 2000. Apenas na região Nordeste, na qual se encontram cerca de 82% dos casos do país, entre os anos de 1998 e 2002, o número de casos da doença

creceu mais de 200%, envolvendo várias capitais de Estados como Teresina, São Luís, Fortaleza, Natal, João Pessoa e mais recentemente Salvador. Outras capitais como Rio de Janeiro e Belo Horizonte sofreram com epidemias, demonstrando claramente que o processo de urbanização da leishmaniose ocorre correntemente em várias cidades brasileiras (ARIAS et al., 1996; CALDAS et al., 2003; DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002b).

Em Pernambuco o número de casos tem aumentado ao longo dos anos, tendo o Estado altos índices de prevalência. Por exemplo, em Petrolina, uma cidade do interior pernambucano que faz divisa com o Estado da Bahia, com o passar dos anos aconteceu um intenso fluxo de pessoas que se introduziram na cidade. Isso configurou um aumento progressivo do número de pessoas dessa população, incrementou a urbanização e ofereceu um ambiente favorável à propagação da doença, destacando-se os principais fatores de risco anteriormente citados: (i) migração de pessoas não – imunes e infectadas, (ii) urbanização descontrolada, (iii) fraca infra-estrutura sanitária, (iv) aumento da densidade do mosquito transmissor e (v) manutenção dos parasitas através de reservatórios animais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002b).

1.3.2 Métodos clássicos de controle da leishmaniose visceral

Segundo Grimaldi Jr e Tesh (1993) as medidas de controle, até então usadas, esforçavam-se por alcançar quatro caminhos distintos que propunham interromper efetivamente o ciclo da doença. Desse modo, colheram-se várias informações acerca de como controlar os mosquitos transmissores das espécies de *Leishmania*, como eliminar os reservatórios animais, como fazer a vigilância e o tratamento dos casos humanos, e como realizar a proteção pessoal. Infelizmente, muitas dessas medidas, senão todas, tiveram sucesso limitado, não demonstrando resultados positivos e por si só tornaram-se inconvenientes.

Esse insucesso decorreu pelo fato de algumas dessas medidas se mostrarem ambientalmente incorretas como, por exemplo, o uso indiscriminado de inseticidas, que pode criar resistência nos mosquitos vetores e contaminar o ambiente. No caso da eliminação dos animais reservatórios, existem programas laboriosos, bastante caros e difíceis de implementar, além de prejudiciais à ecologia. Outras, como o uso de medicamentos, por sua vez, mostraram-se até certo ponto eficazes quando atuam apenas em nível individual, entretanto não são úteis

em uma ampla comunidade por causa do custo e da resistência cultural, entre outros fatores (DESJEUX, 2004a; GRIMALDI JR; TESH, 1993; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002a).

Apesar de todos os esforços e avanços na produção de drogas cada vez mais potentes para diminuir o forte impacto da leishmaniose visceral, destacam-se como desvantagens: (i) os incontáveis casos de fortes e desagradáveis reações tóxicas, causadas principalmente pelas drogas de primeira e segunda geração, como os antimônios, que levam a descontinuidade do tratamento; (ii) a baixa efetividade dessas drogas nos indivíduos imunocomprometidos; e (iii) a existência de alguns casos de resistência aos medicamentos, que pode gerar mais um novo problema a ser enfrentado (ABATH, 2000; DENISE et al., 1999; DESJEUX, 2004a; HANDMAN, 2001; MURRAY et al., 2005; RIVAS et al., 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Apesar de tudo isso, uma nova droga desenvolvida, a miltefosina, tem apresentado altas taxas de cura. Ela tem efeitos colaterais insignificantes, facilidade de manipulação e administração, e tem sido usada com sucesso para tratar os casos resistentes do tratamento antimonial convencional. Dessa forma, a miltefosina tem o potencial de ser usada como uma simples e disponível ferramenta para a saúde pública, tratando efetivamente pacientes nas comunidades e até mesmo durante epidemias (GANGULY, 2002).

1.4 Os métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral

O diagnóstico clássico da leishmaniose visceral é baseado em alguns critérios clínicos auxiliados pelo conhecimento epidemiológico sobre a doença. Entretanto esse tipo de diagnóstico apresenta baixa especificidade e exige uma vasta experiência profissional no assunto. Além disso, o diagnóstico de certeza da infecção leva em consideração o diagnóstico parasitológico, que acontece quando é evidenciada a presença das formas amastigotas em lâminas de microscopia confeccionadas e coradas após aspiração de medula óssea ou em biópsias de baço ou linfonodos (ARIAS et al., 1996; MURRAY et al., 2005). Portanto, fica evidente que este diagnóstico parasitológico é traumatizante por ser bastante invasivo e doloroso, além de possuir em alguns casos baixa sensibilidade (DESJEUX, 2004a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Ainda no que diz respeito ao diagnóstico parasitológico, com o desenvolvimento de um ramo da biologia denominado biologia molecular, o diagnóstico da leishmaniose visceral

abarcou a utilização da técnica chamada Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês “Polymerase Chain Reaction”). Esta técnica tem habilidade em detectar o DNA do parasita em qualquer amostra clínica, produzindo um resultado confiável em poucas horas (BLACKWELL, 1992; FISA et al., 2001; IKONOMOPOULOS et al., 2003; LEÔNIDAS et al., 2002; PAIVA et al., 2004). Como prova diagnóstica esta técnica é altamente sensível e específica, porém atualmente só é possível a sua realização em laboratórios especializados não estando ainda disponível comercialmente (DESJEUX, 2004a; FEITOSA et al., 2000; GONTIJO, B.; CARVALHO, 2003).

Outras maneiras de diagnóstico da leishmaniose visceral utilizam-se de técnicas imunológicas para detecção de imunoglobulinas (anticorpos) anti-*Leishmania*, através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI – em inglês “ImmunoFluorescence Antibody Test” – IFAT), através da técnica de ensaio imunoenzimático ELISA (do inglês “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”) e através do teste de aglutinação direta – TAD (em inglês “Direct Agglutination Test” – DAT) (DESJEUX, 2004a; MURRAY et al., 2005; NEVES, 2005d; PASSOS et al., 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002a). Dentre essas técnicas imunológicas, têm sido propostos ensaio imunoenzimáticos empregando antígenos quimicamente definidos e específicos do parasita. Por exemplo, o antígeno recombinante K39 (rK39) de *L. (L.) chagasi*, um epítipo imunodominante repetitivo em uma proteína relacionada a kinesina e muito conservado entre as espécies de leishmanias viscerotrópicas, têm se mostrado sensível e específico para o diagnóstico da leishmaniose visceral em humanos e cães, através da técnica ELISA ou de tiras de teste rápido em campo (ARIAS et al., 1996; BADARÓ et al., 1996; MURRAY et al., 2005; ROSATI et al., 2003; SCALONE et al., 2002). Em adição, outros antígenos recombinantes de *L. (L.) chagasi* bem definidos como o K9 e o K26, estão sendo avaliados quanto as suas capacidades de carregarem epítipos imunodominantes e serem utilizados como marcadores em diagnósticos imunológicos (BHATIA et al., 1999). Uma outra proteína também recentemente estudada, a HSP70, mostrou grande utilidade em sistema de diagnóstico empregando as técnicas sorológicas como o ELISA (PEREZ-ALVAREZ et al., 2001; ZURITA et al., 2003).

Entretanto, todas essas estratégias clássicas e contemporâneas de diagnóstico da leishmaniose visceral não têm obtido muito sucesso, visto que o diagnóstico é prejudicado por uma evolução clínica gradual e muitas vezes imperceptível, além da dificuldade da discriminação clínica ante outras doenças infecciosas com sintomas similares (ARIAS et al., 1996). Há problemas ainda com o diagnóstico sorológico ocasionado pelos resultados falso-positivos devido à persistência de anticorpos circulantes após cura clínica, bem como a reação

cruzada em pacientes infectados com outros tripanosomatídeos como o *Trypanosoma cruzi*. Por outro lado, o resultado falso-negativo muitas vezes ocorre naqueles pacientes imunocomprometidos. Outras dificuldades encontradas envolvem questões de logística como o adequado armazenamento e transporte dos reagentes utilizados nos testes sorológicos, além das complicações provenientes da descentralização e utilização fora do ambiente laboratorial (DESJEUX, 2004a; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002a).

Não obstante, vários estudos se propõem a aperfeiçoar as ferramentas de controle baseadas em reações imunológicas a fim de melhorar a sensibilidade, a especificidade e a amplitude de utilização dos testes sorológicos correntemente disponíveis, aliadas a novas políticas de saúde que gerenciem de maneira efetiva todas as etapas desse processo. Para isso, estão sendo caracterizadas distintas moléculas comprovadamente antigênicas com o intuito de se encontrar testes diagnósticos que permitam evidenciar as infecções por *L. (L.) chagasi*, assim como discriminar as infecções ativas e servirem como marcadores de resposta para a terapia, conforme estabelece a Organização Mundial de Saúde (LOUZIR, 1994; PASSOS et al., 2005; ROSATI et al., 2003).

1.5 A imunoprofilaxia contra a leishmaniose visceral

Até o presente momento, nenhuma vacina contra as diversas formas de leishmaniose tem se mostrado conclusivamente efetiva (MARTINS et al., 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2005?]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Entretanto, pesquisas correntes sugerem que o desenvolvimento de vacinas que previnam as leishmanioses pode ser possível (NEVES, 2005b,c). Particularmente a vacinação contra leishmaniose visceral tem recebido menor atenção quando comparada com a leishmaniose cutânea, embora a necessidade de uma vacina efetiva contra a primeira seja urgente (STÄGER et al., 2000). Dois caminhos básicos para o desenvolvimento de métodos imunoproláticos contra esta doença têm sido adotados: (i) um caminho é a indução de proteção através de uso de parasitas inteiros, estejam eles vivos (porém atenuados), rompidos ou mortos; (ii) o outro caminho tem o objetivo de identificar, isolar e induzir proteção com antígenos recombinantes purificados (ABATH, 2000; ENGERS; BERGQUIST; MODABBER, 1996; GRIMALDI JR; TESH, 1993; HANDMAN, 2001; PRICE; KIENY,

2001; ROBERTS; HANDMAN; FOOTE, 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2005?]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

Visto isso, e por ser a leishmaniose visceral uma das principais doenças parasitárias combatidas pela Organização Mundial de Saúde, ao longo do tempo diversas estratégias que visam induzir imunidade protetora eficaz contra as leishmanioses foram realizadas. Bom exemplo brasileiro do emprego dos microorganismos inteiros foi a utilização de parasitas mortos, tanto em associação com o tratamento antimonial clássico quanto apenas com cepas de *Leishmania spp.*, que culminou na produção comercial da vacina Leishvacin[®] pela empresa brasileira BioBrás S/A (CARDOSO et al., 2003; MACHADO-PINTO et al., 2002). Inúmeras pesquisas, por outro lado, trabalham demonstrando os efeitos da aplicação do microorganismo associado a indutores da resposta imune como o bacilo de Calmette-Guérin (BCG), algumas interleucinas (ex: IL-12) e alguns adjuvantes comumente administrados em vacinas (ABATH, 2000; ENGERS; BERGQUIST; MODABBER, 1996). Em outro tipo de processo, pesquisas propõem testar vacinas “vivas” com parasitas mutantes – *Leishmania* geneticamente construída (ABATH, 2000; CRUZ, 2000; ENGERS et al., 1996).

No final do século XX iniciaram-se estudos sobre o potencial protetor de frações protéicas de *L. (L.) infantum* ou *L. (L.) major*, que abrangiam moléculas entre 64 e 97 kDa. Desse modo, FROMMEL e colaboradores (1988) relataram a geração de imunidade humoral e celular contra infecção experimental com *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) major* após injetar preparação descrita acima em camundongos BALB/c. Da mesma forma também foi induzida proteção utilizando a fração descrita, entre 67 e 94 kDa, de *L. (Viannia) brasiliensis*, denominada de LbbF2, e seguindo a mesma metodologia, em indivíduos de uma zona endêmica em Pernambuco (MONJOUR et al., 1994).

Especificamente no caso da leishmaniose visceral, a partir dos estudos anteriormente citados, outros grupos de pesquisa começaram a examinar detidamente inúmeras moléculas antigênicas, que abrangiam desde algumas proteínas componentes da superfície do parasita, ou alguns carboidratos expostos nesta superfície, até as proteínas do interior da célula do parasita. Nesses trabalhos, do mesmo modo, procurava-se investigar a habilidade individual dessas moléculas em evocar respostas imunes protetoras e compreender o envolvimento das células T durante a infecção por *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) infantum* ou *L. (L.) donovani*, visando o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a leishmaniose visceral (HANDMAN, 2001; JERÔNIMO et al., 1995; PRICE; KIENY, 2001; GRIMALDI JR, 1995; MODABBER, 1995; WHITE JR; McMAHON-PRATT, 1988; WORLD HEALTH ORGANIZATION, [2005?]; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006; WRIGHT; EL AMIN, 1989).

1.6 Moléculas antigênicas

Devido ao avanço das técnicas da biologia molecular, dos sequenciamentos e dos dados disponíveis na Internet a respeito dos genomas do hospedeiro humano, bem como dos parasitas, por exemplo *L. (L.) major* e *L. (L.) infantum*, o enfoque se voltou para a caracterização dos aspectos fisiológicos e bioquímicos de moléculas do hospedeiro infectado e, especialmente, das moléculas do parasita que estejam envolvidas nas diversas fases da doença (WRIGHT; EL AMIN, 1989).

A partir de abordagens moleculares (ALBERTS et al., 2004), como o rastreamento de bibliotecas de expressão de genes de *Leishmania* com soros de animais e de humanos infectados, diferentes moléculas antigênicas foram identificadas com potencial para uso no controle das diferentes formas de leishmaniose. Algumas dessas moléculas descritas em trabalhos são antígenos protéicos, lipídicos e/ou glicídicos como por exemplo a GP63 (AFRIN et al., 2002; CHAKRABARTY, 1996; WRIGHT; EL AMIN, 1989), a LACK (SOUSSI et al., 2000; MELBY et al., 2001), o LPG (CHAKRABARTY, 1996; WRIGHT; EL AMIN, 1989), a GP46/M-2 (CHAMPSI; McMAHON-PRATT, 1988), a D13 ou p80 (AHMED et al., 2003; WHITE JR; McMAHON-PRATT, 1988), a K9 e a K26 (BATHIA et al., 1999), a proteína de leishmania homóloga à proteína ribossomal eucariótica – LeiF (do inglês “Leishmanial eucaryotic ribosomal protein”) (PRICE; KIENY, 2001), as cisteínas proteinases (CPa e CPb) (PRICE; KIENY, 2001), as HASPs (ALCE et al., 1999; STÄGER et al., 2000; THEINERT et al., 2005), a proteína antioxidante específica de tiol – TSA (do inglês “Thiol- Specific Antioxidant protein”) (PRICE; KIENY, 2001), a proteína induzível por estresse e temperatura – STI1 (do inglês “Stress and Temperature Inducible protein”) (PRICE; KIENY, 2001) e aquelas estágio-específicas como a proteína A2 específica de amastigota (GHEDIN, et al., 1997; MARTINS et al., 2006; PRICE; KIENY, 2001), entre outras.

Cada uma dessas moléculas antigênicas tem características particulares que as tornam capazes de estimular a resposta imune do hospedeiro. A proteína GP63 é uma metaloprotease conservada nas espécies de *Leishmania*, constitui o mais abundante antígeno de membrana destes parasitas e pesquisas demonstram que ela induz significativa proteção em animais experimentais (ABATH, 2000; AFRIN et al., 2002). A proteína LACK (Quinase C Ativada de *Leishmania* – do inglês “*Leishmania* activated C kinase”), que tem homologia com os receptores intracelulares para Quinase C Ativada (RACK), foi identificada por estimular a ação protetora das células Th1 (ABATH, 2000; MELBY et al., 2001; SOUSSI et

al., 2000). Estudos acerca de um antígeno com 80 kDa de *L. (L.) donovani*, chamado de D-13, evidenciaram ser esta uma proteína altamente imunogênica, além de útil na profilaxia e no diagnóstico da leishmaniose visceral (WHITE JR; McMAHON-PRATT, 1988). Outras proteínas também têm sido reconhecidas por soros de animais (cães) e humanos como as proteínas ribossomais, as histonas e as kinesinas (ROSATI et al., 2003; SCALONE et al., 2002). E por sua vez, o LPG, um glicolípido, é considerado a maior molécula de superfície desses parasitas e também possui potencial para indução da resposta imune (AFRIN et al., 2002; AHMED et al., 2003; BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; COSTA et al., 1999; WRIGHT; EL AMIN, 1989).

1.7 Proteínas de choque térmico (HSPs)

As proteínas de choque térmico formam um grupo protéico de elevado interesse para estudos de diferentes doenças infecciosas. Elas são as mais abundantes proteínas intracelulares e estão presentes em todos os compartimentos (ex: núcleo, mitocôndria, cloroplasto, retículo endoplasmático, citoplasma) de todos os tipos celulares de procariotos e eucariotos (KAUFMANN, 1990; KIANG; TSOKOS, 1998; ROBERT, 2003). Essas proteínas são bastante conservadas na escala evolutiva com homólogos constitutíveis e induzíveis, demonstrando a sua importância para os mais diversos seres vivos (CLAYTON et al., 1995; ZÜGEL; KAUFMANN, 1999).

A nomenclatura inicial das HSPs foi baseada nos seus pesos moleculares aparentes (por exemplo HSP72, HSP85, HSP86, etc.) com 72, 85, 86 kDa respectivamente. A partir disso, elas foram agrupadas de acordo com o mais próximo tamanho, compondo famílias cujos principais exemplares são as HSP60, HSP70, HSP90 e HSP110. Existe um segundo grupo de HSP, algumas vezes referidas como HSPs secundárias, no qual estão inclusas aquelas proteínas reguladas pela glicose – GRP (do inglês “glucose-regulated-proteins”). Finalmente um terceiro grupo é formado pelas HSPs de baixo peso molecular, que têm massas moleculares próximas de 20 kDa (KIANG; TSOKOS, 1998; ROBERT, 2003).

Particularmente as proteínas de choque térmico têm suas sínteses aumentadas em situações consideradas estressantes para a célula do parasita como mudanças no pH intracelular, alterações na concentração de outras moléculas no interior da célula e variações na temperatura do ambiente onde se encontra a célula (KIANG; TSOKOS, 1998; ROBERT,

2003). No caso da *Leishmania spp.*, o aumento da síntese das HSPs devido às variações de temperatura pode ser observado, possivelmente, durante a transição do protozoário do mosquito vetor para o hospedeiro mamífero (MILLER et al., 2000; SEARLE; SMITH, 1993). Essa alteração na temperatura promove, então, a diferenciação do parasita, através da desmontagem de complexos protéicos, do desdobramento e redobramento de proteínas, e da expressão de uma maior quantidade de proteínas, e envolve a atuação das HSPs (KAUFMANN, 1990).

Portanto, as HSPs estão envolvidas na prevenção ou na reversão dos eventos adversos para o parasita interagindo com outras proteínas recém-sintetizadas no interior desta mesma célula parasitária, garantindo a correta conformação, o transporte entre os compartimentos celulares, e alterando as funções dessas novas proteínas dentro da célula, sendo por isso denominadas “chaperones moleculares” (CLAYTON et al., 1995; HARTL; HAYER – HARTL, 2002; KARLIN; BROCCIERI, 1998; KAUFMANN, 1990; SEARLE; SMITH, 1993). Além disso, no caso de impossibilidade de redobramento protéico, devido a grande carga metabólica experimentada pela célula do parasita nas situações anteriormente mencionadas, as próprias HSPs também estão envolvidas no processo de remoção das proteínas desnaturadas (HARTL; HAYER – HARTL, 2002; KARLIN; BROCCIERI, 1998; KAUFMANN, 1990).

Sob o ponto de vista imunológico, as HSPs podem sinalizar um sinal de infecção, talvez pela sua quantidade abundante, tornando-se antígenos proeminentes que fazem parte dos fatores de virulência do parasita, sendo identificadas como imunogênicas por produzirem resposta humoral e celular específica contra *Leishmania spp.* (COSTA et al., 1999; KIANG; TSOKOS, 1998; LOUZIR, 1994; ROBERT, 2003; ZÜGEL; KAUFMANN, 1999).

Devido a isso, esse grupo protéico vem sendo exaustivamente estudado e tem demonstrando relevância para futuras aplicações profiláticas e terapêuticas (RICO et al., 1999).

1.7.1. Família HSP70

Dentre as HSPs relatadas, a HSP de 70 kDa (HSP70), se constitui em uma das mais abundantes e de maior atividade imunogênica, podendo estar presente em várias organelas, inclusive na mitocôndria (ENGMAN; KIRCHHOFF; DONELSON, 1989; KARLIN;

BROCCHIERI, 1998; KIANG; TSOKOS, 1998). Sua expressão também é estimulada significativamente durante as variações térmicas ambientais ocorridas no momento da transferência das formas promastigotas metacíclicas do mosquito vetor para o hospedeiro humano (FOLGUEIRA et al., 2005; KARLIN; BROCCHIERI, 1998).

As HSP70s de diversos organismos patógenos, do mesmo modo possuem função “chaperone”, ou seja, atuam no dobramento, transporte e secreção de proteínas recém-sintetizadas, bem como na montagem e dissociação de complexos multiprotéicos (KIANG; TSOKOS, 1998). Estas funções são necessárias durante a adaptação aos diferentes ambientes e temperaturas, como também durante as mudanças bioquímicas e morfológicas sofridas pelo parasita ao longo da transição (no caso da *Leishmania*) da forma promastigota para amastigota, permitindo a sua sobrevivência no hospedeiro vertebrado (KARLIN; BROCCHIERI, 1998; HARTL; HAYER – HARTL, 2002; WILSON; ANDERSEN; BRITIGAN, 1994).

Vários trabalhos que estudaram as HSP70s de *Leishmania spp.* descrevem seu alto poder de estimulação da resposta imune (KIANG; TSOKOS, 1998). Nessas pesquisas é destacada a importância das HSP70s como potentes antígenos indutores da produção de anticorpos específicos para o diagnóstico em pacientes infectados (BLACKWELL, 1992), além da capacidade em proteger os indivíduos contra as diferentes formas de leishmaniose, com muitas das suas propriedades imunogênicas restritas, em grande parte, à extremidade carboxi-terminal (AMORIM et al., 1996; COSTA et al., 1999; LOUZIR, 1994; YEYATI et al., 1991; ZÜGEL; KAUFMANN, 1999)

1.7.1.1 HSP70 mitocondriais (HSP70mts)

Uma subclasse de HSP70 é aquela constituída pelas HSP70 mitocondriais (HSP70mts), proteínas ATP-dependentes que realizam as mesmas funções de “chaperone” da sua homóloga citoplasmática (HSP70), porém tendo como local de ação o interior da mitocôndria (ENGMAN; KIRCHHOFF; DONELSON, 1989; KLEIN et al., 1995a; SEARLE; MCCROSSAN; SMITH, 1993).

Assim como a HSP70 citosólica, as homólogas mitocondriais parecem ter também atividade imunogênica. As HSP70mts são caracterizadas por possuir um sinal na sua extremidade amino-terminal que permite a translocação para o interior da mitocôndria. A

seqüência-sinal é composta de resíduos de arginina e/ou lisina (aminoácidos básicos) carregados positivamente e sem nenhum resíduo ácido. Por sua vez a extremidade carboxi-terminal apresenta uma seqüência rica em aminoácidos hidrofílicos (KARLIN; BROCCIERI, 1998; LOUZIR, 1994). Essas proteínas são extremamente conservadas e mais próximas evolutivamente das proteínas de choque térmico bacterianas (DnaK e GroEL) que realizam a função de “chaperones” nos procariotos, o que pode ratificar a hipótese de que a mitocôndria seria derivada de uma relação simbiótica entre células eucarióticas e procarióticas (HARTL; HAYER – HARTL, 2002; WILLIAMSON, 1993; ZHANG et al., 1999).

Até o século passado eram descritas pelo menos duas proteínas homólogas do tipo HSP70mt em tripanosomatídeos: uma em *Trypanosoma cruzi* denominada MTP 70 (ENGMAN; KIRCHHOFF; DONELSON, 1989) e outra em *L. (L.) major* chamada MP 70.1 (SEARLE; MCCROSSAN; SMITH, 1993). Alguns relatos de imunogenicidade das HSP70mts de *L. (L.) major* e *T. cruzi* já foram feitos, partindo-se da identificação de seqüências de DNA que codificam as citadas proteínas em imunorastreamentos de bibliotecas de cDNA (utilizando soros de indivíduos infectados). Outros estudos corroboraram esses relatos empregando essas proteínas recombinantes identificadas em testes imunodiagnósticos e utilizando soros de pacientes com leishmaniose cutânea e doenças de chagas (ENGMAN; DRAGON; DONELSON, 1990).

Atualmente, com o auxílio das ferramentas computacionais e, em conseqüência, dos grandes bancos de dados sobre genomas de microorganismos disponíveis na rede mundial de computadores (Internet), são descritos vários genes que codificam homólogos que possuem características semelhantes às proteínas HSP70mt.

1.8. Alguns resultados anteriores

1.8.1. HSP70mts de *L. (L.) chagasi*

Em trabalho realizado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por Ferraz Jr (1998), foi produzido um anti-soro policlonal a partir de coelho imunizado com uma fração protéica de 67 a 94 kDa de *L. (V.) brasiliensis* (fração LbbF2) descrita no trabalho de MONJOUR et al. (1994). Após rastreamento de uma biblioteca de cDNA de *L. (L.) chagasi*

com esse soro anti-LbbF2, foram identificados dois clones distintos, denominados Lc2.1 (48 kDa) e Lc2.2 (63 kDa). Os fragmentos de DNA desses clones foram parcialmente seqüenciados e se observou que ambos codificavam porções de uma HSP70mt, até aquele momento não descrita em *L. (L.) chagasi*. Os resultados dos sequenciamentos dos clones de DNA complementar (Lc2.1 – 1.1 Kb¹ e Lc2.2 – 2.0 Kb) mostrou que esses clones apresentavam homologia com gene *hsp70mt* já descrito na literatura para *L. (L.) major*.

A caracterização desses dois diferentes clones foi levada adiante para se obter suas seqüências completas. Pelo fato de as extremidades 5' UTR (do inglês “untranslated regions” = regiões não-traduzíveis) estarem ausentes nos clones originais obtidos por Ferraz Jr (1998), as extremidades 5' UTR foram obtidas (três 5' UTR diferentes) e foi sugerida, a partir desse resultado, a existência de pelo menos dois genes distintos que codificavam diferentes HSP70mts em *L. (L.) chagasi*. Mesmo assim, não foi possível confirmar quais das seqüências 5' UTR correspondiam a cada um dos dois clones. Entretanto, análises comparativas das seqüências de aminoácidos das proteínas revelaram que a Lc2.1 apresentou homologia com a HSP70mt de *L. (L.) major* (MP 70.1), enquanto a Lc2.2 teve maior homologia com a HSP70mt de *T. cruzi* (MTP 70), apresentando na sua extremidade carboxi-terminal vários resíduos do aminoácido glutamina. Além disso foi observada a distribuição dispersa das HSP70mts nativas na matrix mitocondrial em células de *L. (L.) chagasi* e *L. (V.) brasiliensis* (NASCIMENTO, 2000).

O ajuste definitivo para confirmar as seqüências das extremidades 5' UTR dos dois clones (Lc2.1 e Lc2.2), e ratificar a existência de múltiplas cópias de genes *hsp70mts* em *L. (L.) chagasi* ocorreu durante o trabalho de conclusão de curso de graduação do autor deste trabalho. As extremidades iniciais (5' UTR) de ambos os clones foram analisadas e foi observada uma extensa conservação de seqüência ao nível da metade amino-terminal das proteínas Lc2.1 e Lc2.2, em contraste com a metade carboxi-terminal mais divergente. A pesquisa citada também sugeriu a existência de três cópias de genes *hsp70mts* em *L. (L.) chagasi*, com pelo menos uma delas semelhante ao clone Lc2.1 e outra semelhante ao clone Lc2.2.

¹ kb = quilo bases. Quilo (símbolo = k) é o prefixo de um múltiplo da unidade de um par de bases (pb) nucleotídicas de uma cadeia de ácido desoxirribonucléico (DNA), correspondendo a 1.000 (um mil), ou 10³, pares de bases.

2 JUSTIFICATIVA

Devido ao caráter endêmico da leishmaniose no cenário mundial, é necessário progredir nos estudos da biologia dos agentes causadores, assim como identificar diferenças e semelhanças nos seus processos biológicos básicos em comparação com outros eucariotos.

A adequada identificação e caracterização dos genes que codificam proteínas HSP70 mitocondriais se enquadram na proposta do presente trabalho. Estudos sobre essas proteínas e seus respectivos genes são cruciais na determinação de sua relação na virulência e no entendimento da biologia do parasito. Além disso, estes estudos irão permitir a caracterização de um antígeno protéico que eventualmente poderá ser utilizado no desenvolvimento de diagnóstico eficaz e de terapias capazes de levar à indução de uma resposta imune efetiva contra os citados parasitas.

3 PERGUNTA-CONDUTORA

Há antígenos protéicos de *Leishmania (Leishmania) chagasi* que possam ser relevantes para o controle da leishmaniose visceral?

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Caracterizar antígenos protéicos de *Leishmania (Leishmania) chagasi* relevantes para o controle da leishmaniose visceral.

4.2 Objetivos Específicos:

- Subclonar fragmento de gene que codifica HSP70mt de *L. (L.) chagasi* em plasmídeo de expressão;
- Produzir proteínas recombinantes;
- Purificar as proteínas recombinantes;
- Imunizar coelhos com as proteínas recombinantes para a produção de soro policlonal específico;
- Analisar a expressão das HSP70mts durante o ciclo de vida de *L. (L.) chagasi* e em outras espécies de *Leishmania*;
- Verificar a localização das HSP70mts no interior de células do parasito de interesse;
- Contribuir no estudo de nova molécula útil tanto para o diagnóstico quanto para método imunoprolático seguro contra esse grave problema para a saúde pública nacional – a leishmaniose visceral.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cultura de parasitas

Células promastigotas de *L.(V.) braziliensis*, cepa MHOM/BR/73/M2903, de *L. (L.) major*, de *L. (L.) chagasi*, de *L. (L.) amazonensis*, de *Trypanosoma brucei* e de *T. cruzi* foram crescidas a 26°C até a fase estacionária em meio LIT modificado (sucrose 0.2%; infuso de fígado 0.36%; tryptose 0.1%; haemin 0.002%) pH 7.2, suplementado com soro fetal de cabra a 10%.

5.2 Análises de homólogos às HSP70mts de *L. (L.) chagasi*

Seqüências de genes que codificam homólogos às seqüências dos clones Lc2.1 e Lc2.2 nos tripanosomatídeos *L. (L.) infantum*, *L. (L.) major*, *T. brucei* e *T. cruzi* foram recuperadas em bancos de dados na Internet, como o GeneDB (<http://www.genedb.org>) e o NCBI (National Center of Biotechnology Information – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As seqüências foram alinhadas com a utilização de programas computacionais específicos como o DNASTar (através das ferramentas EditSeq, para edição das seqüências; MapDraw, para criação dos mapas de restrição; e MegAlin, para alinhamento das seqüências), além do BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI, para serem examinadas em nível de seqüência nucleotídica e protéica. Quando necessários foram ainda utilizados os programas BioEdit (versão 7.0.5.3) e MEGA (versão 3.1) para alinhamento das seqüências de proteínas e montagem das filogenias, respectivamente.

5.3 Subclonagem de fragmento do gene *hsp70mt* de *L. (L.) chagasi*

Partindo-se de uma clonagem realizada em trabalho anterior, na qual se inseriu um fragmento denominado FP2 (de 1005 pb), que corresponde a um trecho da região codificadora do clone Lc2.2, no sítio para *Pst* I do plasmídio pTZ18R (Pharmacia), realizou-se digestão do plasmídio recombinante (pTZ18R-FP2) com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III (NEW ENGLAND Biolabs_{inc.}) a uma temperatura de 37° C (ver ANEXO B). Outro plasmídio, o pRSET A (InvitrogenTM), também foi digerido com as enzimas supracitadas nas mesmas condições.

Em seguida, pequenas alíquotas de todas estas amostras digeridas foram analisadas em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídeo.

Os fragmentos de DNA correspondentes ao FP2 isolado e ao plasmídio pRSET A, após digestões foram, paralelamente, purificados por eletroeluição ou com auxílio do sistema “QIAEX Gel extraction Kit” (© QIAGEN) para purificação de DNA, seguindo-se as recomendações do fabricante. Em seguida, o fragmento FP2 foi subclonado nos sítios para *Bam* HI e *Hind* III do plasmídio pRSET A com a ajuda da enzima T4 DNA Ligase (NEW ENGLAND Biolabs_{inc.}) ao longo de dez horas a temperatura de 16° C.

O plasmídeo pRSET A permite altos níveis de expressão da seqüência de DNA clonada (FP2) devido à presença do promotor para T7 polimerase. Adicionalmente, o DNA inserido no pRSET A é posicionado para produzir a proteína de interesse fusionada a uma seqüência de 6 (seis) histidinas na extremidade amino-terminal, que será útil para purificação da proteína com resina de níquel em etapa posterior.

Após a etapa de subclonagem, utilizou-se a construção pRSET A-FP2 no protocolo de transformação em células competentes através de choque térmico em solução tamponada de cloreto de magnésio. As células transformadas foram bactérias *Escherichia coli* dos tipos DH5 α ou DH10B, as quais foram posteriormente semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura LB (Luria Bertani) sólido, adicionado de ampicilina a 100 μ g/ml. Em seguida, colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em 2 ml de meio LB líquido com ampicilina e nas culturas resultantes realizaram-se os protocolos de extração de DNA plasmidial, segundo SAMBROOK e RUSSELL (2001). A partir desses protocolos de extrações foi possível identificar aqueles plasmídios que continham o inserto de interesse (pRSET A-FP2).

5.4 Produção e purificação da proteína recombinante FP2

Para produzir a proteína recombinante FP2 fusionada à seqüência de histidinas, transformaram-se células *E. coli* BL21 star™ com alíquotas da construção pRSET A-FP2, obtida acima.

Algumas colônias das células transformadas e semeadas em placas foram inoculadas, separadamente, em tubos contendo 10 ml de meio de cultura LB líquido com ampicilina (100 µg/ml), sendo mantidos sob agitação de 250 rotações por minuto (r.p.m.) e a 37° C durante a noite (16 a 18 horas). Após incubação, foi efetuada a inoculação de todo o volume de cada tubo em um maior volume de meio LB (na proporção de 1 para 50), acrescentando-se ampicilina (100 µg/ml) e mantendo-se as mesmas condições da incubação anterior. Passadas algumas horas, alíquotas do último inóculo foram retiradas para mensuração da densidade óptica em espectrofotômetro com filtro de comprimento de onda 600 nm (A_{600}). Quando o meio de cultura, contendo bactérias em multiplicação, atingiu uma densidade óptica de 0.5, adicionou-se IPTG (“Isopropyl β -D-1-thiogalctopyranoside” da empresa SIGMA-ALDRICH®) para uma concentração final de 0,5 mM e se manteve a incubação por mais 4 horas a 30° C. Em seguida centrifugou-se todo o volume do meio de cultura por 20 minutos a 4.000 g em garrafas tipo GSA.

O sedimento de células transformadas das preparações em larga-escala (500 ml de meio de cultura), com a proteína FP2 expressa, foi ressuspenso em 5–10 ml de tampão de lise modificado (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-Cl 10 mM, Uréia 8 M, pH 8,0) e mantido em gelo. Em seguida, manteve-se a temperatura ambiente antes de ser sonicado com 6 pulsos de 30 segundos, na potência máxima, com intervalos de 1 minuto cada. O lisado foi, então, centrifugado por 20 minutos a 10.000 g e o sobrenadante, com a proteína recombinante, foi subsequentemente submetido ao protocolo de purificação, sob condições desnaturantes, através de cromatografia de afinidade em resina de níquel (matriz para cromatografia de afinidade revestida com metal Ni^{2+} [Ni-NTA Agarose]) da empresa © QIAGEN, seguindo-se as recomendações do fabricante.

Seguido o protocolo de expressão da proteína recombinante FP2 (45 kDa), amostras dessa proteína foram solubilizadas em tampão SDS-desnaturante com 2-mercaptoetanol (concentração final de 5%) e tiveram sua expressão avaliada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15% como descrito por Laemmli (1970). Amostras da proteína recombinante

induzida foram quantificadas por comparação com uma proteína comercial de referência com concentração conhecida, a albumina sérica bovina ou BSA, do inglês “Bovine Seric Albumin” (SIGMA-ALDRICH), com o auxílio dos programas de computador Kodak[®] 1D Image versão 3.5 e Microsoft[®] Excel, respectivamente, para densitometrias das bandas no gel de poliacrilamida e análises densitométricas resultantes.

5.5 Produção de soros policlonais

Produziram-se as proteínas recombinantes Lc2.1 e Lc2.2 em células *E. coli* DH5 α transformadas com plasmídios pBluescript[®] (Stratagene) que continham as seqüências de cDNA dos clones Lc2.1 e Lc2.2. Em seguida, amostras destas proteínas foram avaliadas e quantificadas em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) conforme anteriormente descrito. Subseqüentemente, fracionaram-se 150 μ g das proteínas Lc2.1 e Lc2.2 em dois géis de poliacrilamida a 10 % separadamente, excisaram-se desses géis as bandas correspondentes a proteína Lc2.1 (48 kDa) e Lc2.2 (63 kDa), e em seguida trituraram-se as bandas excisadas com 300 μ l de PBS (tampão fosfato salina, pH 7,5) separadamente em sistema de seringas acopladas a válvulas. Após homogeneização, às amostras foram adicionados 200 μ l de adjuvante completo de Freund, além de mais 300 μ l de PBS, para realizar o primeiro inóculo da etapa imunização de coelhos. Os 4 inóculos restantes foram realizados da mesma maneira descrita, salvo a utilização nesses casos de adjuvante incompleto de Freund.

Os coelhos utilizados para a imunização foram do tipo Nova Zelândia, sendo cedidos pelo biotério do CPqAM, local onde aconteceram as etapas de coleta de sangue e inoculação das proteínas recombinantes, após autorização previa da Fiocruz e com auxílio profissional habilitado. Brevemente, as amostras protéicas processadas foram injetadas subcutâneamente, através de seringas, na região dorsal dos coelhos em intervalos de 15 dias. Decorrida uma semana após o último inóculo, foi realizada a coleta total do sangue dos coelhos e a separação dos soros através de centrifugação.

5.6 Immunoblots e purificação de anticorpos anti-proteína FP2

Os soros policlonais, produzidos contra as proteínas recombinantes Lc2.1 e Lc2.2, foram utilizados em ensaios de “western-blot”. Para realizar esses ensaios, previamente, alíquotas de culturas de várias espécies de tripanosomatídeos foram expandidas em novo volume de meio de cultura apropriado e após centrifugação, foram lavadas com PBS e ressuspensas em tampão para proteínas (LAEMMLI, 1970). Extratos protéicos de células de espécies do gênero *Leishmania* e duas espécies do gênero *Trypanosoma*, bem como das proteínas recombinantes estudadas, foram analisados e quantificados em gel de poliacrilamida a 15%.

Para realizar as reações de “western blot”, alíquotas daqueles extratos selecionados (referentes a aproximadamente 5×10^4 células por poço) e das proteínas recombinantes (quantidades entre 3–20 nanogramas [ηg]² por poço) foram fracionadas em um único gel a 10% e posteriormente transferidas, em sistema semi-seco, através de cuba de transferência, para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do inglês “polyvinylidene fluoride”) da empresa MILLIPORE, seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, as membranas foram incubadas por uma hora em solução de TBS (tampão TRIS-HCl salina, pH 7,5) ou PBS, contendo Tween-20 a 0,05%, leite desnatado a uma concentração final de 1% e os soros policlonais dos coelhos imunizados contra as proteínas recombinantes na diluição de 1:30.000. As membranas foram lavadas, 3 vezes por 10 minutos cada, com a solução de TBS-Tween (ou PBS-Tween), para então serem incubadas por igual período de tempo com o segundo anticorpo anti-Imunoglobulina (IgG) de coelho conjugado a peroxidase (Amershan ou Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.), diluídos de 1 para 5.000 ou 10.000 em solução tampão (TBS ou PBS) com Tween-20 e leite desnatado. Após nova série de 3 lavagens com solução de TBS ou PBS acrescida de Tween, foi realizada a revelação por quimioluminescência depois da incubação com solução do substrato incluindo três reagentes, o Luminol (SIGMA-ALDRICH[®]); o Iodofenol (SIGMA-ALDRICH[®]) diluído em DMSO (Merck); e o peróxido de hidrogênio comercial 20 volumes. Em seguida as membranas foram utilizadas para sensibilizar filmes BioMax Light Film para eletroquimioluminescência (ECL) da empresa KODAK. As revelações dos filmes foram realizadas com revelador Dektol (KODAK) diluído 1:3 e a fixação por soluções de ácido acético.

² Nano (símbolo = η) é o prefixo de um submúltiplo de qualquer unidade de medida do Sistema Internacional (SI), com fator igual a 10^{-9} . Assim, neste caso da unidade “grama” (g), $\eta\text{g} = 10^{-9}$ gramas.

Noutro momento, aquele soro policlonal produzido contra a proteína Lc2.1 foi imunoadsorvido contra a proteína recombinante FP2, gerando anticorpos purificados anti-proteína FP2. Nessa etapa se necessitou fracionar 150 µg da proteína FP2 em gel de poliacrilamida e transferi-la para membrana de PVDF. A membrana, com a proteína FP2 aderida, foi corada com Ponceau-S Red (SIGMA-ALDRICH®) por 1 minuto e descorada com água purificada até visualização da banda da proteína de interesse. Em seguida, cortou-se a banda da membrana e se recortou esse pedaço em pequenos pedaços antes de serem lavadas 3 vezes, por 10 minutos cada, com PBS. Os pequenos pedaços de membrana foram, então, incubados em solução de PBS-Tween, com leite desnatado a 5%, por 30 minutos a temperatura ambiente (mantidos sob agitação) e, depois, lavados uma vez com PBS. Após descartar o sobrenadante, foi adicionada alíquota do soro policlonal anti-Lc2.1 e PBS em volumes iguais, permanecendo sob agitação durante a noite (18 horas). No dia seguinte, esta incubação foi lavada 3 vezes com PBS e, em seguida, foi adicionada a solução glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5) para eluição dos anticorpos anti-proteína FP2 adsorvidos, durante 5 minutos. Subseqüentemente, foi adicionado pequeno volume de solução Tris-HCl 1 M (pH 8,0) antes de se acrescentar PBS, para armazenar os anticorpos purificados anti-proteína FP2 a – 80° C. Utilizaram-se estes anticorpos anti-proteína FP2 em outros ensaios de “western blot”, seguindo-se o mesmo protocolo anteriormente descrito.

5.7 Localização subcelular das HSP70mts em *L. (L.) chagasi*

Em ensaios de localização celular, células promastigotas de *L. (L.) chagasi* sofreram fixação com paraformaldeído e foram lavadas com PBS. Em seguida, recobriram-se lamínulas com poli-L-lisina (SIGMA-ALDRICH) para, a partir de um concentrado em PBS, gotejar as células. Lavaram-se, com PBS-Glicina, as lamínulas contendo as células, depois permeabilizaram as células com Triton X-100 (SIGMA-ALDRICH), diluído em PBS-Glicina, e lavaram as lamínulas novamente com PBS-Glicina. Após isso, realizou-se etapa de bloqueio com albumina em PBS-Glicina, antes de incubar as lamínulas (37°C em estufa com controle de umidade ou câmara úmida) com aqueles anticorpos anti-proteína FP2 diluídos 1:500 na solução de incubação (PBS/Glicina/BSA/Triton X-100). As lamínulas foram novamente lavadas com PBS-Glicina, incubadas com RNase (SIGMA-ALDRICH), lavadas com a solução de bloqueio para serem incubadas com os anticorpos comerciais secundários (anti-

IgG de coelho feito em cabra acoplado à Alexa fluor 488 – Molecular Probes[®]) diluídos 1:500 na solução de incubação, acrescida do marcador para ácidos nucleicos TOTO3 (Molecular Probes[®]) diluído 1:1.000 na mesma solução e mantidas sob a mesma condição descrita anteriormente. Lavaram-se essas mesmas lamínulas com PBS e colocaram-nas, com a face que contém as células, sobre lâminas contendo gotas de ProLong Gold (Molecular Probes[®]). Subseqüentemente, observaram-se as lâminas montadas através de microscopia confocal de varredura laser (raios laser 488 nm e 633 nm) para análise da localização das proteínas nativas no interior das células parasitárias.

O microscópio confocal utilizado foi o Leica TCS SP2-AOBS (Leica Microsystems) e as imagens foram todas obtidas com auxílio de programa do aparelho Leica, no núcleo de integrado de tecnologia (NIT) do CPqAM, e editadas com os programas de computador Adobe[®] Photoshop[®] e Adobe[®] Illustrator[®].

6 RESULTADOS

6.1 Análises de seqüências genômicas

Seguindo-se aos trabalhos de Ferraz Jr (1998), que relatou o potencial imunogênico dos clones Lc2.1 e Lc2.2, que codificavam homólogos em *L. (L.) chagasi* à HSP70mt descrita em *L. (L.) major*, e de Nascimento (2000), que caracterizou melhor essas seqüências de cDNA, dos clones Lc2.1 e Lc2.2, e dos aminoácidos codificados por essas seqüências, relatando a existência de duas proteínas HSP70mts diferentes em *L. (L.) chagasi*, decidiu-se investigar a existência de homólogos adicionais em outros tripanosomatídeos.

Através de pesquisas em bancos de dados genômicos disponíveis na rede mundial de computadores, encontraram-se vários genes que supostamente codificam homólogos protéicos semelhantes às HSP70mts já descritas na literatura entre distintas espécies do gênero *Leishmania* e duas espécies do gênero *Trypanosoma*.

Quando se realizaram análises a cerca da quantidade e da localização dos genes encontrados na espécie *L. (L.) infantum* (geneticamente igual a *L. (L.) chagasi*), revelou-se a presença de quatro genes distribuídos no cromossomo 30, dos quais três desses codificam proteínas semelhantes à proteína codificada pelo clone Lc2.2 e apenas um gene é idêntico ao Lc2.1 (Figura 9). Observou-se que todos os genes diferem em suas regiões 3' não-traduzíveis (3' UTR) e nenhuma duplicação evidente das seqüências encontradas foi verificada.

Por sua vez, os trechos equivalentes na espécie *L. (L.) major* examinados identificaram ortólogos para cada um dos genes encontrados em *L. (L.) infantum*. Nessas análises se observou que duas das seqüências descobertas eram iguais no cromossomo 30 de *L. (L.) major* (ortólogo $Lm2=Lm3=Lc2.2$), sugerindo a ocorrência de evento de duplicação gênica (Figura 9 e Figura 10). Também se verificou o evento de mudança na ordem dos genes descobertos em relação à disposição observada no mesmo cromossomo de *L. (L.) infantum* (Figura 10).

Pesquisas adicionais para homólogos e/ou ortólogos em seqüências genômicas de *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi* revelaram três genes *hsp70mts* localizados em um único agrupamento no cromossomo 6 da espécie *T. brucei* (dados não mostrados). Os três genes codificam proteínas idênticas que são muito similares à proteína Lc2.2, tendo em comum as

regiões centrais e as regiões carboxi-terminais ricas em glutamina (Figura 9). Na espécie *T. cruzi* a organização cromossômica dos genes não pôde ser adequadamente definida, entretanto múltiplos genes foram encontrados codificando para um tipo de proteína parecida àquela codificada pelo clone Lc2.2, conforme foi visto para o homólogo de *T. brucei* (Figura 9 e Figura 11).

<i>Li1</i>	2.1	1	MFARRVCGSA	AASAAFLARH	ESQKVGQDVI	GVDLGTYYSC	VATMDGDKAR	VLENSEGFRT	TPSVVAFKGS	EKLVGLAAKR	QAITNPQSTF	YAVKRLIGRR
<i>Li2</i>	2.2	1	MFARRVCGSA	AASAAFLARH	ESQKVGQDVI	GVDLGTYYSC	VATMDGDKAR	VLENSEGFRT	TPSVVAFKGS	EKLVGLAAKR	QAITNPQSTF	YAVKRLIGRR
<i>Li3</i>		1	MFARRVCGSA	AASAAFLARH	ESQKVGQDVI	GVDLGTYYSC	VATMDGDKAR	VLENSEGFRT	TPSVVAFKGS	EKLVGLAAKR	QAITNPQSTF	YAVKRLIGRR
<i>Li4</i>		1	MFARRVCGSA	AASAAFLARH	ESQKVGQDVI	GVDLGTYYSC	VATMDGDKAR	VLENSEGFRT	TPSVVAFKGS	EKLVGLAAKR	QAITNPQSTF	YAVKRLIGRR
<i>Lm1</i>	2.1	1	MFARRVCGSA	AASAAFLARH	ESQKVGQDVI	GVDLGTYYSC	VATMDGDKAR	VLENSEGFRT	TPSVVAFKGS	EKLVGLAAKR	QAITNPQSTF	YAVKRLIGRR
<i>Lm2-32.2</i>	2.2	1	MFARRVCGSA	AASAAFLARH	ESQKVGQDVI	GVDLGTYYSC	VATMDGDKAR	VLENSEGFRT	TPSVVAFKGS	EKLVGLAAKR	QAITNPQSTF	YAVKRLIGRR
<i>Lm4</i>		1	MFARRVCGSA	AASAAFLARH	ESQKVGQDVI	GVDLGTYYSC	VATMDGDKAR	VLENSEGFRT	TPSVVAFKGS	EKLVGLAAKR	QAITNPQSTF	YAVKRLIGRR
<i>Lm5</i>		1	MFARRVCGSA	AASAAFLARH	ESQKVGQDVI	GVDLGTYYSC	VATMDGDKAR	VLENSEGFRT	TPSVVAFKGS	EKLVGLAAKR	QAITNPQSTF	YAVKRLIGRR
<i>Tc1</i>	2.2	1	MFARRVCGSA	AASAAFLARH	ESQKVGQDVI	GVDLGTYYSC	VATMDGDKAR	VLENSEGFRT	TPSVVAFKGS	EKLVGLAAKR	QAITNPQSTF	YAVKRLIGRR
<i>Tb1</i>	2.2	1	MFARRVCGSA	AASAAFLARH	ESQKVGQDVI	GVDLGTYYSC	VATMDGDKAR	VLENSEGFRT	TPSVVAFKGS	EKLVGLAAKR	QAITNPQSTF	YAVKRLIGRR
<i>Li1</i>	2.1	101	FEDEHIQKDI	KNVYKIVRA	GNGDAWVDG	NGKQYSPSQI	GAFVLEKMKR	TAENFLGHKV	SNVVTCPAY	FNDAQROATK	DAGTIAGLNV	IRVVNEPTAA
<i>Li2</i>	2.2	101	FEDEHIQKDI	KNVYKIVRA	GNGDAWVDG	NGKQYSPSQI	GAFVLEKMKR	TAENFLGHKV	SNVVTCPAY	FNDAQROATK	DAGTIAGLNV	IRVVNEPTAA
<i>Li3</i>		101	FEDEHIQKDI	KNVYKIVRA	GNGDAWVDG	NGKQYSPSQI	GAFVLEKMKR	TAENFLGHKV	SNVVTCPAY	FNDAQROATK	DAGTIAGLNV	IRVVNEPTAA
<i>Li4</i>		101	FEDEHIQKDI	KNVYKIVRA	GNGDAWVDG	NGKQYSPSQI	GAFVLEKMKR	TAENFLGHKV	SNVVTCPAY	FNDAQROATK	DAGTIAGLNV	IRVVNEPTAA
<i>Lm1</i>	2.1	101	FEDEHIQKDI	KNVYKIVRA	GNGDAWVDG	NGKQYSPSQI	GAFVLEKMKR	TAENFLGHKV	SNVVTCPAY	FNDAQROATK	DAGTIAGLNV	IRVVNEPTAA
<i>Lm2-32.2</i>	2.2	101	FEDEHIQKDI	KNVYKIVRA	GNGDAWVDG	NGKQYSPSQI	GAFVLEKMKR	TAENFLGHKV	SNVVTCPAY	FNDAQROATK	DAGTIAGLNV	IRVVNEPTAA
<i>Lm4</i>		101	FEDEHIQKDI	KNVYKIVRA	GNGDAWVDG	NGKQYSPSQI	GAFVLEKMKR	TAENFLGHKV	SNVVTCPAY	FNDAQROATK	DAGTIAGLNV	IRVVNEPTAA
<i>Lm5</i>		101	FEDEHIQKDI	KNVYKIVRA	GNGDAWVDG	NGKQYSPSQI	GAFVLEKMKR	TAENFLGHKV	SNVVTCPAY	FNDAQROATK	DAGTIAGLNV	IRVVNEPTAA
<i>Tc1</i>	2.2	101	FEDEHIQKDI	KNVYKIVRA	GNGDAWVDG	NGKQYSPSQI	GAFVLEKMKR	TAENFLGHKV	SNVVTCPAY	FNDAQROATK	DAGTIAGLNV	IRVVNEPTAA
<i>Tb1</i>	2.2	101	FEDEHIQKDI	KNVYKIVRA	GNGDAWVDG	NGKQYSPSQI	GAFVLEKMKR	TAENFLGHKV	SNVVTCPAY	FNDAQROATK	DAGTIAGLNV	IRVVNEPTAA
<i>Li1</i>	2.1	201	ALAYGMDKTR	DSLIAVVDLG	GGTFDISVLE	IAGGVFEVKA	TNGDTHLGE	DFDLALSDYI	LEEFKRTSGH	DLSKERMALQ	RVREAAEKAK	CELSAMETE
<i>Li2</i>	2.2	201	ALAYGMDKTR	DSLIAVVDLG	GGTFDISVLE	IAGGVFEVKA	TNGDTHLGE	DFDLALSDYI	LEEFKRTSGH	DLSKERMALQ	RVREAAEKAK	CELSAMETE
<i>Li3</i>		201	ALAYGMDKTR	DSLIAVVDLG	GGTFDISVLE	IAGGVFEVKA	TNGDTHLGE	DFDLALSDYI	LEEFKRTSGH	DLSKERMALQ	RVREAAEKAK	CELSAMETE
<i>Li4</i>		201	ALAYGMDKTR	DSLIAVVDLG	GGTFDISVLE	IAGGVFEVKA	TNGDTHLGE	DFDLALSDYI	LEEFKRTSGH	DLSKERMALQ	RVREAAEKAK	CELSAMETE
<i>Lm1</i>	2.1	201	ALAYGMDKTR	DSLIAVVDLG	GGTFDISVLE	IAGGVFEVKA	TNGDTHLGE	DFDLALSDYI	LEEFKRTSGH	DLSKERMALQ	RVREAAEKAK	CELSAMETE
<i>Lm2-32.2</i>	2.2	201	ALAYGMDKTR	DSLIAVVDLG	GGTFDISVLE	IAGGVFEVKA	TNGDTHLGE	DFDLALSDYI	LEEFKRTSGH	DLSKERMALQ	RVREAAEKAK	CELSAMETE
<i>Lm4</i>		201	ALAYGMDKTR	DSLIAVVDLG	GGTFDISVLE	IAGGVFEVKA	TNGDTHLGE	DFDLALSDYI	LEEFKRTSGH	DLSKERMALQ	RVREAAEKAK	CELSAMETE
<i>Lm5</i>		201	ALAYGMDKTR	DSLIAVVDLG	GGTFDISVLE	IAGGVFEVKA	TNGDTHLGE	DFDLALSDYI	LEEFKRTSGH	DLSKERMALQ	RVREAAEKAK	CELSAMETE
<i>Tc1</i>	2.2	201	ALAYGMDKTR	DSLIAVVDLG	GGTFDISVLE	IAGGVFEVKA	TNGDTHLGE	DFDLALSDYI	LEEFKRTSGH	DLSKERMALQ	RVREAAEKAK	CELSAMETE
<i>Tb1</i>	2.2	201	ALAYGMDKTR	DSLIAVVDLG	GGTFDISVLE	IAGGVFEVKA	TNGDTHLGE	DFDLALSDYI	LEEFKRTSGH	DLSKERMALQ	RVREAAEKAK	CELSAMETE
<i>Li1</i>	2.1	301	VNLPPFITANA	DGAQHIOQHI	SRSKFEIGITQ	RLIERSIAPC	KQCKMDAGVE	LKEINDVVLV	GGMTRMPKVV	BEVKKFFQKD	PFRGVNPDEA	VALGAATLGG
<i>Li2</i>	2.2	301	VNLPPFITANA	DGAQHIOQHI	SRSKFEIGITQ	RLIERSIAPC	KQCKMDAGVE	LKEINDVVLV	GGMTRMPKVV	BEVKKFFQKD	PFRGVNPDEA	VALGAATLGG
<i>Li3</i>		301	VNLPPFITANA	DGAQHIOQHI	SRSKFEIGITQ	RLIERSIAPC	KQCKMDAGVE	LKEINDVVLV	GGMTRMPKVV	BEVKKFFQKD	PFRGVNPDEA	VALGAATLGG
<i>Li4</i>		301	VNLPPFITANA	DGAQHIOQHI	SRSKFEIGITQ	RLIERSIAPC	KQCKMDAGVE	LKEINDVVLV	GGMTRMPKVV	BEVKKFFQKD	PFRGVNPDEA	VALGAATLGG
<i>Lm1</i>	2.1	301	VNLPPFITANA	DGAQHIOQHI	SRSKFEIGITQ	RLIERSIAPC	KQCKMDAGVE	LKEINDVVLV	GGMTRMPKVV	BEVKKFFQKD	PFRGVNPDEA	VALGAATLGG
<i>Lm2-32.2</i>	2.2	301	VNLPPFITANA	DGAQHIOQHI	SRSKFEIGITQ	RLIERSIAPC	KQCKMDAGVE	LKEINDVVLV	GGMTRMPKVV	BEVKKFFQKD	PFRGVNPDEA	VALGAATLGG
<i>Lm4</i>		301	VNLPPFITANA	DGAQHIOQHI	SRSKFEIGITQ	RLIERSIAPC	KQCKMDAGVE	LKEINDVVLV	GGMTRMPKVV	BEVKKFFQKD	PFRGVNPDEA	VALGAATLGG
<i>Lm5</i>		301	VNLPPFITANA	DGAQHIOQHI	SRSKFEIGITQ	RLIERSIAPC	KQCKMDAGVE	LKEINDVVLV	GGMTRMPKVV	BEVKKFFQKD	PFRGVNPDEA	VALGAATLGG
<i>Tc1</i>	2.2	301	VNLPPFITANA	DGAQHIOQHI	SRSKFEIGITQ	RLIERSIAPC	KQCKMDAGVE	LKEINDVVLV	GGMTRMPKVV	BEVKKFFQKD	PFRGVNPDEA	VALGAATLGG
<i>Tb1</i>	2.2	301	VNLPPFITANA	DGAQHIOQHI	SRSKFEIGITQ	RLIERSIAPC	KQCKMDAGVE	LKEINDVVLV	GGMTRMPKVV	BEVKKFFQKD	PFRGVNPDEA	VALGAATLGG
<i>Li1</i>	2.1	401	VLRGDVKGLV	LLDVTPLSLG	IETLGGVETR	MIPKNTTIPT	KKSQTFSTAA	DNQTQVGIKV	FQGEREMAAD	NQMMGQFDLV	GIPPAPRGVP	QIEVTFDIDA
<i>Li2</i>	2.2	401	VLRGDVKGLV	LLDVTPLSLG	IETLGGVETR	MIPKNTTIPT	KKSQTFSTAA	DNQTQVGIKV	FQGEREMAAD	NQMMGQFDLV	GIPPAPRGVP	QIEVTFDIDA
<i>Li3</i>		401	VLRGDVKGLV	LLDVTPLSLG	IETLGGVETR	MIPKNTTIPT	KKSQTFSTAA	DNQTQVGIKV	FQGEREMAAD	NQMMGQFDLV	GIPPAPRGVP	QIEVTFDIDA
<i>Li4</i>		401	VLRGDVKGLV	LLDVTPLSLG	IETLGGVETR	MIPKNTTIPT	KKSQTFSTAA	DNQTQVGIKV	FQGEREMAAD	NQMMGQFDLV	GIPPAPRGVP	QIEVTFDIDA
<i>Lm1</i>	2.1	401	VLRGDVKGLV	LLDVTPLSLG	IETLGGVETR	MIPKNTTIPT	KKSQTFSTAA	DNQTQVGIKV	FQGEREMAAD	NQMMGQFDLV	GIPPAPRGVP	QIEVTFDIDA
<i>Lm2-32.2</i>	2.2	401	VLRGDVKGLV	LLDVTPLSLG	IETLGGVETR	MIPKNTTIPT	KKSQTFSTAA	DNQTQVGIKV	FQGEREMAAD	NQMMGQFDLV	GIPPAPRGVP	QIEVTFDIDA
<i>Lm4</i>		401	VLRGDVKGLV	LLDVTPLSLG	IETLGGVETR	MIPKNTTIPT	KKSQTFSTAA	DNQTQVGIKV	FQGEREMAAD	NQMMGQFDLV	GIPPAPRGVP	QIEVTFDIDA
<i>Lm5</i>		401	VLRGDVKGLV	LLDVTPLSLG	IETLGGVETR	MIPKNTTIPT	KKSQTFSTAA	DNQTQVGIKV	FQGEREMAAD	NQMMGQFDLV	GIPPAPRGVP	QIEVTFDIDA
<i>Tc1</i>	2.2	401	VLRGDVKGLV	LLDVTPLSLG	IETLGGVETR	MIPKNTTIPT	KKSQTFSTAA	DNQTQVGIKV	FQGEREMAAD	NQMMGQFDLV	GIPPAPRGVP	QIEVTFDIDA
<i>Tb1</i>	2.2	401	VLRGDVKGLV	LLDVTPLSLG	IETLGGVETR	MIPKNTTIPT	KKSQTFSTAA	DNQTQVGIKV	FQGEREMAAD	NQMMGQFDLV	GIPPAPRGVP	QIEVTFDIDA
<i>Li1</i>	2.1	501	NGICHVTAQD	KATGKTQNTI	ITANGGLSKE	QIEQMIRDSE	QHAEADRVKR	ELVEVRNNAE	TQLTTAERQL	GEWKYVSDAE	KENVKTLVAE	LRKAMENPNV
<i>Li2</i>	2.2	501	NGICHVTAQD	KATGKTQNTI	ITANGGLSKE	QIEQMIRDSE	QHAEADRVKR	ELVEVRNNAE	TQLTTAERQL	GEWKYVSDAE	KENVKTLVAE	LRKAMENPNV
<i>Li3</i>		501	NGICHVTAQD	KATGKTQNTI	ITANGGLSKE	QIEQMIRDSE	QHAEADRVKR	ELVEVRNNAE	TQLTTAERQL	GEWKYVSDAE	KENVKTLVAE	LRKAMENPNV
<i>Li4</i>		501	NGICHVTAQD	KATGKTQNTI	ITANGGLSKE	QIEQMIRDSE	QHAEADRVKR	ELVEVRNNAE	TQLTTAERQL	GEWKYVSDAE	KENVKTLVAE	LRKAMENPNV
<i>Lm1</i>	2.1	501	NGICHVTAQD	KATGKTQNTI	ITANGGLSKE	QIEQMIRDSE	QHAEADRVKR	ELVEVRNNAE	TQLTTAERQL	GEWKYVSDAE	KENVKTLVAE	LRKAMENPNV
<i>Lm2-32.2</i>	2.2	501	NGICHVTAQD	KATGKTQNTI	ITANGGLSKE	QIEQMIRDSE	QHAEADRVKR	ELVEVRNNAE	TQLTTAERQL	GEWKYVSDAE	KENVKTLVAE	LRKAMENPNV
<i>Lm4</i>		501	NGICHVTAQD	KATGKTQNTI	ITANGGLSKE	QIEQMIRDSE	QHAEADRVKR	ELVEVRNNAE	TQLTTAERQL	GEWKYVSDAE	KENVKTLVAE	LRKAMENPNV
<i>Lm5</i>		501	NGICHVTAQD	KATGKTQNTI	ITANGGLSKE	QIEQMIRDSE	QHAEADRVKR	ELVEVRNNAE	TQLTTAERQL	GEWKYVSDAE	KENVKTLVAE	LRKAMENPNV
<i>Tc1</i>	2.2	501	NGICHVTAQD	KATGKTQNTI	ITANGGLSKE	QIEQMIRDSE	QHAEADRVKR	ELVEVRNNAE	TQLTTAERQL	GEWKYVSDAE	KENVKTLVAE	LRKAMENPNV
<i>Tb1</i>	2.2	501	NGICHVTAQD	KATGKTQNTI	ITANGGLSKE	QIEQMIRDSE	QHAEADRVKR	ELVEVRNNAE	TQLTTAERQL	GEWKYVSDAE	KENVKTLVAE	LRKAMENPNV
<i>Li1</i>	2.1	601	AKDDLAAATD	KLQKAVMECG	RTEYQAAAA	NSGSS	NSG	EQOQQQCGQE	QQQQ--NSE	ETK		
<i>Li2</i>	2.2	601	AKDDLAAATD	KLQKAVMECG	RTEYQAAAA	NSGSS	NSG	EQOQQQCGQE	QQQQ--NSE	ETK		
<i>Li3</i>		601	AKDDLAAATD	KLQKAVMECG	RTEYQAAAA	NSGSS	NSG	EQOQQQCGQE	QQQQ--NSE	ETK		
<i>Li4</i>		601	AKDDLAAATD	KLQKAVMECG	RTEYQAAAA	NSGSS	NSG	EQOQQQCGQE	QQQQ--NSE	ETK		
<i>Lm1</i>	2.1	601	AKDDLAAATD	KLQKAVMECG	RTEYQAAAA	NSGSS	NSG	EQOQQQCGQE	QQQQ--NSE	ETK		
<i>Lm2-32.2</i>	2.2	601	AKDDLAAATD	KLQKAVMECG	RTEYQAAAA	NSGSS	NSG	EQOQQQCGQE	QQQQ--NSE	ETK		
<i>Lm4</i>		601	AKDDLAAATD	KLQKAVMECG	RTEYQAAAA	NSGSS	NSG	EQOQQQCGQE	QQQQ--NSE	ETK		
<i>Lm5</i>		601	AKDDLAAATD	KLQKAVMECG	RTEYQAAAA	NSGSS	NSG	EQOQQQCGQE	QQQQ--NSE	ETK		
<i>Tc1</i>	2.2	601	AKDDLAAATD	KLQKAVMECG	RTEYQAAAA	NSGSS	NSG	EQOQQQCGQE	QQQQ--NSE	ETK		
<i>Tb1</i>	2.2	601	AKDDLAAATD	KLQKAVMECG	RTEYQAAAA	NSGSS	NSG	EQOQQQCGQE	QQQQ--NSE	ETK		

Figura 9. Alinhamento dos resíduos de aminoácidos componentes das proteínas identificadas em tripanosomatídeos. *L. (L.) infantum* (4 homólogos *Li1*=*Lc* 2.1; *Li2*–*Li4*=*Lc* 2.2), *L. (L.) major* (5 homólogos *Lm1*=*Lc* 2.1; *Lm2*=*Lm3*=*Lc* 2.2; *Lm4*–*Lm5*=*Lc* 2.2), *T. cruzi* (1 homólogo *Tc1*=*Lc* 2.2), *T. brucei* (1 dos homólogos *Tb1*=*Lc* 2.2) e semelhança de cada uma delas com as proteínas *Lc2.1* e *Lc2.2* (HSP70mts). Notar a presença de muitos resíduos de glutamina (Q) nas regiões carboxi-terminais daqueles homólogos à proteína *Lc2.2* (final das seqüências).

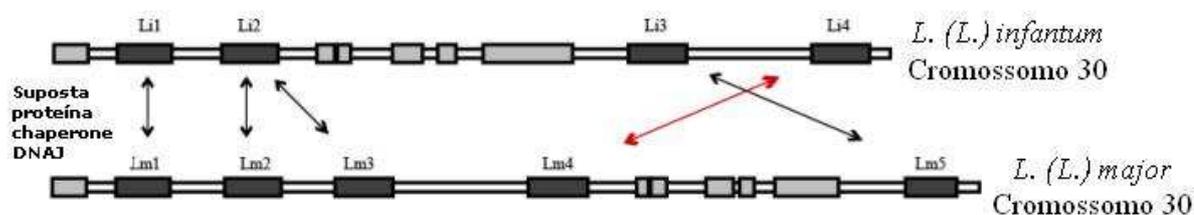


Figura 10. Organização gênica das HSP70mts nas espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) major*. Destaca-se a existência de duas seqüências gênicas idênticas (evento de duplicação) conforme apresentado no cromossomo 30 de *L. (L.) major* (*Lm2*=*Lm3*) quando comparado com o cromossomo 30 de *L. (L.) infantum* (*Li2*), e a mudança de posição de genes na espécie *L. (L.) major* (*Lm4* e *Lm5*) em relação aos genes homólogos na espécie *L. (L.) infantum* (*Li3* e *Li4*).

Durante investigação de homologias com seqüências genômicas de *L. (V.) brasiliensis* foram descobertas duas seqüências completas e três seqüências parciais também no cromossomo 30 (dados não mostrados). Dentre essas, uma seqüência codifica uma proteína que se assemelha à proteína Lc2.1, e outras duas codificam proteínas semelhantes à proteína Lc2.2 (Figura 11), no que diz respeito à região central. Embora algumas seqüências protéicas derivadas dos genes (completos e incompletos) de *L. (V.) brasiliensis* se assemelhem à da proteína Lc2.2, necessitam-se mais esclarecimentos, visto que para duas das proteínas identificadas apenas estão disponíveis as regiões amino-terminais (dados não mostrados).

Todos os dados adquiridos e analisados das espécies citadas puderam ser agrupados em uma árvore filogenética, permitindo o estudo da origem dessas proteínas, dentro de cada espécie e fundamentado em elementos comparativos das seqüências em questão. Isso pôde demonstrar o grau de similaridade das seqüências descobertas entre as espécies estudadas e a relação de semelhança dessas seqüências protéicas com as seqüências das proteínas codificadas pelos clones Lc2.1 e Lc2.2 (Figura 11). A figura 11 mostra que as proteínas pertencentes a gêneros distintos (*Leishmania* e *Trypanosoma*) formam grupos bastante distintos, apesar de possuírem evolutivamente as mesmas funções. Além disso, as proteínas relacionadas ao clone Lc2.1 se agrupam separadamente das demais o que indica uma evolução comum dessa proteína dentro do gênero *Leishmania*.

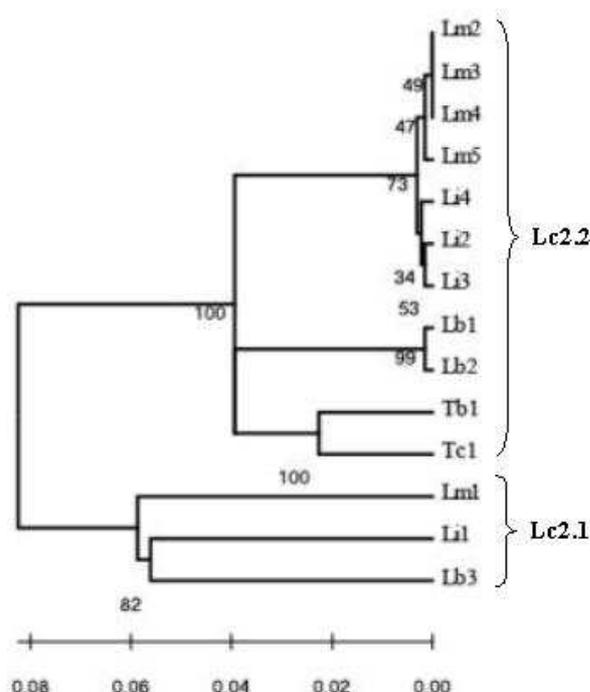


Figura 11. Análise filogenética agrupando os supostos homólogos mitocondriais (HSP70mts) em várias espécies de tripanosomatídeos (*L.(L.) major*, *L.(L.) infantum*, *L.(V.) brasiliensis*, *T. brucei* e *T. cruzi*) em relação às HSP70mts de *L. (L.) chagasi* descobertas (Lc2.1 e Lc2.2).

6.2 Estratégias de subclonagem

A estratégia de subclonagem do fragmento FP2, que corresponde a um trecho da sequência da região codificadora do clone Lc2.2 (aminoácidos 279–613 da proteína inteira), foi concebida a partir dos sequenciamentos e dos mapas de restrição obtidos durante o trabalho de Nascimento (2000) conforme ilustra a figura 12A. Em primeiro lugar, o plasmídeo recombinante pBlueScript-Lc2.2 foi digerido com a enzima *Pst* I, que possui dois sítios dentro da região codificadora do clone Lc2.2 (Figura 12A). Essa digestão gerou um novo fragmento com 1.005 pares de bases (FP2), que por sua vez foi clonado em outro plasmídeo de clonagem, o pTZ18R, no sítio para *Pst* I (Figura 12B). No presente trabalho, uma alíquota do plasmídeo recombinante pTZ18R-FP2 foi digerida com as enzimas *Bam* HI e *Hind* III, que possuem sítios antes e depois do sítio para *Pst* I no pTZ18R (ANEXO B). Paralelamente, um plasmídeo de expressão (pRSET A), previamente clonado com um fragmento (A4), foi digerido com as mesmas enzimas *Bam* HI e *Hind* III, para se obter o plasmídeo de expressão com extremidades complementares àquelas do fragmento FP2 digerido (Figura 12B). Desse modo, para a subclonagem do fragmento de interesse (FP2) no plasmídeo pRSET A foi

necessária avaliação prévia em gel de agarose (Figura 12C). Consecutivamente, o fragmento FP2 foi subclonado no pRSET A, gerando o novo plasmídio pRSET A-FP2, conforme mostra o desenho esquemático da figura 12B.

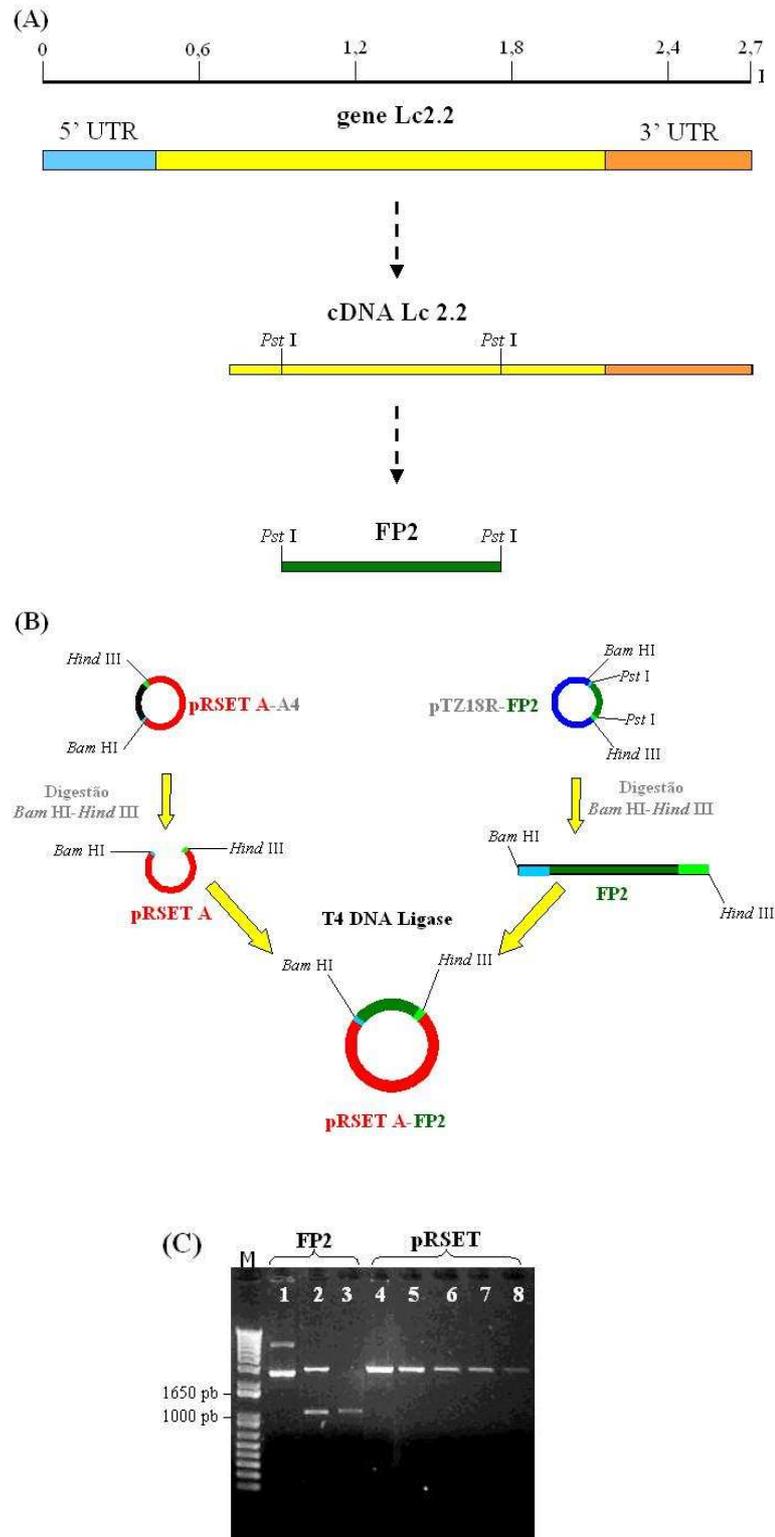


Figura 12. Desenho esquemático da estratégia de subclonagem do fragmento FP2 no plasmídio de expressão. (A) Gene Lc2.2 de *L. (L.) chagasi* com a seqüência codificadora em amarelo, a região 5' não-traduzível em azul e a região 3' não-traduzível em laranja. Obtenção do fragmento FP2 após digestão com a enzima de restrição *Pst* I a partir do clone de cDNA Lc2.2 (clonado no pBlueScript), para clonagem no sítio *Pst* I do pTZ18R no trabalho de Nascimento (2000). Escala horizontal mostrando tamanho provável do gene em kilobases (kb). (B) Digestões das construções pRSET A-A4 e pTZ18R-FP2 com as enzimas *Bam* HI–*Hind* III para subclonagem do FP2 no pRSET A. (C) Gel agarose 1% com amostras de DNA do fragmento FP2 e do plasmídio pRSET A: (1) construção pTZ18R-FP2; (2) digestão do pTZ18R-FP2 com *Bam* HI–*Hind* III; (3) fragmento FP2 purificado; (4) pRSET A digerido com *Bam* HI–*Hind* III e purificado; (5–8) quantificação do pRSET A. M = pesos moleculares em pares de base (pb).

Após realizar a subclonagem do fragmento FP2, transformaram-se bactérias *E. coli* DH5 α ou DH10B com alíquota do plasmídio recombinante (pRSET A-FP2) e, após selecção de colônias bacterianas que continham o material recombinante, realizou-se a extração do DNA plasmidial pRSET A-FP2, segundo Sambrook e Russell (2001) (Figura 13).

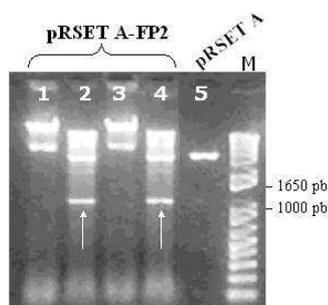


Figura 13. Gel agarose 1% com amostras de extrações de DNA plasmidial. (1 e 3) Exemplos de plasmídios recombinantes pRSET A-FP2 provenientes de diferentes colônias de bactérias e obtidos após minipreparação de DNA plasmidial. (setas em 2 e 4) fragmentos FP2 originados após digestões dos DNAs plasmidiais, mostrados nas colunas 1 e 3, com enzimas *Bam* HI–*Hind* III. (5) Alíquota do plasmídio pRSET A purificado. M = pesos moleculares em pares de base (pb).

6.3 Expressão em *E. coli* e purificação da proteína recombinante

Bactérias *E. coli* BL21 starTM, previamente transformadas com o plasmídio recombinante pRSET A-FP2, foram inoculadas em meio de cultura líquido para, após adição de IPTG, produzir a proteína recombinante. O padrão de migração da proteína recombinante em gel de poliacrilamida foi consistente com o peso molecular estimado de 45 kDa para a proteína recombinante FP2 expressa em larga escala conforme apresenta a figura 14, após alguns ensaios preliminares em pequenas escalas (dados não mostrados).

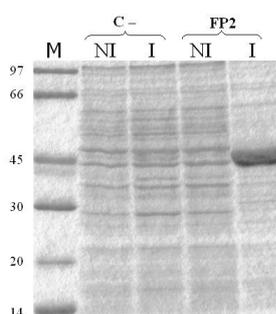


Figura 14. Expressão da proteína recombinante FP2 em *E. coli* BL21 starTM. Gel de poliacrilamida 15 % corado com azul de Coomassie, contendo amostras de diferentes extratos de bactérias recombinantes antes da indução (colunas NI), e após a indução da expressão (colunas I). (C –) Controle negativo e (FP2) proteína recombinante FP2 produzida. M = pesos moleculares em kilodaltons (kDa).

Em seguida à expressão da proteína recombinante, aquelas amostras que apresentaram bom rendimento foram quantificadas por densitometria da banda protéica de interesse (FP2) em gel SDS (dados não mostrados), e o sedimento de células da produção protéica em grande escala foi tratado com tampão PBS ou Tris-HCl para viabilizar a purificação da proteína FP2 através de resina de níquel (Figura 15).

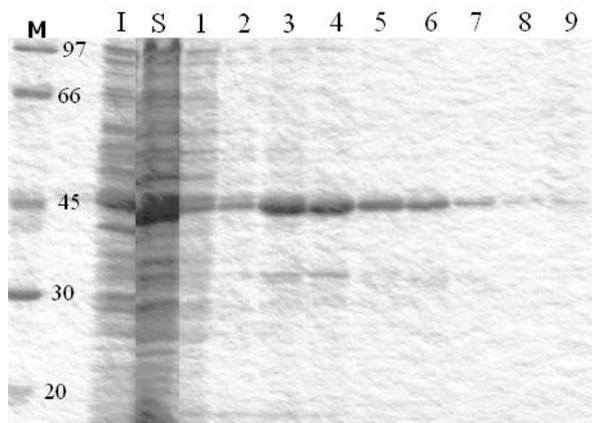


Figura 15. Purificação da proteína recombinante FP2 com resina de níquel. Gel de poliacrilamida 15 % corado com Coomassie blue. (I) Amostra contendo extrato de bactérias recombinantes produtoras da proteína FP2. (S) amostra com proteína recombinante solubilizada no sobrenadante após sonicação. (1 e 2) Amostras das lavagens. (3–8) Amostras das eluições. (9) Amostra da resina após eluições. M = pesos moleculares em kilodaltons (kDa).

6.4 Exame das HSP70mts em tripanosomatídeos

Apoiando-se nas descobertas, através dos bancos de dados na Internet, das seqüências de genes dos diversos tripanosomatídeos citados, desenvolveram-se estratégias para verificar a expressão das formas nativas das HSP70mts, codificadas pelos genes, em células de espécies do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*.

Entretanto, antes, realizou-se fracionamento de amostras das proteínas recombinantes Lc2.1, Lc2.2 (10 η g – ambas de extratos de bactérias), da FP2 e de uma HSP70 citoplasmática (respectivamente 20 η g e 10 η g – ambas purificadas), em gel SDS como ilustra o gel corado com Coomassie na Figura 16A. Por sua vez, transferiu-se essas mesmas amostras na mesma seqüência de aplicação, e a partir do mesmo gel, para uma membrana de PVDF com o intuito de, em seguida, sondar essa membrana com anticorpos purificados anti-proteína FP2. Através desse ensaio se verificou que os anticorpos anti-proteína FP2 purificados reconhecem especificamente as HSP70 mitocondriais recombinantes sem ocorrer

qualquer reação cruzada com a HSP citoplasmática ou com qualquer proteína do extrato de bactéria *E. coli* não-transformada (Figura 16B). Não obstante, foram detectadas no filme de ECL bandas abaixo daquelas relativas às proteínas Lc2.1 e Lc2.2, provavelmente devido à degradação dessas proteínas provenientes da produção em extratos bacterianos.

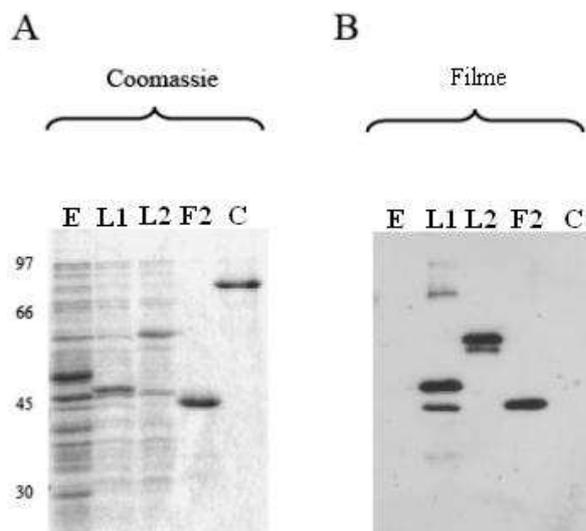


Figura 16. Análise das proteínas recombinantes e reatividade dos soros por “western blot”. (A) Gel de poliacrilamida corado com Coomassie blue contendo na coluna (E) extrato de *E. coli* não-transformada, na (L1) extrato de *E. coli* com Lc2.1, na (L2) extrato de *E. coli* com Lc2.2, na (F2) proteína FP2 purificada e na (C) proteína HSP70 citoplasmática purificada. (B) Revelação de membrana de PVDF sondada com anticorpos purificados após transferência das mesmas amostras a partir do mesmo gel. Na coluna ao lado do gel Coomassie estão indicados os pesos moleculares em kilodaltons (kDa).

A revelação da especificidade dos anticorpos purificados conduziu para a pesquisa do padrão de reconhecimento protéico e a confirmação da existência do tipo da proteína de interesse em extratos de algumas espécies de tripanosomatídeos (5×10^4 células/poço), utilizando-se os anticorpos anti-proteína FP2, conforme mostra a figura 17. Observaram-se particularidades entre as diversas espécies, das quais se destacaram: (i) diferenças nas quantidades de proteínas nativas expressas em cada espécie; e (ii) variações nas características moleculares como tamanho e peso molecular em cada espécie. Interessantemente, a banda correspondente à proteína de interesse em *T. brucei* apresentou uma fraca intensidade possivelmente devido à manipulação durante a preparação do extrato dessa espécie.

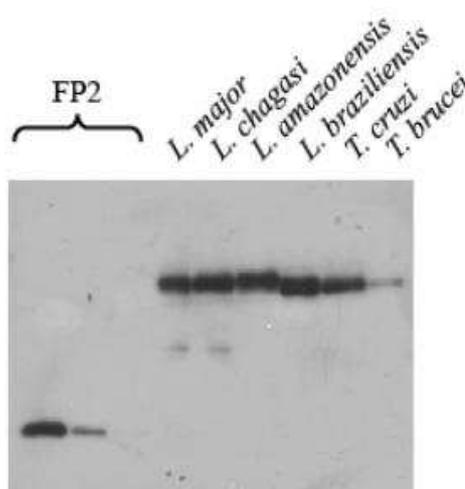


Figura 17. Filme de ECL revelado com anticorpos anti-proteína FP2 após transferência de extratos de diversas espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* para membrana de PVDF. Nas duas colunas FP2 são mostradas bandas referentes às quantidades de 6,25 η g e 3 η g da proteína recombinante FP2 purificada.

Diante do exposto, procurou-se avaliar a expressão da HSP70 mitocondrial em diversas fases do ciclo de vida de algumas espécies do gênero *Leishmania*. A Figura 18 apresenta o padrão de reconhecimento da proteína nativa em curvas de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* (5×10^4 células/poço), utilizando-se anticorpos anti-proteína FP2. Nesta figura se constata a presença de duas bandas nos extratos de *L. (L.) amazonensis* (Figura 18A). Além disso, esse resultado pôde ratificar achados de “imunoblots” anteriores da presente pesquisa que apresentavam um mesmo padrão de reconhecimento de duas bandas em extratos protéicos de várias fases do ciclo de vida de *L. (L.) amazonensis* ($5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$ células/poço), com a diferença, nesses casos, de ter sido utilizado soro policlonal contra a proteína recombinante Lc2.1 (dados não mostrados). Além disso, observou-se o reconhecimento das duas bandas também na forma amastigota de *L. (L.) amazonensis*. Todavia, o efeito encontrado demonstrou semelhanças nas intensidades dessas bandas, correspondendo, possivelmente, à expressão equivalente de dois diferentes homólogos na fase amastigota (setas Figura 18A). Isso reforçou os achados de “immunoblots”, já realizados com soro policlonal anti-Lc2.1, que apresentavam mesmo padrão de reconhecimento proporcional de duas bandas na fase amastigota de extrato protéico de *L. (L.) amazonensis* (dados não mostrados).

No que diz respeito à expressão da HSP70mt em *L. (L.) chagasi* (5×10^4 células/poço) verificou-se o reconhecimento de apenas uma forma da proteína conforme ilustra o filme da figura 18B. Entretanto, vale ressaltar que a cepa de *L. (L.) chagasi* utilizada pode ter perdido a infectividade pelo fato de ser mantida por muito tempo em meios de cultivo. Além disso, para

a cepa de *L. (L.) chagasi* não houve qualquer ensaio contendo amostras de extratos da forma amastigota.

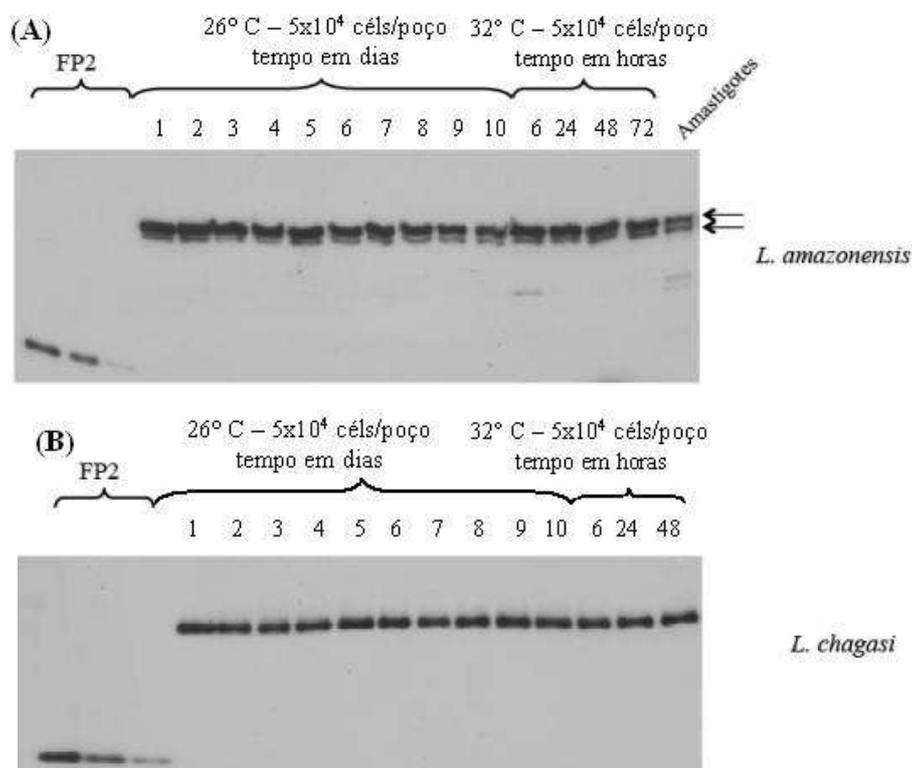


Figura 18. Filmes de ECL com padrão de reconhecimento da proteína recombinante FP2 e das HSPs70mt nativas em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*. (A) Curva de extratos de *L. (L.) amazonensis* com 5×10^5 células/poço de dias seguidos na temperatura de 26° C e a quantidade de tempo transcorrido na temperatura de 32° C; poço “Amastigotes” com, aproximadamente, $1,5 \times 10^6$ células amastigotas. (B) Curva de extratos de *L. (L.) chagasi* com 5×10^5 células/poço de dias seguidos na temperatura de 26° C e a quantidade de tempo transcorrido na temperatura de 32° C. Ambos os filmes revelam a presença da proteína recombinante FP2 nas quantidades de 6,25 ng, 3,0 ng e 1,5 ng.

6.5 Localização protéica

O dado revelado através da microscopia confocal demonstrou a localização das HSP70mts no interior de células de *L. (L.) chagasi*, como pode ser verificado na figura 19. A mitocôndria em *Leishmania spp.* é uma estrutura tubular que se espalha ao longo de toda a célula do parasita, e por isso as proteínas HSP70mts nativas (em verde) se mostram distribuídas ao longo de toda a célula.

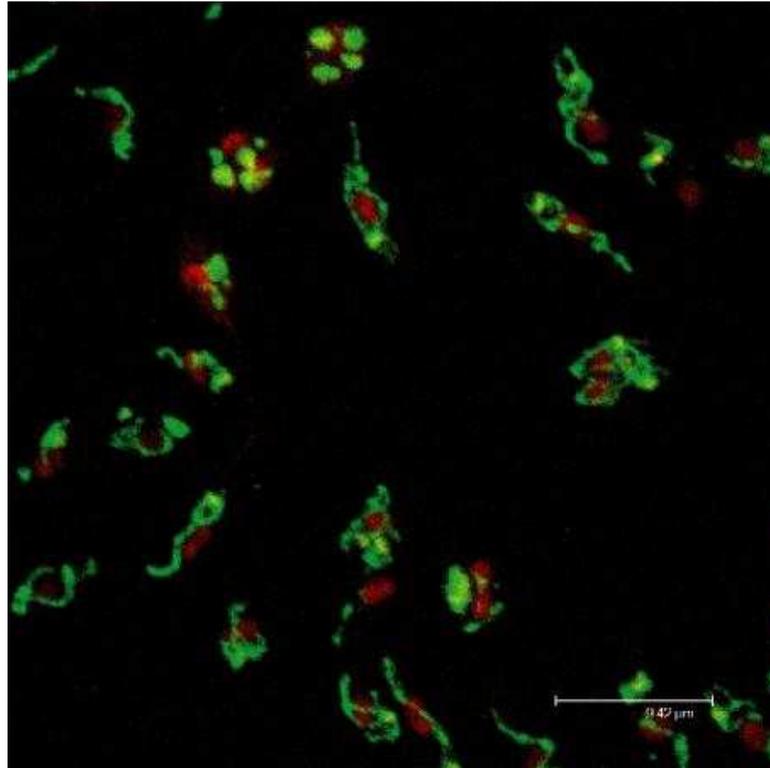


Figura 19. Imunolocalização das HSP70mts no interior de células de *L. (L.) chagasi* através de microscopia confocal. Foto digitalizada de preparação de células de *L. (L.) chagasi* sondadas com anticorpos anti-proteína FP2. As ligações dos anticorpos nos locais onde se encontravam as HSP70mts foram reveladas com anticorpos anti-IgG de coelho conjugados a moléculas fluorescentes Alexa fluor 488 (fluorescência verde). Estruturas formadas por ácidos nucléicos marcaram-se com TOTO3 (fluorescência vermelha). Escala utilizada de 1:6.000.

7 DISCUSSÃO

Este estudo surgiu a partir de uma abordagem que originalmente se propôs a indentificar antígenos imunologicamente relevantes e conservados entre diferentes espécies de *Leishmania*. Especificamente, o presente trabalho destacou um grupo de proteínas composto por várias famílias protéicas, as proteínas de choque térmico ou HSPs. O isolamento de dois fragmentos distintos de cDNA (Lc2.1 e Lc2.2) que codificam HSPs mitocondriais de 70kDa em *L. (L.) chagasi*, orientou-nos em direção à explicação de distintos aspectos das HSP70mts em *Leishmania spp.* com possíveis implicações no metabolismo mitocondrial.

Os resultados obtidos quando se realizou a comparação das seqüências nucleotídicas (DNA) e de aminoácidos de diversos homólogos às HSP70mts de *L. (L.) chagasi*, em várias espécies de tripanosomatídeos, corroborou com dados descritos na literatura que relatam a existênica de dois tipos distintos de genes (FOLGUEIRA et al., 2005; QUIJADA et al., 2000; ROBERT, 2003; SEARLE; MCCROSSAN; SMITH, 1993).

Em tripanosomatídeos, homólogos às HSP70mts foram originalmente relatados em *L. (L.) major*, com a denominação de mp70.1 (SEARLE; MCCROSSAN; SMITH, 1993), em *T. cruzi*, denominada mtp70 (ENGMAN; KIRCHHOFF; DONELSON, 1989) e em *Crithidia fasciculata*, chamada de MCP72 (EFFRON et al., 1993). Searle, Mccrossan e Smith (1993) ainda relataram a possível existênica de dois distintos homólogos à HSP70mt, baseados na localização celular diferente de duas HSP70mts descritas em tripanosomatídeos, quando encontraram a mp70.1 distribuída por toda a mitocôndria, enquanto a mtp70 estava restrita à região do cinetoplasto e associada ao DNA nesta estrutura.

No presente trabalho, sugeriu-se a produção equivalente de dois homólogos na forma amastigota de *L. (L.) amazonensis*. Esse dado, recentemente descrito na literatura, pode representar a expressão estágio-específica equivalente de dois possíveis homólogos que apresentam diferenças pontuais em trechos de suas seqüências polipeptídicas e provavelmente em segmentos das seqüências nucleotídicas (FOLGUEIRA et al., 2005). Dados de reconhecimento de duas bandas referentes à expressão concomitante de duas formas homólogas já havia sido relatado para *L. (V.) brasiliensis* por Nascimento (2000).

Por outro lado, Klein et al. (1995a, b) descreveram que a localização das HSP70mts no cinetoplasto era típica para todos os tripanosomatídeos, contrariando os nossos resultados. Entretanto, vale ressaltar que não é possível definir as razões para essa discrepância nos

resultados de diferentes grupos de pesquisa, uma vez que os distintos homólogos à HSP70mt são muito semelhantes para serem facilmente discriminados através de soro policlonal.

Entretanto, a análise de citolocalização no presente estudo revelou que as HSP70mts nativas se distribuem ao longo de toda a mitocôndria tubular da célula do parita *L. (L.) chagasi*, e não especificamente numa região dessa organela, como o cinetoplasto. Isso reforça o relato de Nascimento (2000) no que diz respeito à refutação dos dados revelados por Klein et al. (1995a, b), apoiando os dados de Searle; Mccrossan e Smith (1993) a cerca da distribuição da mp70.1 por toda a mitocôndria, e de Rassow et al. (1999) sobre a importação desse tipo de proteína da mitocôndria para o citoplasma e vice-versa.

Sabe-se que as proteínas HSP70 mitocondriais estudadas desempenham uma função essencial na importação protéica para a mitocôndria, onde a atividade ATPase proporciona a força motora para o transporte de polipeptídeos através das duas membranas mitocondriais (RASSOW et al., 1999). Elas também participam no dobramento daquelas proteínas que são sintetizadas pela maquinaria de tradução mitocondrial, bem como protege as proteínas mitocondriais de eventos estressores.

No presente trabalho, duas características distintas descobertas nos homólogos à HSP70mt em *Leishmania spp.* merecem destaque. Em primeiro lugar, a provável expressão da proteína menor (Lc2.1) em células amastigotas após choque térmico. Isto foi sugerido anteriormente quando Searle, Mccrossan e Smith (1993) observaram a indução de uma proteína HSP70mt menor, reconhecida por anticorpos específicos para o homólogo à HSP70mt de *L. (L.) major*, em células que sofreram choque térmico por duas horas. A outra característica está relacionada com diferenças nas seqüências de aminoácidos das proteínas Lc2.1 e Lc2.2. A seqüência rica em glutamina (Q) na extremidade carboxi-terminal exclusiva da proteína Lc2.2, e em proteínas relacionadas a Lc2.2 encontradas nas espécies *Trypanosoma* e *Crithidia*, foi percebida precocemente e sugerida como tendo um possível papel na multimerização protéica (EFFRON et al., 1993). De fato, trechos de poli-glutamina estão associados com multimerização e agregação proteína-proteína encontradas no início de doenças humanas neurodegenerativas (PERUTZ et al., 1994; STOTT et al., 1995). A distinta extremidade carboxi-terminal e as proteínas ricas em glutamina dos tripanosomatídeos relacionadas à proteína Lc2.2 devem ter implicações funcionais as quais permanecem para serem identificadas. Por sua vez, uma distinta extremidade carboxi-terminal para as proteínas relacionadas à proteína Lc2.1 adiciona um maior grau de variação para esse tipo de proteína como será discutido adiante.

Por exemplo, dos três homólogos à HSP70mt diferentes descritos em leveduras por Craig e Marszalek (2002), há uma identidade de 52% entre a HSP70mt predominante em levedura (Ssc1) e o homólogo mais divergente (Ssq1). Entretanto esses homólogos ainda compartilham alguns resíduos conservados, dicordantes na proteína Lc2.1. Contudo, não estamos aptos no momento para detectar substituições pontuais de aminoácidos na proteína Lc2.1 e em qualquer outra proteína relacionada à HSP70, seja mitocondrial ou citoplasmática. Relatos anteriores de alinhamentos incluindo grande número de HSP70s de diferentes organismos destaca a conservação de alguns dos resíduos modificados na proteína de *Leishmania* (KARLIN; BOCCHIERI, 1998).

Nossos resultados realçam uma forte pressão seletiva nos tripanosomatídeos para a evolução das HSP70mts em relação a seus correlativos citoplasmáticos que são mais conservados em comparação com outros eucariotos. Isso é mais exacerbado nas proteínas de *Leishmania*, culminando com a evolução de uma nova proteína que possui distinto domínio de ligação ao substrato e extremidade carboxi-terminal. Será muito interessante elucidar quais são razões biológicas que sustentam esse dinamismo evolutivo.

Portanto, para tentar controlar da leishmaniose visceral, sugere-se o uso de antígenos protéicos definidos de espécies do gênero *Leishmania* como componentes de uma vacina, porque isso pode ser um avanço em relação ao emprego de extratos totais ou de frações protéicas, em termos de padronização e redução dos efeitos colaterais (ABATH, 2000; HANDMAN, 2001; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Em particular, as HSPs são fortes candidatas para serem utilizadas na imunoprofilaxia da leishmaniose, tendo em vista a alta conservação de seqüência e a sua comprovada imunogenicidade.

8 CONCLUSÕES

- A análise das seqüências dos genes que codificam HSP70mt em *Leishmania spp.* e *Trypanosoma spp.* mostrou que existem dois tipos de proteínas com características distintas.
- Demonstrou-se que um tipo de gene *hsp70mt* possui várias cópias dentro dos cromossomos dispostas em tandem.
- Resultados apontam para uma recente evolução das HSP70mt especificamente no gênero *Leishmania*.
- A análise da expressão das HSP70mts nativas, em diversos tripanosomatídeos, demonstrou que este tipo de proteína possui alto grau de conservação entre espécies.
- A expressão das HSP70mts nativas durante o ciclo de vida de *L. (L.) amazonensis* mostrou o aumento da síntese de um tipo de HSP70mt após choque térmico.
- Resultados de microscopia confocal revelaram que as HSP70mt nativas se distribuem ao longo de toda a mitocôndria tubular no interior de células de *L. (L.) chagasi*.

9 PERSPECTIVAS

Ainda são necessários estudos aprofundados para avaliar, de maneira precisa, qual o papel da HSP70mt como antígeno diagnóstico e até mesmo sua função como componente de vacina, para humanos e cães, que possa vir a ser desenvolvida.

Por isso sugere-se:

- Utilizar a HSP70mt recombinante em ensaios de ELISA com soros de indivíduos e cães infectados.
- Avaliar o desempenho diagnóstico deste teste com grande quantidade de amostras.
- Utilizar a HSP70mt recombinante em kits de teste rápido (cromatografia) para triagem em campo de indivíduos e cães.
- Propor uso da HSP70mt recombinante em etapas pré-clínicas, clínicas e em ensaios clínicos (fases I a IV) para desenvolver vacina, visando prevenir e controlar a leishmaniose visceral.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Imunidade contra micróbios. In: _____. **Imunologia Celular & Molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: RevinteR, 2000. Cap. 16. ISBN 85-7309-364-1.
- ABATH, F. G. C. Development of vaccines against human parasitic diseases: tools, current status and perspectives. **Expert opinion on investigational drugs**, London, v. 9, n. 2, p. 301–310, fev. 2000.
- AFRIN, F. et al. Characterization of *Leishmania donovani* Antigens Encapsulated in Liposomes That Induce Protective Immunity in BALB/c Mice. **Infection and immunity**, Washington, v. 70, n. 12, p. 6697–6706, 2002.
- AHMED, S. et al. Intradermal Infection Model for Pathogenesis and Vaccine Studies of Murine Visceral Leishmaniasis. **Infection and immunity**, Washington, v. 71, p. 401–410, 2003.
- AKOPYANTS, N. S. et al. Expression profiling using random genomic DNA microarrays identifies differentially expressed genes associated with three major developmental stages of the protozoan parasite *Leishmania major*. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 136, p. 71–86, 2004.
- ALBERTS, B. et al. Manipulação de proteínas, DNA e RNA. In: _____. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. Cap 8. ISBN 85-363-0272-0.
- ALCE, T. M. et al. Expression of hydrophilic surface proteins in infective stages of *Leishmania donovani*. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 102, p. 191–196, 1999.
- AMORIM, A. G. et al. Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. **Cell stress & chaperones**, New York. 1, n. 3, p. 177–87, 1996.
- ARIAS, J. R. et al. The Reemergence of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 2, n. 2, p. 145–146, abr.–jun. 1996.
- AZEVEDO, A. C. et al. The sand fly fauna (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of a focus of cutaneous Leishmaniasis in Ilheus, state of Bahia, Brazil. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 1, p. 75–79, 1996.

BADARÓ, R. et al. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **The Journal infectious diseases**, Chicago, v. 173, p. 758–761, 1996.

BEDOR, C. N. G. **Sequenciamento e caracterização de genes identificados como codificantes para proteínas antigênicas de *Leishmania chagasi***. 2003. 75 f. Dissertação (Mestrado em genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

BHATIA, A. et al. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmaniachagasi*. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 102, p. 249–261, 1999.

BLACKWELL, J. M. Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. **Parasitology**, London, v. 104, p. S19–S34, 1992.

BLACKWELL, J. M. Tumor Necrosis Factor alpha and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Parasitology today**, Cambridge, v. 15, n. 2, p. 73–75, 1999.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International journal for parasitology**, New York, v. 28, p. 121–134, 1998.

BRANDÃO – FILHO, S. P. et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in ‘Zona da Mata’ region. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 445–449, 1994.

CABRERA, M. et al. Polymorphism in Tumor Necrosis Factor Genes Associated with Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of experimental medicine**, New York, v. 182, p. 1259–1264, 1995.

CALDAS, A. J. M. et al. Visceral leishmaniasis in pregnancy: a case report. **Acta tropica**, Basel, v. 88, p. 39–43, 2003.

CAMPOS JR, D. Características clínico-epidemiológicas do Calazar na criança. Estudo de 75 casos. **Jornal de pediatria**, Rio de Janeiro, v. 71, n. 5, p. 261–265, 1995.

CAMPOS-NETO, A. et al. Cloning and Expression of a *Leishmania donovani* Gene Intructed by a Peptide Isolated from Major Histocompatibility Complex II Molecules of Infected Macrophages. **Journal of experimental medicine**, New York, v. 182, p. 1423–1433, 1995.

CARDOSO, S. R. A. et al. Identification and purification of immunogenic proteins from nonliving promastigote polyvalent *Leishmania* vaccine (Leishvacin[®]). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 193–199, 2003.

CHAKRABARTY, R. et al. Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules (gp63 and LPG). **The Journal of parasitology**, Lawrence, v. 82, n. 4, p. 632–635, 1996.

CHAMPSI, J.; MCMAHON-PRATT, D. Membrane glycoprotein M-2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. **Infection and immunity**, Washington, v. 52, n. 12, p. 3272–3279, 1988.

CHANG, K-P. et al. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication na pathoantigenicity. **Acta tropica**, Basel, v. 85, p. 375–390, 2003.

CLAYTON, C. et al. Protein trafficking in Kinetoplastid Protozoa. **Microbiological reviews**, Washington, v. 59, n. 3, p. 325–344, 1995.

COSTA, S. R. et al. T Cell Response of Asymptomatic *Leishmania chagasi* Infected Subjects to Recombinant *Leishmania* Antigens. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 3, p. 367–370, 1999.

COURRET, N. et al. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of cell science**, London, v. 155, p. 2303–2316, 2002.

CRAIG, E. A.; MARSZALEK, J. A specialized mitochondrial molecular chaperone system: a role in formation of Fe/S centers. **Cellular and molecular life sciences**, Basel, v. 59, n. 10, p. 1658–1665, 2002.

CRUZ, A. K. **Do genoma à biologia de Leishmania: uma abordagem compreensiva**.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo, 2000.

Disponível em: <http://www.fapesp.br/materia.php?data%5Bid_materia%5D=1152>. Acesso em: 28 dez. 2006.

CUNHA, S. et al. Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 89, n. 2, p. 155–158, 1995.

DENISE, H. et al. Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Between the Idea and the Reality of Control. **Parasitology today**, Cambridge v. 15, n. 2, p. 43–45, 1999.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, p. 239–243, 2001.

_____. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, Oxford, v. 27, p. 305–318, 2004a.

_____. Leishmaniasis. **Nature reviews microbiology**, v. 2, p. 692–693, 2004b.

DYE, C.; WILLIAMSON, B. G. Malnutrition, age and risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revised. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, London, v. 254, n. 1339, p. 33–39, 1993.

EFFRON, P. N. et al. A mitochondrial heat shock protein from *Crithidia fasciculata*. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 59, p. 191–200, 1993.

EL-SAYED, N. et al. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science**, Washington, v. 309, p. 404–409, 2005.

ENGERS, H. D.; BERGQUIST, R.; MODABBER, F. Progress on vaccines against parasites. **Developments in biological standardization**, Basel, v. 87, p. 73, 1996.

ENGMAN, D. M.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON J. E. Molecular Cloning of mtp70, a Mitochondrial Member of the hsp70 Family. **Molecular and cellular biology**, Washington, v. 9, n. 11, p. 5163–5169, 1989.

ENGMAN, D. M.; DRAGON, E. A.; DONELSON J. E. Human humoral immunity to hsp70 during *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of immunology**, Baltimore, v. 144, n. 10, p. 3987–3991, 1990.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clinica Veterinária**, São Paulo, ano 5, v. 28, p. 36–44, set.–out. 2000.

FERRAZ JR, J. C. S. **Identificação e Caracterização Parcial da HSP70 Mitocondrial de *Leishmania (Leishmania) chagasi* e seu Envolvimento com uma Fração Protéica Protetora contra a Leishmaniose.** 1998. 105 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1998.

FISA, R. et al. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 99, n. 2, p. 105–111, 2001.

FOLGUEIRA, C. et al. The Translational Efficiencies of the Two *Leishmania infantum* HSP70... **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 42, p. 35172–35183, 2005.

FROMMEL, D. et al. Vaccine-induced immunity against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Infection and immunity**, Washington, v. 56, p. 843–848, 1988.

GAMA, M. E. A. et al. Avaliação do nível de conhecimento que populações residentes em áreas endêmicas têm sobre leishmaniose visceral, Estado do Maranhão, Brasil. **Cadernos de saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 2, p. 381–390, 1998.

_____. Serum cytokine profile in the subclinical form of visceral leishmaniasis. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 1, p. 129–136, 2004.

GANGULY, N. K. Oral miltefosine may revolutionize treatment of visceral leishmaniasis. **TDR news**, n. 68, p.2, June 2002.

GHEDIN, E. et al. Antibody Response against a *Leishmania donovani* Amastigote-Stage-Specific Protein in Patients with Visceral Leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v. 4, n. 5, p. 530–535, 1997.

GONTIJO, B.; CARVALHO M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista brasileira de epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GOUSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International journal for parasitology**, New York, v. 33, p. 1027–1034, 2003.

GRAB, D. J. et al. A role for the peripheral blood fibrocyte in leishmaniasis? **Trends in parasitology**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 12, 2004.

GRIMALDI JR, G. Meetings on vaccine studies towards the control of leishmaniasis. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 4, p. 553–556, 1995.

GRIMALDI JR, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 6, p. 230–250, 1993.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 2, p. 229–243, 2001.

HARTL, F. U.; HAYER – HARTL, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. **Science**, Washington, v. 295, p. 1852–1858, 2002.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 354, p. 1191–1199, 1999.

HICKS, S. J. et al. The Role of Mucins in Host–Parasite Interactions. Part I – Protozoan Parasites. **Parasitology today**, Cambridge, v. 16, n. 11, p. 476–481, 2000.

HOMEDES, N. **The Disability-Adjusted Life Year (DALY) definition, measurement and potential use**. Human Capital Development and Operations Policy. Working Papers. European Bioethics conference. "Institut Borja de Bioetica". Sant Cugat del Valles, Spain. Oct. 1995.

IKONOMOPOULOS, J. et. al. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the propose assay on clinical samples. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 113, p. 99–113, jan. 2003.

ILG, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. **Parasitology today**, Cambridge, v. 16, n. 11, p. 489–497, 2000.

JERÔNIMO, S. M. B. et al. Identification of *Leishmania chagasi* Antigens Regonized by Human Lymphocytes. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 172, n. 4, p. 1055–1060, 1995.

KARLIN, S.; BROCCHERI, L. Heat Shock Protein 70 Family: Multiple Sequence Comparisons, Function, and Evolution. **Journal of molecular evolution**, Berlin, v. 47, p. 565–577, 1998.

KAUFMANN, S. H. E. Heat shock proteins and the immune response. **Immunology today**, Cambridge, v. 11, n. 4, p. 129–136, 1990.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G.C. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. **Pharmacology and therapeutics**, Oxford, v. 80, n. 2, p. 183–201, 1998.

KLEIN, K. G. et al. Molecular comparison of the mitochondrial and cytoplasmic HSP 70 of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. **The Journal of eukaryotic microbiology**, Lawrence, v. 42, n. 5, p. 473–476, 1995a.

KLEIN, K. G. et al. Mitochondrial heat shock protein 70 is distributed throughout the mitochondrion in a dyskinetoplasmic mutant of *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v.70, n.1–2, p. 207–209, 1995b.

LAEMMLI, U. K. Cleavage os stuctural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680–685, 1970.

LEÔNIDAS, S. et al. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and sorology in Greece. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 109, n. 1–2, p. 19–27, oct. 2002.

LEISHMANIASIS. [2004?]. Disponível em:
<<http://www.med1.de/Laien/Krankheiten/Tropen/Leishmaniasis/#04>>. Acesso em: 04 jul. 2007.

LEISHMANIOSES. [2007?]. Disponível em:
<<http://www.md.ucl.ac.be/stages/hygtrop/arthropodes/protozoaires/leshdia5.html>>. Acesso em: 04 jul. 2007.

LEISHMANIA FACTS. 2006. Disponível em:
<<http://www.susanamendez.com/LeishmaniaFacts/LifeCicle.html>>. Acesso em: 04 jul. 2007.

LIEW, F. Y. et al. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**, Oxford, v. 69, n. 4, p. 570–573, 1990a.

_____. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 144, n. 12, p. 4794–4797, 1990b.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Immunology**, Oxford, v. 71, n. 4, p. 556–559, 1990a.

_____. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 145, n. 12, p. 4306–4310, 1990b.

LOUZIR, H. Antibodies to *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* heat-shock protein 70 in human visceral Leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 169, n. 5, p. 1183–1184, 1994.

MACHADO-PINTO, J. et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. **International journal of dermatology**, Philadelphia, v. 41, p. 73–78, 2002.

MARTINS, D. R. A. et al. *Leishmania chagasi* T-Cell Antigens Identified through a Double Library Screen. **Infection and immunity**, Washington, v. 74, n. 12, p. 6940–6948, 2006.

MELBY, P. C. et al. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA Vaccine Is Highly Immunogenic but Not Protective against Experimental Visceral Leishmaniasis. **Infection and immunity**, Washington, v. 69, n. 8, p. 4719–4725, 2001.

MILLER, M. A. et al. Inducible Resistance to Oxidant Stress in the Protozoan *Leishmania chagasi*. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 43, p. 33883–33889, 2000.

MODABBER, F. Vaccines against leishmaniasis. **Annals of tropical medicine and parasitology**, Liverpool, v. 89, n. 1, p. 83–88, 1995.

MONJOUR, L. et al. Exploitation of parasite derived antigen in therapeutic success of human cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 479–483, 1994.

MOREL, C. M. et al. Health Innovation Networks to Help Developing Countries Address Neglected Diseases. **Science**, Washington, v. 309, p. 401–404, 2005.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 366, p. 1561–1577, 2005.

MUTEBI, J-P. et al. Breeding structure of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in Brazil. **The American journal of medicine and tropical hygiene**, Baltimore, v. 61, n. 1, p. 149–157, 1999.

NASCIMENTO, M. G. M. V. **Caracterização Molecular de Dois Genes que Codificam para a HSP70 Mitocondrial de *Leishmania (L.) chagasi***. 2000. 86 f. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

NEVES, D. P. (Ed.). Gênero *Leishmania*. In: **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005a. Cap. 7, p. 41–46. ISBN 85-7379-737-1;

_____. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005b. Cap. 8, p. 47–64. ISBN 85-7379-737-1;

_____. Leishmaniose Tegumentar do Velho Mundo. In: **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005c. Cap. 9, p. 65–66. ISBN 85-7379-737-1;

_____. Leishmaniose Visceral Americana. In: **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005d. Cap. 10, p. 67–83. ISBN 85-7379-737-1;

PAIVA, B. R. et al. Single Step Polymerase Chain Reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania (Viannia)* Subgenus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 46, n. 6, p. 335–338, 2004.

PASSOS, S. et al. Recombinant *Leishmania* Antigens for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v. 12, n. 10, p. 1164–1167, 2005.

PEREZ-ALVAREZ, M. J. et al. Characterisation of a monoclonal antibody recognising specifically the HSP70 from *Leishmania*. **Parasitology research**, Berlin, v. 87, n. 11, p. 907–910, 2001.

PERUTZ, M. F. et al. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 12, p. 5355–5358, 1994.

PRICE, V. L.; KIENY M. P. Vaccines for Parasitic Diseases. **Current drug targets**, Hilversum, v. 1, p. 315–324, 2001.

QUIJADA, L. et al. Identification of a putative element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 110, p. 79–91, 2000.

RAMOS, C. S. et al. Characterisation of a new *Leishmania META* gene and genomic analysis of the *META* cluster. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 213–219, 2004.

RASSOW, J. et al. The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. **Journal of molecular biology**, New York, v. 286, n. 1, p. 105–120, 1999.

REY, L. In: _____. **Bases da Parasitologia Médica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 50–70. ISBN 85-277-0693-8.

REY, L. C. et al. American visceral leishmaniasis (kala-azar) in hospitalized children from an endemic area. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 1, p. 73–78, 2005.

RIBEIRO, V. M; MICHALICK, M. S. M. Protocolos terapêuticos e controle da Leishmaniose visceral canina. **Nosso clínico**, v.4, n. 24, p. 10, 2001. Disponível em: <http://www.crmvms.org.br/artigos_tecnicos_view.php?id=3>. Acesso em: 01 mar. 2007.

RICO, A. I. et al. Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. **Molecular immunology**, Oxford, v. 36, p. 1131–1139, 1999.

RITTER, U. et al. The control of *Leishmania (Leishmania) major* by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. **Microbes and infection**, Paris, v. 6, p. 559–565, 2004.

RIVAS, L. et al. Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient? **Trends in parasitology**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 297–301, 2004.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Imunidade aos Protozoários e Vermes. In: _____. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999. 423 p. 28 cm. Cap. 18. ISBN 85-204-0825-7.

ROBERT, J. Evolution of heat shock protein and immunity. **Developmental and comparative immunology**, Elmsford, v. 27, p. 449–464, 2003.

ROBERTS, L. S.; JANOVY-JR, J. Kinetoplastida: Trypanosomes and... In: **Foundations of Parasitology**. 5th edition. Wm C Brown, 1996. Chapter 5. ISBN 0-697-26071-2.

ROBERTS, L. J.; HANDMAN, E.; FOOTE, S. J. Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. **British medical journal**, London, v. 321, p. 801–804, 2000.

ROSATI, S. et al. Prokariotic Expression and Antigenic Characterization of Three Recombinant *Leishmania* Antigens for Serological Diagnosis of Canine Leishmaniasis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v. 10, n. 6, p. 1153–1153, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCALONE, A. et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary parasitology**, Amsterdam, v. 104, p. 275–285, 2002.

SEARLE, S.; SMITH, D. F. *Leishmania major*: Characterisation and Expression of a Cytoplasmic Stress-Related Protein. **Experimental Parasitology**, New York, v. 77, p. 43–52, 1993.

SEARLE, S.; MCCROSSAN, M. V.; SMITH, D. F. Expression of mitochondrial stress protein in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Journal of Cell Science**, London, v. 104, n. 4, p. 1091–1100, 1993.

SEREZANI, C. H. C. et al. Evaluation of the murine immune response to *Leishmania* meta 1 antigen delivered as recombinant protein or DNA vaccine. **Vaccine**, Kidlington v. 20, p. 3755–3763, 2002.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 471–478, 1994.

SHERLOCK, I. A. Ecological Interactions of Visceral Leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 6, p. 671–683, 1996.

SOUSSI, N. et al. *Listeria monocytogenes* as a short-lived delivery system for the induction of type 1 cell-mediated immunity against the p36/LACK antigen in *Leishmania major*. **Infection and immunity**, Washington v. 68, n. 3, p. 1498–1506, 2000.

STÄGER, S. et al. Immunization with a Recombinant Stage-Regulated Surface Protein from *Leishmania donovani* Induces Protection Against Visceral Leishmaniasis. **The Journal of immunology**, Baltimore, v. 165, p. 7064-7071, 2000.

STOTT, K. et al. Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: implications for neurodegenerative diseases. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 14, p. 6509–6513, 1995.

THEINERT, S. M. et al. Identification of New Antigens in Visceral Leishmaniasis by Expression Cloning and Immunoblotting with Sera of Kala-Azar Patients from Bihar, India. **Infection and immunity**, Washington, v. 73, n. 10, p. 7018–7021, 2005.

URIBE, S. The status of the *Lutzomyia longipalpis* species complex and possible implications for *Leishmania* transmission. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n. 6, p. 729–734, 1999.

VISCERAL LEISHMANIASIS. 2006. Disponível em: <<http://www.stanford.edu>>. Acesso em: 04 jul. 2007.

WHITE JR, A. C.; McMAHON-PRATT, D. Purification and Characterization of an 80-Kilodalton Membrane Protein from *Leishmania donovani*. **Infection and immunity**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2385-2391, 1988.

WILLIAMSON, D. H. **Microbial mitochondrial genomes – windows on the worlds**. In: Symposium 50. The eukaryotic genome – organization and regulation. 1993. Cambridge. **Anais...** Cambridge: Cambridge University Press. Society for general Microbiology, p. 73–106.

WILSON, M. E.; ANDERSEN, K. A.; BRITIGAN, B. E. Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. **Infection and immunity**, Washington, v. 62, n. 11, p. 5133–5141, 1994.

WRIGHT, E. P.; EL AMIN, E. R. M. Leishmania infection: surfaces and immunity. **Biochemistry and cell biology**, Ottawa, v. 67, n. 9, p. 525–536, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Programme for the surveillance and control of leishmaniasis**. 1999. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>>. Acesso em: 12 fev. 2004.

_____. Tropical Diseases Research (TDR). **Strategic Direction for Research: Leishmaniasis. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases**. February 2002a. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/direction.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2002.

_____. **Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis=Urbanisation: facteur de risque croissant pour la leishmaniose**. Weekly epidemiological record=Relevé épidémiologique hebdomadaire. Geneva=Genève, v. 77, n. 44, p. 365–372., 2002b. Disponível em: <<http://www.who.int/docstore/wer/pdf/2002/wer7744.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2005.

_____. **Leishmaniasis – The disease and its epidemiology**. [2004?]a. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/>. Acesso em: 03 nov. 2004.

_____. **Leishmaniasis – A brief history of the disease (continued)**. [2004?]b. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/history_disease/en/>. Acesso em: 03 nov. 2004.

_____. **Initiative for Vaccine Research (IVR)**. [2005?] Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index3.html>. Acesso em: 23 maio 2006.

_____. **Control of the leishmaniasis**. Executive board. 118th Session. Provisional agenda item 5.1. EB118/4. 11 May 2006. Disponível em: <www.emro.who.int/afghanistan/Media/PDF/Leishmaniasis_EB118_4.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2006.

_____. **Essential leishmaniasis maps**. 2007a. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index1.html>. Acesso em: 04 jul. 2007.

_____. **Research on leishmaniasis**. 2007b. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>>. Acesso em: 04 jul. 2007.

_____. **Leishmaniasis – background information**. 2007c. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 04 jul. 2007.

YAMEY, G. The world's most neglected diseases. **British medical journal**, London, v. 325, p. 176–177, 2002.

YEYATI, P. L. et al. The 70-kDa heat shock protein is a major antigenic determinant in human *Trypanosoma cruzi/Leishmania braziliensis* mixed infection. **Immunology letters**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 27–34, 1991.

ZERPA, O. et al. Epidemiological and Immunological Aspects of Human Visceral Leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. **Memórias do instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 8, p. 1079–1083, 2003.

ZHANG, X-P. et al. Interaction of mitochondrial presequences with DnaK and mitochondrial hsp70. **Journal of molecular biology**, London, v. 288, n. 1, p. 177–190, 1999

ZIJLSTRA, E. E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 3, p. 87–98, fev. 2003.

ZÜGEL, U.; KAUFMANN, S. H. E. Role of Heat Shock Proteins in Protection from and Pathogenesis of Infectious Diseases. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 12, n. 1, p. 19–39, 1999.

ZURITA, A. I. et al. Cloning and Characterization of the *Leishmania (Viannia) Braziliensis* *Hsp70* gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513–663). **Journal of parasitology**, Lawrence, v. 89, n. 2, p. 372–378, 2003.

11 APÊNDICE

APÊNDICE A – Artigo proposto: revista Molecular and Biochemical Parasitology.

Mitochondrial HSP70 from *Leishmania chagasi*: distinct homologues conserved among various *Leishmania* species may indicate novel biological functions.

R. M. de Campos, M. G. M. V. do Nascimento, J. C. S. Ferraz Jr., P. O. Rocha, G. M. A. Thompson, R. B. Q. Figueiredo and Osvaldo P. de Melo Neto

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, Av. Moraes Rego s/n, Campus da UFPE, Recife-PE, 50670-420 Brazil.

e-mail: opmn@cpqam.fiocruz.br

ABSTRACT

The Leishmaniasis are a group of relevant human diseases prevalent in many countries, including Brazil. Within these diseases, the visceral leishmaniasis (VL) or Kala-azar, caused by *L. chagasi/L.infantum* is the form with the greatest potential for lethality. To facilitate the control and diagnosis of VL, innumerable isolated antigens of different *Leishmania* species have been studied at the molecular level. The heat shock proteins of the 70 kDa family (HSPs70), and their mitochondrial homologues (mtHSPs70), are abundant intracellular proteins present in prokaryotes and eukaryotes which are also prominent inducers of immune response. Their synthesis is increased in stress situations, such as during exposure of *Leishmania* to new thermal conditions inside their vertebrate host. Here we report the identification of two distinct mtHSPs70 homologues from *L. chagasi/L.infantum* (Lc2.1 and Lc2.2), fortuitously discovered in a screen for immunologically relevant antigens. Analysis of their genes, through the various trypanosomatid genome databases, uncovered multiple genes encoding Lc2.2 in *L. chagasi/L. infantum* and also in *L. major*, while only one gene was found to encode Lc2.1. In contrast, Lc2.1 genes are absent from *Trypanosoma* species, which may indicate a recent evolution within the *Leishmania* genus. The Lc2.2 proteins are characterized by a poly-glutamine rich C-terminal end, whilst Lc2.1 contains unique amino acid substitutions within its substrate binding domain, suggesting novel biological functions. Affinity purified antibodies which recognize both mtHSPs70 proteins equally well were then used to analyze their expression in total protein extracts from promastigotes of various *Leishmania* and *Trypanosoma* species and from representative forms of the *L. amazonensis* and *L. chagasi* life cycle. Only in *Leishmania* species two bands were observed, where the lower band (Lc2.1) seemed to be the more expressed in *L. amazonensis* amastigote forms. Furthermore, these mtHSPs70 were analyzed in *L. chagasi* by confocal and electron microscopy which ratified a distribution throughout the mitochondrial matrix.

Key-words: *Leishmania chagasi* – Heat Shock Proteins – mtHSPs70 – mitochondria

INTRODUCTION

The different forms of human leishmaniasis constitute a complex of diseases caused by infection with protozoan parasites of the genus *Leishmania*. Approximately 12 million people around the world have one form or the other of these diseases and about 367 million are under risk of infection. Tegumentary leishmaniasis, caused by a number of different species around the world, is the most frequent form of the disease and can cause disfiguring lesions in the affected subjects. *L. major*, in Europe and Asia, and *L. braziliensis*, in South America, are two species responsible for different forms of tegumentary leishmaniasis whose genome have been targeted for sequencing. Visceral leishmaniasis, caused in South America by *L. chagasi* and in Europe and Asia by *L. infantum*, is a chronic disease which can be fatal when not treated. It is believed that *L. chagasi* and *L. infantum* represent different populations of a single species, with *L. chagasi* being derived from *L. infantum* after its involuntary introduction in the Americas within the last 500 years. The various *Leishmania* species are classified with the *Trypanosoma* species, as well as various non-pathogenic protozoa, within the family Trypanosomatidae of the order Kinetoplastida. These organisms have been the focus of much attention not only for the diseases they cause but also for their unique basic biological mechanism which distinguish them from most groups of eukaryotes.

The classical procedures for the treatment and control of leishmaniasis require the use of expensive and frequently toxic drugs whose mechanisms of action are little understood (Marsden, 1994; Correia et al., 1996; Berman, 1997; Marzochi and Marzochi, 1994). A vaccine against leishmaniasis is a potentially efficient and viable alternative to stop its spread in humans, however it hasn't been produced yet. Tests in humans with vaccines composed of total parasite extracts have produced satisfactory levels of protection (Antunes et al., 1986; Mendonca et al., 1995). Protein fractions electroeluted from SDS-PAGE gels of *Leishmania* lysates were also used as vaccines, inducing protection against experimental infection by several species of parasites in animal models (Monjour et al., 1986; Monjour et al., 1988; Frommel et al., 1988).

Heat shock proteins (HSPs) are evolutionary conserved proteins which are powerful immunogens with a role in several infections, including those by *Leishmania*, where they can be involved in immuno-protection (Russo et al., 1993; Skeiky et al., 1995; de Andrade et al., 1992). The HSP70 family comprises a group of related proteins localized to different subcellular compartments with roles in protein folding, during or after synthesis, and removal from cytosol when misfolded (Bukau et al., 2006). Mitochondrial HSP70 proteins are a subset

of the HSPs70 localized to the inner mitochondrial membrane or the mitochondrial matrix, which exerts similar functions to its cytoplasmic counterpart as well as being a major participant in the transport of proteins through the mitochondrial membrane (Rassow et al., 1999).

Here we describe the characterization of two different cDNAs from *L. chagasi* coding for the mitochondrial homologues of the HSP70 proteins (mtHSPs70). These clones were fortuitously isolated as a result of an immunoscreening of a *L. chagasi* cDNA expression library with a rabbit serum produced against a subset of *L. braziliensis*, purified according to their molecular weight. Taking advantage of the various trypanosomatid genome sequences available we have analyzed the genome organization of the *mthsp70* genes and their corresponding sequences. Two distinct homologues for the *Leishmania* mtHSPs70 were identified, one of which is found only within the *Leishmania* genus and display unique aminoacid substitutions which may reflect novel functions. Expression of these proteins was analyzed through western-blot and the *Leishmania* specific homologue was seen to be expressed predominantly in amastigotes. Immunocitochemistry using confocal and electron-microscopy confirmed a non-localized distribution throughout the mitochondrial matrix.

MATERIAL AND METHODS

Parasite cultures – Promastigotes of *L.(V.) braziliensis*, strain MHOM/BR/73/M2903, and promastigotes of *L.(L.) chagasi*, were grown at 26°C up to stationary phase in modified LIT medium pH 7.2 (0.2% sucrose w/v; 0.36% liver broth w/v; 0.1% tryptose w/v; 0.002% haemin w/v), supplemented with 10% foetal calf serum.

Production of the L. braziliensis protein fraction – Promastigotes of *L. braziliensis* grown to stationary phase, were centrifuged at 4.000 rpm for 15 min at 4°C and washed twice with ice cold sterile PBS. The final sediment was resuspended gently in SDS-PAGE sample buffer at a concentration of 5–10 x 10⁸ parasites per ml. The cellular lysates were used in preparative SDS-PAGE gels, for the isolation of the proteins within the molecular weight range of 67 to 94 kDa. The gel fragments containing these proteins were excised and the embedded proteins electroeluted and dialysed for about 30 hours at 4°C, in 0,3% NaCl. The electroeluted protein fraction was then lyophilised, resuspended in PBS, and its concentration measured using the modified Lowry method (Protein Assay Kit, SIGMA-ALDRICH).

Antibody production – One New Zealand rabbit was inoculated with an initial dose of 300 µg of the *L. braziliensis* protein fraction in PBS and mixed with Freund's complete adjuvant (SIGMA-ALDRICH). Three further inoculations of the same antigen (250 µg) mixed with equal volumes of Freund's incomplete adjuvant (SIGMA-ALDRICH) were performed at 15 days intervals. The anti-serum was obtained from blood collected 14 days after the last inoculation. Two different sets of rabbit anti-sera were also raised against the two recombinant mtHSP70 proteins, Lc2.2 and Lc2.1. The two different mtHSPs70 specific antibodies were used after affinity purification. Both sets of mtHSPs70 anti-sera had similar specificities and produced identical results. Western-blotting was carried out using standard methods. For the serum against the *L. braziliensis* protein fraction, Protein-A peroxidase (SIGMA-ALDRICH), diluted 1:3000 v/v, was used as the secondary antibody, and the westerns were developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, SIGMA-ALDRICH) and hydrogen peroxide. For the mtHSP70 polyclonal sera, peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) was used as secondary antibody and the reactions were detected by enhanced chemiluminescence (ECL). Densitometric scanning, when necessary, was performed with the Kodak 1D Image Analysis Software, version 3.5 for Windows.

Screening of the L. chagasi cDNA expression library – Screening of an *L. chagasi* cDNA expression library constructed in the bacteriophage LambdaZAPII was performed using standard procedures. For the screening the serum produced against the *L. braziliensis* protein fraction was used, diluted 1:200, after previous immunoadsorption for 12 to 24 hours with total *E. coli* XL1-Blue extract. The protein-A peroxidase, used as the secondary antibody in the screening (diluted 1:3000), was also treated likewise. The filters were developed with DAB (SIGMA-ALDRICH). Selected positive clones were amplified and used for successive rounds of screening in order to obtain homogeneous populations. Plasmid recovery was performed according to the manufacturer (Stratagene, USA).

Subcloning of the Lc2.2 into the His-tagged vector – A 1005 bp *Pst* I fragment from the Lc2.2 cDNA (FP2), encompassing aminoacids (aas) 279–613 of the wild type protein (661 aas total), was first subcloned into the *Pst* I site of the pTZ18R cloning vector (after linearization and treatment with alkaline phosphatase) oriented so that the segment coding for the N-terminal end of the protein was near the T7 promoter. The resulting plasmid (pTZ18R-FP2) was then digested with *Bam*H I/*Hind* III (these sites flank the *Pst* I fragment)

and the fragment released subcloned into the *Bam*H I/*Hind* III sites of the expression vector pRSET A. The resulting plasmid encoded for a recombinant fusion protein which contained at its N-terminus 34 aminoacids encoded by the pRSET A vector, including a 6 histidine tag and an Xpress epitope, followed by the peptide GSSRVD (encoded by 18 nucleotides from the pTZ18R polylinker) and the 335 aminoacids long fragment from the Lc2.2 protein. At its C-terminus the protein was terminated by the sequence ACKL (encoded by a 12 nucleotide segment from pTZ18R) followed by 20 aminoacids encoded by the pRSET vector after the *Hind* III site (DPAANKARKEAELAAATAEQ).

RT-PCR – Two different sets of RT-PCR reactions were performed using total RNA from *L. chagasi*. The first used as primer for the reverse transcription (RT) the oligonucleotide 655 (5' GC CCC GGA TCC TTC GTC TTG TCC ATG 3' – anneals within the Lc2.2 clone) followed by PCR with the primer pair 656 (5' GC CCC GGA TCC CCG CGT CCT TCG TCG 3' – also anneals within the Lc2.2 clone, upstream of the RT primer) and 650 (5' GC GGC GGA TCC GTT TCT GTA CTT TAT TG 3' – anneals with the *Leishmania* spliced-leader). Later, a new set of RT reactions were performed using the primer 6510 (5' AAC TGG CCC ATC ATC TGG 3'). Two different PCR reactions followed using a new spliced leader oligonucleotide as 5' primer (6514 – 5' GC GGC GGA TCC GTT TCT GTA C 3') and two alternative 3' primers, 6512 (5' GCG GGA TCC CCA CCT GCG TCT GGT TG 3' – anneals within a sequence unique to Lc2.2) and 6511 (5' GCG GGA TCC GTC AAC CAG TAT CAA GCC AC – anneals within a sequence unique to Lc2.1). With the exception of the PCR fragment 6514/6511 (submitted to direct sequencing) all the remaining PCR fragments (flanked by sites for the enzyme *Bam*H I (underlined in the oligonucleotides above) were cloned into the same site of the pTZ18R vector prior to sequencing.

Sequence analysis – Recombinant plasmid DNA extracted from the selected clones were digested with restriction enzymes and sequenced through automatic sequencing. When necessary subclones were generated by the deletion of specific restriction fragments to facilitate sequencing. Likewise, when necessary internal primers were also used for the same purpose. The sequences obtained were analysed using the program BLAST and DNASTAR. Pairwise identity (similarity) values were obtained using the BLAST two sequences tool available at the NCBI Web Page (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

Immunocytochemistry – For the indirect immunofluorescence assay, wild type *L. chagasi* or *L. braziliensis* promastigotes grown logarithmically were harvested, washed with PBS 10 mM glycine and adsorbed to poly-L-lysine coated slides. The cells were then fixed in 3% paraformaldehyde prior to incubation with the proper antibodies following standard procedures. DNA was stained using the TOTO3 marker. For the immunogold labeling, the parasites were harvested and washed with PBS as above prior to fixing in 0,1% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 0,02% Picric acid in 0.2 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 for 1 hour at 4°C. The cells were then washed 3 times in the same buffer followed by incubation with ammonium chloride 50 mM for 45 min at 4°C. They were then washed with ice cold PBS and dehydrated with methanol (30–100%) followed by inclusion into the Lowicryl 4KM resin (SIGMA-ALDRICH) polymerized under UV. Ultra-thin slices were then used for the immunogold labeling using standard procedures with the anti-mtHSP70 antibodies diluted 1:50 followed by incubation with the anti-rabbit IgG secondary antibody labeled with 10 nm gold particles (SIGMA-ALDRICH). Samples were then visualized under the electron microscope.

RESULTS

Identification of two variants of the mitochondrial HSP70 proteins from *L. chagasi*.

A screening of a *Leishmania chagasi* cDNA expression library with a rabbit polyclonal anti-serum produced against a subset of *L. braziliensis* proteins, designed to identify antigens immunologically conserved between these two *Leishmania* species, yielded two distinct clones which upon sequencing were found to encode different variants of the mitochondrial 70 kDa Heat Shock Protein (mtHSP70). The anti-serum used for the screening was produced against a subset of *L. braziliensis* proteins whose molecular weight ranged between 67 and 94 kDa (see material and methods). Prior to the screening, this anti-serum was tested in immunoblots against total protein extracts from both *L. braziliensis* and *L. chagasi* (Figure 1A and 1B) and found to recognize many proteins in both *L. braziliensis* and *L. chagasi* extracts. The two distinct clones identified (Lc2.1 and Lc2.2) were found to contain incomplete cDNAs of 1351 and 2029 bp coding for protein fragments of approximately 48 and 63 kDa respectively. RT-PCR reactions were then performed from total *L. chagasi* mRNA, using as 3' primers oligonucleotides complementary to internal gene sequences and, as 5' primers, oligos coding for part of the *Leishmania* spliced leader sequence. The gene sequences coding for the N-terminal ends of both proteins were then identified and sequenced. Clone Lc2.1

encompasses aas 280–635 of the full length protein and is followed by 278 nucleotides (nt) of its 3'UTR whilst clone Lc2.2 includes aas 168–661 of the full length protein and a 3'UTR 540 nt long. Neither cDNA clone includes a poly-A tail. From the RT-PCR two different 5'UTRs were identified for the Lc2.2 protein (26 and 155 nt long) compatible with the existence of at least two different genes coding for this protein (see below), whilst for the Lc2.1 a single 5'UTR fragment was obtained.

At the aminoacid level, the two proteins share an overall identity of 91% with the N-terminal end being completely conserved (Figure 1C). The strong conservation at the 5' end of the coding sequence is maintained at the nucleotide level and includes the last 8 nt of the 5' UTRs. In contrast no similarities are found in the 3' UTRs when the two sequences are aligned. Segments of sequence divergence between the two proteins are clustered on their C-terminal half and concentrate on a segment encompassing aas 400–540 of the full length protein as well as on their C-terminal end, where Lc2.2 contains a 26 aas long C-terminal extension absent from Lc2.1. This extension is very rich in glutamine and contains two repeats of the motif GEQQQQQ(G/S)Q.

Genomic organization of the *mthsp70* genes.

Blast searches using genome sequences available from *L. infantum* were then carried out and several different genes found to encode *mthsp70* genes. In total four different genes were found in chromosome 30 (Figure 2A). These were named *LimtHSP70.1-4* for clarity. Analysis of the protein coding regions found that only one is identical to Lc2.1 (*LimtHSP70.1*). The other 3 genes code for proteins which are either identical (*LimtHSP70.3*) or nearly identical to Lc2.2 (*LimtHSP70.2* and 4). In fact, genes *LimtHSP70.2* and 4 code for identical proteins which differ from Lc2.2 only at their C-terminal end. A single aminoacid deletion (S655) plus 2 conserved (Q656N; G657S) and 1 non-conserved (T660K) substitutions, all found within the last 6 aas, distinguish them (Table I).

The four *L. infantum mthsp70* genes differ in their 3'UTRs and, despite the obvious relatedness of the *LimtHSP70.2* and 4 coding sequences, no clear-cut duplications were found when their non-coding sequences were compared. When the equivalent region from *L. major* chromosome 30 was analysed a total of 5 genes were identified (Figure 2A and Table I). Clear orthologues for each of the *L. chagasi* genes were identified, based on the analysis of their non-coding 3'UTR segments, and one of them (*LimtHSP70.2*) was further duplicated in *L. major* (*LmmtHSP70.2* and 3). As in *L. infantum*, there is only one gene encoding a Lc2.1-like protein (*LmmtHSP70.1*). The gene order was found to differ between the two species, with

one of the *L. infantum* genes changing places in *L. major*. Homology searches with *L. braziliensis* genomic sequences (chromosome 30) yielded three clearly identifiable protein sequences, two complete and one partial. The partial sequence contains the segment between aas 400–500 typical of Lc2.1 although it does have a glutamine rich C-terminal end. The remaining two sequences are clearly related to Lc2.2 (not shown). Two neighbouring fragments within the same region of chromosome 30 also appear to encode mtHSP70 proteins but are too small for any analysis, maybe as a consequence of the preliminary nature of the *L. braziliensis* genome assembly. Further searches for mtHSPs70 homologues/orthologues in genomic sequences from *T. brucei* and *T. cruzi* produced a simpler picture. In *T. brucei* the 3 genes identified are also located in a single cluster in chromosome 6 (within a syntenic block conserved in *L. major* chromosome 30 (see also El-Sayed et al., 2005). The three genes codes for identical proteins which are very similar to Lc2.2, sharing the internal segment typical for this protein as well as the glutamine rich C-terminus. In *T. cruzi* the chromosome organization of the genes could not be adequately defined however multiple genes are found coding for a single protein which, as for the *T. brucei* homologue, is related to Lc2.2.

Evolutionary relationship of the two types of *Leishmania* mtHSPs70 homologues.

The unique sequence variation observed for the Lc2.1 – *LimtHSP70.1* protein (and its *L. major* orthologue – *LmmtHSP70.1*) as compared with the remaining *Leishmania* and *Trypanosoma* mtHSPs70 homologues raised the possibility that these proteins have evolved within the *Leishmania* species, although it could be possible that their genes were lost from the *Trypanosoma* lineage. When the various *L. infantum* and *L. major* mtHSPs70 orthologues were compared pairwise the Lc2.1-*LimtHSP70.1*/*LmmtHSP70.1* pair were the most divergent (94% identity as compared to the 99% identity for the remaining pairs). An intermediate rate of divergence is observed for the *Leishmania* cytoplasmic homologue of HSP70 (Table I). These differences in divergence rate however are small and may not be significant. We then decided to investigate the degree of similarity between the *Leishmania* mtHSPs70 and HSP70 homologues with related proteins from other eukaryotic organisms.

New pairwise comparisons were performed, this time between the two distinct *Leishmania* mtHSP70 proteins, as well as cytoplasmic HSP70, with their nearest homologues from the two best known *Trypanosoma* species (*T. brucei* and *T. cruzi*) and organisms representing the main lineages of multicellular eukaryotes (*Saccharomyces cerevisiae*, *Arabidopsis thaliana* and *Homo sapiens*). The results, summarized on Table II, clearly show that within the Trypanosomatidae (*Leishmania* versus *Trypanosoma*) no significant difference

in divergence rate is observed between mtHSP70 and HSP70 proteins when Lc2.2 is used as the mtHSP70 homologue (86–89% identity versus 83–88% for the cytoplasmic protein). Lc2.1, however, is more divergent (80–82%), reflecting the differences highlighted earlier which are absent from the *Trypanosoma* mtHSP70 protein. Strikingly, the mitochondrial HSP70 proteins are much more divergent than their cytoplasmic counterparts when the *Leishmania* proteins are compared with distantly related organisms (56–59% identity between the mtHSP70s as compared to 72% identity for cytoplasmic HSP70 when the *Leishmania* and human proteins are analysed, for example).

The differences in divergence rate between mtHSPs70 and HSP70 homologues can be clearly observed when the various proteins listed in Table II, plus a few others such as the Eubacterial homologue to HSP70, the protein DnaK from *E. coli*, were used in a neighbour-joining analysis to compare their phylogenetic relationships (Figure 2B). The resulting tree clearly shows the greater degree of conservation of cytoplasmic HSP70 within the eukaryotes when compared to mitochondrial HSP70. It is possible that these differences in divergence rate might indicate more relaxed evolutionary constraints on the mitochondrial proteins or alternatively a selective pressure for them to evolve within the various eukaryotic lineages.

Mapping of aminoacids unique to the Lc2.1 protein.

The HSP70 proteins consist of three conserved domains. At the N-terminus lies the 44 kDa ATP binding/ATPase domain, which comprises roughly 2/3rds of the protein, and is strongly conserved. It is followed by the 18 kDa substrate-binding domain, also very conserved and consisting of two sets of antiparallel β -sheets, each with four strands. At the C-terminal end lies the 10 kDa α -helical domain which is much more divergent when sequences from distantly related organisms are compared. Both the N-terminal domain, which couple the hydrolysis of ATP to the binding/release of the substrate, as well as the C-terminal α -helical domain, which lies like a lid over the substrate-binding cleft, perform regulatory roles defining when the substrate is bound by the protein. Binding of HSP70 to its substrate occurs within a groove formed by several of the β -strands of the substrate-binding domain, and flanked by loops L1,2 and L3,4, where linear segments of the target protein are bound (Zhu et al., 1996; Morshauer et al., 1999; Stevens et al., 2003). To understand the functional implications of the distinct sequence patterns found in the *Leishmania* mtHSPs and map where within the predicted structure of Lc2.1 are located its unique aminoacid substitutions, we aligned the last two domains from HSP70 and mtHSP70 homologues from selected

organisms and superimposed within the alignment the secondary structural elements defined for *E. coli* DnaK.

The alignment in (Figure 3) clearly shows the greater amount of divergence in the α -helical domain, especially when the trypanosomatid mtHSP70s sequences are compared with mtHSP70 from non-protozoans or *E. coli* DnaK. The unique glutamine rich C-terminus of the parasite proteins related to Lc2.2 is clearly distinct from other mtHSP70 and HSP70 homologues, which may reflect a specific aspect of its function in these organisms. Nevertheless, all mtHSP70 homologues (with the exception of Lc2.1 related proteins) end with one or two positively charged amino acids (K or Q), contrasting with the cytoplasmic HSP70 proteins which end with the negatively charged, strongly conserved, EEVD motif. This motif has been shown to mediate binding to several proteins containing tetratricopeptide repeats (TPRs) which are involved in different aspects of HSP70 function (Scheufler et al., 2000). One of these proteins is TOM70p, a component of the translocase of the outer membrane complex which is a major surface receptor for mitochondrial protein precursors (Wu and Sha, 2006). When the same sequences are compared with the focus on the substrate binding domain the overall conservation is much greater. No major differences are identified between the parasite mtHSP70 homologues related to Lc2.2 and other mtHSP70 or HSP70 homologues. In contrast the substitutions identified in Lc2.1 clearly distinguish it (or its *L. major* homologue) from the remaining proteins in the alignment since they modify aminoacids which are conserved not only in mtHSP70 homologues from different eukaryotic lineages but also in *E. coli* DnaK and cytoplasmic HSP70. These modifications are concentrated on the strands β 1, β 3 and β 4 as well as the loops connecting β 1- β 2 and β 3- β 4, which have been implicated in substrate recognition and binding (highlighted in Figure 3). Some of these, such as the replacement of the IETLGG hexapeptide (which includes the IE aminoacids nearly universally conserved in cytoplasmic and mitochondrial HSP70s alike) for TSVVGD clearly should have functional implications.

Expression analysis of the *Leishmania* mtHSP70 homologues in different trypanosomatids and during different life stages.

Two different sets of antibodies specific for the mtHSP70 proteins were obtained using the original Lc2.1 and Lc2.2 protein bands (48 and 63 kDa respectively) which were gel purified and used to immunize distinct rabbits. The two antisera were able to recognize equally well both the Lc2.1 and Lc2.2 proteins and no cross-reaction was seen with either *E. coli* extracts or *L. chagasi* cytoplasmic HSP70 (Figure 4A–B and data not shown).

Antibodies, affinity purified against a recombinant ~45 kDa His-tagged protein fragment, encompassing amino acids 279–613 from the wild type Lc2.2 protein, were then used to investigate the expression of mtHSP70s in total protein extracts from different trypanosomatids. One single band of roughly the same size was clearly identifiable in extracts from different *Leishmania* species and to a minor extent in extracts of *T. cruzi* and *T. brucei* (Figure 4C). In *L. braziliensis* possibly two bands, with very similar molecular weights, are equally well detected by the anti-serum.

To investigate if differences in expression levels of the mtHSP70 proteins could be detected during different stages of the *Leishmania* life cycle we used freshly isolated *L. amazonensis* cells which were cultivated in M-199 medium, pH 7.2, at 26°C up to stationary phase. Log phase cells (days 1–3) assumed the typical promastigote morphology which, upon reaching the stationary phase (5 days of culture onwards), changed to a more elongated metacyclic morphology. Heat-shocked cells were obtained by diluting the stationary phase forms into RPMI-1640 medium, pH 5.5, and cultured at 37°C. Samples were taken at daily intervals for both cultures and for the heat-shocked cells an additional sample was taken at the 6 hours time point. After 2–3 days at 37°C the cells assumed a round amastigote-like morphology and stopped growing. A second set of amastigote-like cells were obtained as described (Cysne-Finkelstein et al., 1998) from cultures of *L. amazonensis* grown in Schneider's Medium, pH 5.5, at 32°C. When samples from the various cultures/time points were assayed for the expression of mtHSP70s (Figure 4D), three different profiles can be observed. The first, seen mainly in cells grown in log phase at 26°C, is represented by the detection of a major band accompanied by a much fainter second band of lower molecular weight. An intermediate profile is observed in cells at stationary phase at 26°C and early on after the cells are heat-shocked when an increase in the levels of the second band is seen concomitant with a decrease of the protein with the greater molecular weight. Finally late in the heat-shock stage or in the amastigote-like cells the expression levels of the two bands are very similar. It seems then that the protein band corresponding to Lc2.2 has a constitutive expression profile, whilst Lc2.1 is predominantly expressed in cells late in growth, submitted to heat shock or grown as amastigote-like forms.

Subcellular localization of mtHSP70s in *L. chagasi* and *L. braziliensis*.

The subcellular localization of mtHSP70s in trypanosomatids has been the focus of several different publications in the last decade. The proteins analysed were always found within the mitochondria, but in most cases it was found to be strictly associated the

kinetoplast (Engman et al., 1989; Effron et al., 1993; Klein et al., 1995a; Klein et al., 1995b). A single report points to a more widespread localization for this protein within the single *Leishmania* mitochondria (Searle et al., 1993). Hoping to resolve this discrepancy, and in the light of our results showing the existence of two distinct mitochondria proteins in *Leishmania* we set out to confirm the subcellular localization of the *Leishmania* mtHSP70 proteins using distinct *Leishmania* species and two different approaches. First, an indirect immunofluorescence assay was carried out with *L. chagasi* promastigotes using the anti-FP2 purified antibodies. The mtHSP70s were localized throughout the mitochondria with no evidence of a defined localization within this organelle (Figure 5A). We then did an immunogold labelling assay using the anti-Lc2.2 antibodies with the electron microscope and again the protein is clearly detected within the mitochondria but little or no labelling near the kinetoplast is seen (Figure 5B).

DISCUSSION

The unexpected isolation of two distinct cDNA fragments coding for mitochondrial HSP70s in *L. chagasi* reported in this work, in an approach originally proposed to identify immunologically relevant antigens conserved between different *Leishmania* species, led to the unraveling of a distinct aspect of mtHSP70 proteins in *Leishmania* species with possible implications in the metabolism of their mitochondria. mtHSP70 homologues in trypanosomatids were originally described from *L. major* (mp70.1 – Searle et al., 1993), *T. cruzi* (mtp70 – Engman et al., 1989) and *Crithidia fasciculata* (MCP72 – Effron et al., 1993). The possible existence of two distinct mtHSP70 homologues had been suggested by Searle et al. (1993), based upon the differential cytolocalization of the 2 mitochondrial HSP70s described from trypanosomatid parasites. Whereas mp70.1 was found all over the mitochondrion, mtp70 was restricted to the region of the kinetoplast and associated with the kDNA. Later it seemed that a kinetoplast localization was typical for all trypanosomatids (Klein et al., 1995a; Klein et al., 1995b) but our results clearly show the opposite, although at this stage it is not possible to define the reasons for this discrepancy in results from different groups, since the two distinct mtHSP70 homologues are too similar to be easily discriminated by polyclonal serum.

Two distinct features of the *Leishmania* mtHSP70 homologues deserve specific mention. First is the inducibility of the lower molecular weight protein (Lc2.1) after heat-shock and in amastigotes. This has been suggested before when the induction of a smaller

molecular weight protein, recognized by an antibody specific to the *Leishmania major* mtHSP70 homologue, was reported in cells heat-shocked for 2 hours (Searle et al., 1993). The other has to do with their sequence distinctions. The unique glutamine-rich C-terminus of Lc2.2 and related proteins from other trypanosomatids, which include the *Trypanosoma* (which lack Lc2.1 like proteins) and *Crithidia* homologues, was noticed early on and suggested as having a possible role in protein multimerization (Effron et al., 1993). Indeed poly-glutamine tracts have been found to be associated with protein-protein multimerization and aggregation which in some cases are associated with the onset of neurodegenerative human diseases (Perutz et al., 1994; Stott et al., 1995). The C-terminal end of the cytoplasmic HSP70 has been found to be a major site for protein-protein interaction and the I/VEEVD peptide at its end is strictly conserved in proteins as distantly phylogenetically as the human and *Leishmania* homologues. Multiple binding partners specifically recognize this site which is also conserved in HSP90-related proteins (Scheufler et al., 2000). The distinct C-terminal end of bacterial DnaK, eukaryotic mtHSP70s and the glutamine-rich trypanosomatid proteins related to Lc2.2 clearly should have functional implications which remain to be identified. A yet distinct C-terminal end for the *Leishmania* Lc2.1 proteins adds a further degree of variation for these unique proteins as will be discussed below.

Three different mtHSP70 homologues have been described in yeast (Craig and Marszalek, 2002). Despite the 52% amino acid identity between the predominant mtHSP70 from yeast (Ssc1) and the more divergent homologue (Ssq1 – Schilke et al., 1996) they still share some conserved residues (for example the IETLGG residues aas 421-426; V449; I 456) which have diverged in the *Leishmania* Lc2.1 protein. In fact we have not been able to detect the unique amino acid substitutions of the substrate binding domain of Lc2.1 in any other HSP70 related proteins, mitochondrial or cytoplasmic. Previous reports with multiple alignments including a great number of HSP70s from different organisms and divergent functions highlight the conservation of some of the residues modified in the *Leishmania* protein (Karlin and Brocchieri, 1998), such as the universally conserved E/D422.

Mitochondrial HSP70 proteins perform an essential function in protein import to the mitochondrial as part of the TIM complex, where its ATPase activity provides the driving force for the transport of unfolded polypeptides through the two mitochondrial membranes (Rassow et al., 1999). They also participate in the folding of those proteins which are synthesized by the mitochondrial translation apparatus as well as protect the mitochondrial proteins against stress. Our results highlight a strong selective pressure in trypanosomatids for the evolution of the mitochondrial HSP70s, in relation to their cytoplasmic counterparts which

are more conserved in comparison to other eukaryotes. This is even more exacerbated in the *Leishmania* proteins which culminated with the evolution of a novel protein with strikingly distinct substrate binding domain and C-terminus. It will be very interesting to unravel what are the biological reasons behind this evolutionary drive.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the program PAPES/FIOCRUZ, FACEPE and CNPq. We would like to thank Dr. O. A. Silva from the Depto. of Parasitology, CPqAM/FIOCRUZ for tips for purification of the protein fraction and Dr. P. P. de Andrade, for the *L. chagasi* cDNA expression library.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Identification of two distinct mtHSP70 homologues in *L. chagasi*. (A) Western-blot of total *L. braziliensis* protein extract incubated with the serum used in the immunoscreening (Lb). As control the pre-immune serum (Pi) was used in a similar blot. (B) Same as A but using total protein extract from *L. chagasi* and different dilutions of the serum. (C) Final consensus full-length protein sequences for Lc2.1 and Lc2.2 derived from sequencing the original Lc2.1 and Lc2.2 clones and including the sequences from the RT-PCR fragments. The boxed sequence highlights the polyglutamine tract at the C-terminus of Lc2.2.

Figure 2: Organization and evolutionary relationship of the *L. infantum* *mtHSP70* genes. (A) Schematic representation of the genomic organization of the *mtHSP* gene cluster in chromosome 30 from *L. infantum* and *L. major*. The four *L. infantum* and five *L. major* *mtHSP70* homologues are shown as well as neighbouring gene sequences. The duplication event in *L. major* as well as the change in gene order between the two species is highlighted. (B) Evolutionary relationship of selected mtHSP70 and HSP70 proteins from various eukaryotic organisms and *E. coli* DnaK. Neighbour-Joining tree based on the alignment of the various protein sequences. Bootstrap values are shown next to the respective branches (10,000 replicates). GenBank accessions for proteins not described in Tables I and II: *Crithidia fasciculata* mtHSP70 (Cf) – M95682; *Escherichia coli* (Ec) DnaK – NP 285706.

Figure 3: Sequence comparison of the substrate binding (SBD) and α -helical domains from mtHSP70 and HSP70 homologues from selected eukaryotic organisms. Clustal W alignment comparing the sequence of the 18 kDa substrate binding domain of mtHSP70 and HSP70 homologues from organisms representing different groups of eukaryotes and also *E. coli* DnaK. Aminoacids identical in more than 60% of the sequences are highlighted in dark gray, while aminoacids defined as similar, based on the BLOSUM 62 Matrix, on more than 60% of the sequences, are shown in pale gray. When necessary, spaces were inserted within the various sequences (dashes) to allow better alignment. (The aminoacids marked with \Downarrow were mentioned in Zhu et al. [1996] as being involved in the substrate binding interaction, whilst those marked with \downarrow were from Stevens et al. [2003]).

Figure 4: Expression analysis of the mtHSP70 homologues in different species of trypanosomatids and during different life stages of *L. amazonensis*. (A) Total protein extracts from *E. coli* XL1-Blue expressing the Lc2.1 and Lc2.2 recombinant proteins were ran on 15% denaturing polyacrilamide gels with the affinity purified his-tagged FP2 fragment and the recombinant his-tagged version of the full length cytoplasmic HSP70 from *L. chagasi*. Extracts from the non-transformed *E. coli* strain were also used as control. (B) Western-blot of the same samples shown in A using the antibodies purified anti-FP2 protein directed against both *Leishmania* mtHSP70s showing the specific recognition, with equal intensities, of the various mtHSP70 fragments. (C) Expression analysis of mtHSP70s in total protein extracts derived from cultures of *L. major*, *L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. braziliensis*, *T. cruzi* and *T. brucei* (log phase, insect form). Extracts from about 5×10^5 cells were loaded in each lane. (D) Expression analysis of the mtHSP70 homologues during different stages of the growth curve of *L. amazonensis*. Cultures were started at a concentration of $\sim 3 \times 10^5$ cells/ml and maintained at 26°C up to 10 days when the cells started dying. Heat-shocked cells were obtained as described in the text and aliquots were taken afters 6 hours and at daily intervals up to 3 days when the cells died. The rounded amastigote-like cells were obtained as described in Cysne-Finkelstein et al., 1998. Equal loads of 10^6 cells were ran on 10% SDS-PAGE gels prior to western-blotting.

Figure 5: Subcellular localization of mtHSP70s in *L. chagasi* and *L. braziliensis* promastigotes. (A) Indirect immunofluorescence of exponentially grown *L. chagasi* promastigotes. To confirm the localization of the nuclei and kinetoplast samples were incubated with TOTO3 which has affinity for DNA. Similar results were obtained with *L.*

braziliensis promastigotes (data not shown). **(B)** Immunogold labelling of *L. chagasi* (top panels) and *L. braziliensis* (bottom panels) promastigotes with the same antibody as in A. The arrows highlight the external mitochondrial membrane. K stands for kinetoplast. Little or no labelling was seen associated with the kinetoplast DNA.

Table I – Summary of the main characteristics of the *Leishmania* mtHSP70 homologues.

<i>L. infantum</i> proteins	GeneDb accession	Size (no. of Aas)	MW (kDa)	<i>L. major</i> orthologue(s)	GenBank (GeneDb) accessions for <i>L. major</i> proteins	% Identity (similarity) to <i>L. major</i> orthologue
<i>LimtHSP70.1</i> (Lc2.1)	LinJ30.2810	635	68.8	<i>LmmtHSP70.1</i> (Lc2.1)	CAJ06531 (LmjF30.2460)	94 (97)
<i>LimtHSP70.2</i> (Lc2.2)	LinJ30.2820	660	71.6	<i>LmmtHSP70.2</i> <i>LmmtHSP70.3</i> (Lc2.2)	CAJ06535 (LmjF30.2470) CAJ06535 (LmjF30.2480)	99 (99)
<i>LimtHSP70.3</i> (Lc2.2)	LinJ30.2870	661	71.7	<i>LmmtHSP70.5</i> (Lc2.2)	CAJ06551 (LmjF30.2550)	99 (99)
<i>LimtHSP70.4</i> (Lc2.2)	LinJ30.2880	660	71.6	<i>LmmtHSP70.4</i> (Lc2.2)	CAJ06539 (LmjF30.2490)	99 (100)
<i>LiHSP70</i>	LinJ28.2920	654	71.2	<i>LmHSP70</i>	CAJ05735 (LmjF28.2770) CAJ05736 (LmjF28.2780)	97 (98)

Table II – Pairwise sequence comparison between *L. infantum* mtHSP70/HSP70 proteins and their nearest homologues identified in selected organisms.

<i>L. infantum</i> Proteins	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>H. sapiens</i>
Lc2.1	82 (90)	80 (90)	55 (73)	57 (77)	56 (75)
Lc2.2	89 (95)	86 (93)	57 (74)	61 (79)	59 (77)
<i>LiHSP70</i>	88 (93)	83 (90)	70 (83)	71 (82)	72 (84)

Values are shown as % identity (% similarity). GeneDb accession for *L. infantum* HSP 70 – LinJ28.2920. Relevant GenBank accessions not included in Table I for mtHSP70 homologues (equivalent GenBank accessions, when available, in parenthesis): *Trypanosoma brucei* – AAX80773 (Tb927.6.3740); *T. cruzi* – EAN84370 (Tc00.1047053507029.30); *Saccharomyces cerevisiae* – NP_012579; *Arabidopsis thaliana* – CAB80456; *Homo sapiens* – EAW62129. Accessions for cytoplasmic HSP70 homologues: *T. brucei* – XP_829198 (Tb11.01.3110); *T. cruzi* – XP_817738 (Tc00.1047053511211.170); *S. cerevisiae* – CAA81523; *A. thaliana* – NP_173055; *H. sapiens* – NP_005336.

Figure 1 – Campos et al., 2006

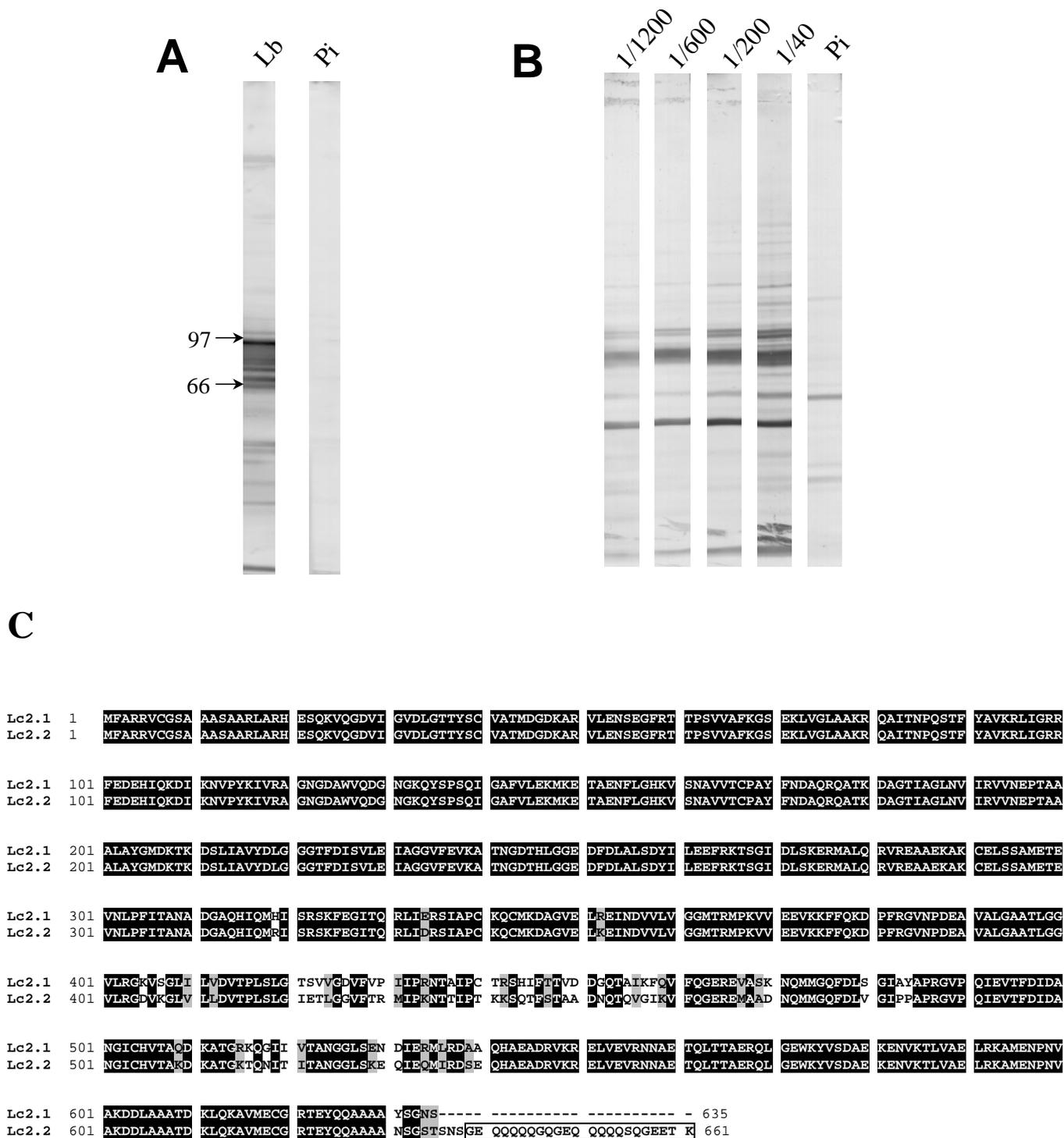


Figure 2 – Campos et al., 2006

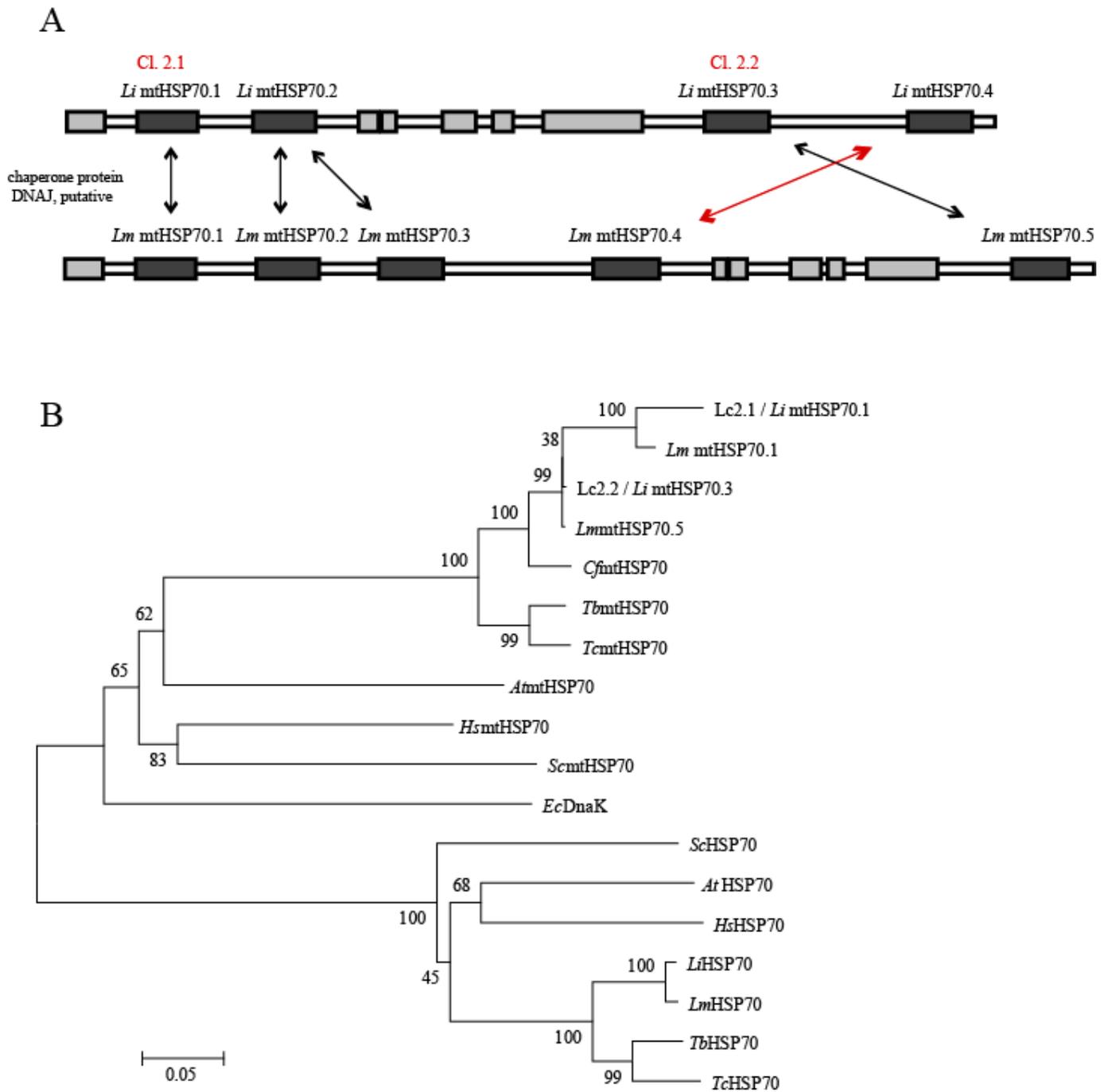


Figure 4 – Campos et al., 2006

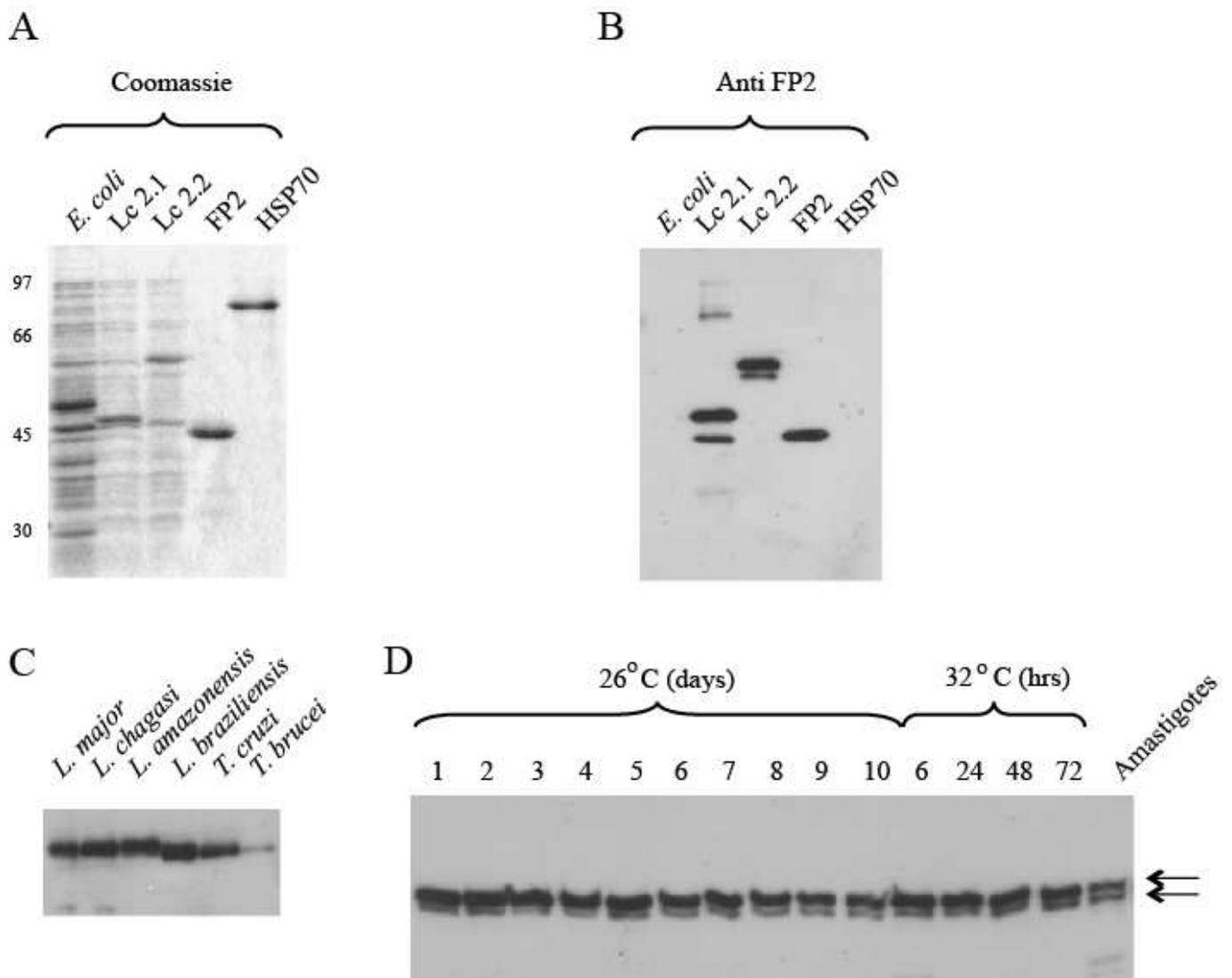
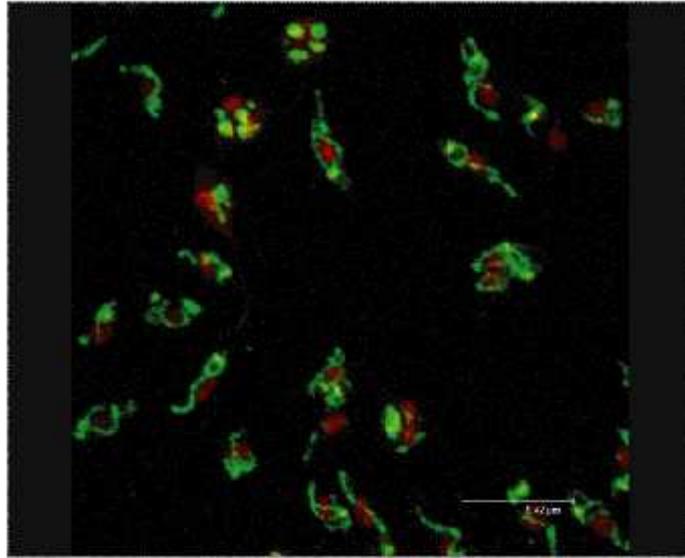
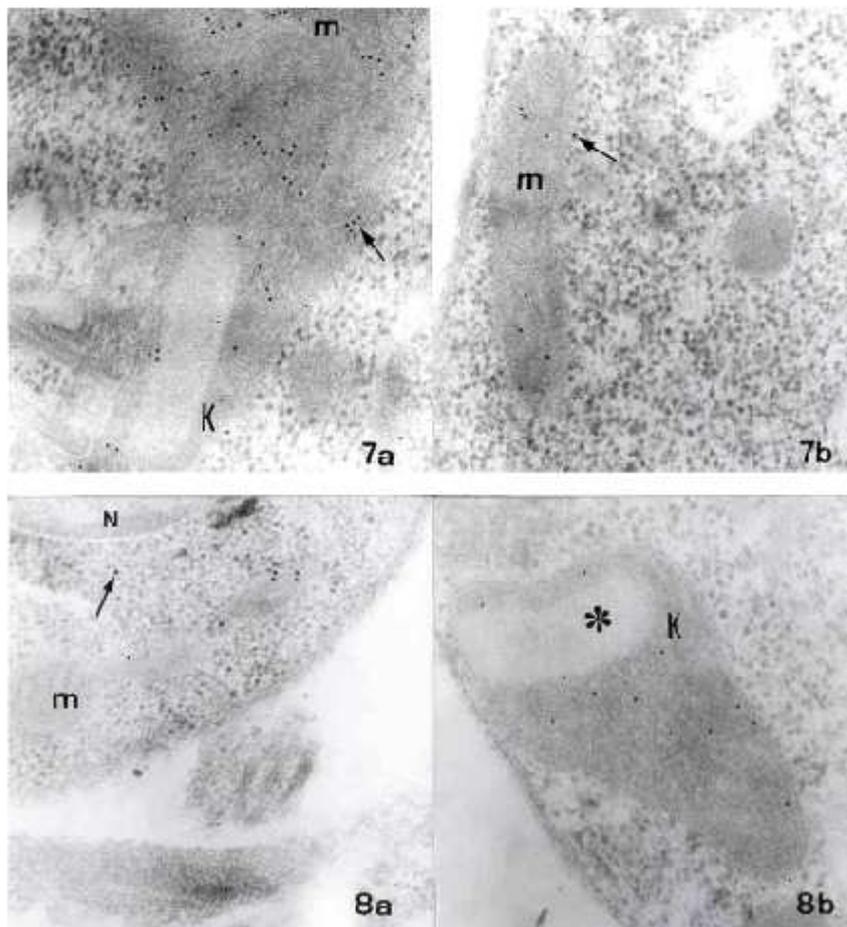


Figure 5 – Campos et al., 2006

A



B



REFERENCE LIST

- Antunes,C.M., Mayrink,W., Magalhaes,P.A., Costa,C.A., Melo,M.N., Dias,M., Michalick,M.S., Williams,P., Lima,A.O., Vieira,J.B., and . (1986). Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Epidemiol.* *15*, 572-580.
- Berman,J.D. (1997). Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* *24*, 684-703.
- Bukau,B., Weissman,J., and Horwich,A. (2006). Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* *125*, 443-451.
- Correia,D., Macedo,V.O., Carvalho,E.M., Barral,A., Magalhaes,A.V., de Abreu,M.V., Orge,M.L., and Marsden,P. (1996). [Comparative study of meglumine antimoniate, pentamidine isethionate and aminosidine sulfate in the treatment of primary skin lesions caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* *29*, 447-453.
- Craig,E.A. and Marszalek,J. (2002). A specialized mitochondrial molecular chaperone system: a role in formation of Fe/S centers. *Cell Mol. Life Sci.* *59*, 1658-1665.
- Cysne-Finkelstein,L., Temporal,R.M., Alves,F.A., and Leon,L.L. (1998). *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp. Parasitol.* *89*, 58-62.
- de Andrade,C.R., Kirchhoff,L.V., Donelson,J.E., and Otsu,K. (1992). Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from visceral leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. *J. Clin. Microbiol.* *30*, 330-335.
- Effron,P.N., Torri,A.F., Engman,D.M., Donelson,J.E., and Englund,P.T. (1993). A mitochondrial heat shock protein from *Crithidia fasciculata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *59*, 191-200.
- El-Sayed,N.M., Myler,P.J., Blandin,G., Berriman,M., Crabtree,J., Aggarwal,G., Caler,E., Renauld,H., Worthey,E.A., Hertz-Fowler,C., Ghedin,E., Peacock,C., Bartholomeu,D.C., Haas,B.J., Tran,A.N., Wortman,J.R., Alsmark,U.C., Angiuoli,S., Anupama,A., Badger,J., Bringaud,F., Cadag,E., Carlton,J.M., Cerqueira,G.C., Creasy,T., Delcher,A.L., Djikeng,A., Embley,T.M., Hauser,C., Ivens,A.C., Kummerfeld,S.K., Pereira-Leal,J.B., Nilsson,D., Peterson,J., Salzberg,S.L., Shallom,J., Silva,J.C., Sundaram,J., Westenberger,S., White,O., Melville,S.E., Donelson,J.E., Andersson,B., Stuart,K.D., and Hall,N. (2005). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* *309*, 404-409.
- Engman,D.M., Kirchhoff,L.V., and Donelson,J.E. (1989). Molecular cloning of mtp70, a mitochondrial member of the hsp70 family. *Mol. Cell Biol.* *9*, 5163-5168.
- Frommel,D., Ogunkolade,B.W., Vouldoukis,I., and Monjour,L. (1988). Vaccine-induced immunity against cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Infect. Immun.* *56*, 843-848.
- Karlin,S. and Brocchieri,L. (1998). Heat shock protein 70 family: multiple sequence comparisons, function, and evolution. *J. Mol. Evol.* *47*, 565-577.

Klein,K.G., Olson,C.L., Donelson,J.E., and Engman,D.M. (1995a). Molecular comparison of the mitochondrial and cytoplasmic hsp70 of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 42, 473-476.

Klein,K.G., Olson,C.L., and Engman,D.M. (1995b). Mitochondrial heat shock protein 70 is distributed throughout the mitochondrion in a dyskinetoplasmic mutant of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 70, 207-209.

Marsden,P.D. (1994). Personal experience with diagnostic and therapeutic aspects of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Tres Bracos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 485-487.

Marzochi,M.C. and Marzochi,K.B. (1994). Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad. Saude Publica* 10 Suppl 2, 359-375.

Mendonca,S.C., De Luca,P.M., Mayrink,W., Restom,T.G., Conceicao-Silva,F., Da-Cruz,A.M., Bertho,A.L., da Costa,C.A., Genaro,O., Toledo,V.P., and . (1995). Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 195-201.

Monjour,L., Monjour,E., Vouldoukis,I., Ogunkolade,B.W., and Frommel,D. (1986). Protective immunity against cutaneous leishmaniasis achieved by partly purified vaccine in a volunteer. *Lancet* 1, 1490.

Monjour,L., Vouldoukis,I., Ogunkolade,B.W., Hetzel,C., Ichen,M., and Frommel,D. (1988). Vaccination and treatment trials against murine leishmaniasis with semi-purified *Leishmania* antigens. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 412-415.

Morshauer,R.C., Hu,W., Wang,H., Pang,Y., Flynn,G.C., and Zuiderweg,E.R. (1999). High-resolution solution structure of the 18 kDa substrate-binding domain of the mammalian chaperone protein Hsc70. *J. Mol. Biol.* 289, 1387-1403.

Perutz,M.F., Johnson,T., Suzuki,M., and Finch,J.T. (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 5355-5358.

Rassow,J., Dekker,P.J., van,W.S., Meijer,M., and Soll,J. (1999). The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *J. Mol. Biol.* 286, 105-120.

Russo,D.M., Armitage,R.J., Barral-Netto,M., Barral,A., Grabstein,K.H., and Reed,S.G. (1993). Antigen-reactive gamma delta T cells in human leishmaniasis. *J. Immunol.* 151, 3712-3718.

Scheufler,C., Brinker,A., Bourenkov,G., Pegoraro,S., Moroder,L., Bartunik,H., Hartl,F.U., and Moarefi,I. (2000). Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell* 101, 199-210.

Schilke,B., Forster,J., Davis,J., James,P., Walter,W., Laloraya,S., Johnson,J., Miao,B., and Craig,E. (1996). The cold sensitivity of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* lacking a mitochondrial heat shock protein 70 is suppressed by loss of mitochondrial DNA. *J. Cell Biol.* 134, 603-613.

Searle,S., McCrossan,M.V., and Smith,D.F. (1993). Expression of a mitochondrial stress protein in the protozoan parasite *Leishmania major*. *J. Cell Sci.* *104* (Pt 4), 1091-1100.

Skeiky,Y.A., Benson,D.R., Guderian,J.A., Whittle,J.A., Bacelar,O., Carvalho,E.M., and Reed,S.G. (1995). Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infect. Immun.* *63*, 4105-4114.

Stevens,S.Y., Cai,S., Pellicchia,M., and Zuiderweg,E.R. (2003). The solution structure of the bacterial HSP70 chaperone protein domain DnaK(393-507) in complex with the peptide NRLLLTG. *Protein Sci.* *12*, 2588-2596.

Stott,K., Blackburn,J.M., Butler,P.J., and Perutz,M. (1995). Incorporation of glutamine repeats makes protein oligomerize: implications for neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 6509-6513.

Wu,Y. and Sha,B. (2006). Crystal structure of yeast mitochondrial outer membrane translocon member Tom70p. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 589-593.

Zhu,X., Zhao,X., Burkholder,W.F., Gragerov,A., Ogata,C.M., Gottesman,M.E., and Hendrickson,W.A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science* *272*, 1606-1614.

12 ANEXOS

ANEXO A – Normas para publicação na revista *Molecular and Biochemical Parasitology*

MOLECULAR AND BIOCHEMICAL PARASITOLOGY

Guide for Authors

Submission of a paper to *Molecular and Biochemical Parasitology*, including a revised version, implies the transfer of copyright from the author(s) to the publisher and therefore that the corresponding author has obtained the approval of all other authors to the text and that it does not contain information previously published (except as a meeting abstract or by submission of sequence data to an electronic database) and is not under consideration for publication elsewhere. Publication in *Molecular and Biochemical Parasitology* is taken to imply the authors' willingness to comply with reasonable requests to supply reagents such as recombinant clones and monoclonal antibodies, and sequence data in electronic form to persons lacking access to computer databases.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a "Journal Publishing Agreement" (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding authors confirming receipt of the manuscript together with a "Journal Publishing Agreement" form or a link to the online version of this agreement. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+44) 1865 843830, fax (+44) 1865 853333, e-mail permissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage (<http://www.elsevier.com/locate/permissions>).

Manuscripts returned for revision should be returned to the editor within 3 months. Papers accepted for publication should be as concise as possible and should be no longer than 14 printed pages. In exceptional cases the editors will consider longer papers (never exceeding 20 printed pages) if the authors of such complex papers show to the satisfaction of the editors that the limitation in length would result in subdivision of the material into several papers and hence in an increase in the total number of pages necessary for the presentation of the work.

Online Submission Submission to this journal proceeds totally online. Please use the following guidelines to prepare your article. Via the home page of this journal (<http://www.elsevier.com/locate/molbiopara>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and request for revision, takes

place by email and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

The above represents a brief outline of this form of submission. It can be advantageous to print this "guide for authors" from the site (<http://www.elsevier.com/locate/molbiopara>) for reference in the subsequent stages of article preparation.

Authors' rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/authorsrights>

Protein and Nucleic Acid Sequences.

Novel nucleotide or protein sequence data *must* be deposited in the GenBank™, EMBL or DDBJ databases and an accession number obtained *before* the paper can be accepted for publication. Submission to any one of the collaborating databanks is sufficient to ensure entry in all. The accession number should be included as a footnote on the title page of the manuscript:

Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession number(s)----'. If requested the database will withhold release of data until publication. The usual method for submitting sequence data is by World Wide Web to either GenBank™ (via BankIt: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>), EMBL (via Webln: <http://www.ebi.ac.uk/subs/allsubs.html>) or to DDBJ (via SAKURA: <http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/>). Special types of submissions such, as genomes, bulk submissions, segmented sets, and population/phylogenetic/mutation studies, can be more easily prepared with the Sequin programme (available from the above Web sites). Files generated by the Sequin programme may be sent via e-mail to GenBank™ (submissions: e-mail: gb-sub@ncbi.nlm.nih.gov; enquiries: e-mail: info@ncbi.nlm.nih.gov, EMBL (submissions: e-mail: datasubs@ebi.ac.uk; enquiries: e-mail: datalib@ebi.ac.uk) or DDBJ (submissions: e-mail: ddbjsub@ddbj.nig.ac.jp; enquiries: e-mail: sakura-admin@ddbj.nig.jp). Submitters without Web or e-mail access should write to one of the following addresses to obtain a hard copy submission form (GenBank Submissions, National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Building 38A, Room 8N-805, Bethesda, MD 20894, USA. EMBL Nucleotide Sequence Submissions, European Bioinformatics Institute, Hinxton Hall, Hinxton, Cambridge, CB10 1SD, UK. DNA Data Bank of Japan, Center for Information Biology, National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan). Authors are encouraged by the databases to update their entries as the need arises.

DNA sequences and GenBank Accession numbers

Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For *each and every* accession number cited in an article, authors should type the accession number in **bold, underlined text**. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "Note: GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead link.**

In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "Note: GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Manuscripts

Manuscripts should be in English on numbered pages with double-spaced typing throughout (including tables, legends and reference lists). They should be divided into: (1) *title page* - include a succinct title (which should not normally exceed 100 characters and should not contain any subtitles or abbreviations), the names of all authors, including a given name for each, the institutions with city, state and country where the work was performed, the name and complete address (including telephone, fax and e-mail) of the corresponding author, a list of abbreviations and a list of addresses of authors who have moved from the institutions where the work was performed. (2) *abstract* - maximum 250 words, (3) *keywords* (3-6 indexing terms), (4) *introduction*, (5) *materials and methods*, (6) *results*, (7) *discussion*, (8) *acknowledgements* (grant support and technical support to be listed here), (9) *references*, (10) *tables* and (11) *figure legends*. A recent issue of the journal should be consulted for details. In the interests of clarity and brevity, it may sometimes be advantageous to combine the results and discussion into a single section. Everyone makes minor modifications to standard methods. Do not describe standard materials and methods or modifications unless they have significant and demonstrable utility. Do not duplicate descriptions of methodology in the figure legends. Generic and species names should be typed out in full the first time mentioned - in the title, the summary and the text - and thereafter the generic name should be abbreviated. Words or letters to be printed in italics should either be in italics or underlined. The metric system should be used throughout.

Short communications These are intended for the publication of brief definitive reports,

primarily to complete DNA sequence data, methods, biochemical or immunochemical data that do not merit a full-length publication. Short communications are no more than four pages long including everything, with maximally two figures, one table and a maximum of 20 references. A single page contains about 900 words. Only the salient points of a long DNA sequence should be published, as the whole sequence will be available for a computer database. The title, authorship and affiliations will be in the standard format of the journal. The text should not be sectioned, except for references. Essential experimental details may be incorporated into a figure legend. To facilitate rapid publication, authors will be expected to supply high-quality copy and expedite any necessary revisions, although decisions will normally be yes or no, based on the quality and appropriateness of the initial submission.

Minireviews

Minireviews are by invitation only. Potential topics of general current interest should be submitted to the senior editor for consideration. Reviews should be short, current, specific and potentially provocative. They should provide a balanced synthesis from the available data rather than a comprehensive regurgitation of the literature. If possible, they should provide new concepts and ideas extending across different parasite systems. Reviews are restricted to about 4000 words, at most three display items including figures and tables and a list of references of not more than 50. The text can be divided into simple subsections with a succinct abstract. Minireviews will undergo the established review process at MBP, and will be published by an accelerated schedule if accepted.

References

In the *text*, references should be numbered singly in square brackets in order of their citation, e.g. [2,3,5-7]. In the *list*, references should be numbered in the order of citation in the text, *not* in alphabetical order. Unpublished data, personal communications and papers in preparation or 'submitted' should not be listed in the references (but may be incorporated at the appropriate place in the text); work 'in press' may be listed only if it has been accepted for publication. Personal communications must be accompanied by a letter from the named person(s) giving permission to quote such information. Abstracts (whether published or not), theses and similar material are not to be quoted in the list. If necessary, they can be referred to in the text in parentheses. Periodicals [1], books [2] and edited books [3] should accord with the following examples:

[1] Furuya T, Zhong L, Meyer-Fernandes JR, Lu H, Moreno SNJ, Docampo R. Ecto-protein tyrosine phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages. *Mol Biochem Parasitol* 1988;92:339-48.

[2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

[3] Borst P, Bitter W, Blundell PA, et al. The expression sites for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. In: Hide G, Mottram JC, Coombs GH, Holmes PH, editors. *Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Biology and Control*. Oxford: CAB International, 1997;7:109-31.

Abbreviations of journal titles should conform to those adopted by the *List of Serial Title Word abbreviations*, ISDS International Centre, 20, rue Bachaumont, 75002 Paris, France (ISBN 2-904938-02-8).

Tables

Each table should be typed double-spaced on a separate page and have a short descriptive title. A legend may be placed under table. Footnotes should be identified in the table by ^a, ^b, ^c, etc.

Figures

Figures must be in a form and condition suitable for high quality reproduction. Lettering should be clear and of adequate size to be legible after reduction. Consider the printed page and column proportions when preparing figures. If figures are not to be reduced their format should not exceed 16 x 20 cm. Multiple panels of a single figure must be mounted together. Each DNA sequence figure must fit on a single sheet of paper. Place numbering at one end of each line, not on separate lines, and avoid excessive line spacing. Consider placing nucleotide and protein data in separate panels, using single-letter amino acid abbreviations for the protein sequence and grouping nucleotides either continuously or in blocks of ten separated by one space (90 to 120 nt per line). Over 10 000 bp can legibly fit on each journal page in this format (see, e.g., *Mol. Biochem. Parasitol.* 95:141-146). Preferably use a *sans-serif* font. Upper case is standard, except that introns or other features can be usefully distinguished by lower case. Provide sharp laser-printer or imagesetter copy. Nucleotide sequences of long coding regions, where the amino acid sequence is the primary feature, and long DNA sequences, may, at the editor's discretion, be omitted from the printed paper. They can be obtained from electronic databases or from the authors. Half-tone illustrations may be included. They should have as much contrast as possible. A *scale* should appear on photomicrographs. Colour plates will be published free of charge if colour contributes to the understanding of the information. In all other cases, the author should be prepared to pay the extra costs of 635 EUR for the first page and 318 EUR for following pages of colour. Figure legends should be typed double spaced at the end of the text, not on the figures. Figures should be checked extremely carefully, particularly after revisions. *No changes to figures will be possible after acceptance of the manuscript.*

Detailed instructions

Abbreviations, symbols, chemical and biochemical nomenclature, etc., should follow the recommendations given in the *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 272, pp. 28165-28170; <http://www.jbc.org>). Avoid abbreviations which are not in common use across the field of molecular and biochemical parasitology. Those used should be defined in the text on first usage and listed as a footnote on the title page. Do not introduce abbreviations unless they are used at least 4 times.

Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania* should follow the guidelines proposed by Clayton et al (1998), *Mol Biochem Parasitol* 1998;97:221-224 (<http://www.elsevier.nl/cas/tree/store/molbio/free/1998/97/1-2/3178.pdf>).

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles please visit this journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/molbiopara>. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up email alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as copyright information, frequently asked questions and more.

For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Proofreading

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author. (If we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or send by post. Proofs should be read carefully and returned within 2 days of receipt. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Language Polishing

For authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information, please refer to our terms and conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting/ "Public Access Policy"

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://publicaccess.nih.gov/>) by submitting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, immediately after formal publication. Please e-mail us at NIHauthorrequest@elsevier.com that your work has received NIH funding (with the NIH grant/project number(s), as well as the name and e-mail address of the Principal Investigator(s)) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for public access posting 12 months after the final publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited (although Elsevier will not request that manuscripts authored and posted by US government employees should be taken down from PubMed Central). Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society

publishing partners.

Editors

C.E. Clayton Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 282, D-69120 Heidelberg, Germany Tel: +49 6221 546876 Fax: +49 6221 545894; E-mail: cclayton@zmbh.uni-heidelberg.de

A.P. Waters Department of Parasitology, L4-Q, Leiden University Medical Center, Albinusdreef 2, 2333 ZA Leiden, The Netherlands. Tel.: +31 71 5265069; Fax +31 71 52668907; E-mail: a.p.waters@lumc.nl

P.T. LoVerde, Southwest Foundation for Biomedical Research, PO BOX 760549, USA; E-mail: ploverde@sfbr.org

B. Ullman Department of Biochemistry, Oregon Health Science University, 3181 SW Sam Jackson Park Road, Portland OR 97201, USA Tel: +1 503 494 8437 Fax: +1 503 494 8393 E-mail: ullmanb@ohsu.edu

Reviews Editor

Alister Craig, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK. Tel: +44 151 705 3161; Fax: +44 151 705 3371; E-mail: agcraig@liverpool.ac.uk

Sponsored Articles:

Molecular and Biochemical Parasitology offers authors or their institutions the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please click [here](#).

Copyright © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

ANEXO B – Plasmídio pTZ18R. Esquema de sua forma circular e a seqüência linear da região dos sítios de clonagem

