

I. RESUMO

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE SEGMENTOS CONSERVADOS DA GLICOPROTEÍNA GP63 DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* E DOS SEUS EFEITOS SOBRE MACRÓFAGOS

Introdução: A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal causa da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil. Na Bahia a *L. (V.) braziliensis* causa as três formas clínicas de leishmaniose: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD). Corte de Pedra (CP) na Bahia é uma área endêmica para a LTA. A leishmanolisina, ou GP63, é uma importante protease da superfície da leishmania capaz de hidrolisar uma grande variedade de substratos tanto no parasita quanto no hospedeiro. Seus produtos estão envolvidos na adesão e internalização desses parasitas nos macrófagos do hospedeiro e tem sido relacionado com a resistência do parasita à lise pelo sistema complemento e o aumento da virulência da *L. (V.) braziliensis*. **Objetivo:** Avaliar os efeitos de segmentos conservados da GP63 na interação de *Leishmania (V.) braziliensis* com macrófagos hospedeiros e sua imunogenicidade. **Métodos:** Quarenta e cinco alelos de gp63 foram identificados na área endêmica para LTA de Corte de Pedra, Bahia. Foram encontrados os segmentos SRYD, PAVGNIPA, HEVAH e KAREQYGC conservados da molécula GP63 que fazem interação do parasita com a célula hospedeira. Com base na sequência destes segmentos, quatro peptídeos foram sintetizados. Macrófagos de doadores saudáveis foram empregados na avaliação *in vitro* da capacidade destes peptídeos de estimular a célula hospedeira e inibir a internalização de *L. (V.) braziliensis* por estas células. Os Macrófagos foram incubados com meio, peptídeos, *Leishmania* e *Leishmania* + peptídeos, em paralelo, por 4 horas a uma razão de 2:1 (*Leishmania*:macrófagos). O percentual e o número de amastigotas por célula foi avaliado por microscopia. Foi realizado ensaio imunoenzimático (ELISA) para pesquisa de anticorpos em pacientes com LTA para os segmentos conservados e ensaios de inibição para análise de expressão gênica por RNAseq. **Resultados:** Os estímulos com os peptídeos sintéticos com macrófagos humanos mostraram que os segmentos inibiram a internalização da *Leishmania* em células hospedeiras com um $p < 0.0001$. Os ensaios com ELISA constatou presença de anticorpos contra os segmentos conservados em todas as formas clínicas. E as formas mais graves estavam mais associadas a anticorpos contra os segmentos. **Conclusão:** Segmentos conservados da GP63 são naturalmente imunogênicos em populações infectadas pela *L. (V.) braziliensis* e peptídeos sintéticos (PAVGNIPA, SRYD, HEMA, E KAREQYGC) da proteína GP63, inibem a internalização de *L. (V.) braziliensis* em MDM.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose Tegumentar Americana 2. *Leishmania Viannia braziliensis* 3. GP63 4. protease.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE PROTEASE GP63 POLYMORPHISM IN A POPULATION OF *Leishmania Viannia braziliensis* causing AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS

Introduction: *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main cause of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in Brazil. In Bahia *L. (V.) braziliensis* causes the three clinical forms of leishmaniasis: cutaneous leishmaniasis (LC), mucosal leishmaniasis (LM) and disseminated leishmaniasis (LD). Corte de Pedra (CP) in Bahia is an area endemic to the LTA. Leishmanolysin, or GP63, is an important leishmania surface protease capable of hydrolyzing a wide variety of substrates both in the parasite and in the host. Its products are involved in the adhesion and internalization of these parasites in the host macrophages and have been related to the resistance of the parasite to the lysis by the complement system and the increase of the virulence of *L. (V.) braziliensis*. Goal. To evaluate the effects of conserved GP63 segments on the interaction of *Leishmania (V.) braziliensis* with host macrophages and their immunogenicity. **Methods:** Forty-five alleles of gp63 were identified in the endemic area for LTA of Corte de Pedra, Bahia. The conserved SRYD, PAVGNIPA, HEVAH and KAREQYGC segments of the GP63 molecule have been found to interact with the host cell. Based on the sequence of these segments, four peptides were synthesized. Macrophages from healthy donors were used in the in vitro evaluation of the ability of these peptides to stimulate the host cell and to inhibit the internalization of *L. (V.) braziliensis* by these cells. Macrophages were incubated with medium, peptides, Leishmania and Leishmania + peptides in parallel for 4 hours at a ratio of 2: 1 (Leishmania: macrophages). The percentage and number of amastigotes per cell was evaluated by microscopy. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to investigate antibodies in LTA patients for the conserved segments and inhibition assays for analysis of gene expression by RNAseq. **Results:** Stimulations with synthetic peptides with human macrophages showed that the segments inhibited the internalization of Leishmania in host cells with a $p < 0.0001$. The ELISA assays showed presence of antibodies against the conserved segments in all clinical forms. And the more severe forms were more associated with antibodies against the segments. **Conclusion:** Preserved segments of GP63 are naturally immunogenic in populations infected with *L. (V.) braziliensis* and synthetic peptides (PAVGNIPA, SRYD, HEMAH, and KAREQYGC) of GP63 protein, inhibit the internalization of *L. (V.) braziliensis* in MDM.

Keywords: 1. American Cutaneous Leishmaniasis; 2. *Leishmania Viannia braziliensis*; 3. GP63; 4. Protease.

Principais resultados

Tabela 01. Características e diversidades química dos peptídeos sintéticos derivados de segmentos conservados da glicoproteína GP63.

SEQUÊNCIA	FÓRMULA	PESO MOLECULAR	CONDIÇÃO DE DISSOLUÇÃO	HIDROFOBICIDADE (%)
SRYD	C ₂₂ H ₃₃ N ₇ O ₉	0,539kDa	100% H ₂ O	75% Hidrofílico
HEVAH	C ₂₅ H ₃₇ N ₉ O ₈	0,591kDa	100% H ₂ O	60% Hidrofílico
PAVGVNIPA	C ₃₈ H ₆₄ N ₁₀ O ₁₁	0,836kDa	100% H ₂ O	75% Hidrofóbico
KAREQYGC	C ₃₉ H ₆₃ N ₁₃ O ₁₃ S ₁	0,954kDa	100% H ₂ O	50% Hidrofílico
PAVGNIPASRYDHEVA HKAREQYGC (CONCATAMERO)	C ₁₁₉ H ₁₈₂ N ₃₈ O ₃₇ S ₁	2,769kDa	100% H ₂ O	44% Hidrofóbico/ 44% Hidrofílico

Tabela 02. ELISA utilizando o soro dos pacientes com LTA para análise de reatividade no reconhecimento dos peptídeos por anticorpos dos pacientes. Os dados foram apresentados através da média da absorbância do controle negativo, valor mínimo e máximo de absorbância. O ponto de corte (*cut-off*) foi estabelecido através da média de absorbância de três pacientes negativos mais 3 desvio padrão. A reatividade foi atribuída aos pacientes que apresentaram valores de absorbância superior ao ponto de corte.

PEPTÍDEO	Média Controle negativo	<i>Cut-off</i>	Reatividade LC (%)	Abs MINIMA/MAXIMA LC	Reatividade LD (%)	Abs MINIMA/MAXIMA LD	Reatividade LM (%)	Abs MINIMA/MAXIMA LM
SRYD	0,034	0,0448	50	0,045/0,150	50	0,045/0,225	50	0,052/0,520
CONCAT	0,034	0,0448	30	0,047/0,116	40	0,051/0,187	60	0,047/0,511
HEVAH	0,043	0,059	20	0,061/0,128	40	0,075/0,243	50	0,068/0,517
PAVGNIPA	0,043	0,059	20	0,084/0,143	60	0,061/0,230	50	0,070/0,531
KAREQYGC	0,034	0,037	40	0,047/0,099	50	0,040/0,217	60	0,041/0,549

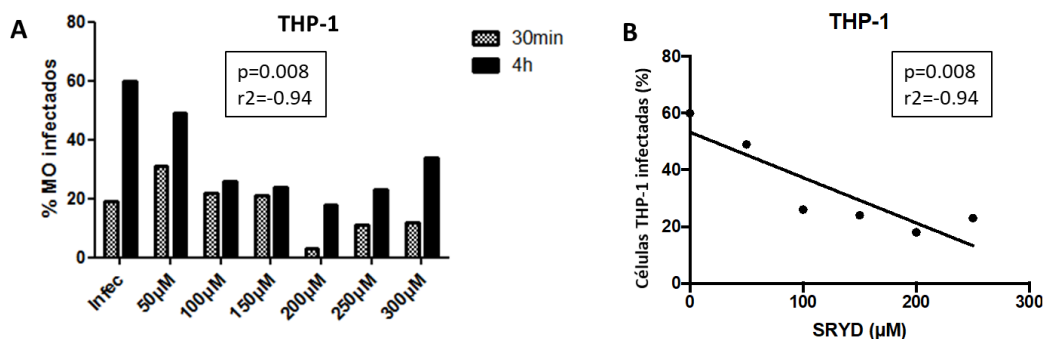


Figura 05: Percentagem de infecções / inibições da internalização da *Leishmania (Viannia) braziliensis* por macrófagos derivados da linhagem celular THP1. Nos ensaios de inibições/infecções utilizamos a proporção do parasito 2:1 e concentrações variadas do peptídeo SRYD. A) Ensaios de inibição por 30 minutos e 4 horas com concentrações que variaram de 50µM à 300µM. B) Ensaio de inibição/infecção por 4 horas com concentrações que variaram de 100µM a 300µM. Os valores de p foram obtidos através do teste estatístico regressão linear $p < 0.05$.

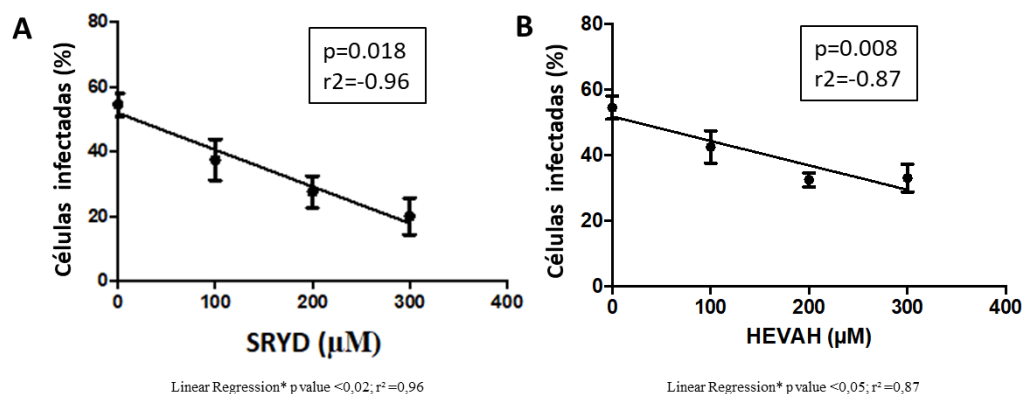


Figura 06. Percentual de infecções / inibições da internalização da *Leishmania (Viannia) braziliensis* por macrófagos humanos com os peptídeos SRYD (A) e HEVAH (B). Nos ensaios de inibições/infecções utilizamos a proporção do parasito 2:1 e concentrações variadas do peptídeo SRYD e HEVAH. A) Ensaios de inibição com o peptídeo SRYD por 4 horas com concentrações que variaram de 100μM á 300μM. B) Ensaio de inibição com o peptídeo HEVAH por 4 horas com concentrações que variaram de 100μM a 300μM. Os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico regressão linear $p < 0.05$.

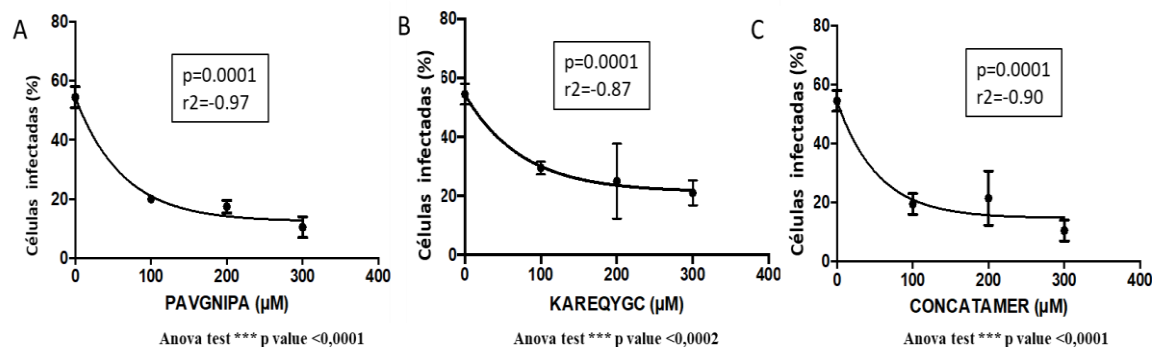


Figura 07- Análise por regressão não linear evidenciando uma diminuição da infecção em MDM após ensaios de inibição com os peptídeos PAVGNIPA (A), KAREQYGC (B) e o CONCATAMERO (C). Nos ensaios de inibições/infecções utilizamos a proporção do parasito 2:1 e concentrações variadas do peptídeo PAVGNIPA, KAREQYGC e CONCATAMERO. A) Ensaios de inibição com o peptídeo PAVGNIPA por 4 horas com concentrações que variaram de 100μM a 300μM. B) Ensaio de inibição com o peptídeo KAREQYGC por 4 horas com concentrações que variaram de 100μM a 300μM e C) Ensaios de inibição com o CONCATAMERO por 4 horas com concentrações que variaram de 100μM á 300μM. Os valores de *p* foram obtidos através do teste estatístico regressão não linear e Anova $p < 0.05$.